

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 avec le CHU de Grenoble (laboratoire de Virologie) disposant de l'automate Alinity m

Nom du Kit : ALINITY m SARS-COV-2 ASSAY (CE)

Automate: Alinity m

Fabricant / Fournisseur : Abbott

Laboratoire Investigateur

Evaluation réalisée par le CHU de Grenoble:

Dr Sylvie LARRAT (SLarrat@chu-grenoble.fr)

Dr Florence PUCH, Dr Sandrine Boisset

Institut de Biologie et de Pathologie

Laboratoire de VIROLOGIE

CHU de Grenoble-Alpes

CS10217

38043 GRENOBLE

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 :

- de dilutions de culture de virus SARS-CoV-2 à différentes concentrations (fournies par le CNR de Lyon à Grenoble) et
- de prélèvements positifs pour le SARS-CoV-2 (échantillons du CHU de Grenoble conservés à -80°C et/ou retestés récemment avec la technique de référence CNR à Grenoble)
- de prélèvements négatifs pour le SARS-CoV-2 et éventuellement positifs pour d'autres virus respiratoires

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
 - les échantillons étaient stockés à -80°C à Lyon et à Grenoble et ont été envoyés en carboglace
 - les échantillons ont été testés avec la technique de référence du CNR à Lyon et à Grenoble ainsi qu'avec le test à évaluer
- Echantillons de patients positifs pour le SARS-CoV-2 à différentes concentrations :
 - Echantillons testés avec la technique de référence du CNR à Grenoble
- Echantillons de patients négatifs pour le SARS-CoV-2 (5)
- Echantillons de patients négatifs pour le SARS-CoV-2 et positifs pour un virus influenza (4) ou pour un coronavirus humain (HCoV NL63) (12)

Technique de référence CNR (site de Lyon)

Extraction avec Nuclisens EasyMag® 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 de référence CNR (site de Grenoble) : adaptation de la technique CNR en diminuant le volume réactionnel à 15 µl (10 µl de mix réactionnel + 5 µl d'extrait) et le temps de la RT-PCR de moitié. Détection de deux cibles en duplex (région RdRp) : amorces et sondes (IP2 VIC, IP4 FAM) et d'un contrôle cellulaire (GAPDH Cy5).

Extraction avec Nuclisens eMag® bioMérieux selon la technique du fournisseur à partir de 200 µL de prélèvement ; éluat de 50 µL

SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Ref: Invitrogen 1732-088).

Amplifications sur LightCycler® 480 instrument II Roche Life Science (à partir de 5 µL d'éluat)

Technique évaluée : selon la notice du fournisseur

Principe du test :

- il détecte **2 cibles** du SARS-CoV-2 (dans les gènes RdRp et N) ainsi qu'un **contrôle interne (IC)**

Mise en œuvre :

- inactivation du virus par incubation du prélèvement 10 min à 65°C
- à partir de 800 µL de prélèvement (500 µl pour l'extraction et 300 µl de volume mort)
- Prélèvement en milieu de transport mis directement sur l'automate après inactivation par la chaleur.
- facilité de lecture du signal : détection automatique des courbes de PCR
- **la stabilité des réactifs est de 8h seulement lors des tests**
- concernant l'interprétation des résultats, **une seule courbe moyenne des deux courbes d'amplification est donnée, ainsi que la moyenne des deux Ct**. Pour chaque cible, le détail des Ct et les courbes ne sont pas disponibles. Ce point fait défaut, il serait pertinent de disposer de ces informations pour faciliter la validation biologique et éviter de passer à côté de faux positifs ou de faux négatifs.

RESULTATS

Numéro échantillon	Test ALINITY m SARS-COV-2 ASSAY (Abbott)			Technique de référence PCR Institut Pasteur (à Lyon); Extraction E-mag; Amplification QS5			Technique de référence PCR Institut Pasteur (à Grenoble); Extraction eMag; Amplification LC480 II		Type d'échantillon
	Résultat	Ct (RdRp et/ou N)	Ct (IC)	Résultat	IP2	IP4	Résultat	IP2/IP4	
10-3	Positif	24,33	27,83	Positif	23,3	22,5	Positif	24,7/24,2	surageant de culture virale - dilution 10-3
10-4	Positif	27,51	28,30	Positif	27,1	26,2	Positif	27,8/27,1	surageant de culture virale - dilution 10-4
10-5	Positif	32,18	28,76	Positif	30,7	29,7	Positif	31,9/31,5	surageant de culture virale - dilution 10-5
10-6 (A)	Positif	35,34	27,91	Positif	33,8	32,7	Positif	34,4/34,4	surageant de culture virale - dilution 10-6 (A)
10-6 (B)	Positif	35,96	30,34	NR	NR	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-6 (B)
10-6 (C)	Positif	35,98	30,64	NR	NR	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-6 (C)
10-7 (A)	Pos Lim	40,31	28,66	Pos Lim	39,8	NEG	Pos Lim	NEG/36,0	surageant de culture virale - dilution 10-7 (A)
10-7 (B)	Pos Lim	38,17	28,70	NR	NR	NR	NR	NR	surageant de culture virale - dilution 10-7 (B)
66960 (1)	Positif	16,19	28,26	NR	NR	NR	Positif	15	Echantillon positif en SARS-CoV-2
66883 (2)	Positif	21,69	27,82	NR	NR	NR	Positif	20	Echantillon positif en SARS-CoV-2
66911 (3)	Positif	23,71	27,31	NR	NR	NR	Positif	20	Echantillon positif en SARS-CoV-2
67329 (4)	Positif	24,35	29,30	NR	NR	NR	Positif	22	Echantillon positif en SARS-CoV-2
66907 (5)	Positif	24,94	28,58	NR	NR	NR	Positif	23	Echantillon positif en SARS-CoV-2
75043 (6)	Positif	29,28	29,43	NR	NR	NR	Positif	25	Echantillon positif en SARS-CoV-2
66906 (7)	Positif	27,9	28,54	NR	NR	NR	Positif	25	Echantillon positif en SARS-CoV-2
70653 (8)	Positif	29,24	28,48	NR	NR	NR	Positif	26	Echantillon positif en SARS-CoV-2
75117 (9)	Positif	31,51	32,64	NR	NR	NR	Positif	26	Echantillon positif en SARS-CoV-2
70684 (10)	Positif	36,76	29,00	NR	NR	NR	Positif	28	Echantillon positif en SARS-CoV-2
70684 (10) dilué au ¼ en PBS	Positif	39,12	29,13	NR	NR	NR	NR	NR	Echantillon positif en SARS-CoV-2
71613 (11)	Positif	30,72	29,25	NR	NR	NR	Positif	28	Echantillon positif en SARS-CoV-2
70354 (12)	Positif	33,45	28,64	NR	NR	NR	Positif	30	Echantillon positif en SARS-CoV-2
70153 (14)	Positif	35,76	28,14	NR	NR	NR	Positif	32	Echantillon positif en SARS-CoV-2
69056 (15)	Positif	37,27	27,52	NR	NR	NR	Positif	34	Echantillon positif en SARS-CoV-2
79557 (35)	Positif	33,14	28,66	NR	NR	NR	Positif	33	Echantillon positif en SARS-CoV-2
70152 (16)	Négatif	NEG	28,63	NR	NR	NR	Positif	34	Echantillon positif en SARS-CoV-2
70152 (16) dilué au ½ en PBS	Négatif	NEG	29,39	NR	NR	NR	NR	NR	Echantillon positif en SARS-CoV-2
70399 (17)	Positif	35,22	28,57	NR	NR	NR	Positif	35	Echantillon positif en SARS-CoV-2
69387 (18)	Positif	39,02	27,90	NR	NR	NR	Positif	35	Echantillon positif en SARS-CoV-2
71168 (19)	Négatif	NEG	28,35	NR	NR	NR	Positif	35	Echantillon positif en SARS-CoV-2 (LBA)
71168 (19) dilué au ½ en PBS	Négatif	NEG	28,96	NR	NR	NR	NR	NR	Echantillon positif en SARS-CoV-2 (LBA)

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

RESULTATS suite (échantillons négatifs)

Numéro échantillon	Test ALINITY m SARS-COV-2 ASSAY (Abbott)			Technique de référence PCR Institut Pasteur (à Lyon); Extraction E-mag; Amplification QS5			Technique de référence PCR Institut Pasteur (à Grenoble); Extraction eMag; Amplification LC480 II		Type d'échantillon
	Résultat	Ct (RdRp et/ou N)	Ct (IC)	Résultat	IP2	IP4	Résultat	IP2/IP4	
80332 (41)	Négatif	NEG	29,45	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2
80326 (42)	Négatif	NEG	28,81	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2
80333 (43)	Négatif	NEG	28,56	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2
80331 (44)	Négatif	NEG	30,54	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2
80327 (45)	Négatif	NEG	29,79	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2
66640 (20)	Négatif	NEG	28,33	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un virus influenza
66639 (21)	Négatif	NEG	29,38	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un virus influenza
66463 (22)	Négatif	NEG	28,51	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un virus influenza
66603 (23)	Négatif	NEG	28,98	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un virus influenza
65645 (24)	Négatif	NEG	29,05	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63
65934 (25)	Négatif	NEG	28,64	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63
65854 (26)	Négatif	NEG	27,59	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63
65324 (27)	Négatif	NEG	29,79	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63
65141 (28)	Négatif	NEG	30,39	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63
64887 (29)	Négatif	NEG	28,63	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63
64842 (30)	Négatif	NEG	27,37	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63
66444 (31)	Négatif	NEG	29,08	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63
65438 (32)	Négatif	NEG	29,33	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63
65872 (33)	Négatif	NEG	28,28	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63
65772 (34)	Négatif	NEG	27,67	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63
66312 (36)	Négatif	NEG	28,93	NR	NR	NR	Négatif	NEG	Echantillon négatif en SARS-CoV-2 mais positif pour un HCoV NL63

Abréviations : NR ; Non réalisé

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

- dilutions des surnageants de culture virale en EMEM :
 - o dilutions 10^{-3} à 10^{-6} sont toutes détectées,
 - o dilution 10^{-7} : détection d'une cible sur deux

Le test ALINITY m SARS-COV-2 ASSAY (Abbott) détecte l'ARN viral du SARS-CoV-2 comme détaillé ci-dessous:

- dilutions des surnageants de culture virale en EMEM :
 - o dilutions 10^{-3} à 10^{-7} sont toutes détectées;
- échantillons positifs :
 - o les échantillons détectés avec un Ct ≤ 30 dans la technique de référence sont tous détectés positifs ;
 - o un échantillon ayant un Ct à 34 et un échantillon ayant un Ct à 35 avec la technique de référence n'étaient pas détectés (les repasses de ces échantillons dilués sont restées négatives). Un de ces échantillons était un liquide broncho-alvéolaire. Ce type de prélèvement n'est pas validé par la notice du fabricant.

La détection du **contrôle cellulaire était correcte dans l'ensemble des échantillons testés** (Ct de 27,31 à 30,64).

Globalement, le test ALINITY m SARS-COV-2 ASSAY (Abbott) présente:

- une sensibilité similaire à la technique de référence CNR mais avec un volume d'entrée important (problème pour les repasses)
- une interprétation simple et automatisée avec une visualisation possible des courbes d'amplification

Le test est facile d'utilisation et la RT-PCR dure 135 minutes pour 12 échantillons puis 15 min par tranche de 12 échantillons supplémentaires dans la limite de 244 prélèvements lancés simultanément.

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.