

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

Evaluation réalisée le 15.04.2020, vérifiée pour certains échantillons le 22.04.2020.

Essai complémentaire avec 40 cycles d'amplification le 22.04.2020

Nom du Kit : Bosphore® Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit V2 de Anatolia Genworks (V2, 1 MIX)

REF : ABCOW5 (50 tests)

Fournisseur : Launch Diagnostics

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

Jaqueline COMBRISON

Responsable Commerciale Grand-Est

Launch Diagnostics SAS



OBJECTIFS

L'objectif de l'évaluation est de tester la sensibilité analytique 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, 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 (mais positifs éventuellement pour d'autres virus respiratoires).

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 (*** nouvelles dilutions par rapport aux précédentes évaluations**)
- Echantillons respiratoires de patients de différentes nature, positifs ou négatifs pour le SARS-CoV-2 (cf tableau)

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 : Bosphore® Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit V2

- le test est **très simple à utiliser**
- il détecte 2 cibles du SARS-CoV-2 : cible dans le **gène E** (générique bêta-coronavirus groupe B) et cible dans le **gène orf1ab** (spécifique SARS-CoV-2) ainsi qu'un **contrôle interne (IC)**.

Mise en œuvre :

- extraction : ajout de 5 µL de contrôle interne dans le tube de tampon de lyse EMAG puis ajout de **200 µL** d'échantillon et extraction selon la procédure EMAG.
- RT-PCR réalisée à partir de **10µL** d'éluat ajouté dans 15µL de Master Mix.

Le fournisseur nous a indiqué a posteriori avoir fait leurs essais et préconiser 400 µL d'échantillon et d'élué dans 60µL.

Au vu des premiers résultats et des signaux franchissant très peu la ligne de base pour des échantillons attendus avec un Ct de 33/34, la technique a été évaluée aussi sur quelques échantillons (cf Tableau 2) en augmentant le nombre de cycles d'amplification à 40 fois (au lieu de 35 fois). Le fournisseur n'a pas souhaité que le nombre de cycles soit augmenté à 45 fois.

RESULTATS

Numéro échantillon	Bosphore® Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit V2				Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction Emag; Amplification QS5			Type d'échantillon	Commentaires
	Résultat RT-PCR	Ct (orf1ab)	Ct (E)	Ct (CI)	Résultat	IP2	IP4		
10-3	Positif	22,5	22,9	24,1	Positif	22,9	22,4	surageant de culture virale - dilution 10-3	
10-4	Positif	26,3	26,9	24,6	Positif	27,3	26,9	surageant de culture virale - dilution 10-4	
10-5	Positif	29,5	29,6	24,7	Positif	29,7	29,4	surageant de culture virale - dilution 10-5	
10-6	ININT	ININT*	ININT*	24,8	Positif	34,3	33,3	surageant de culture virale - dilution 10-6	Erreur probable de dépôt d'éluat
10-6 (1)	Positif	33,0	32,0	25,2	Positif	34,3	33,3	surageant de culture virale - dilution 10-6	Manip du 22.04.2020 pour recontrôler ce point Signal d'amplification dépassant peu la ligne de base notamment en orf1ab
10-6 (2)	Positif	33,0	31,8	25,3	Positif	34,3	33,3	surageant de culture virale - dilution 10-6	Idem 10-6 (1)
10-6 (3)	Positif	33,3	32,2	24,6	Positif	34,3	33,3	surageant de culture virale - dilution 10-6	Idem 10-6 (1)
10-7 (1)	Négatif	NEG	NEG	24,3	Positif	37,4	36,6	surageant de culture virale - dilution 10-7 (1)	
10-7 (2)	Négatif	NEG	NEG	24,2	Positif	37,8	36,9	surageant de culture virale - dilution 10-7 (2)	
10-7 (3)	Négatif	NEG	NEG	24,7	Positif	38,0	37,8	surageant de culture virale - dilution 10-7 (3)	
10-8 (1)	Négatif	NEG	NEG	24,8	Négatif	NEG	NEG	surageant de culture virale - dilution 10-8 (1)	
10-8 (2)	Négatif	NEG	NEG	25,0	Négatif	NEG	NEG	surageant de culture virale - dilution 10-8 (2)	
10-8 (3)	Négatif	NEG	NEG	25,3	Négatif	NEG	NEG	surageant de culture virale - dilution 10-8 (3)	
221-57	Positif	24,8	25,3	24,5	Positif	23,3	23,7	écouvillon naso-pharyngé	
220-76	Positif	23,7	24,0	24,8	Positif	24,9	25,1	aspiration trachéo-bronchique	
220-80	Positif	25,5	26,1	23,6	Positif	26,8	27,0	aspiration trachéo-bronchique	
220-71	Positif	26,3	27,1	24,9	Positif	27,5	27,8	aspiration trachéo-bronchique	
220-57	Positif	28,2	28,0	24,8	Positif	30,0	30,3	aspiration trachéo-bronchique	
220-46	Positif	31,3	31,9	24,8	Positif	32,8	33,0	écouvillon naso-pharyngé	
212-23	A retester	33,5*	34,4*	24,3	Positif	33,1	34,7	écouvillon naso-pharyngé	*Signaux très faibles qui dépassent de quelques millimètres la ligne de base
136-75	Positif*	33,3*	32,6*	21,3	Positif	35,5	34,3	écouvillon naso-pharyngé	Manip du 22.04.2020. Ct du CI plus précoce. *Signaux très faibles
210-57	Négatif	NEG	NEG	25,2	Positif	36,1	35,5	écouvillon naso-pharyngé	
139-51	Négatif	NEG	NEG	23,8	Positif	36,3	37,0	écouvillon naso-pharyngé	Manip du 22.04.2020
111-100	Négatif	NEG	NEG	24,8	Négatif	NEG	NEG	écouvillon naso-pharyngé	Virus influenza A H3N2 (Film Array)
113-89	Négatif	NEG	NEG	24,9	Négatif	NEG	NEG	écouvillon naso-pharyngé	VRS (Ct 21,4) Hologic
128-10	Négatif	NEG	NEG	25,8	Négatif	NEG	NEG	écouvillon naso-pharyngé	Virus Influenza B (Ct 31,0) Hologic

Tableau 1 : Résultats obtenus en suivant la notice du fournisseur indiquant 35 cycles d'amplification

Abréviations : ININT : ininterprétable

Numéro échantillon	Bosphore® Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit V2				Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction Emag; Amplification QS5			Type d'échantillon	Commentaires
	Résultat RT-PCR	Ct (orf1ab)	Ct (E)	Ct (CI)	Résultat	IP2	IP4		
10-5	Positif	29,9	29,6	24,7	Positif	29,7	29,4	urnageant de culture virale - dilution 10-5	Sur extrait du 15.04.2020
10-6 (1)	Positif	33,1	33,1*	25,4	Positif	34,3	33,3	urnageant de culture virale - dilution 10-6	*Signal gène E gondolé
10-6 (2)	Positif	32,9	32,9	25,1	Positif	34,3	33,3	urnageant de culture virale - dilution 10-6	
10-6 (3)	Positif	33,8	32,5	24,9	Positif	34,3	33,3	urnageant de culture virale - dilution 10-6	
10-7 (1)	Négatif	NEG	NEG	25,2	Positif	37,4	36,6	urnageant de culture virale - dilution 10-7 (1)	Sur extrait du 15.04.2020
10-7 (2)	Négatif	NEG	NEG	25,3	Positif	37,8	36,9	urnageant de culture virale - dilution 10-7 (2)	Sur extrait du 15.04.2020
10-7 (3)	Négatif	NEG	NEG	25,3	Positif	38,0	37,8	urnageant de culture virale - dilution 10-7 (3)	Sur extrait du 15.04.2020
133-14	Positif	32,8	33,9	20,4	Positif	32,7	33,0	écouvillon naso-pharyngé	Ct du CI plus précoce
220-57	Positif	27,9	28,0	24,1	Positif	30,0	30,3	aspiration trachéo-bronchique	Sur extrait du 15.04.2020
220-46	Positif	31,7	31,9	25,4	Positif	32,8	33,0	écouvillon naso-pharyngé	Sur extrait du 15.04.2020
212-23	Positif	33,6	33,0	24,5	Positif	33,1	34,7	écouvillon naso-pharyngé	Sur extrait du 15.04.2020
136-75	A retester	35,6*	34,7*	25,2	Positif	35,5	34,3	écouvillon naso-pharyngé	*Signaux non exponentiels et très bas, serait à retester
210-57	A retester	37,3*	NEG	24,0	Positif	36,1	35,5	écouvillon naso-pharyngé	Sur extrait du 15.04.2020 *Signal non exponentiel et très bas, serait à retester
139-51	Négatif	NEG	NEG	24,9	Positif	36,3	37,0	écouvillon naso-pharyngé	

Tableau 2 : Résultats obtenus en augmentant à 40 le nombre de cycles d'amplification

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.

Conditions d'utilisation mentionnées ci-dessus : utilisation d'une technique d'extraction appropriée pour les prélèvements respiratoires.

Le kit Bosphore® Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit V2 était valide pour tous les échantillons testés avec une détection du contrôle interne correcte. Un signal d'amplification non spécifique (non exponentiel) a été détecté comme croisant la ligne de base pour la détection du contrôle interne pour le témoin positif du kit dans les 3 expériences réalisées.

Pour les gammes de dilutions de virus, le kit testé détecte l'ARN viral du SARS-CoV-2 avec une sensibilité plus faible que la technique de référence du CNR :

- pour les dilutions 10^{-3} à 10^{-5} : détection des cibles orf1ab et E avec des Ct proches de ceux obtenus avec la technique du CNR ;
- pour la dilution 10^{-6} : détection des cibles orf1ab et E avec des Ct proches de ceux obtenus avec la technique du CNR, **mais le signal dépasse de très peu la ligne de base** avec le protocole comportant 35 cycles, le signal est plus franc avec 40 cycles d'amplification ;
- pour les trois dilutions 10^{-7} : aucune dilution n'a été détectée
- pour les trois dilutions 10^{-8} aucune dilution n'a été détectée

Pour les échantillons respiratoires testés, les résultats sont similaires avec ceux obtenus avec la technique IP2/IP4 pour les prélèvements ayant un Ct ≤ 33 . Cependant, pour des prélèvements respiratoires détectés avec des Ct $> 33/34$ avec la technique de référence CNR, on note un défaut de détection car le signal dépasse de très peu la ligne de base avec le protocole utilisant 35 cycles d'amplification. Le signal est plus franc et on peut rendre positif avec le programme comportant 40 cycles d'amplification (cf échantillon 212-23). Le test est en limite de détection à partir des Ct de 35 (avec 35 ou 40 cycles d'amplification)

Le test Bosphore® Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit V2 présente :

- une sensibilité plus faible que celle de la technique de référence CNR IPP (testée à Lyon) avec un possible défaut de détection lié à un franchissement trop faible de la ligne de base pour les prélèvements respiratoires ayant un Ct détectés 33 avec la technique de référence ;
- la sensibilité est améliorée avec une modification du programme à au moins 40 cycles d'amplification pour permettre un franchissement plus lisible de ligne de base
- il n'a pas été observé de réaction croisée avec d'autres virus respiratoires (sur 3 échantillons testés)

Le test est facile d'utilisation et a duré environ 70 minutes.

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 **à la condition d'augmenter le nombre de cycles d'amplification à au moins 40 cycles** pour atteindre une sensibilité acceptable.