

Evaluation de la performance analytique du test
Simplexa™ COVID-19 Direct sur automate LIAISON®MDX (DiaSorin)

08/05/2020

Nom du Kit : Simplexa™ COVID-19 Direct

Automate : LIAISON®MDX, logiciel LIAISON®MDX Studio

Fournisseur : DiaSorin Molecular

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 :

Alexandre MARIE

alexandre.marie@diasorin.it

Molecular Product Specialist

I. Objectifs

L'objectif de l'évaluation est de tester la sensibilité analytique et *a 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 :

L'étape d'extraction est incluse dans la réaction : il s'agit donc de charger les prélèvements et non les extraits.

Le principe est celui de la RT-PCR en temps réel multiplex avec 2 cibles spécifiques du Sars-CoV-2 et un contrôle interne :

- le gène ORF1ab (marquage JOE)
- Gène S (marquage FAM)
- le contrôle interne (IC) (marquage Q670)

Des contrôles positifs et négatifs sont disponibles mais non fournis avec le kit.

Le kit Simplexa™ COVID-19 Direct contient 24 tests, à conserver entre -10°C et -30°C. La réalisation du test se fait dans le disque de réaction Direct Reaction Disk qui contiennent 8 zones de réactions RT-PCR, et qui est chargé sur le LIAISON® MDX.

La durée du run est de 82 minutes.

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=9) ou négatifs (n=2) pour le SARS-CoV-2 (pour tester *a minima* l'effet matrice)

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 50 µL du mélange réactif dans le puits de réaction

Ajout de 50 µL d'échantillon dans le puits d'échantillon

Chargement des disques scellés dans le LIAISON® MDX

IV. Résultats

Table 1 : Surnageants de culture sur cellules BGM infectées par SARS-CoV-2, souche 715/P2

dilutions	Pasteur			DiaSorin			
	Ct IP2	Ct IP4	Résultat	Ct ORF1ab	Ct S	Ct CI	Résultat
10-2	18,5	17,7	positif	17,1	16,6	31,5	positif
10-3	20,6	20,8	positif	20,3	20,2	29,9	positif
10-4	24,7	24,2	positif	24	24	30	positif
10-5 A	28,6	28,4	positif	27,4	27,5	30,6	positif
10-5 B	NR	NR	NR	27,2	27,3	30,1	positif
10-5 C	NR	NR	NR	27,2	27,1	29,8	positif
10-6 A	31,9	31,3	positif	31,1	30,4	29,5	positif
10-6 B	NR	NR	NR	31,1	30,8	30,2	positif
10-6 C	NR	NR	NR	30,4	30,4	29,4	positif
10-7 A	35,2	33,8	positif	0	33,8	29,7	positif
10-7 B	NR	NR	NR	32,3	32,7	30,1	positif
10-7 C	NR	NR	NR	0	0	30,2	négatif
10-8 A	0	36,2	positif	0	33,6	30,9	positif
10-8 B	NR	NR	NR	0	0	30,7	négatif
10-8 C	NR	NR	NR	0	0	30,1	négatif

NR : non réalisé

Table 2 : Prélèvements

Prélèvements	Nature	Date	Pasteur			DiaSorin			
			Ct IP2	Ct IP4	Résultat	Ct ORF1ab	Ct S	Ct CI	Résultat
200615996	ENP	11/04/2020	0	0	négatif	0	0	31,6	négatif
200707974	ENP	30/04/2020	0	0	négatif	0	0	31,1	négatif
200611393	ENP	10/04/2020	24,6	24,2	positif	22	22,4	30,4	positif
200599365	ENP	08/04/2020	25,7	25,2	positif	23,5	23,5	30,3	positif
200616202	ENP	11/04/2020	28,4	28	positif	31,5	32,2	30,6	positif
200613050	ENP	10/04/2020	30	29,7	positif	27,7	27,3	31	positif
200616135	ENP	11/04/2020	33	32,7	positif	32,5	32,8	30,3	positif
200615668	ENP	11/04/2020	33,3	32,9	positif	31,2	31,3	31,3	positif
200606860	ENP	09/04/2020	33,6	33,5	positif	31,8	32,7	30,9	positif
200613400	ENP	10/04/2020	33,8	34,5	positif	0	33,6	32	positif
200698988	ENP	29/04/2020	0	39,1	positif	32,6	34	30,5	positif

ENP : écouillons naso-pharyngés

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

- pour les dilutions du virus (Table 1):
 - o 10^{-2} 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 24.2 à 39.1
Le prélèvement avec le Ct à 39.1 n'est détecté que dans une seule cible (IP4).

Le test Simplexa™ COVID-19 Direct détecte :

Pour les dilutions de virus (Table 1) :

- Jusqu'à la dilution 10^{-6} : positif pour 3 dilutions sur 3
- Pour la dilution 10^{-7} : positif pour 2 dilutions sur 3, dont une dilution avec une seule cible.
- Pour la dilution 10^{-8} : positif pour une dilution sur 3 dans une seule cible (Ct 41.5)

Pour les prélèvements (Table 2):

- Jusqu'au Ct 33.5 en IP4 (n= 7/9) : détection des 2 cibles de tous les échantillons
- Au Ct 34.5 en IP4, détection de la cible S uniquement.
- Au Ct à 39.1 en IP4 : les deux cibles S et ORF1ab du test DiaSorin sont détectées

Au total, tous les échantillons positifs sont concordants avec la technique CNR.

- Toutes les courbes d'amplification sont validées, y compris pour les Ct élevés. Pas d'amplification aspécifique.
- Les Ct obtenus (comparaison Ct IP4 versus Ct S) sont comparables pour les 2 techniques. Seul l'échantillon présentant un Ct tardif en IP4 (200698988) sort de façon plus précoce avec le test DiaSorin.
- Prélèvements négatifs (n=2/2) : pas de signal aspécifique
- Le contrôle interne sort systématiquement correctement (moyenne à Ct 30.8 pour les prélèvements)
- L'interprétation de l'automate est systématique correcte

Le test Simplexa™ COVID-19 Direct est un test simple d'utilisation. Il ne nécessite que 50 µL de prélèvement sans perte de sensibilité. Jusqu'à 8 tests peuvent être lancés en même temps, et les puits réaction non utilisés peuvent être réutilisés *a posteriori*.

Au total, le test Simplexa™ COVID-19 Direct présente une sensibilité similaire à la technique de référence de CNR IPP (Lyon).

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.