

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 : Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Kit (EUA, Emergency Use Authorization)

Automate : QXDx AutoDG Droplet Digital PCR Systems

Fournisseur : Bio-Rad Laboratories Inc.

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

Groupe Hospitalier Nord

103 boulevard de la Croix-Rousse

69317 Lyon CEDEX 04

FRANCE

Dr Grégory DESTRAS (gregory.destras@chu-lyon.fr)

Tel : 04 72 07 10 22

Correspondant

denis_brochard@bio-rad.com

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 et
- de dilutions d'un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire

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 nasopharyngé négatif pour le SARS-CoV-2 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

Les extraits d'acides nucléiques purifiés (5,5µL) (sur Emag BioMérieux dans notre cas) et le mastermix de RT-ddPCR ont été fractionnés en utilisant l'automate générateur de gouttelettes (QXDx AutoDG Droplet Digital PCR Systems) en 15 000 à 20 000 gouttelettes de l'ordre du nanolitre formant une émulsion huile dans l'eau. Il est aussi possible d'utiliser le générateur non automatisé Biorad QX200.

La RT-PCR est réalisée dans chaque gouttelette (incubation en thermocycleur) permettant la génération des différents ADNc.

L'intensité de fluorescence éventuellement présente est mesurée pour chaque gouttelette dans deux canaux FAM et HEX dans le lecteur de gouttelettes.

Les données de fluorescence sont ensuite analysées grâce aux logiciels QuantaSoft v1.7 Software et QuantaSoft Analysis Pro v1.0 Software pour établir la présence de SARS-CoV-2.

Le test Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR inclut: 2019-nCoV CDC ddPCR Triplex Probe Assay, One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes (Supermix, Reverse Transcriptase, Dithiothreitol (DTT)), Exact Diagnostic SARS-CoV-2 Standard, and Exact Diagnostic SARS-CoV-2 Negative.

- Le test cible **2 gènes** du SARS-CoV-2 (N1 et N2 dans le gène N) ainsi qu'un **contrôle cellulaire** (RNase P).
- La durée globale de l'expérience à partir des extraits d'ARN (ici pour 24 échantillons) est d'environ 5h30-6h. La durée de préparation des échantillons en plaque est estimée de 30 min à 1h et la génération de gouttelettes de 10 min à 1h en fonction de la quantité d'échantillon. La durée d'amplification est de 3h30. La durée d'analyse des gouttelettes est d'1 min 30 par échantillon.

RESULTATS

Les résultats sont donnés en copies/μL d'extrait. Les concentrations positives mais en dessous la limite de détection sont considérées négatives selon les recommandations fournisseurs.

Numéro échantillon	Test Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Kit				Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction E-mag; Amplification QS5			Type d'échantillon
	Résultat	N1 (copies/μL d'extrait)	N2 (copies/μL d'extrait))	RNaseP (copies/μL d'extrait)	Résultat	IP2 (Ct)	IP4 (Ct)	
10-3	Positif	1 592,42	1 641,14	0,36	Positif	23,3	22,6	surnageant de culture virale - dilution 10-3
10-4	Positif	209,41	215,96	0,00	Positif	27,6	26,9	surnageant de culture virale - dilution 10-4
10-5	Positif	12,81	13,71	0,00	Positif	30,6	30,1	surnageant de culture virale - dilution 10-5
10-6	Positif	1,79	2,14	0,07 (Neg)	Positif	34,7	33,6	surnageant de culture virale - dilution 10-6
10-7	Pos Lim	0,00	0,14 (Pos)	0,00	Pos Lim	43,6	39,4	surnageant de culture virale - dilution 10-7
10-7 Bis	Pos Lim	0,07 (Neg)	0,14 (Pos)	0,07 (Neg)	NR	NR	NR	surnageant de culture virale - dilution 10-7
10-7 Ter	Négatif	0,07 (Neg)	0,07 (Neg)	0,00	NR	NR	NR	surnageant de culture virale - dilution 10-7
10-8	Négatif	0	0	0	Pos Lim	43,3	40,9	surnageant de culture virale - dilution 10-8
10-8 Bis	Négatif	0	0	0	NR	NR	NR	surnageant de culture virale - dilution 10-8
10-8 Ter	Négatif	0	0	0	NR	NR	NR	surnageant de culture virale - dilution 10-8
P0 10-2	Positif	3 657,27	3 819,18	1 208,98	Positif	22,8	22,3	Dilution pvt positif en SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
P0 10-3	Positif	431,05	436,89	1 160,12	Positif	26,3	25,7	Dilution pvt positif en SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
P0 10-4	Positif	37,29	39,23	1 258,95	Positif	30,1	29,4	Dilution pvt positif en SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
P0 10-5	Positif	3,22	3,36	1 017,24	Positif	32,9	32,1	Dilution pvt positif en SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
P0 10-6	Pos Lim	0,24	0,39	1 076,46	Pos Lim	40,6	35,4	Dilution pvt positif en SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
P0 10-6 Bis	Pos Lim	0,40	0,16 (Neg)	958,88	NR	NR	NR	Dilution pvt positif en SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
P0 10-6 Ter	Pos Lim	0,38	0,53	1 063,07	NR	NR	NR	Dilution pvt positif en SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
P0 10-7	Négatif	0,07 (Neg)	0,07 (Neg)	928,45	Négatif	Négatif	Négatif	Dilution pvt positif en SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
P0 10-7 Bis	Négatif	0	0	1 115,82	NR	NR	NR	Dilution pvt positif en SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
P0 10-7 Ter	Négatif	0	0	1 086,84	NR	NR	NR	Dilution pvt positif en SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
Standard positif	Positif	157,42	155,25	96,49	NR	NR	NR	Standard positif (Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard) attendu à 200 copies/μL de génome viral et 75 copies/μL de génome humain
Standard positif	Positif	165,55	160,71	102,99	NR	NR	NR	Standard positif (Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard) attendu à 200 copies/μL de génome viral et 75 copies/μL de génome humain

Standard négatif	Négatif	0	0	43,48	NR	NR	NR	Standard Négatif (Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative) attendu à 0 copies/μL de génome viral et 75 copies/μL de génome humain
Standard négatif	Négatif	0	0	41.72	NR	NR	NR	Standard Négatif (Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative) attendu à 0 copies/μL de génome viral et 75 copies/μL de génome humain

Abréviations : ININT : Ininterprétable ; NR : Non réalisé ; 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 :
 - o dilutions 10^{-3} à 10^{-8} sont toutes détectées, les dilutions 10^{-7} et 10^{-8} étant en limite de détection
- dilutions du prélèvement positif en matrice respiratoire :
 - o dilutions 10^{-2} à 10^{-6} sont détectées, la dilution 10^{-6} étant en limite de détection
 - o dilutions 10^{-7} : aucune cible n'a été détectée

Le test Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Kit (EUA, Emergency Use Authorization)

- dilutions des surnageants de culture virale en EMEM :
 - o dilutions 10^{-3} à 10^{-7} sont toutes détectées, la dilution 10^{-7} étant en limite de détection
 - o la dilution 10^{-8} : aucune cible n'a été détectée
- dilutions du prélèvement positif en matrice respiratoire :
 - o dilutions 10^{-2} à 10^{-6} sont détectées, la dilution 10^{-6} étant en limite de détection
 - o dilutions 10^{-7} : aucune cible n'a été détectée

Globalement, le test présente :

- une sensibilité similaire à la technique de référence du CNR ;
- des points positifs : détection quantitative et reproductible ;
- des points négatifs : préparation plus longue des échantillons (génération des gouttelettes) et résultat en point final aboutissant à un délai plus long qu'une technique en temps réel.

CONCLUSIONS

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.