

Evaluation de la performance analytique du test
VIASURE Real Time PCR Detection Kits by Certest Biotec (Orgentec)
96 well plates

30/04/2020

Nom du Kit : VIASURE Real Time PCR Detection Kit by Certest Biotec

Fournisseur : Orgentec

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)

Correspondant :

Damien GARCIN

Group Product Manager

Molecular Specialist



ORGENTEC SASU

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

La spécificité du kit par rapport à d'autres souches de coronavirus et d'autres virus n'a pas été évaluée.

II. Principe de la détection :

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

- le gène ORF1 (marquage FAM)
- Gène N (marquage ROX)
- le contrôle interne (IC) (marquage VIC (HEX, ou JOE))

Les contrôles positifs et négatifs sont fournis avec le kit.

Les réactifs sont présentés en plaque de 96 puits, sécables en barrettes de 8 tests. Le réactif permettant la RT-PCR est réhydraté au fond de chaque puits au moment de la manipulation.

Le kit est compatible avec large panel de thermocyclers (voir annexe fabricant).

La durée du run est de 90 min.

III. Matériel et méthodes

Panel d'échantillons testés :

- Surnageants de culture sur cellules BGM infectées par SARS-CoV-2 (n=15) :
 - 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
 - o Les dilutions 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} sont passées en triplicate
- Echantillons respiratoires (écouvillons naso-pharyngés) positifs (n=18) ou négatifs (n=2) pour le SARS-CoV-2 (pour tester à minima l'effet matrice et la spécificité)

Technique de référence IP 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™

Mise en œuvre :

Technique évaluée selon la notice du fournisseur

Ajout de 15 µl de tampon de réhydratation (blue vial) dans chaque puits

Ajout des extraits des échantillons: 5 µl d'ARN

Bien homogénéiser par refoulement 2 à 3 fois le mastermix et l'ADN dans chaque puits de la barrette

Centrifuger la plaque ou taper pour que tous les réactifs soient au fond des puits

IV. Résultats

Table 1 : Surnageants de culture sur cellules BGM infectées par SARS-CoV-2

Souches diluées	Pasteur			Viasure			
	Dilutions	Ct IP2	Ct IP4	Résultat	Ct ORF1ab	Ct N	CI
10-2	18,5	17,7	Positif	21	23,8	25,5	Positif
10-3	20,6	20,8	Positif	24,6	26,7	25,7	Positif
10-4	24,7	24,2	Positif	28,9	30,5	25,7	Positif
10-5	28,6	28,4	Positif	30,9	29	25,4	Positif
10-5	NR	NR	NR	30,2	25	23,4	Positif
10-5	NR	NR	NR	30,6	28	25,2	Positif
10-6	31,9	31,3	Positif	35,1	29,9	25,3	Positif
10-6	NR	NR	NR	39,4	37	25,6	Positif
10-6	NR	NR	NR	40,5	35,8	25,8	Positif
10-7	35,2	33,8	Positif	0	29	24	Ininterprétable
10-7	NR	NR	NR	0	0	24,4	Négatif
10-7	NR	NR	NR	0	0	24,5	Négatif
10-8	neg	36,2	Positif	0	0	24,3	Négatif
10-8	NR	NR	NR	0	0	24,4	Négatif
10-8	NR	NR	NR	0	41,5	24,4	Ininterprétable

pb de courbe : Courbe initialement droite pour passer la ligne de base puis exponentielle = Ct plus élevés que prévu

Amplification non exponentielle
Vérifié sur 2^{ème} essai

NR = non réalisé

Table 2 : Prélèvements		Nature	Date prélèvement	Pasteur			Viasure			
				Ct IP2	Ct IP4	Résultat	Ct ORF1ab	Ct N	CI	Résultat
Références										
2020/01888		NG	18/03/2020	17,3	17,2	Positif	18,5	22,2	26,2	Positif
2020/01745		NG	09/03/2020	19	17,9	Positif	20,5	23,7	26	Positif
2020/01829		NG	16/03/2020	20,1	18,6	Positif	20,3	23,8	26,1	Positif
2020/01926		NG	23/03/2020	20,2	19	Positif	20,7	24	26,2	Positif
2020/01890		NG	19/03/2020	21,1	20,8	Positif	21,8	24,5	25,7	Positif
2020/01827		NG	18/03/2020	24,9	23,5	Positif	27,2	29,1	25,9	Positif
2020/01907		NG	18/03/2020	24,8	24,6	Positif	24,9	27,6	25,7	Positif
2020/02389		NG	06/04/2020	27,6	27,1	Positif	31	31,6	25,1	Positif
2020/02384		NG	31/03/2020	28,6	28	Positif	32,8	31,1	24,5	Positif
2020/01930		NG	19/03/2020	27,9	28,2	Positif	31,4	32,8	27,1	Positif
2020/02039		NG	25/03/2020	28,7	29,1	Positif	38,4	33,7	25,2	Positif
2020/02033		NG	20/03/2020	32	31,5	Positif	0	34,9	25,2	Positif
20061108201	VRES20-231-37	NG	10/04/2020	31	32	Positif	31,1	27,2	25,6	Positif
20060239701	VRES20-223-71	NG	09/04/2020	33	34	Positif	42,9	37,3	25,4	Positif
20061530701	VRES20-236-57	NG	11/04/2020	34,6	34,5	Positif	0	36	25,1	Positif
20061528601	VRES20-236-53	NG	11/04/2020	36	35	Positif	0	0	25,5	Négatif
20061516201	VRES20-236-27	NG	11/04/2020	37,5	35,9	Positif	0	44,8	24,9	Positif
2020/01896		NG	19/03/2020	39,7	36,1	Positif	41,7	0	26,2	Positif
20061615701	VRES20-238-24	NG	11/04/2020	0	0	Négatif	0	0	26	Négatif
	R20.227.74	NG	09/04/2020	0	0	Négatif	0	0	25,1	Négatif

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

- pour les dilutions du virus (Table 1):
 - o 10^{-3} à 10^{-7} sur les deux cibles ;
 - o pour la dilution 10^{-8} : une des 2 cibles sort positive mais avec une intensité de fluorescence plus faible
- pour les prélèvements (Table 2):
 - o l'ensemble de ces prélèvements ayant des Ct de 17.2 à 36.1

Le test VIASURE Real Time PCR Detection Kit by Certest Biotec (Orgentec) détecte :

Pour les dilutions de virus (Table 1) :

- Jusqu'à la dilution 10^{-6} , correspondant à un Ct de 31 : positif pour 3 dilutions sur 3
- Pour la dilution 10^{-7} , correspondant à un Ct de 33.8 : signal non exponentiel pour une dilution sur 3, négatif dans les 2 autres dilutions
- Pour la dilution 10^{-8} , correspondant à un Ct de 36.2 : signal non exponentiel pour une dilution sur 3 (Ct 41.5)

Pour les prélèvements (Table 2):

- Jusqu'au Ct 29 (n= 11): détection de tous les échantillons, avec les 2 cibles positives
- Ct entre 31 et 34 (n=4) : positif pour les 4 prélèvements ; 2 prélèvements sortent dans les 2 cibles ; 2 prélèvements présentent 1 cible / 2
- Ct à partir de 35 (n=3) : 2 prélèvements sur 3 sortent positifs avec signaux très tardifs ; 1 échantillon avec Ct à 44.8 en N ; 1 échantillon avec Ct à 41.7 en ORF1
- On observe un décalage de Ct (comparaison Ct IP4 versus Ct ORF1):
 - o Ct jusqu'à 21 en IP4 : décalage de 1 à 2 Ct
 - o Ct jusqu'à 28 en IP4 : décalage de 3 à 5 Ct
 - o Quantité faible de virus : décalage plus marqué (jusqu'à 9 Ct)
- Prélèvements négatifs (n=2) : pas de signal

Pour le test VIASURE Real Time PCR Detection Kit by Certest Biotec (orgentec), le contrôle interne sort systématiquement correctement (moyenne à Ct 25.7 pour les prélèvements). Pour l'aspect technique, le format est pratique et présente l'avantage que les barrettes soient sécables. Cependant, il est possible que l'utilisation d'une seule barrette nécessite un adaptateur pour rééquilibrer la plaque dans l'automate. Il aurait fallu investiguer ce point pour savoir si c'était la raison des signaux modifiés pour certaines dilutions virales (10^{-5} , 10^{-6} A, 10^{-7} A et 10^{-8} C).

Au total, le test VIASURE Real Time PCR Detection Kit by Certest Biotec (orgentec) présente une sensibilité inférieure à la technique de référence de CNR IPP (Lyon), mais néanmoins acceptable.

CONCLUSION

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.