

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 les 07 et 08 décembre 2020

Nom du Kit : RT-LAMP RUNCOV

Fournisseur : CIRAD

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

Correspondant au CIRAD :

Emmanuel JOUEN (emmanuel.jouen@cirad.fr), responsable technique et responsable Management Qualité/Sécurité/Environnement de la plateforme technologique labellisée IBiSA « Pôle de Protection des Plantes » (3p.cirad.fr) et du CRB Vatel

CIRAD / UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical

Dr Isabelle ROBENE (isabelle.robene@cirad.fr), Phytopathologiste

CIRAD / UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical

Laboratoire de Pathologie et Génétique Moléculaire

7, chemin de l'IRAT

97410 Saint-Pierre, La Réunion (FRANCE)

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 surnageant 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 en milieu de culture pour virus en EMEM afin de couvrir une large gamme de Ct et d'atteindre une limite de détection ;
 - dilutions secondaires dans de l'eau RNase free pour certains échantillons
- Un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
 - dilutions successives dans des prélèvements respiratoires négatifs pour le SARS-CoV-2 (prélevés sur milieu de transport REMEL) afin de couvrir une large gamme de Ct et d'atteindre une limite de détection
 - analyse à partir des culots cellulaires pour certains échantillons pour se rapprocher des conditions d'utilisation du test pour lever les éventuelles inhibition du test LAMP lorsque le milieu de transport pour virus est complexe .

Nous avons fait des essais sur ces différents types d'échantillons pour s'affranchir de toute interférence ou incompatibilité qui serait liée au type de milieu de transport pouvant diminuer la sensibilité 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)

Technique évaluée :

- **Test simple et rapide**
- Test ne nécessitant pas d'extraction au préalable des acides nucléiques

- Permet de rendre un résultat qualitatif (rendu positif, négatif)
- Basé sur la technologie d'amplification isothermale **LAMP** (*loop-mediated isothermal amplification*)
- **Deux cibles distinctes** sont détectées (dans le gène S et dans le gène N)
- **Une cible cellulaire** (gène de la bêta-actine) peut être détectée selon le même principe en réalisant un mix spécifique
- Le test utilise la fluorescence d'un intercalant (détection en FAM) et la spécificité des signaux est contrôlée par la réalisation de courbes de fusion juste après l'étape de RT-LAMP
- Le test est réalisé dans des barrettes de 8 tubes et l'amplification et la lecture sont effectuées sur appareil Genie II (logiciel OptiGene d'utilisation aisée)
- Le test comprend trois étapes :
 - Etape de lyse de l'échantillon par une solution d'inactivation (ST1 1X)
 - A partir des prélèvements naso-pharyngés totaux (ainsi que pour les surnageants et échantillons testés) (20µL + 0,2 µL de ST1 1X, concentration finale dans l'échantillon à analyser à 1%)
 - A partir des culots cellulaires après centrifugation de 500µL d'échantillon
 - lavage des culots en PBS
 - reprise des culots dans 20µL de ST1 diluée à 1%
 - Etape d'amplification à partir de 5 µL du lysat précédent
 - Lecture

Mise en œuvre :

- Le test doit normalement être réalisé à partir d'un écouvillonnage naso-pharyngé.
 - Si l'écouvillon naso-pharyngé est déchargé dans un milieu simple (cas le plus fréquent) (sérum physiologique ou milieu de type Amie ou autres milieux salins) l'analyse est réalisable directement à partir de 5µL du milieu.
 - Si l'écouvillon naso-pharyngé a été déchargé dans un milieu plus complexe susceptible d'inhiber la RT-LAMP, la notice du test recommande de réaliser le test sur les culots cellulaires lavés.
- Le CNR a réalisé une évaluation sur les échantillons mentionnés précédemment mais pas directement sur des prélèvements respiratoires.
- Le CIRAD a réalisé, en partenariat avec les autorités sanitaires de la Réunion, une évaluation de la sensibilité de leur test par rapport à la technique RTqPCR de référence du CNR **directement à partir d'écouvillons naso-pharyngés de patients testés dans les deux techniques en parallèle**. Cette évaluation est disponible via le lien : <https://figshare.com/account/home#/projects/94409>

RESULTATS à partir des surnageants de culture virale dilué

Nom de l'échantillon	Evaluation test RUNCOV sur Genie II (logiciel OptiGene)						Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction E-mag; Amplification QS5		
	Résultat	Temps de sortie (min,sec) RT LAMP (N ou S SARS-CoV-2)	Tm (N ou S)	Pics courbes de fusion	Temps de sortie RT- LAMP β- actine	Tm β- actine	Résultat	IP2	IP4
S 10-3	Positif	11,15	84,3	S et N	NR	NR	Positif	23,3	22,6
S 10-4	Positif	14,00	84,3	S et N	NR	NR	Positif	27,6	26,9
S 10-5 (A)	Positif	23,45	nd	S et N faible	NR	NR	Positif	31,2	30,1
S 10-5 (B)	Positif	19,00	84,4	S et N faible	NR	NR			
S 10-5 (C)	Positif	16,45	89,3	S et N	NR	NR			
S 10-5 (D)	Positif	20,45	84,3	S et N faible	NR	NR			
S 10-5 (E)	Positif	17,15	84,4	S et N	NR	NR			
S 10-5 (F)	Positif	15,30	84,4	S et N	NR	NR			
S 10-5 (G)	Positif	15,15	84,4	S et N	NR	NR			
S 10-5 (A) dilué au 1/2	Positif	12,30	83,7	S et N	NR	NR	Positif	33,0	31,1
S 10-5 (B) dilué au 1/2	Positif	16,15	88,7	S faible et N	NR	NR			
S 10-5 (C) dilué au 1/2	Positif	21,30	88,9	N seul	NR	NR			
S 10-5 (D) dilué au 1/2	Positif	19,15	83,7	S seul	NR	NR			
S 10-6 (A)	Négatif	négatif	-	-	NR	NR	Positif	34,8	33,5
S 10-6 (B)	Négatif	négatif	-	-	NR	NR			
S 10-6 (C)	Positif	23,3	ND	N seul	NR	NR			
S 10-6 (D)	Positif	18,45	89,3	N seul	NR	NR			
S 10-6 (E)	Négatif	négatif	-	-	NR	NR			
S 10-6 (F)	Négatif	négatif	-	-	NR	NR			
S 10-6 (G)	Négatif	négatif	-	-	NR	NR			

S 10-6 (A) dilué au 1/2	Positif	18,45	88,8	N seul	NR	NR	Positif	35,5	34,5
S 10-6 (B) dilué au 1/2	Positif	24,15	83,6	S seul	NR	NR			
S 10-6 (C) dilué au 1/2	Négatif	négatif	-	-	NR	NR			
S 10-6 (D) dilué au 1/2	Positif	21,00	83,3	S seul	NR	NR			
S 10-7	Négatif	négatif	-	-	NR	NR	Pos Lim	43,6	39,4
Témoïn négatif	Négatif	négatif	-	-	NR	NR	NR	NR	NR

Abréviations : Pos Lim : Positif en limite de détection, NR : non réalisé, ND : non déterminé

RESULTATS à partir des dilutions d'un échantillon en matrice respiratoire négative

Nom de l'échantillon	Evaluation test RUNCOV sur Genie II (logiciel OptiGene)						Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction E-mag; Amplification QS5		
	Résultat	Temps de sortie (min,sec) RT LAMP (N ou S SARS-CoV-2)	Tm (N ou S)	Pics courbes de fusion	Temps de sortie RT- LAMP β- actine	Tm β- actine	Résultat	IP2	IP4
PO 10-2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Positif	22,6	21,9
PO 10-3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Positif	25,7	25,1
PO 10-4 (A)	Positif	23,30	88,1	N seul	13,45	92,0	Positif	30,3	29,4
PO 10-4 (B)	Positif	24,15	88,3	N seul	13,45	91,9			
PO 10-4 (C)	Positif	19,15	88,4	S faible et N	13,45	91,9			
PO 10-4 (D)	Positif	18,30	88,5	N seul	14,45	91,9			
PO 10-5 (A)	Négatif	négatif	-	-	14,00	91,9	Positif	33,8	32,1
PO 10-5 (B)	Positif	20,45	88,4	S faible et N	14,30	91,9			
PO 10-5 (C)	Positif	23,45	88,3	N seul	14,30	91,8			
PO 10-5 (D)	Négatif	négatif	-	-	14,30	91,8			
PO 10-6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Pos Lim	39,9	36,4
Témoin négatif	Négatif	négatif	-	-	négatif	-	NR	NR	NR

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

RESULTATS à partir des dilutions en matrice respiratoire négative (culots après centrifugation)

Nom de l'échantillon	Evaluation test RUNCOV sur Genie II (logiciel OptiGene)						Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction E-mag; Amplification QS5		
	Résultat	Temps de sortie (min,sec) RT LAMP (N ou S SARS-CoV- 2)	Tm (N ou S)	Pics courbes de fusion	Temps de sortie RT- LAMP β- actine	Tm β- actine	Résultat sur l'échantillon non centrifugé et pas sur le culot*	IP2	IP4
Culot P0 10-2	Positif	9,30	88,6	S faible et N	9,45	91,5	Positif*	22,6*	21,9*
Culot P0 10-3	Positif	15,45	88,6	N seul	11,00	91,8	Positif*	25,7*	25,1*
Culot P0 10-4 A	Positif	18,45	88,6	S faible et N	10,30	91,9	Positif *	29,6*	29*
Culot P0 10-4 B	Négatif	négatif	-	-	9,00	91,9			
Culot P0 10-4 C	Positif	20,15	83,6	S faible et N	10,30	91,9			
Culot P0 10-4 A	Positif	17,30	83,3	S et N	11,00	92,0			
Culot P0 10-4 B	Négatif	négatif	-	-	9,45	91,9			
Culot P0 10-4 C	Négatif	négatif	-	-	10,45	91,9			
Culot P0 10-4 D	Positif	24,00	88,4	N seul	11,15	91,9			
Culot P0 10-5 A	Négatif	négatif	-	-	10,45	91,8	Positif*	33,7*	32,6*
Culot P0 10-5 B	Négatif	négatif	-	-	10,45	91,9			
Culot P0 10-5 C	Négatif	négatif	-	-	11,00	91,9			
Culot P0 10-5 A	Positif	22,45	88,2	-	11,45	91,9			
Culot P0 10-5 B	Négatif	négatif	-	-	11,30	92,0			
Culot P0 10-5 C	Négatif	négatif	-	-	12,00	91,9			
Culot P0 10-5 D	Négatif	négatif	-	-	11,30	92,0			
Culot P0 10-6	Négatif	négatif	-	-	12,00	92,0	Positif*	39,9*	36,4*
Témoïn négatif	Négatif	négatif	-	-	négatif	-	NR	NR	NR

Remarque : * Les Ct indiqués pour la RTqPCR de référence correspondent à l'analyse sur les dilutions en matrice respiratoire avant centrifugation et non sur les culots - Abbrévations : Pos Lim : Positif en limite de détection, NR : non réalisé

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

- pour les dilutions de surnageants de culture virale, détection :
 - o pour les dilutions 10^{-3} à 10^{-6} sur les deux cibles (10^{-6} Ct à 33,5 cible IP4);
 - o pour la dilution 10^{-7} , limite de détection (2 détections sur 3 tests)
- pour les dilutions du prélèvement respiratoire positif:
 - o pour les dilutions 10^{-2} à 10^{-6} sur les deux cibles (10^{-6} Ct en limite de détection à 36,5)

Le test RT-LAMP RUNCOV détecte l'ARN viral du SARS-CoV-2 :

- pour les dilutions des surnageants de culture virale, détection :
 - o pour les dilutions 10^{-3} à 10^{-5} (7 tests) et 10^{-5} au demi (4 tests), l'ensemble des passages testés
 - o pour la dilution 10^{-6} (Ct à 33,5 cible IP4 avec la technique CNR), limite de détection (2 détections sur 7 tests)
 - o pour la dilution 10^{-6} au demi (Ct à 34,5 cible IP4 avec la technique CNR), limite de détection (3 détections sur 4 tests) mais la dilution au demi paraît améliorer la sensibilité, suggérant la présence d'inhibiteur de la RT-LAMP dans le milieu de culture
 - o pour la dilution 10^{-7} : absence de détection
- pour les dilutions du prélèvement positif en matrice respiratoire négative , détection :
 - o pour la dilution 10^{-4} (4 tests), l'ensemble des passages testés
 - o pour la dilution 10^{-5} (Ct à 32,1 cible IP4 technique CNR) détection dans 2 cas sur 4 tests, limite de détection
- pour les culots cellulaires après centrifugation des dilutions du prélèvement positif en matrice respiratoire négative :
 - o pour la dilution 10^{-2} et 10^{-3} ,
 - o pour la dilution 10^{-4} détection dans 4 cas sur 7 tests,
 - o pour la dilution 10^{-5} détection dans 1 cas sur 7 tests, limite de détection

Durée du test : phase de préparation (10 à 25 minutes selon que test directement sur l'échantillon ou sur les culots en cas de milieux complexes), phase d'amplification/annealing/lecture (35 minutes). Plusieurs échantillons sont analysables simultanément.

Le test RT-LAMP RUNCOV présente :

- **une sensibilité légèrement inférieure à celle de la technique de référence CNR IPP**, notamment en raison de la présence d'inhibiteurs de RT-LAMP dans les milieux complexes des échantillons testés. En diluant afin d'éliminer des inhibiteurs potentiels, des échantillons détectés avec des Ct de 34,5 avec la

technique de référence CNR IPP sont détectés dans 3 cas sur 4 avec le test RT-LAMP RUNCOV.

CONCLUSIONS

En résumé, le test RT-LAMP RUNCOV est un **test rapide et très simple à utiliser**. Il s'agit d'un test **LAMP** destiné à être utilisé directement à partir d'écouvillons nasopharyngés. **Le CNR n'a pas évalué ce test directement à partir d'écouvillons nasopharyngés comme recommandé par le fournisseur**. Mais cette évaluation directement sur écouvillons nasopharyngés a été réalisée par le CIRAD : <https://figshare.com/account/home#/projects/94409>

Comme pour les autres tests de RT-LAMP, en cas de signes cliniques évocateurs et de négativité du test, il est recommandé de faire un autre écouvillonnage nasopharyngé qui sera testé par une technique moléculaire type RTqPCR de sensibilité supérieure avant de considérer la négativité du test.

Avec la recommandation mentionnée ci-dessus, 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.