

Résultats d'évaluation de la performance en analytique
pour la détection du SARS-CoV-2 dans le cadre de l'épidémie de COVID-19
comparaison avec la technique de référence du CNR IPP

Nom du Kit : test VIASURE SARS-CoV-2 Gene S de CerTest sur BD MAX™ couplé au test RIDA GENE SARS-CoV-2 Gene E de R-Biopharm

Fournisseurs : BD et R-Biopharm

Laboratoire Investigateur

Pr Bruno Lina

Laboratoire associé au Centre National de Référence des virus des infections respiratoires

Institut des Agents infectieux

Centre de Biologie et Pathologie Nord

Groupement Hospitalier Nord

103 boulevard de la Croix-Rousse

69317 Lyon CEDEX 04

FRANCE

Dr Vanessa Escuret (vanessa.escuret@chu-lyon.fr)

Tel : 04 72 07 10 35

Correspondant

BD : Vincent Francart et David Menahem

R-Biopharm : Romain Pugni

OBJECTIFS

L'objectif de l'évaluation est de tester la sensibilité analytique mentionné ci-dessus, pour la détection du SARS-CoV-2 par comparaison de la technique maison de référence utilisée au CNR de Lyon, à partir :

- de dilutions de culture de virus SARS-CoV-2 à différentes concentrations et
- d'échantillons respiratoires (pour tester l'effet de la matrice type prélèvement respiratoire sur le test) positifs ou négatifs pour le SARS-CoV-2.

MATERIELS ET METHODES

Panel d'échantillons testés

- Surnageant de culture de cellules BGM infectées par SARS-CoV-2
 - échantillon 2020/715 ; récolte après 2 passages (présence d'effet cytopathique)
 - dilutions successives afin de couvrir une large gamme de Ct et d'atteindre une limite de détection
- Echantillons respiratoires de patients de différentes nature, positifs ou négatifs pour le SARS-CoV-2

Technique de référence CNR (site de Lyon)

Extraction avec EMAG® bioMérieux selon la technique du fournisseur à partir de 200µL de prélèvement ; éluat de 50µL

Détection de deux cibles en duplex (région RdRp) : amorces et sondes (IP2, IP4) (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2)

SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Ref: Invitrogen 1732-020)

Amplifications sur QuantStudio™ 5 Applied Biosystems™ (à partir de 5µL d'éluat)

Technique évaluée : selon la notice du fournisseur

Principe du test : test Viasure SARS-CoV-2 de CerTest sur BD MAX™ (Gène S) couplé au test RIDA GENE SARS-CoV-2 de R-Biopharm (Gène E)

Le test réalise l'extraction de l'ARN viral et détecte :

- 1 cible située dans le gène S du SARS-CoV-2 ainsi qu'un contrôle interne (IC)
- 1 cible située dans le gène E du SARS-CoV-2 ainsi qu'un contrôle interne (IC2)

Mise en œuvre :

- ajout de 20 µL du contrôle interne du test R-Biopharm dans chaque tube de lyse du kit d'extraction BD MAX TNA-3
- ajout de 200 µL d'échantillon dans chaque tube de tampon de lyse, puis le tube est vortexé au moins 10 secondes

RESULTATS

Numéro échantillon	Résultat RT-PCR	Test Certest		Test R-Biopharm		Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction Emag; Amplification QS5			Type d'échantillon	Commentaires
		Ct (S)	Ct (IC)	Ct (E)	Ct (IC2)	Résultat	IP2	IP4		
10-3	A retester	37,6	23,6	-1	31,6	Positif	22,9	22,4	surageant de culture virale - dilution 10-3	aspect bizarre courbe gène S : à retester
10-3 (repassé)	Positif	30,8*	26,5	26,6	32,9	Positif	22,9	22,4	surageant de culture virale - dilution 10-3	repassé cf case ci-dessus aspect courbe gène S non satisfaisant mais OK sur gène E
10-4	Positif	30,6	22,9	29,3	30,3	Positif	27,3	26,9	surageant de culture virale - dilution 10-4	
10-5	Positif	33,8	22,9	33,7	31,5	Positif	29,7	29,4	surageant de culture virale - dilution 10-5	
10-6	Positif	-1,0	22,9	35,2	30,5	Positif	34,3	33,3	surageant de culture virale - dilution 10-6	
10-6 (bis)	Positif	-1,0	23,9	34,8	32,0	Positif	34,3	33,3	surageant de culture virale - dilution 10-6	
10-7 (1)	Positif	-1,0	23,7	34,5	30,1	Positif	37,4	36,6	surageant de culture virale - dilution 10-7 (1)	
10-7 (2)	Négatif	-1,0	24,4	-1,0	31,5	Positif	37,8	36,9	surageant de culture virale - dilution 10-7 (2)	
10-7 (3)	Négatif	-1,0	23,6	-1,0	32,0	Positif	38,0	37,8	surageant de culture virale - dilution 10-7 (3)	
10-8 (1)	Négatif	-1,0	32,2	-1,0	30,9	Négatif	NEG	NEG	surageant de culture virale - dilution 10-8 (1)	Ct du IC décalé
10-8 (2)	Négatif	-1,0	24,0	-1,0	30,1	Négatif	NEG	NEG	surageant de culture virale - dilution 10-8 (2)	
10-8 (3)	Négatif	-1,0	24,1	-1,0	32,2	Négatif	NEG	NEG	surageant de culture virale - dilution 10-8 (3)	
139-18	Positif	28,2	27,7	30,0	-1,0	Positif	24,8	24,0	écouvillon naso-pharyngé	absence du IC2 mais détection du gène E
133-17	Positif	27,1	24,5	26,9	30,3	Positif	25,6	25,4	écouvillon naso-pharyngé	
133-22	Positif	29,3	21,5	28,8	33,6	Positif	26,8	27,0	écouvillon naso-pharyngé	
136,64	Positif	31,4	22,9	30,6	31,8	Positif	28,2	28,0	aspiration trachéo-bronchique	
136-35	Positif	32,8	23,6	32,7	31,8	Positif	31,7	31,4	écouvillon naso-pharyngé	
136-44	Positif	31,4	23,6	31,4	31,7	Positif	32,7	32,5	écouvillon naso-pharyngé	
133-14	Positif	33,4	25,5	34,7	34,4	Positif	32,7	33,0	écouvillon naso-pharyngé	
136-75	Négatif	-1,0	23,9	-1,0	32,6	Positif	35,5	34,3	aspiration trachéo-bronchique	
139-51	A retester	34,5*	23,1	-1,0	33,0	Positif	36,3	37,0	écouvillon naso-pharyngé	signal gène S : fausse amplification à retester
139-51 (bis)	Négatif	-1,0	24,7	-1,0	32,9	Positif	36,3	37,0	écouvillon naso-pharyngé	
243-67	Négatif	-1,0	23,6	-1,0	32,5	Négatif	NEG	NEG	écouvillon naso-pharyngé	
237-58	Négatif	-1,0	24,0	-1,0	33,2	Négatif	NEG	NEG	écouvillon naso-pharyngé	

Abréviations : NR : Non Réalisé ; Pos Lim : Positif en limite de détection

La technique de référence du CNR détecte l'ARN viral du SARS-CoV-2 :

- pour les dilutions 10^{-3} à 10^{-6} sur les deux cibles ;
- pour les trois dilutions 10^{-7} , sur les deux cibles avec une intensité de fluorescence plus faible ;
- pour les trois dilutions 10^{-8} : aucune dilution n'a été détectée.

Pour le test VIASURE SARS-CoV-2 Gene S de CerTest sur BD MAX™ couplé au test RIDA GENE SARS-CoV-2 Gene E de R-Biopharm les contrôles internes sont détectés avec pour IC un Ct d'environ 23 et pour IC2 un Ct d'environ 31. Le contrôle interne IC est apparu cependant très décalé pour la dilution 10^{-8} (-1). Le contrôle interne IC2 n'a pas été détecté pour l'échantillon 139-18 (mais cela n'a pas gêné l'interprétation du résultat, détection du gène E).

Pour l'interprétation des tests il **est important de bien regarder l'aspect des courbes** et de **considérer chaque RTqPCR indépendamment l'une de l'autre**. En effet le IC2 (test R-Biopharm) a une intensité de fluorescence plus faible que l'autre test mais regardés indépendamment les signaux sont jolis et bien exponentiels. Il est important de regarder l'aspect des courbes.

Lorsque **l'un des deux tests est positif** avec des courbes exponentielles il faut considérer **qu'il y a bien présence de SARS-CoV-2**.

Le logiciel rend des résultats positifs alors que la courbe d'amplification est non exponentielle ou paraît peu spécifique : **il est important de retester l'échantillon** pour avérer qu'il s'agit d'un vrai positif. Ainsi, la dilution de surnageant de virus à 10^{-3} (Ct à 22/23 en IP2 IP4), testée une première fois avec un signal faible non spécifique en S et négative en E, a été détectée positive lors de la repasse avec un signal positif en E mais négatif en S.

Le test VIASURE SARS-CoV-2 Gene S de CerTest sur BD MAX™ couplé au test RIDA GENE SARS-CoV-2 Gene E de R-Biopharm a détecté la présence de SARS-CoV-2 :

- pour la dilution 10^{-3} à 10^{-5} sur les deux cibles (même si problème pour la dilution 10^{-3} mentionné plus haut) ;
- pour la dilution 10^{-6} : sur la cible E seulement ;
- pour les trois dilutions 10^{-7} , détection dans un cas sur la cible E seulement ;
- pour les trois dilutions 10^{-8} : aucune dilution n'a été détectée.

Concernant les échantillons respiratoires, on observe un décalage de 2 à 4 Ct par rapport au Ct en IP2/IP4 qui est plus important pour les échantillons fortement positifs en IP2/IP4 et pour les dilutions des surnageants de culture de virus. La présence du gène E permet d'améliorer la sensibilité de détection des surnageants de virus dilués. **La technique est en limite de détection pour des prélèvements respiratoires détectés positifs avec un Ct en IP2/IP4 à 35.**

Le test VIASURE SARS-CoV-2 Gene S de CerTest sur BD MAX™ couplé au test RIDA GENE SARS-CoV-2 Gene E de R-Biopharm présente :

- une sensibilité inférieure à celle de la technique de référence CNR IPP (testée à Lyon). La sensibilité du test est améliorée par rapport à la version ne détectant que le gène S grâce à une meilleure sensibilité sur le gène E ;
- les courbes sont parfois d'allure non exponentielle et sont rendues malgré tout positives alors qu'il paraît plus prudent de retester l'échantillon.

Le test est facile d'utilisation et dure 150 minutes pour 20 échantillons (103 minutes pour 4 échantillons).

CONCLUSIONS

Le Centre National de Référence des Virus des Infections Respiratoires considère que le kit soumis peut être utilisé pour la détection du SARS-CoV-2 dans le cadre de l'épidémie de COVID-19 que connaît actuellement la France.