

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 : NOVEL CORONAVIRUS (2019-nCoV) Sansure Biotech

Fournisseur : BLUE DNA Companion / Sansure Biotech

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

Correspondants

M. Franck CHAUBRON (f.chaubron.bdc@gmail.com)

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 d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 dans une matrice type prélèvement respiratoire négative,
- d'échantillons respiratoires positifs ou négatifs pour le SARS-CoV-2.

MATERIELS ET METHODES

Panel d'échantillons testés

- dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2
 - 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
 - écouvillons naso-pharyngés (5 positifs, 2 négatifs)
- Nous n'avons testé aucun prélèvement visqueux.

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 :

- le test est **très simple à utiliser et inclut une étape d'extraction des acides nucléiques**
- il détecte 2 cibles du SARS-CoV-2 :
 - cible dans le **gène orf1ab** (spécifique SARS-CoV-2) et
 - cible dans le **gène N** (spécifique SARS-CoV-2)
 - ainsi qu'un **contrôle cellulaire (gène RNase P)**

Mise en œuvre :

- l'originalité de ce test est qu'il **inclut un tampon de lyse** qui permet d'extraire les acides nucléiques selon un protocole très simple (protocole « One Tube Extraction protocol (10+10) ») :
 - inactivation du virus à la chaleur (30 minutes à 56°C)
 - 10µL de Tampon de lyse + 10µL d'échantillon inactivé : 10 minutes à T° ambiante
- ajout de 30µL de Mix aux 20µL du mélange (Tampon de lyse + échantillon inactivé)

Remarques :

- Le protocole « One Tube Extraction protocol (10+10) » est utilisable directement avec des échantillons biologiques conservés dans le milieu de transport fourni avec le kit " sample storage reagent" qui est une solution saline (ou TE avec guanidine)
- Le protocole « Concentrated Washing Method » est utilisable directement avec des échantillons biologiques issus d'autres milieux de collecte et de décharge des écouvillons.

RESULTATS

Numéro échantillon	NOVEL CORONAVIRUS (2019-nCoV) Sansure Biotech				Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction Emag; Amplification QS5			Type d'échantillon	Commentaires
	Résultat RT-PCR	Ct (orf1ab)	Ct (N)	Ct (RNAseP)	Résultat	IP2	IP4		
10-2	Positif	30,7	26,4	26,7	Positif	21,7	21,8	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
10-3	Positif	34,7	29,9	25,7	Positif	25,4	24,9	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
10-4	Positif	36,2	32,9	26,6	Positif	28,8	28,3	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
10-5 (A)	Positif	40,1	37,4	26,5	Positif	32,7	32,1	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
10-5 (B)	Positif	NEG	36,0	26,7	NR	NR	NR	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
10-5 (C)	Positif	40,8	37,5	26,7	NR	NR	NR	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
10-6 (A)	Positif	NEG	39,7	26,1	Positif	35,5	35,3	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
10-6 (B)	Négatif	NEG	NEG	26,7	Positif	39,5	38,4	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
10-6 (C)	Positif	NEG	37,2	26,4	Positif	39,9	36,8	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
10-7 (A)	Négatif	NEG	NEG	26,2	Négatif	NEG	NEG	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
10-7 (B)	Négatif	NEG	NEG	26,0	Négatif	NEG	NEG	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
10-7 (C)	Négatif	NEG	NEG	26,2	Négatif	NEG	NEG	Dilution de prélèvement positif dans matrice négative	
355-78	Positif	33,6	31,9	27,0	Positif	27,7	28,0	écouvillon naso-pharyngé	
345-61	Positif	NEG	38,9	NEG	Positif	28,7	29,9	écouvillon naso-pharyngé	
355-67	Positif	NEG	39,2	36,6	Positif	31,3	32,3	écouvillon naso-pharyngé	
356-57	Positif	29,9	34,5	28,3	Positif	31,8	33,0	écouvillon naso-pharyngé	Signal exponentiel mais 1 ^{ère} phase plate
352-72	Négatif	NEG	NEG	26,3	Positif	33,9	35,4	écouvillon naso-pharyngé	
357-24	Négatif	NEG	NEG	28,5	Négatif	NEG	NEG	écouvillon naso-pharyngé	
357-31	Négatif	NEG	NEG	25,3	Négatif	NEG	NEG	écouvillon naso-pharyngé	

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

- pour les dilutions 10^{-2} à 10^{-6} sur les deux cibles ;
- pour les trois dilutions 10^{-7} : aucune dilution n'a été détectée.

Conditions d'utilisation mentionnées ci-dessus. Nous n'avons pas testé de prélèvements visqueux dans la présente évaluation. Il est nécessaire de suivre les recommandations du fournisseur concernant l'extraction des acides nucléiques à adapter selon la nature des prélèvements et selon la composition du milieu de transport.

Le test NOVEL CORONAVIRUS (2019-nCoV) Sansure Biotech était valide avec un Ct à 27 pour le gène cellulaire de la RNaseP pour la majorité des échantillons testés. Le gène de la RNase P n'était cependant pas détecté pour le prélèvement 345-61 (mais prélèvement détecté positif en SARS-CoV-2) et il était décalé à 36,6 pour le prélèvement 355-67 (également détecté positif en SARS-CoV-2).

Concernant la détection du SARS-CoV-2 sur les dilutions du prélèvement positif dans une matrice prélèvement respiratoire :

- pour les dilutions 10^{-2} à 10^{-4} : détection des 2 cibles orf1ab et N avec des Ct plus tardifs que ceux de la technique du CNR. Le Ct est décalé par rapport aux cibles IP2/IP4, d'environ 5 Ct de plus pour la cible N et d'environ 7 à 8 Ct de plus pour la cible orf1ab.
- pour la dilution 10^{-5} : les 3 dilutions sont détectées positives avec détection d'au moins une cible (2 cibles détectées dans 2 cas et 1 cible dans 1 cas)
- pour les dilutions 10^{-6} : détection de 2 dilutions sur les 3 (détection de la cible N seulement)
- pour les trois dilutions 10^{-7} : aucune dilution n'a été détectée

Pour ces gammes de dilutions de virus, les résultats sont donc légèrement inférieurs à ceux de la technique de référence IP2/IP4 mais acceptables car concernant des prélèvements détectés avec un $Ct \geq 35$. La sensibilité de la cible N est meilleure que celle de la cible orf1ab.

Pour les échantillons respiratoires testés, on observe un décalage de Ct plus importants par rapport aux Ct en IP2/IP4 pour les prélèvements 345-61 et 355-67 qui sont aussi ceux pour lesquels le gène de la RNase P est non détecté ou plus tardif. Mais ces échantillons sont néanmoins bien détectés positifs. Globalement seul l'échantillon 352-72 détecté avec un Ct de 34/35 en IP2/IP4 n'est pas détecté par la technique testée.

Le test NOVEL CORONAVIRUS (2019-nCoV) Sansure Biotech présente :

- une sensibilité légèrement inférieure à celle de la technique de référence CNR IPP (testée à Lyon) avec un possible défaut de détection pour les prélèvements respiratoires faiblement positifs ($Ct \geq 35$) ;

Le test est facile d'utilisation et la RT-PCR a duré 97 minutes (sans compter le temps nécessaire à l'extraction).

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.