

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 : Combo2Screen SARS-CoV-2 Assay (REF : 139A100)

Fournisseurs : ABL (*Advanced Biological Laboratories*)

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

M. Ronan Boulmé

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 : Combo2Screen SARS-CoV-2 Assay

- test **très simple à utiliser**
- utilisation de 2 Master Mix permettant la détection de 2 cibles spécifiques du SARS-CoV-2 dans 2 puits différents (sondes marquées par le même fluorophore FAM):
 - cible dans le **gène E**
 - cible dans le **gène N**
- il n'y a pas de contrôle interne

Mise en œuvre :

- extraction selon la procédure EMAG de **200 µL** d'échantillon et élution dans 50µL,
- RT-PCR réalisée à partir de **10µL** d'éluat ajouté dans 15µL de chaque Master Mix E et N.

Le fournisseur préconise d'extraire 700 µL d'échantillon et d'éluer dans 50µL (Programme Pathogen 1000 sur Magna Pure 24).

RESULTATS

Numéro échantillon	Résultat RT-PCR	Test Combo2Screen SARS-CoV-2 Assay (ABL)		Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction Emag; Amplification QS5			Type d'échantillon	Commentaires
		Ct (gène E)	Ct (gène N)	Résultat	IP2	IP4		
10-2	Positif	16,0	18,9	Positif	18,5	17,7	surageant de culture virale - dilution 10-2	
10-3	Positif	18,9	22,4	Positif	20,6	20,8	surageant de culture virale - dilution 10-3	
10-4	Positif	23,0	26,5	Positif	24,7	24,2	surageant de culture virale - dilution 10-4	
10-5	Positif	30,3	29,7	Positif	28,6	28,4	surageant de culture virale - dilution 10-5	
10-6 (1)	Positif	NEG	33,1	Positif	31,9	31,3	surageant de culture virale - dilution 10-6 (1)	
10-6 (2)	Positif	NEG	33,7	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-6 (2)	
10-6 (3)	Positif	NEG	33,1	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-6 (3)	
10-7 (1)	Positif	NEG	35,8	Positif	35,2	33,8	surageant de culture virale - dilution 10-7 (1)	
10-7 (2)	Positif	NEG	35,5	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-7 (2)	
10-7 (3)	Positif	NEG	36,4	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-7 (3)	
10-8 (1)	Négatif	NEG	NEG	Positif Limite	NEG	36,2	surageant de culture virale - dilution 10-8 (1)	
10-8 (2)	Négatif	NEG	NEG	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-8 (2)	
10-8 (3)	Négatif	NEG	NEG	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-8 (3)	
2020/1745	Positif	18,3	21,9	Positif	19,0	17,9	écouvillon naso-pharyngé	
2020/2389	Positif	30,5	31,4	Positif	27,6	27,1	écouvillon naso-pharyngé	
2020/2384	Positif	NEG	33,3	Positif	28,6	28,0	écouvillon naso-pharyngé	
2020/2039	Positif	NEG	33,0	Positif	28,7	29,1	écouvillon naso-pharyngé	
20-231-37	Positif	NEG	34,5	Positif	31,0	32,0	écouvillon naso-pharyngé	
20-236-53	Positif	NEG	35,7	Positif	32,0	31,5	écouvillon naso-pharyngé	
20-223-71	Positif	NEG	34,3	Positif	33,0	34,0	écouvillon naso-pharyngé	
20-236-57	Négatif	NEG	NEG	Positif	34,6	34,5	écouvillon naso-pharyngé	
2020/2033	Positif	NEG	34,4	Positif	35,1	35,1	écouvillon naso-pharyngé	
20-236-27	Négatif	NEG	NEG	Positif	37,5	35,9	écouvillon naso-pharyngé	
20-238-24	Négatif	NEG	NEG	Négatif	NEG	NEG	écouvillon naso-pharyngé	
20-227-74	Négatif	NEG	NEG	Négatif	NEG	NEG	écouvillon naso-pharyngé	

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

- pour les dilutions 10^{-3} à 10^{-7} sur les deux cibles ;
- pour la dilution 10^{-8} : détection sur une cible seulement.

Le test Combo2Screen SARS-CoV-2 Assay n'a **pas de contrôle interne**.

Le test Combo2Screen SARS-CoV-2 Assay a détecté la présence de SARS-CoV-2 :

- pour la dilution 10^{-3} à 10^{-5} sur les deux cibles;
- pour les dilutions 10^{-6} et 10^{-7} : détection correcte sur la cible N seulement ;
- pour les trois dilutions 10^{-8} : aucune dilution n'a été détectée.

Concernant les échantillons respiratoires, la RTqPCR ciblant le gène E manque de sensibilité mais la RTqPCR ciblant le gène N a permis la détection de la majorité des prélèvements respiratoires testés, dont le prélèvement 2020/2033 (Ct IP2/IP4 à 35,1) mais à l'exception des prélèvements 20-236-57 (Ct IP2/IP4 à 34,6 et 34,5) et 20-236-27 (Ct IP2/IP4 à 37,5 et 35,9).

La sensibilité de détection du SARS-CoV-2 est faible en ce qui concerne la cible E : en effet cette RTqPCR est en limite de détection dès un Ct de 31. **Par contre ce manque de sensibilité est compensé par une meilleure sensibilité pour la RTqPCR ciblant le gène N et il faut rendre un résultat positif même si seul le gène N est détecté.**

Le test Combo2Screen SARS-CoV-2 Assay présente :

- une absence de contrôle interne ;
- une sensibilité légèrement inférieure à celle de la technique de référence CNR IPP (testée à Lyon) si on considère la cible N avec un défaut possible de détection pour des prélèvements attendus avec un Ct de 35 en IP2/IP4;
- il faut rendre un résultat positif si le signal est exponentiel même s'il est positif seulement au niveau de la cible N et négatif au niveau de la cible E.

Le test est facile d'utilisation et dure environ 90 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.