

Evaluation de la performance analytique du test

Expert 1S® SARS-CoV2

Genestore France

Nom du Kit : Expert 1S® SARS-CoV2

Fournisseur : Genestore France

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)

Dr Vanessa Escuret (vanessa.escuret@chu-lyon.fr)

Correspondant :

Nathalie Compagnone, Ph.D

Product manager, GeneStore France

nathalie.compagnone@genestore.eu

I. Objectif

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.

L'évaluation a été conduite à partir de :

- dilutions de surnageant de culture de virus SARS-CoV-2 en EMEM à différentes concentrations et
- dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 dans une matrice type prélèvement respiratoire négative

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

Ce kit réalise 2 RT-PCR en temps réel en parallèle.

La 1^{ère} RT-PCR cible 2 gènes spécifiques du Sars-CoV-2:

- Gène N1 : marquage FAM
- Gène N2 : marquage HEX / VIC

La 2^{ème} RT-PCR cible le gène de la RNase P, comme contrôle cellulaire :

- Gène RNase P : marquage FAM

La durée du run est de 1h05.

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 (présence d'effet cytopathique)
 - o Dilutions successives afin de couvrir une large gamme de Ct et d'atteindre une limite de détection
 - o Les dilutions 10^{-6} et 10^{-7} sont passées en triplicate
- Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 : dilutions successives dans une matrice type prélèvement respiratoire négative afin de couvrir une large gamme de Ct et d'atteindre une limite de détection

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)

Mise en œuvre :

Technique évaluée selon la notice du fournisseur

L'extrait d'acide nucléique est le même que celui qui a servi à faire le test de référence (extraction à partir de 200µL de prélèvement respiratoire sur EMAG et élution dans 50µL)

Les 2 RT-PCR avec les mix N1/N2 et RNase P sont réalisées en parallèle sur la même plaque, avec le même programme.

Préparation du mix N1/N2 :

- selon le protocole du fabricant
- Dépôt de 15µL de mix N1/N2 par puits

Préparation du mix RNase P :

- selon le protocole du fabricant
- Dépôt de 15µL de mix N1/N2 par puits

Dépôt de 5µL d'extrait (ou témoin positif ou témoin négatif)

IV. Résultats

Table 1 : Surnageants de culture sur cellules BGM infectées par SARS-CoV-2

dilutions	Pasteur			Genestore			
	Ct IP2	Ct IP4	Résultat	Ct N1	Ct N2	Ct Rnase P	Résultat
10-3	23,9	23,1	Positif	22,8	22	37,8	Positif
10-4	28,2	27,5	Positif	26,7	26,7	0	Positif
10-5	31,5	30,5	Positif	29,6	30	38	Positif
10-6 A	35,2	34,5	Positif	33	33,9	0	Positif
10-6 B	NR	NR	NR	33,7	33,6	38,5	Positif
10-6 C	NR	NR	NR	33,8	33,6	0	Positif
10-7 A	40,6	38,3	Positif limite	0	44,2	0	négatif
10-7 B	NR	NR	NR	36,9	36,5	0	Positif limite
10-7 C	NR	NR	NR	37	0	0	Positif limite

signal trop faible
courbe OK uniquement en log

Table 2 : Dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire

dilutions	Pasteur			Genestore				
	Ct IP2	Ct IP4	Résultat	Ct N1	Ct N2	Ct Rnase P	Résultat	
10-2	23	22,3	Positif	22	22	22,9	Positif	
10-3	26,5	25,9	Positif	25,4	25,1	23	Positif	
10-4	29,9	29,3	Positif	28,9	28,5	23,1	Positif	
10-5 A	33,3	32,9	Positif	31,9	32,6	22,9	Positif	
10-5 B	NR	NR	NR	32,9	32,7	23	Positif	
10-5 C	NR	NR	NR	32,5	32,4	23	Positif	
10-6 A	37,6	36,1	Positif	36,1	39,1	23	Positif limite	fausse amplification
10-6 B	NR	NR	NR	36,4	37,6	23,2	Positif limite	fausse amplification
10-6 C	NR	NR	NR	35,3	37,6	23	Positif limite	fausse amplification
10-7 A	0	0	Négatif	0	0	22,8	négatif	
10-7 B	NR	NR	NR	37,9	43,1	22,8	Positif limite	fausse amplification
10-7 C	NR	NR	NR	0	42,2	22,8	négatif	fausse amplification

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

- pour les dilutions du virus (Table 1):
 - o 10^{-3} à 10^{-6} sur les deux cibles ;
 - o pour la dilution 10^{-7} : sur les 2 cibles, positif en limite de détection (Ct 40.6/38.3)
- pour les dilutions du prélèvement positif en matrice respiratoires (Table 2):
 - o pour les dilutions 10^{-2} à 10^{-6} sur les deux cibles,
 - o pour la dilution 10^{-7} : absence de détection

Le test Expert 1S® SARS-CoV2 de Genestore présente des courbes d'amplification sans ambiguïté pour le gène N1. Concernant le gène N2, les amplifications sont « crénelées » et certains signaux tardifs ne peuvent être interprétés comme positif. Les amplifications du contrôle cellulaire sont toutes interprétables (remarque : pas d'amplification dans les dilutions de virus en MEM normale du fait de l'absence de cellules humaines).

Le test Expert 1S® SARS-CoV2 de Genestore détecte :

- pour les dilutions du virus (Table 1):
 - o jusqu'à 10^{-6} : toutes les dilutions sont détectées
 - o à 10^{-7} : 2 dilutions sur 3 sont rendues « positif limite », le dernier triplicat étant négatif
- pour les dilutions du prélèvement positif en matrice respiratoires (Table 2):
 - o à 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} (triplicate) : toutes les dilutions sont détectées sans ambiguïté, avec des Ct comparables à ceux de la technique de référence
 - o à 10^{-6} : l'amplification N1 est conforme, N2 montrant de fausses amplifications, rendant ainsi les résultats à la limite de la positivité
 - o à 10^{-7} : 1 dilution sur 3 est positive en N1, N2 montrant 2 fausses amplifications

Le test Expert 1S® SARS-CoV2 de Genestore présente une sensibilité légèrement inférieure à la technique de référence mais permet d'obtenir des résultats qualitatifs similaires. L'interprétation pour les signaux en N2 est malaisée.

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.