

Résultats d'évaluation de la performance 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 les 14 et 29.05.2020

Nom du Kit : Real-time fluorescent RT-PCR kit for detecting 2019-nCoV (REF MFG030010) TEST CE IVD
Lot n° 6220200310

Fournisseur : BGI (Global Genomic Services)

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 Alexandre Gaymard (alexandre.gaymard@chu-lyon.fr)

Tel : 04 72 07 10 53

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
- de dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire et
- d'échantillons respiratoires positifs 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
- Un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
 - dilutions successives dans un prélèvement nasopharyngée négatif pour le SARS-CoV-2 afin de couvrir une large gamme de Ct et d'atteindre une limite de détection
- Echantillons respiratoires positifs pour le SARS-CoV-2
 - écouvillons naso-pharyngés avec positivité tardive (6 positifs) (Ct>35)

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 :

- il détecte 1 cible du SARS-CoV-2 (2019-nCoV ; en FAM) ainsi qu'un contrôle cellulaire (IC, en VIC).

Mise en œuvre :

- Extraction sur la plateforme MGISP-960 avec le Kit MGIEasy Magnetic Beads Virus DNA/RNA Extraction Kit (ref : 100020261) selon les recommandations du fournisseur à partir de 160 µL de prélèvement ; éluat de 30 µL.
- RT-PCR réalisée à partir de 10µL d'éluat ajouté dans 20µL de Master Mix.

RESULTATS

Numéro échantillon	Technique évaluée Real-time fluorescent RT-PCR kit for detecting 2019-nCoV Extraction sur MGISP-960			Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction E-mag; Amplification QS5			Type d'échantillon	Commentaires
	Résultat	Ct (2019 nCoV)	Ct (IC)*	Résultat	IP2	IP4		
10-3	Positif	23,2	NA	Positif	23,8	23,1	surageant de culture virale - dilution 10-3	
10-4	Positif	28,2	NA	Positif	28,2	27,5	surageant de culture virale - dilution 10-4	
10-5 (1)	Positif	30,3	NA	Positif	31,5	30,5	surageant de culture virale - dilution 10-5 (1)	
10-5 (2)	Positif	29,9	NA	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-6 (2)	
10-5 (3)	Positif	31,0	NA	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-6 (3)	
10-6 (1)	Positif	35,2	NA	Positif	35,2	34,5	surageant de culture virale - dilution 10-6 (1)	
10-6 (2)	Positif	33,1	NA	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-6 (2)	
10-6 (3)	Positif	36,0	NA	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-6 (3)	
10-7 (1)	Pos Lim	37,4	NA	Pos Lim	40,6	38,3	surageant de culture virale - dilution 10-7 (1)	
10-7 (2)	Négatif	Neg	NA	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-7 (2)	
10-7 (3)	Négatif	Neg	NA	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-7 (3)	
10-2	Positif	22,2	19,0	Positif	23	22,3	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	
10-3	Positif	25,1	19,6	Positif	26,5	25,9	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	
10-4	Positif	28,7	19,9	Positif	29,9	29,3	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	
10-5 A	Positif	32,0	19,6	Positif	33,3	32,9	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	
10-5 B	Positif	32,1	19,6	NR	NR	NR	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	
10-5 C	Positif	33,3	21,6	NR	NR	NR	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	
10-6 A	Positif	36,9	19,7	Positif	37,6	36,1	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	
10-6 B	Positif	35,1	19,7	NR	NR	NR	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	
10-6 C	Pos Lim	37,4	20,7	NR	NR	NR	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	
10-7 A	Pos Lim	37,7	19,6	Négatif	Négatif	Négatif	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	
10-7 B	Pos Lim	38,0	19,4	NR	NR	NR	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	Attention les résultats >38 doivent être systématiquement vérifiés
10-7 C	Pos Lim	37,6	20,5	NR	NR	NR	Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire	
42-0002	Positif	34,7	21,2	Positif	36,8	35,1	écouvillon naso-pharyngé	
006-0016	Positif	35,2	19,5	Positif	34,5	35,1	écouvillon naso-pharyngé	
41-0002	Positif	36,4	22,4	Positif	37,7	35,1	écouvillon naso-pharyngé	
42-0001	Positif	36,1	20,6	Pos Lim	39,9	36,8	écouvillon naso-pharyngé	
006-0007	Négatif	NEG	20,7	Pos Lim	Neg	37,1	écouvillon naso-pharyngé	
005-0013	Positif	35,0	21,1	Positif	34,7	35,1	écouvillon naso-pharyngé	

* Le contrôle cellulaire est ininterprétable pour les dilutions de virus (NA : non applicable)

Abréviations : Pos Lim : Positif en limite de détection, NR : Non réalisé

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 les surnageants de culture virale;
- pour les dilutions 10^{-2} à 10^{-6} sur les deux cibles pour le prélèvement positif dilué en matrice respiratoire. Pour la dilution 10^{-7} aucune cible n'a été détectée

Le test Real-time fluorescent RT-PCR kit for detecting 2019-nCoV (REF MFG030010) marqué CE IVD détecte l'ARN viral du SARS-CoV-2 :

- pour les dilutions 10^{-3} à 10^{-6} sur l'ensemble des passages testés pour les surnageants de culture virale; mais uniquement 1/3 pour la dilution 10^{-7}
- pour les dilutions 10^{-2} à 10^{-7} sur l'ensemble des passages testés pour le prélèvement positif dilué en matrice respiratoire.
- Un seul écouvillon naso-pharyngés (1/6) avec positivité tardive (Ct>35) n'a pas été retrouvé positif avec ce kit

Attention, selon les recommandation fournisseur l'ensemble **des amplifications Ct>38 doivent être vérifiées.**

Le test Real-time fluorescent RT-PCR kit for detecting 2019-nCoV (REF MFG030010) marqué CE IVD est composé d'un contrôle cellulaire ayant nécessité le passage d'échantillons nasopharyngés supplémentaires (n=6) pour être évalué. Ce test est valide pour les échantillons testés avec une détection d'un **contrôle cellulaire (IC) correcte dans l'ensemble des échantillons** (Ct de 19 à 23). Ce contrôle cellulaire est plus compliqué d'interprétation qu'un contrôle interne mais permet une évaluation de la qualité de l'échantillon. **Le Ct limite du contrôle cellulaire** fourni par le fournisseur **est de 32.**

Pour les échantillons respiratoires testés, les résultats sont qualitativement similaires avec ceux obtenus avec la technique IP2/IP4. Seul un positif faible en limite de détection n'a pas été retrouvé (échantillon 006-0007, Ct IP4 37.1, IP2 négatif).

Le test Real-time fluorescent RT-PCR kit for detecting 2019-nCoV (REF MFG030010) marqué CE IVD présente :

- une sensibilité similaire à celle de la technique de référence CNR

A l'utilisation, le test est facile à reconstituer et la RT-PCR dure 90 minutes hors extraction. Une vigilance accrue sur la chaîne du froid est nécessaire avec une perte de sensibilité en l'absence de travail au froid.

CONCLUSIONS

Le Centre National de Référence des Virus des Infections Respiratoires (dont la grippe) considère que le **kit Real-time fluorescent RT-PCR kit for detecting 2019-nCoV** possède une sensibilité satisfaisante à partir d'ARN extrait sur la plateforme MGISP-960 avec le kit Kit MGIEasy Magnetic Beads Virus DNA/RNA Extraction Kit peut donc être utilisé dans ces conditions pour la détection du SARS-CoV-2 dans le cadre de l'épidémie de COVID-19.