

Evaluation des performances analytiques du test

COBAS® SARS-CoV-2, Roche Diagnostics

Pour la détection du SARS-CoV-2 dans le cadre de l'épidémie de COVID-19

Mars 2020

Nom du Kit : COBAS® SARS-CoV-2

- COBAS® SARS-CoV-2 : 09175431190
- COBAS® SARS-CoV-2 Control kit : 09175440190
- COBAS® 6800/8800 Buffer Negative Control Kit : 07002238190

Fournisseur : ROCHE DIAGNOSTICS

Laboratoire Investigateur :

Pr Bruno Lina

Laboratoire de Virologie
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 Emilie Frobert (emilie.frobert@chu-lyon.fr)

Dr Geneviève Billaud (genevieve.billaud@chu-lyon.fr)

Pr Florence Morfin (florence.morfin@chu-lyon.fr)

Correspondant :

Alexandre Cassou (alexandre.cassou@roche.com)

Product Specialist Molecular Diagnostic

Roche Diagnostics France

I. Objectifs

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

L'évaluation a été conduite à partir de :

- dilutions de culture de virus SARS-CoV-2 à différentes concentrations et
- échantillons respiratoires positifs ou négatifs pour le SARS-CoV-2

II. Principe de la détection :

RT-PCR en temps réel multiplex avec 2 cibles et un contrôle interne :

- le gène ORF1 (target 1)
- le gène E panSarbecovirus (target 2)

III. Matériel et méthodes

Panel d'échantillons testés :

- Surnageants de culture sur cellules BGM infectées par SARS-CoV-2
 - o Comparaison avec la technique CNR sur QS
 - o Echantillon 2020/715 : récolte après 2 passages
 - o Dilutions successives afin de couvrir une large gamme de Ct et d'atteindre une limite de détection
- Prélèvements de patients en rétrospectif :
 - o Comparaison avec la technique CNR adaptée sur Panther Fusion Hologic
 - o 15 prélèvements positifs de matrice différente
 - 5 avec un Ct = 25 à 30 dont 1 prélèvement bas et 4 prélèvements hauts
 - 5 avec un Ct = 30 à 35 dont 2 prélèvements bas et 3 prélèvements hauts
 - 5 avec un Ct > 35 dont 2 prélèvements bas et 3 prélèvements hauts
 - o 5 prélèvements négatifs dont 2 prélèvements bas et 3 prélèvements hauts sur Panther Fusion Hologic
- Essais de stabilité virale en tampon de lyse Cobas :
 - o 2 prélèvements de patients : tests à 24h et 48h, à RT et +4°C

Technique de référence du CNR (site de Lyon) :

- Extraction avec EMAG® bioMérieux selon la technique du fournisseur à partir de 200µL de prélèvement, élution dans 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 CNR adaptée sur instrument Panther Fusion Hologic Open Access:

- Mêmes amorces que technique CNR de référence

- Présence d'un CI
- Sensibilité équivalente avec technique CNR de référence sur QS
- Résultats et protocole disponibles sur demande auprès de florence.morfin@chu-lyon.fr

Mise en œuvre de la technique sur COBAS :

Prétraitement :

- 400 µl de tampon de lyse
- 200 µl de prélèvement
- En tube Abbott 5 ml bouchons vissés
- 10 min sous PSM

Analyseur : COBAS 6800

IV. Résultats

1. Surnageants de culture

dilutions	lyse	COBAS					Ct PASTEUR (manip du 18/03/20)	
		CT T1	CT T2	CT_QS	Interpretation T1	Interpretation T2	IP2	IP4
10-2	cobas	27,71	27,92	33,48	Positive	Positive	24,20	24,60
10-3	cobas	30,54	30,97	33,85	Positive	Positive	27,80	28,10
10-4	cobas	33,39	33,94	34,74	Positive	Positive	31,30	31,10
10-5	cobas	36,12	36,39	34,40	Positive	Positive	34,90	34,60
10-5	cobas	35,31	36,69	34,60	Positive	Positive	35,00	34,30
10-5	cobas	35,26	36,83	33,54	Positive	Positive	34,80	35,00
10-6	cobas	37,22	38,31	33,71	Positive	Positive	NEG	NEG
10-6	cobas	36,46	40,27	34,07	Positive	Positive	NEG	39,00
10-6	cobas			34,12	Negative	Negative	39,70	NEG
10-7	cobas			34,13	Negative	Negative	NEG	NEG
10-7	cobas			34,37	Negative	Negative	42,10	39,50
10-7	cobas			34,22	Negative	Negative	NEG	NEG
10-8	cobas			34,08	Negative	Negative	NEG	NEG
10-8	cobas			34,35	Negative	Negative	NEG	NEG
10-8	cobas			33,96	Negative	Negative	NEG	NEG

Ct positifs en COBAS jusqu'à Ct 35-36 : 100%

Décalage de 3 Ct entre COBAS et IP pour les dilutions de 10^{-2} (Ct de 27), 10^{-3} (Ct 30) et 10^{-4} (Ct 32)

A la dilution de à 10^{-6} , COBAS légèrement + sensible : 1 dilution sort en COBAS et pas en technique de référence CNR

Au-delà, détection possible mais aléatoire

Conclusion : technique COBAS sensible et donc applicable en production

2. Prélèvements de patients

N° Glims	Nature	COBAS					Panther		Diff IP4 - T1
		CT T1	CT T2	CT CI	Interpretation T1	Interpretation T2	Ct IP2	Ct IP4	
20048756101	NG	34,19	35,40	33,89	Positive	Positive	25,40	24,50	-9,69
20044122901	ATB	23,03	23,93	34,38	Positive	Positive	27,20	24,50	1,47
20048744601	NG	24,73	25,08	34,28	Positive	Positive	27,80	27,30	2,57
20048166301	ANP	26,76	26,94	34,79	Positive	Positive	28,90	29,00	2,24
20048729601	NG	26,37	26,69	35,15	Positive	Positive	30,10	29,30	2,93
20048707001	NG	29,17	29,79	38,50	Positive	Positive	32,10	32,10	2,93
20044120001	ANP	30,19	31,11	37,96	Positive	Positive	32,70	30,30	0,11
20043588902	ATB	21,17	21,32	35,23	Positive	Positive	33,00	30,20	9,03
20045789101	ATB	29,06	30,77	33,64	Positive	Positive	33,80	31,40	2,34
20048734101	NG	31,22	32,08	34,96	Positive	Positive	34,20	33,40	2,18
20046540901	LBA	31,50	33,04	33,40	Positive	Positive	35,50	34,60	3,10
20048593101	NG	32,50	34,70	36,05	Positive	Positive	36,30	38,80	6,30
20048749701	NG	32,21	34,21	35,35	Positive	Positive	37,00	37,20	4,99
20043852401	ATB	30,93	33,62	33,57	Positive	Positive	38,80	35,40	4,47
20048621901	NG	Negative	40,60	33,51	Negative	Positive	41,20	43,90	
20044834002	ATB	Negative	Negative	34,28	Negative	Negative	NEG	NEG	
20048214501	LBA	Negative	Negative	34,48	Negative	Negative	NEG	NEG	
20048755301	ANP	Negative	Negative	35,25	Negative	Negative	NEG	NEG	
20048755901	NG	Negative	Negative	34,23	Negative	Negative	NEG	NEG	
20048756201	NG	Negative	Negative	34,62	Negative	Negative	NEG	NEG	

pb prélèvement ?

Moyenne CI 34,88

Le COBAS sort avec 1 à 6 Ct plus tôt : comparatif par rapport aux résultats Panther, malgré la congélation des P0

Concordance de 100 % quel que soit le Ct

Conclusion : technique COBAS validée avec pré-traitement de 400µl de tampon COBAS + 200 µl de prélèvement

Attention aux prélèvements visqueux : pré-traitement efficace absolument nécessaire.

3. Stabilité

Sur 2 prélèvements, les Ct sont identiques à 24h à 4°C et aussi à RT.

A 48h, à 4°C les Ct sont identiques ; à RT, un prélèvement perd 3 Ct.

Conclusion :

La stabilité est donc OK jusqu'à 48h à +4°C, et au moins 24h à RT si on est conservateur.

Remarque : Incompatibilité des tampons de Lyse Panther et Cobas :

Sur 38 échantillons : 14 % d'INH alors qu'en tampon COBAS : 0 INH

CONCLUSION :

Le Laboratoire de Virologie de Lyon, Institut des Agents infectieux, 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.