

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

Nom du Kit : BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples (RUO)

Fabricant : Bertin Technologies

Automate : Incubateur / lecteur Axxin T8

Fournisseur : Bertin Technologies et C4Diagnostics

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

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 d'extraits d'acides nucléiques** :

- de dilutions de culture de virus SARS-CoV-2 (en EMEM ou en eau) à différentes concentrations

Notre évaluation a été réalisée en accord avec le fournisseur et selon ses recommandations à partir des extraits d'acides nucléiques. En effet, le test RT-LAMP mentionné ci-dessus a pour objectif de rechercher la présence du génome du SARS-CoV-2 directement à partir d'écouvillons naso-pharyngés secs, sans milieu de transport. Ce type d'évaluation n'est possible qu'au sein d'un service clinique, avant que les écouvillons ne soient classiquement déchargés dans du milieu de transport pour virus.

MATERIELS ET METHODES

Panel d'échantillons testés : extraits d'acides nucléiques des prélèvements indiqués :

- Surnageant de culture de cellules BGM infectées par SARS-CoV-2
 - échantillon 2020/715 ; récolte après 2 passages (présence d'effet cytopathique)
 - dilutions successives en EMEM ou en eau afin de couvrir une large gamme de Ct et d'atteindre une limite de détection

Technique de référence CNR (site de Lyon)

Extraction sur 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 BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples (RUO) :

- il s'agit d'un test moléculaire RT-LAMP avec incorporation d'un agent intercalant
- le test cible **2 gènes** du SARS-CoV-2 (dans les gènes RdRp et N) ainsi qu'un **contrôle cellulaire** (RNase P)

Mise en œuvre :

- Dans son utilisation normale, le kit permet de tester deux échantillons en parallèle et consiste à réaliser les étapes suivantes :
 - o extraction rapide de l'ARN viral avec une lyse chimique et précipitation par agents chaotropiques (tube vert)
 - o neutralisation des inhibiteurs d'amplification présents dans le lysat (ajout tube bleu)
 - o filtration du lysat (tube violet)
 - o puis transfert du lysat dans du tampon réactionnel (tube orange)
 - o puis répartition dans les tubes d'amplification contenant les réactifs d'amplification lyophilisés (micro-tubes en barrettes)
 - o incubation à 65°C dans l'incubateur-lecteur en temps réel

- **Afin d'évaluer la partie analytique uniquement du test (RT-LAMP)**, nous avons utilisé directement des acides nucléiques déjà extraits sur EMAG (à partir de 200µL de surnageant dilué en EMEM ou en eau, élué dans 50µL) **en démarrant alors le test à l'étape 5 directement** après dilution des extraits d'acides nucléiques dans le « Reaction buffer » contenu dans le tube orange.

RESULTATS sur la partie RT-LAMP :

A partir d'acides nucléiques déjà extraits sur EMAG

Pour chaque échantillon de dilution de surnageant de virus en EMEM ou en eau : 34 µL d'extrait d'acides nucléiques ont été dilués dans 51 µL de « Reaction Buffer » du tube orange.

Puis 25 µL de ce mélange a été introduit dans chacun des trois micro-tubes réactionnels.

Numéro échantillon	Test BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples (RUO)				Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction E-mag; Amplification QS5		
	Résultat	Contrôle cellulaire	RdRp	N	Résultat	IP2	IP4
10-2 EMEM (ARN)	Positif	NEG ^a	POS	POS	Positif	20,5	19,7
10-3 EMEM (ARN)	Positif	NEG ^a	POS	POS	Positif	23,6	22,7
10-4 EMEM (ARN)	Positif	NEG ^a	POS	POS	Positif	27,3	26,4
10-4 EAU (ARN)	Positif	NEG ^a	POS	POS	Positif	26,1	25,2
10-5 EMEM (ARN)	Positif	NEG ^a	POS	POS	Positif	31,3	30,5
10-5 EAU (ARN)	Positif	NEG ^a	POS	POS	Positif	29,5	28,5
10-6 EMEM (ARN)	Positif	NEG ^a	POS	POS	Positif	34,3	33,5
10-7 EMEM (ARN)	Négatif	NEG ^a	NEG	NEG	Pos Lim	39,2	38,4

Abréviations : Pos Lim : Positif en limite de détection

^a il est normal que le témoin contrôle cellulaire ne soit pas détecté car les surnageant de culture de virus dilués sont très pauvres en cellules

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

- dilutions des surnageants de culture virale en EMEM ou en eau :
 - o dilutions 10^{-3} à 10^{-7} sont toutes détectées, la dilution 10^{-7} étant en limite de détection.

Le test BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples (RUO) détecte l'ARN viral du SARS-CoV-2 pour les :

- dilutions des surnageants de culture virale en EMEM ou en eau :
 - o dilutions 10^{-3} à 10^{-6} sont détectées sur les deux cibles,
 - o la dilution 10^{-7} n'est pas détectée mais en limite de détection avec la technique de référence.

Globalement, le test BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples (RUO):

- est facile d'utilisation notamment grâce au code couleur
- dure 25 minutes maximum (sans compter le temps nécessaire à la préparation de l'échantillon, d'environ 5 minutes)
- présente une sensibilité similaire à la technique de référence pour la partie analytique RT-LAMP

CONCLUSIONS

La sensibilité de la RT-LAMP est satisfaisante à partir d'acides nucléiques déjà extraits sur EMAG au préalable et montre des performances similaires à la technique de référence.