

Résultats d'évaluation de la performance analytique pour la détection du SARS-CoV-2 dans le cadre de l'épidémie de COVID-19

Evaluation réalisée au Laboratoire de virologie de l'hôpital Paul Brousse, CHU Paris-Saclay disposant des automates Alinity m (Abbott Molecular) et QiaSymphony (Qiagen)

Nom du Kit : QIAprep& Viral RNA UM Kit

Automate : QiaSymphony

Fabricant / Fournisseur : Qiagen

Laboratoire Investigateur :

Pr Anne-Marie ROQUE-AFONSO (anne-marie.roque@aphp.fr)

Dr Honorine FENAUX, Dr Lamia LIMAM

Hôpital Paul Brousse, CHU Paris-Saclay

Service de Virologie

12 avenue Paul Vaillant-Couturier

94800 VILLEJUIF

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

L'objectif de l'évaluation est de tester la sensibilité analytique du test QIAprep& Viral RNA UM Kit pour la détection du SARS-CoV-2 par comparaison :

- à la technique de référence utilisée au CNR de Lyon sur des dilutions de culture de virus SARS-CoV-2 à différentes concentrations
- à la technique Alinity m sur des prélèvements positifs et négatifs pour le SARS-CoV-2 (échantillons du CHU Paris Sud frais ou conservés à -80°C)

MATERIELS ET METHODES

Panel d'échantillons testés

- Surnageant de culture de cellules BGM infectées par SARS-CoV-2 (échantillon 715/20) : Dilutions successives en EMEM de 10^{-3} à 10^{-7} , testées avec la technique de référence du CNR à Lyon et envoyées en carboglace au laboratoire de virologie de l'hôpital Paul Brousse
- Echantillons de patients positifs pour le SARS-CoV-2 à différentes concentrations (n=73)
- Echantillons de patients négatifs pour le SARS-CoV-2 (n=7)
- Echantillons de patients négatifs pour le SARS-CoV-2 et positifs pour d'autres virus respiratoires (n=26, dont 8 positifs pour des coronavirus saisonniers)

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)
- RT-PCR : 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 Paul Brousse

- Alinity m (Abbott Molecular) : détection de 2 cibles du SARS-CoV-2 (dans les gènes RdRp et N) et d'un contrôle interne (IC)
- Prélèvement chargé sur l'automate après inactivation du virus en tampon de lyse : 500 µL du milieu de transport du prélèvement et 500 µL de tampon de lyse ; l'automate prélève 500µL pour extraction et amplification
- **Automate en « random access » : avec obtention du 1^{er} résultat en 135 min après pipetage**
- Les deux cibles sont détectées par des sondes marquées par le même fluorophore : une seule courbe d'amplification des cibles est disponible

Technique évaluée : selon la notice du fournisseur

- Principe du test : détection de **2 cibles du SARS-CoV-2** (dans les gènes N1 et N2), d'un **contrôle interne (IC)** et d'un **contrôle cellulaire sur 2 cibles (CC)**
- Technique « en série » avec lyse et distribution des échantillons sur QiaSymphony et amplification sur RotorGeneQ (RGQ)
- Prélèvement chargé sur le QiaSymphony après inactivation du virus : 200µL du milieu de transport du prélèvement incubé 10 min à 70°C
- L'appareil distribue 20 µL de tampon de lyse, ajoute 80 µL d'échantillon inactivé et après une incubation de 2 min, transfère 60 µL dans une plaque d'élution
- Le volume de master mix nécessaire au nombre d'échantillons à tester est préparé au préalable en dehors de l'automate
- L'automate distribue 10µL de mix et 10µL d'échantillon. Après distribution, le disque est scellé et transféré sur RGQ
- La RT PCR dure 1h10 : 3 courbes sont disponibles : 1 courbe commune aux 2 cibles SARS-CoV-2, 1 courbe IC et 1 courbe CC
- La procédure ne prévoyant pas d'extraction, certains milieux de transport de sont pas adaptés. Le fournisseur a évalué les milieux UTM, VTM, PBS, ESwabs®, Virocult™, ou 0.9% NaCl.

RESULTATS

Surnageants de culture virale

Echantillons congelés (dilutions)	Test QIAprep& Viral RNA UM Kit (Qiagen)				Technique de référence PCR IP (Lyon)			Technique de référence Alinitym	
	Résultat	Ct SARS CoV 2	Ct IC	Ct CC	Résultat	IP2	IP4	Résultat	Ct SARS CoV 2
10-4	Positif	25,86	27,40	35,03	Positif	27,6	26,9	NR	
10-4 *	Positif	26,64	30,65	36,31	NR			Positif	24,8
	Positif	25,95	31,01	34,42					
	Positif	26,40	30,80	38,32					
10-5	Positif	28,83	27,92	NEG	Positif	30,6	30,1	NR	
	Positif	28,96	28,00	NEG					
	Positif	28,90	27,70	NEG					
10-5*	Positif	29,93	30,92	39,30	NR			Positif	27,0
	Positif	27,78	30,81	37,49					
	Positif	30,12	30,95	39,70					
10-6 (A)	Positif	32,49	27,84	NEG	Positif	33,8	32,7	NR	
	Positif	31,83	27,43	NEG					
10-6 (B)	Positif	33,14	27,69	NEG	Positif	34,7	33,6	NR	
	Positif	31,89	27,86	NEG					
10-6 (C)	Positif	31,67	27,76	NEG	Positif	NR	NR	NR	
	Positif	33,43	27,92	NEG					
10-6*	Positif	33,20	30,91	NEG	NR			Positif	32,8
	Positif	33,77	30,83	NEG					
	Positif	33,13	30,78	NEG					
10-7 (A)	Positif	36,37	27,89	NEG	Pos Lim	39,6	NEG	NR	
	Positif	34,39	27,85	NEG					
10-7 (B)	Positif	35,25	27,89	NEG	Pos Lim	43,6	39,6	NR	
	Négatif	NEG	27,79	NEG					
10-7 (C)	Négatif	NEG	27,84	NEG	Négatif	NEG	NEG	NR	
	Négatif	NEG	28,11	NEG					
10-7*	Négatif	NEG	30,84	NEG	NR			Pos Lim	38,0
	Positif	37,87	30,80	NEG					
	Positif	38,50	30,78	NEG					

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

*Dilutions réalisées au laboratoire de virologie de l'Hôpital Paul Brousse à partir de la dilution 10⁻³ du CNR.

Echantillons cliniques négatifs

Echantillon	Test QIAprep& Viral RNA UM Kit (Qiagen)				Technique de référence Alinitym		Type d'échantillon
	Résultat	Ct SARS CoV 2	Ct IC	Ct sample control	Résultat	Ct SARS CoV 2	
201108621901	Négatif	NEG	23,93	25,97	Négatif	NEG	frais
201108622601	Négatif	NEG	24,33	26,34	Négatif	NEG	frais
201108623401	Négatif	NEG	23,4	26,37	Négatif	NEG	frais
962010099482	Négatif	NEG	28,06	28,06	Négatif	NEG	congelé
962010099503	Négatif	NEG	30,39	30,39	Négatif	NEG	congelé
962010099488	Ininterprétable*	NEG	NEG	NEG*	Négatif	NEG	congelé
962010099484	Ininterprétable*	NEG	NEG	NEG*	Négatif	NEG	congelé

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

Echantillons cliniques négatifs en SARS-CoV-2 mais positifs pour d'autres virus respiratoires

Echantillon	Test QIAprep& Viral RNA UM Kit (Qiagen)				Type d'échantillon	Commentaire
	Résultat	Ct SARS CoV 2	Ct IC	Ct sample control		
962012027766	Négatif	NEG	31,87	26,52	congelé	ADV
962012023018	Négatif	NEG	31,96	24,78	congelé	ADV
962012053311	Négatif	NEG	31,55	22,71	congelé	COV NL63, ADV, HRV
962012045317	Négatif	NEG	31,04	24,03	congelé	COV 229E
962011083702	Négatif	NEG	32,25	24,83	congelé	COV 229E
962003008519	Négatif	NEG	30,90	26,89	congelé	COV HKU1
962003003995	Négatif	NEG	31,32	25,99	congelé	COV HKU1
962010109196	Négatif	NEG	31,57	NEG**	EEQ QCMD congelé	COV NL63
962012002347	Négatif	NEG	31,60	23,81	congelé	COV OC43
962010109194	Négatif	NEG	31,47	NEG**	EEQ QCMD congelé	COV OC43
962012070758	Négatif	NEG	30,87	24,66	congelé	MPV
962012063442	Négatif	NEG	31,14	29,82	congelé	MPV
962012001395	Négatif	NEG	31,22	28,25	congelé	HRV
962011028080	Négatif	NEG	32,35	23,75	congelé	HRV, INF B, PIV3
962003008793	Négatif	NEG	32,07	22,83	congelé	INF A H3
962010109180	Négatif	NEG	31,39	NEG**	EEQ QCMD congelé	INF A H3
962010109176	Négatif	NEG	30,95	NEG**	EEQ QCMD congelé	INF A H3
962002050882	Négatif	NEG	30,98	30,82	congelé	INF B
962011048243	Négatif	NEG	33,85	26,58	congelé	PIV1
962011046446	Négatif	NEG	32,37	23,48	congelé	PIV2
962009083133	Négatif	NEG	31,26	23,25	congelé	PIV2, HRV
962012023042	Négatif	NEG	31,30	26,48	congelé	PIV3
962010047886	Négatif	NEG	31,95	23,89	congelé	PIV4
962009100428	Négatif	NEG	33,11	19,11	congelé	PIV4
962012074475	Négatif	NEG	31,07	26,22	congelé	VRS
962012106171	Négatif	NEG	31,53	24,46	congelé	VRS, HRV

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

***Echantillon en milieu de transport Lingen, non compatible avec ces techniques sans extraction**

**échantillons QCMD : dilutions de surnageants de culture, contrôle cellulaire non détecté

Echantillons cliniques positifs

Echantillon	Test QIAprep& Viral RNA UM Kit (Qiagen)				Technique de référence Alinitym		Type d'échantillon
	Résultat	Ct SARS CoV 2	Ct IC	Ct sample control	Résultat	Ct SARS CoV 2	
962101008278	Positif	13,56	33,30	23,07	Positif	11,47	congelé
962012101673	Positif	21,59	31,25	28,53	Positif	11,98	congelé
962011003643	Positif	17,37	31,72	24,41	Positif	12,35	congelé
962010104278	Positif	15,93	NEG	NEG	Positif	12,50	congelé
201010939501	Positif	13,93	28,66	28,66	Positif	14,25	congelé
962101002912	Positif	16,93	32,55	26,14	Positif	15,60	congelé
962012105749	Positif	16,26	32,03	25,2	Positif	15,60	congelé
962101002461	Positif	19,33	31,57	28,43	Positif	16,07	congelé
962011005904	Positif	22,14	27,58	27,58	Positif	16,47	congelé
962012106578	Positif	20,62	31,72	27,31	Positif	16,58	congelé
962101008292	Positif	18,14	31,28	25,34	Positif	17,07	congelé
962012106581	Positif	19,07	31,38	26,87	Positif	17,10	congelé
962101008289	Positif	17,40	31,52	26,67	Positif	17,26	congelé
962010108907	Positif	21,76	27,36	27,36	Positif	17,33	congelé
962101007453	Positif	20,71	31,6	30,77	Positif	17,86	congelé
962011019045	Positif	17,52	27,94	27,94	Positif	18,26	congelé
201109031101	Positif	18,91	25,45	26,89	Positif	18,82	frais
201108622801	Positif	18,57	23,67	25,23	Positif	19,02	frais
201100371902	Positif	17,65	28,23	28,23	Positif	19,09	congelé
201109030601	Positif	19,59	25,48	27,85	Positif	19,22	frais
962101010734	Positif	19,23	31,81	25,75	Positif	19,31	congelé
201108923301	Positif	18,30	25,83	27,09	Positif	20,09	frais
201010396101	Positif	28,38	29,55	29,55	Positif	20,59	congelé
962101002746	Positif	22,54	30,67	26,88	Positif	20,93	congelé
201108844301	Positif	20,67	25,54	26,12	Positif	21,38	frais
962010097770	Positif	21,81	28,96	28,96	Positif	21,93	congelé
962011013749	Positif	30,42	28,17	28,17	Positif	21,93	congelé
962101002687	Positif	22,79	31,68	30,68	Positif	21,98	congelé
201010364601	Positif	30,93	28,21	28,21	Positif	23,21	congelé
962101011320	Positif	24,73	31,54	23,47	Positif	23,96	congelé
962010091924	Positif	23,46	27,82	27,82	Positif	24,33	congelé
962101002438	Positif	26,30	31,33	31,27	Positif	24,65	congelé
962010093445	Positif	24,12	27,56	27,56	Positif	25,34	congelé
962101008664	Positif	29,69	31,04	26,35	Positif	25,86	congelé
962101009193	Positif	33,81	30,85	28,09	Positif	26,49	congelé
201108844902	Positif	25,89	25,77	22,81	Positif	26,67	frais
201011019601	Positif	25,14	27,77	27,77	Positif	27,34	congelé
962010104069	Positif	26,34	27,91	27,91	Positif	27,89	congelé
962010110178	Positif	27,18	30,06	30,06	Positif	27,89	congelé
201108646601	Positif	28,34	25,85	29,47	Positif	27,89	frais
962101002362	Positif	30,27	31,67	29,04	Positif	28,23	congelé

Echantillons cliniques positifs (suite)

Echantillon	Test QIAprep& Viral RNA UM Kit (Qiagen)				Technique de référence Alinitym		Type d'échantillon
	Résultat	Ct SARS CoV 2	Ct IC	Ct sample control	Résultat	Ct SARS CoV 2	
962010100103	Positif	30,59	27,88	27,88	Positif	30,61	congelé
201108408301	Positif	36,68	25,77	27,91	Positif	30,73	frais
201100360301	Positif	21,59	30,83	30,83	Positif	31,13	congelé
962101007437	Positif	31,97	31,24	29,70	Positif	31,56	congelé
962012105261	Ininterprétable	NEG	NEG	NEG*	Positif	32,29	congelé
201108918801	Positif	32,58	26,37	28,90	Positif	32,66	frais
201108620901	Positif	30,95	24,03	27,46	Positif	32,90	frais
962011009162	Positif	32,89	28,97	28,97	Positif	32,98	congelé
201109006801	Positif	31,65	24,13	27,37	Positif	33,75	frais
201108953301	Positif	31,60	25,67	25,73	Positif	34,12	frais
962010095888	Négatif	NEG	28,77	28,77	Positif	34,23	congelé
962011020713	Négatif	NEG	28,46	28,46	Positif	34,39	congelé
962011012772	Positif	30,78	28,33	28,33	Positif	34,89	congelé
962011009058	Positif	32,84	28,22	28,22	Positif	35,43	congelé
962012106519	Positif	33,09	30,90	25,99	Positif	35,46	congelé
201109011701	Positif	31,81	24,71	28,29	Positif	35,49	frais
201108618501	Positif	35,17	24,13	25,54	Positif	35,55	frais
201108592901	Négatif	NEG	21,87	20,98	Positif	35,76	frais
201010182301	Négatif	NEG	27,82	27,82	Positif	35,79	congelé
201010604501	Positif	32,60	28,09	28,09	Positif	35,85	congelé
962010104497	Ininterprétable	NEG	NEG	NEG*	Pos Lim	36,37	congelé
962101007447	Positif	34,18	31,66	27,34	Pos Lim	36,49	congelé
962012103494	Négatif	NEG	31,05	29,02	Pos Lim	36,93	congelé
962010106095	Positif	30,20	27,56	27,56	Pos Lim	37,15	congelé
201108828001	Positif	34,25	26,01	25,22	Pos Lim	37,52	frais
201108933101	Négatif	NEG	26,44	27,86	Pos Lim	37,89	frais
962011018569	Négatif	NEG	28,06	28,06	Pos Lim	38,22	congelé
962012104805	Négatif	NEG	31,76	24,33	Pos Lim	38,37	congelé
201108851401	Négatif	NEG	24,98	22,25	Pos Lim	39,01	frais
962011005582	Négatif	NEG	27,97	27,97	Pos Lim	39,02	congelé
201108860301	Ininterprétable	NEG	NEG	NEG*	Pos Lim	39,09	frais
201108860801	Négatif	NEG	25,95	29,81	Pos Lim	40,75	frais

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

*Echantillon en milieu de transport Lingen, non compatible avec ces techniques sans extraction

Synthèse des résultats

Surnageants de culture

Les dilutions 10^{-4} à 10^{-6} des surnageants de culture virale en EMEM, sont toutes détectées par la technique de référence du CNR et par le test QIAprep& Viral RNA UM Kit

La dilution 10^{-7} constitue la limite de détection de ces techniques (positif limite).

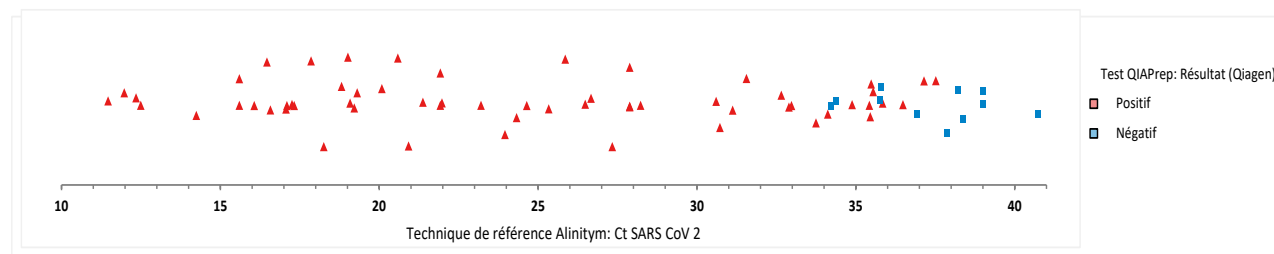
- CNR : détection d'une cible sur deux, des 2 cibles à des Ct élevés ou non détection
- Test QIAprep& Viral RNA UM Kit : détection de 5/9 réplicats; le contrôle cellulaire n'est pas détecté au-delà de la dilution 10^{-4}
- Test Alinity m : détection avec un Ct à 38

Dans les échantillons positifs ou positifs limite (positif faible si $Ct > 36$) en technique Alinity m, le test QIAprep& Viral RNA UM Kit est ininterprétable (non détection du contrôle cellulaire et/ou du contrôle interne) dans 3/73 échantillons : nature du milieu de transport non adaptée.

Pour les 70 échantillons interprétables, le test QIAprep& Viral RNA UM Kit est :

- positif pour 49/49 échantillons ayant un $Ct \leq 34$ en Alinity m
- positif pour 10/16 échantillons ayant un Ct compris entre 34 et 38 en Alinity m
- négatif pour 5/5 échantillons ayant un $Ct > 38$ en Alinity m

La répartition des résultats QIAprep& Viral RNA UM Kit positifs (en rouge) et négatifs (en bleu) selon le Ct obtenu en Alinity m, pour les 70 échantillons est présentée ci-dessous :



En conclusion

Le test QIAprep& Viral RNA UM Kit présente une sensibilité similaire à la technique de référence CNR et une sensibilité inférieure à la technique Alinity m mais qui est acceptable avec détection de tous les échantillons ayant un $Ct < 34$ et de plus de la moitié des échantillons ayant un Ct compris entre 34 et 38 avec la technique Alinity m.

Le test est facile d'utilisation pour les techniciens familiers du Qiasymphony. L'automatisation sécurise tout le processus analytique, 72 résultats peuvent être obtenus en moins de 5h. La prise d'essai est faible ($200\mu\text{L}$) et permet d'effectuer des repasses éventuelles.

Le test demande peu de consommables et de réactifs et notamment, pas de réactifs d'extraction.

Le milieu de transport utilisé est critique pour la réalisation de la technique. La présence des 2 contrôles analytiques garantit que des faux négatifs pour raisons pré-analytiques ne sont pas rendus.