

Evaluation de la performance analytique du test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2

Servibio

Nom du Kit : Vitassay qPCR SARS-CoV-2

Fournisseur : Servibio

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 :

Luc Doublier

Chef de Produits/Product Manager

Groupe



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

RT-PCR en temps réel multiplex avec 2 cibles et un contrôle interne :

- le gène ORF1 (marquage FAM)
- Gène N (marquage ROX)
- le contrôle interne (IC) (marquage VIC (HEX, ou JOE))

Les réactifs sont présentés en plaque de 96 puits, sécables en barrettes de 8 tests. Le réactif permettant la RT-PCR est réhydraté au fond de chaque puits au moment de la manipulation.

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

Ajout de 15 µl de tampon de réhydratation dans chaque puits

Ajout des extraits des échantillons: 5 µl d'ARN

Bien homogénéiser par refoulement 2 à 3 fois le mastermix et l'ADN dans chaque puits de la barrette

Centrifuger la plaque ou taper pour que tous les réactifs soient au fond des puits

IV. Résultats

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

| dilutions | Pasteur | | | Vitassay | | | |
|-----------|---------|--------|----------------|-----------|------|------|-----------------|
| | Ct IP2 | Ct IP4 | Résultat | Ct ORF1ab | Ct N | CI | Résultat |
| 10-3 | 23,9 | 23,1 | Positif | 24,0 | 27,5 | 24,2 | Positif |
| 10-4 | 28,2 | 27,5 | Positif | 29,3 | 30,9 | 23,5 | Positif |
| 10-5 | 31,5 | 30,5 | Positif | 32,7 | 34,5 | 27,6 | Positif |
| 10-6 A | 35,2 | 34,5 | Positif | 37,4 | 36,1 | 27,0 | Positif |
| 10-6 B | NR | NR | NR | 35,8 | 36,8 | 31,5 | Positif |
| 10-6 C | NR | NR | NR | 35,1 | 30,4 | 15,0 | ininterprétable |
| 10-7 A | 40,6 | 38,3 | Positif limite | 37,6 | 0,0 | 27,6 | Positif limite |
| 10-7 B | NR | NR | NR | 0,0 | 0,0 | 33,7 | négatif |
| 10-7 C | NR | NR | NR | 38,6 | 0,0 | 25,7 | Positif limite |

Courbe cassée
Problème de CI; Courbes ORF1et N cassées

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

| dilutions | Pasteur | | | Vitassay | | | |
|-----------|---------|--------|----------|-----------|------|------|----------------|
| | Ct IP2 | Ct IP4 | Résultat | Ct ORF1ab | Ct N | CI | Résultat |
| 10-2 | 23 | 22,3 | Positif | 22,5 | 26,2 | 24,3 | Positif |
| 10-3 | 26,5 | 25,9 | Positif | 25,8 | 28,7 | 23,1 | Positif |
| 10-4 | 29,9 | 29,3 | Positif | 30,6 | 32,1 | 23,3 | Positif |
| 10-5 A | 33,3 | 32,9 | Positif | 0 | 0 | 23,4 | négatif |
| 10-5 B | NR | NR | NR | 41,3 | 44,4 | 24,0 | Positif limite |
| 10-5 C | NR | NR | NR | 38,7 | 0 | 23,5 | Positif limite |
| 10-6 A | 37,6 | 36,1 | Positif | 0 | 0 | 24,3 | négatif |
| 10-6 B | NR | NR | NR | 0 | 0 | 24,5 | négatif |
| 10-6 C | NR | NR | NR | 0 | 0 | 23,1 | négatif |
| 10-7 A | 0 | 0 | Négatif | 0 | 0 | 23,2 | négatif |
| 10-7 B | NR | NR | NR | 0 | 0 | 23,0 | négatif |
| 10-7 C | NR | NR | NR | 0 | 0 | 23,0 | négatif |

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

La technique Vitassay qPCR SARS-CoV-2, Servibio détecte :

- pour les dilutions du virus (Table 1):
 - o jusqu'à 10^{-5} : toutes les dilutions
 - o à 10^{-6} , correspondant à un Ct de 34.5 en technique de référence (IP4) : 2 prélèvements sur 3 sont correctement détectés, l'un avec un signal ORF1 incorrect (échantillon 10^{-6} B) ; l'échantillon 10^{-6} C est ininterprétable
 - o à 10^{-7} , correspondant à un Ct de 38.3 en technique de référence (IP4) : 2 échantillons sur 3 sont positifs en limite de détection
- pour les dilutions du prélèvement positif en matrice respiratoires (Table 2):
 - o à la dilution 10^{-5} , correspondant à un Ct de 32.9 (IP4) : 1 échantillon sort négatif, les 2 autres sont positifs en limite de détection
 - o au-delà : pas de détection

Pour le test Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (Servibio), le contrôle interne sort systématiquement correctement. Pour l'aspect technique, le format est pratique et présente l'avantage que les barrettes soient sécables. Deux échantillons (dilutions de virus 10^{-6} B et 10^{-6} C) ont présenté des amplications non appropriées.

Au total, le test Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (Servibio) présente une sensibilité inférieure à la technique de référence CNR - Lyon, mais néanmoins acceptable du fait des résultats sur les dilutions de virus.

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.