

Résultats d'évaluation de la performance en 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

Société BforCure

Dispositif : Chronos™Dx et logiciel Ananke™

Nom du Kit : Novel Coronavirus (2019-nCoV) Sansure Biotech (Ref S3102E)

Fournisseur : Sansure Biotech

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

Correspondants

Mme Amélie DUBOIS (amelie.dubois@bforcure.com)

BforCure - 14, rue de la Beaune, 93100 Montreuil -

OBJECTIFS

L'objectif de l'évaluation est de tester la sensibilité analytique du test mentionné ci-dessus (kit de Sansure Biotech) utilisant le dispositif Chronos™Dx, pour la détection du SARS-CoV-2 par comparaison de la technique maison de référence utilisée au CNR de Lyon, à partir d'échantillons respiratoires positifs ou négatifs pour le SARS-CoV-2.

MATERIELS ET METHODES

Panel d'échantillons testés

- Echantillons respiratoires (écouvillons naso-pharyngés) de patients positifs ou négatifs pour le SARS-CoV-2 (16 positifs, 1 négatif)
- Nous n'avons testé aucun prélèvement visqueux.

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) avec un mix de deux sondes IP4 afin de détecter d'éventuels variants (cf https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2021/04/Modif_IP4_probe_Update_CNRVIR210406_VE.pdf)

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 :

La société BforCure a développé un test moléculaire rapide combinant le kit SANSURE Biotech d'une part et le dispositif Chronos™Dx qui utilise le principe de la microfluidique permettant de réaliser des changements de température très rapidement (durée de la RTqPCR de 15 minutes)

- le test est très simple à utiliser et inclut une étape d'extraction des acides nucléiques
 - il détecte 2 cibles du SARS-CoV-2 :
 - o cible dans le **gène orf1ab** (spécifique SARS-CoV-2) et
 - o cible dans le **gène N** (spécifique SARS-CoV-2)
- ainsi qu'un **contrôle cellulaire (gène RNase P)**

Mise en œuvre :

En amont du test, préparation d'une solution mère de mix RT-PCR à partir des réactifs du kit Sansure (Réf S3102 E) (48 Tests/kit) (PCR mix, Enzyme Mix et eau nucléase free) et réalisation de 96 aliquots de 24 µL de ce mix PCR conservés 2 semaines maximum à -20°C.

Manipulation sous PSM (L2)

- 1. Prélever 200 µl du tampon de transport dans lequel l'écouvillon a été déchargé après l'avoir vortexé et l'ajouter dans un tube conique type Eppendorf™ de 1,5 mL
- 2. Centrifuger pendant 2 min à 12500 rpm à RT
- 3. Prélever le surnageant du côté opposé du « culot » (jeter le surnageant dans une poubelle DASRI) et y ajouter 50 µl de tampon de lyse Sansure™ sur le culot
- 4. Vortexer centrifuger 10 secondes
- 5. Prélever 1 µl du lysat et l'ajouter dans le tube unitaire de mix PCR (volume final de 25 µl)
- 6. Vortexer centrifuger pendant 2-3 secondes
- 7. Dépôt dans la puce de réaction Chronos™Dx sans bulles d'air et scellage sans faire de plis

Le programme de PCR est déjà codé dans une méthode de l'automate Chronos™Dx. Il consiste en une étape de 30 s à 50°C, de transcription inverse ; une étape de 1 min à 98°C de dénaturation de l'échantillon et d'activation de la polymérase ; puis 45 cycles composés d'une étape de 15 s à 60°C suivie d'une étape de 3 s à 98°C.

Remarque :

- Le dispositif Chronos™Dx est un système PCR unitaire permettant le diagnostic d'un échantillon à la fois (puce à une chambre réactionnelle actuellement disponible ; puce à 4 chambres réactionnelles en cours de développement).

RESULTATS

Numéro ECHANTILLON	Test de BforCure (Sansure Biotech et Dispositif Chronos™Dx)				Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction Emag; Amplification QS5			Type d'échantillon
	Résultat	cible ORF1ab (Ct)	cible N (Ct)	contrôle RNase P (Ct)	Résultat	IP2	IP4	
380/2021	Positif	27,85	24,21	32,96	Positif	17,51	17,84	écouvillon naso-pharyngé
321/2021	Positif	30,72	26,78	28,9	Positif	20,34	19,17	écouvillon naso-pharyngé
21-522/0010	Positif	27,96	25,48	30,39	Positif	19,80	19,77	écouvillon naso-pharyngé
365/2021	Positif	32,67	30,07	36,32	Positif	23,38	22,98	écouvillon naso-pharyngé
21-505/0006	Positif	33,06	28,69	32,09	Positif	23,91	23,66	écouvillon naso-pharyngé
144/2021	Positif	35,16	31,58	32,8	Positif	24,44	24,02	écouvillon naso-pharyngé
21-521/0041	Positif	Négatif	31,87	27,28	Positif	26,10	25,81	écouvillon naso-pharyngé
21-530/0078	Positif	35,05	32,8	29,96	Positif	26,79	26,44	écouvillon naso-pharyngé
21-533/0082	Positif	30,62	33,86	34,61	Positif	29,59	29,24	écouvillon naso-pharyngé
21-505/0041	Positif	Négatif	33,35	34,62	Positif	30,81	30,64	écouvillon naso-pharyngé
21-534/0087	Positif	30,32	32,25	30,09	Positif	30,98	31,48	écouvillon naso-pharyngé
364/2021	Positif	32,52	34,95	29,58	Positif	32,39	31,88	écouvillon naso-pharyngé
21-505/0057	Négatif	Négatif	Négatif	29,89	Positif	32,97	32,96	écouvillon naso-pharyngé
21-533/0046	Positif	Négatif	34,08	29,88	Positif	33,75	34,06	écouvillon naso-pharyngé
21-528/0029	Négatif	Négatif	Négatif	31,18	Positif	35,67	35,81	écouvillon naso-pharyngé
21-533/0093	Négatif	Négatif	NA	29,17	Positif Lim	36,46	36,35	écouvillon naso-pharyngé
388/2021	Négatif	NA	NA	30,79	Négatif	neg	neg	écouvillon naso-pharyngé

Les conditions d'utilisation sont celles mentionnées ci-dessus. Nous avons testé seulement des échantillons cliniques (et pas de surnageant de culture de virus sans cellules) afin **d'avoir des culots cellulaires avant lyse** par le tampon de lyse du kit Sansure.

Nous n'avons pas testé de prélèvements visqueux dans la présente évaluation.

Le test NOVEL CORONAVIRUS (2019-nCoV) Sansure Biotech utilisé avec le dispositif Chronos™Dx était valide avec une détection du gène cellulaire de la RNaseP pour tous des échantillons testés.

Globalement on observe comme attendu, une différence de sensibilité entre les deux cibles du kit SANSURE, la cible N étant la plus sensible. Sur 13 échantillons détectés positifs, 3 sont positifs seulement sur la cible N et négatifs sur la cible ORF1ab.

On observe un défaut de détection par rapport à la technique de référence pour 3 échantillons sur 16, ces 3 échantillons étant détectés avec un Ct de 32,96 ; 35,81 ; et 36,35 avec la technique de référence. On a donc un possible défaut de sensibilité pour des échantillons détectés positifs à partir d'un Ct de 33 avec la technique de référence.

Le test Novel Coronavirus (2019-nCoV) Sansure Biotech adapté sur le dispositif Chronos™Dx par la société BForCURE présente :

- une sensibilité inférieure à celle de la technique de référence CNR IPP (testée à Lyon) avec un possible défaut de détection pour les prélèvements respiratoires modérément ou faiblement positifs (Ct \geq 33) ;

Le test est facile d'utilisation et la RT-PCR dure 15 minutes (sans compter environ 5 minutes nécessaires à la préparation de l'échantillon) permettant un diagnostic rapide de l'échantillon testé.

CONCLUSIONS

En résumé, le test Novel Coronavirus (2019-nCoV) Sansure Biotech adapté sur le dispositif Chronos™Dx par la société BforCure est un test très simple à utiliser destiné à être utilisé en laboratoire directement à partir d'écouillons naso-pharyngés pour des rendus de résultats en urgence ou dans le cadre de dépistage délocalisé.

En cas de signes cliniques évocateurs et de négativité du test, il est recommandé de faire un autre écouvillonnage naso-pharyngé 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.