



## Procédure de l'OMSA pour l'enregistrement des kits de diagnostic Résumé des études de validation

**Nom du kit de diagnostic :** BIONOTE® Kit de test rapide MERS-CoV Ag

**Fabricant :** BioNote, Inc.

**Numéro de la demande/approbation :** 20160212

**Date d'enregistrement :** mai 2016

**Date de renouvellement :** mai 2023

**Maladie :** syndrome respiratoire du Moyen-Orient

**Agent pathogène :** coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient

**Type d'épreuve :** essai immunochromatographique

**Objectifs du test :** certifié par l'OMSA pour la détection qualitative directe de la présence d'antigènes du coronavirus responsable du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) dans des écouvillons nasaux prélevés sur le dromadaire et pour les emplois suivants :

- Détection de troupeaux infectés par le MERS-CoV (dépistage à l'échelle du troupeau) dont les animaux présentent une infection aiguë avec une forte charge virale ;
- En tant qu'épreuve complémentaire, l'estimation de la prévalence de l'infection pour les besoins de l'analyse du risque (par ex., enquêtes, programmes sanitaires à l'échelle des troupeaux et programmes de lutte contre les maladies).

**Espèce et type d'échantillons :** écouvillons nasaux prélevés sur le dromadaire

### 1. Information sur le kit

Veuillez consulter la notice du kit disponible sur la page Web du Registre de l'OMSA ou contactez le fabricant à l'adresse suivante :

Site web : [www.bionote.co.kr](http://www.bionote.co.kr)

Courriel : [bionote@bionote.co.kr](mailto:bionote@bionote.co.kr)

### 2. Résumé des études de validation

#### **Spécificité analytique**

**Conclusion :** Le kit BRM ne présente pas de réactivité croisée avec les coronavirus du chameau (DcCoV UAE-HKU23), le COVID-19 (SARS-CoV-2) ni avec d'autres coronavirus (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, RbCoV HKU14, Ty-Bat CoV HKU4).

**Tableau 1. Spécificité analytique**

Virus		Résultat du kit BRM	
Coronavirus alpha	Coronavirus humain 229E (HCoV-229E)	Négatif	
	Coronavirus humain NL63 (HCoV-NL63)	Négatif	
Coronavirus bêta	Embecovirus	Coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43)	Négatif
		Coronavirus du lapin HKU14 (RbCoV HKU14)	Négatif
		Coronavirus du dromadaire UAE-HKU23 (DcCoV UAE-HKU23)	Négatif
	Sarbecovirus	Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2)	Négatif
		Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)	Positif
	Merbecovirus	Coronavirus du chiroptère <i>Tylonycteris</i> HKU4 (Ty-Bat CoV HKU4)	Négatif

### **Sensibilité analytique**

#### **Conclusion :**

Expérience 1. Le test BIONOTE® Rapid MERS-CoV Ag Test Kit (en abrégé, BRM) détecte jusqu'à 3,125 ng/ml d'antigène recombinant de la nucléocapside du MERS CoV.

Expérience 2. Des écouvillons nasaux de dromadaires négatifs, prélevés au Central Veterinary Research Laboratory (CVRL) de Dubaï (Émirats arabes unis), et le liquide de culture du MERS-CoV ont été utilisés pour le test de limite de détection. Le liquide de culture du MERS-CoV a fait l'objet de deux dilutions successives et a été testé par RT-PCR en temps réel ciblant simultanément l'UpE et l'Orf1b (Corman *et al.*, 2012). Dans les expériences réalisées avec du liquide de culture MERS-CoV, le kit BRM détecte jusqu'à  $1,63 \times 10^2$  DICT<sub>50</sub>/ml, ce qui correspond à une valeur de seuil du cycle (Ct) de 32,51 pour la cible UpE et de 34,93 pour la cible ORF1b, d'après les analyses moléculaires réalisées en parallèle.

#### **Répétabilité**

La variation dans un même cycle a été évaluée sur quatre copies de 5 échantillons internes (un échantillon fort, un échantillon moyen, un échantillon faible et deux échantillons négatifs) lors de quatre cycles avec un même opérateur. La variation d'un cycle à l'autre a été évaluée sur trois copies de 5 échantillons internes lors de 30 cycles effectués par 3 opérateurs à des jours différents. La variation entre lots a été évaluée sur 5 échantillons internes utilisés par un opérateur le même jour.

**Conclusion :** Toutes les valeurs du CV étaient inférieures à 5 % pour les variations dans un même cycle, d'un cycle à l'autre et entre lots.

#### **Caractéristiques diagnostiques**

Détermination des seuils, et estimations de la sensibilité diagnostique (SeD) et de la spécificité diagnostique (SpD) :

**Conclusion :** Le kit BIONOTE® Rapid MERS-CoV Ag Test Kit est un essai qualitatif. La présence de la ligne violette à la fois sur la position « contrôle » (C) et « test » (T) détermine le seuil. L'échantillon testé est positif lorsque deux lignes s'affichent (sur C et sur T) et négatif lorsqu'une seule ligne s'affiche (sur C). Les lignes sont le résultat d'une réaction immunitaire entre le conjugué d'or et les analytes cibles. Le conjugué d'or est composé d'or colloïdal et d'anticorps anti-CoV MERS. Le seuil déterminé par la sensibilité analytique correspond à  $10^5$  DICT<sub>50</sub> (dose infectant 50 % des cultures tissulaires).

**Tableau 2a. Estimations de la sensibilité diagnostique (SeD) relative et de la spécificité diagnostique (SpD) relative**

Méthode d'essai évaluée		Espèces cibles
Sensibilité diagnostique	N	(66)
	SeD	(93,9 %)
	IC	(85,20-98,32 %)
Spécificité diagnostique	N	(523)
	SpD	(99,6 %)
	IC	(98,63-99,95 %)

**Tableau 2b. Tableau croisé des SeD et des SpD**

Résumé		RT-PCR en temps réel UpE et Orf1A		Total
		POS	NEG	
<b>Kit BRM</b>	POS	62	2	64
	NEG	4	521	525
<b>Total</b>		66	523	589

## Reproductibilité

### Reproductibilité analytique

La reproductibilité a été évaluée dans trois laboratoires différents en utilisant un panel de référence codé en aveugle. Les panels ont été testés en utilisant trois lots différents lors de 21 passages dans 3 laboratoires différents avec l'intervention d'un opérateur par jour pendant trois jours. Chaque laboratoire a utilisé des panels de référence positifs et négatifs les trois jours du test.

**Conclusion** : Les CV de la reproductibilité de l'essai entre laboratoires se situent entre 3 et 11 %.

### Reproductibilité diagnostique

L'objectif de cette étude comparative inter-laboratoire était de déterminer la reproductibilité de la PCR en temps réel et du kit BRM pour la détection du MERS-CoV dans des échantillons d'écouillons nasaux de terrain prélevés dans des milieux de transport et testés dans les trois laboratoires participants.

**[date du test]** : octobre 2015

**[site du test]** : **Trois laboratoires ont participé au test comparatif inter-laboratoires du kit BRM.** (Les participants ont également réalisé avec les échantillons une PCR en temps réel, dont les résultats sont présentés ici à titre d'information.)

#### 1. Abu Dhabi Food Control Authority (ADFCA)

Lieu : Émirats arabes unis  
 Ville : Abou Dhabi  
 Niveau d'expertise : technicien hautement qualifié  
 Statut au regard de l'accréditation : Certifié ISO 17025

#### 2. King Faisal University Laboratory (KFU)

Lieu : Arabie saoudite  
 Ville : Al-Hasa  
 Niveau d'expertise : technicien hautement qualifié  
 Statut au regard de l'accréditation : Certifié ISO 17025

### 3. Molecular Biology & Genetics laboratories (MBG)

Lieu : Émirats arabes unis

Ville : Dubaï

Niveau d'expertise : technicien hautement qualifié

Statut au regard de l'accréditation : Certifié ISO 17025

#### [matériels]

##### 1. Information sur le panel du test

Le panel était constitué de 6 échantillons positifs et 4 échantillons négatifs. Les échantillons ont été préparés à partir de prélèvements dont l'histoire était connue. Les échantillons ont été fractionnés en portions aliquotes de 300 µl conservées dans des flacons de 2 ml. Les échantillons à analyser ont été préparés à partir d'écouvillons nasaux de chameaux positifs et négatifs au MERS.

##### 2. Conditions d'expédition

Les échantillons ont été expédiés aux laboratoires participants en octobre 2015. Chaque participant a reçu une boîte contenant le matériel de test (dix flacons de 2 ml contenant 300 µl de chaque échantillon).

Les échantillons ont été congelés et expédiés aux laboratoires dans de la glace sèche.

#### [résultat]

##### BIONOTE® Rapid MERS-CoV Ag Test Kit

Chaque laboratoire a analysé les échantillons à l'aide du kit BRM et d'une PCR en temps réel. Le Tableau 3 ci-dessous montre les résultats obtenus avec le kit BRM dans les trois laboratoires participants.

**Tableau 3. Résultats obtenus avec le kit BRM dans les trois laboratoires participants**

N° échantillon	Résultats attendus (originaux)	KFU, Arabie saoudite	Lab. MBG	VLD – ADFCA
1	Positif	Positif	Positif	Positif
2	Positif	Positif	Positif	Positif
3	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
4	Positif	Positif	Faiblement positif	Positif
5	Positif	Positif	Faiblement positif	Positif
6	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
7	Positif	Positif	Positif	Positif
8	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
9	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
10	Positif	Positif	Positif	Positif

##### PCR en temps réel

Les trois laboratoires participants ont également soumis les échantillons à une PCR en temps réel. Les résultats de la PCR en temps réel de l'ADFCA (Abu Dhabi, EAU) reposent sur la détection de l'upE et sur le kit Roche MERS-CoV qPCR ciblant le gène Orf 1a. Les résultats de la PCR en temps réel du KFU (Arabie saoudite) reposent sur la détection de l'upE et sur le kit CDC MERS-CoV qPCR ciblant le gène N2. Les résultats de la PCR en temps réel du laboratoire MGB (Dubaï, EAU) reposent sur le calcul de la valeur maximale de la dérivée seconde. Le Tableau 4 présente les résultats qualitatifs et quantitatifs des PCR en temps réel obtenus par les laboratoires participants.

Les résultats « pas de Ct » ont été considérés comme clairement négatifs. Pour les valeurs de Ct supérieures à 35, chaque laboratoire a donné une interprétation différente ; si d'autres PCR étaient réalisées, les interprétations étaient faites en même temps que les résultats. Étant donné que d'après le CDC, les échantillons positifs au MERS CoV doivent donner un résultat positif pour deux cibles génétiques distinctes (par exemple upE et N2, ou N2 et N3, ou upE et N3, etc.), les deux cibles doivent être positives pour que le résultat soit interprété comme positif.

**Tableau 4. Résultats des PCR en temps réel dans les trois laboratoires participants**

N° d'échantillon	KFU, Arabie saoudite			Lab. MBG		VLD- ADFCA		
	Résultat PCR en temps réel	Valeur de Ct upE	Valeur de Ct N2	Résultat PCR en temps réel	Valeur maximale de la dérivée seconde	Résultat PCR	Valeur de Ct upE	Valeur de Ct ORF1a
1	Positif	21,33	16,65	Positif	19,59	Positif	23,65	24,1
2	Positif	16,01	15,97	Positif	19,61	Positif	23,34	23,84
3	Négatif	Pas de Ct	Pas de Ct	Non concluant**	>35	Négatif	Pas de Ct	Pas de Ct
4	Positif	19,95	18,16	Positif	21,2	Positif	24,8	24,68
5	Positif	25,9	19,03	Positif	21,15	Positif	24,89	24,51
6	Négatif	Pas de Ct	Pas de Ct	Non concluant**	>35	Négatif	Pas de Ct	Pas de Ct
7	Positif	20,06	19,86	Positif	19,22	Positif	23,16	23,26
8	Négatif	Pas de Ct	Pas de Ct	Non concluant**	>35	Négatif	Pas de Ct	Pas de Ct
9	Négatif	Pas de Ct	39,95*	Non concluant**	>35	Négatif	Pas de Ct	Pas de Ct
10	Positif	22,16	18,95	Positif	20,84	Positif	24	23,87

\* Sur l'échantillon 9, la valeur de Ct était de 39,95 avec une PCRq ciblant N2 ; aucune valeur de Ct n'ayant été obtenue avec la PCRq ciblant upE, le KFU a considéré cet échantillon comme négatif.

\*\*La valeur de Ct obtenue dans le laboratoire MBG était de 35 ; toute amplification nécessitant plus de 35 cycles est considérée comme non concluante.

#### [conclusion]

Les tests comparatifs inter-laboratoires du kit BRM avec un panel composé de 6 échantillons positifs au MERS-Cov et de 4 échantillons négatifs au MERS-Cov dans 3 laboratoires différents ont montré une concordance de 100 % des résultats du kit BRM en prenant comme tests de référence les essais moléculaires du KFU et du VLD. Les résultats de l'essai réalisé au MGB ont été exclus de l'analyse car aucun résultat négatif n'avait été obtenu lors de cet essai.

#### Analyses supplémentaires

Des tests supplémentaires ont été effectués sur les échantillons enrichis de 12 écouvillons nasaux positifs et de 18 écouvillons nasaux négatifs de chameaux, à l'aide du kit BRM, d'une RT-PCR pour le MERS-CoV, d'une PCR en temps réel pour le MERS-CoV et d'une PCR en temps réel pour le DcCoV UAE-HKU23. La spécificité et la sensibilité relatives du kit antigénique rapide par rapport à la qPCR étaient respectivement de 100 % (18/18) et de 91,7 % (11/12) (Lau, Susanna Kar-Pui, *et al.*, 2022).

**Tableau 5. Tableau croisé**

		PCR en temps réel gène N du MERS-CoV		
		Positif	Négatif	Total
Kit Rapide Ag MERS-CoV	Positif	11	0	11
	Négatif	1	18	19
	Total	12	18	30
Sensibilité		91,7 %		
Spécificité		100 %		

## Conclusion

Le kit BRM se révèle moins sensible que les tests PCR en temps réel. Les échantillons dont la charge virale est inférieure à la limite de détection du kit BRM vont probablement donner un résultat négatif au kit BRM. Il est généralement reconnu que les tests antigéniques présentent une sensibilité moindre que les PCR en temps réel. Les dromadaires infectés par le MERS-CoV-2 sont excréteurs d'ARN viral en faible quantité pendant une période prolongée (plusieurs semaines). Toutefois, le virus infectieux n'est généralement détectable que pendant la première semaine suivant l'infection (Adney *et al.*, EID 2014).

En résumé, le kit BRM est capable de détecter un échantillon positif avec une charge virale élevée : il peut donc servir de test de dépistage pour une identification rapide des dromadaires fortement contagieux, afin de prendre en temps opportun les mesures appropriées de gestion des risques (par exemple, la quarantaine). Étant donné que ce test antigénique pourrait ne pas détecter des chameaux infectés par le MERS-CoV et présentant une faible charge virale (par exemple, ceux qui viennent de contracter l'infection), un résultat négatif ne permet pas d'exclure complètement l'infection par le MERS-CoV. **La fenêtre de détection estimée du test BIONOTE est de 1 à 7 jours (par opposition à celle de la PCR en temps réel, qui est de 1 à 35 jours).** Les échantillons prélevés après ce délai donneront probablement des résultats négatifs au test BIONOTE (voir aussi le protocole détaillé relatif à l'échantillonnage, au stockage et au transport des prélèvements dans les informations sur le kit).

Lors de la réalisation du test, il convient de suivre l'algorithme de diagnostic fourni dans le mode d'emploi du kit BRM. En cas de résultat négatif du test sur un animal présentant des signes cliniques, des examens complémentaires devront être réalisés. Un tel résultat peut s'expliquer par une charge virale faible, inférieure à la limite de détection du test antigénique rapide. Il conviendra dans ce cas d'effectuer des investigations complémentaires, dont un nouveau test sur les chameaux négatifs à des intervalles de 2 à 3 jours afin de détecter l'antigène viral, dont la quantité augmente généralement peu de temps après l'infection. Nous avons défini un délai de surveillance de 2 à 3 jours, car le test antigénique rapide pourrait détecter l'antigène du MERS-CoV 7 jours après le début de l'infection.

## Références

Organisation mondiale de la santé animale (OMSA), Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres, édition 2021.

Song, Daesub, *et al.*, Development and validation of a rapid immunochromatographic assay for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus antigen in dromedary camels. *Journal of clinical microbiology*, 53.4 (2015): 1178-1182.

Lau, Susanna Kar-Pui, *et al.* Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Antigen Detection Assay. *Infectious Microbes & Diseases*, 4.4 (2022): 175-177.

Corman, V. M., *et al.* Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Eurosurveillance*, 17.39 (2012): 20285.

Adney, Danielle R., *et al.* Replication and shedding of MERS-CoV in upper respiratory tract of inoculated dromedary camels. *Emerging infectious diseases*, 20.12 (2014): 1999. (doi: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2012.141280>)

<https://www.cdc.gov/coronavirus/mers/lab/lab-testing.html>

## Remerciements

La plupart des études de validation ont été organisées et réalisées par la Division des laboratoires vétérinaires, Abu Dhabi Food Control Authority (ADFCA) (Émirats arabes unis). BioNote, Inc. remercie le Dr Salama, directeur de la Division des Laboratoires vétérinaires, Service de la santé animale, ADFCA (Émirats arabes unis), pour son soutien continu à ce travail.