

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 le 05 novembre 2020

Nom du Kit : AmpliFlow® SARS-CoV-2

Fournisseur : BIOTEM

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

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 *SPB* (*sample-preparation buffer*) afin de couvrir une large gamme de Ct et d'atteindre une limite de détection ;
- Un prélèvement positif pour le SARS-CoV-2 en matrice respiratoire
 - dilutions successives en *SPB* afin de couvrir une large gamme de Ct et d'atteindre une limite de détection.

Les dilutions ont été effectuées **dans le (SPB) (*sample-preparation buffer*) fourni par BIOTEM** dans lequel sont déchargés les écouvillons naso-pharyngés dans l'utilisation recommandée du test. Nous avons procédé ainsi 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 :

- **Très simple à utiliser**
 - Test ne nécessitant pas d'extraction au préalable des acides nucléiques
 - Permet de rendre un résultat qualitatif (rendu positif, négatif, ininterprétable)
 - Basé sur la technologie d'amplification isothermale **LAMP** (*loop-mediated isothermal amplification*)
- Deux cibles distinctes** sont détectées (dans ORF1ab)

- Chambre de détection individuelle pour sanctuariser la lecture du résultat et **éviter la contamination du laboratoire avec les amplicons**
- Le test comprend trois étapes :
 - Etape de lyse de 25µL du *sample-preparation buffer* (échantillon testé)
 - Etape d'amplification à partir de 10µL du lysat précédent
 - Etape de révélation immuno-chromatographique dans un dispositif plastique fermé. **Un contrôle interne** apparait sur la bandelette de révélation finale et permet de s'assurer du bon déroulement du test

Mise en œuvre :

- Le test doit normalement être réalisé à partir d'un écouvillonnage naso-pharyngé déchargé dans le *sample-preparation buffer (SPB)* fourni par BIOTEM. Le test a également été validé par BIOTEM sur les écouvillons en milieux de transport pour virus Sigma Virocult®, et Deltaswab® et milieu Amies.
- Notre évaluation a été réalisée en diluant, comme expliqué précédemment, des surnageants de culture de virus SARS-CoV-2 et du milieu de transport pour virus d'un prélèvement positif en SARS-CoV-2 dans le *sample-preparation buffer (SPB)* fourni par BIOTEM.

BIOTEM a réalisé, en partenariat avec le laboratoire de Virologie de l'Hôpital de Bichat (APHP), une évaluation de la sensibilité de leur test par rapport à des techniques de RTqPCR **directement à partir d'écouvillons naso-pharyngés de patients testés dans les deux techniques en parallèle**. Cette évaluation est disponible via le lien :

<https://www.BIOTEM.fr/wp-content/uploads/2020/11/AmpliFlow-Etude-Clinique.pdf>

RESULTATS

Echantillon et dilution testée	AmpliFlow® SARS-CoV-2 Detection Test			Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction E-mag; Amplification QS5			Type d'échantillon
	Résultat	T	C	Résultat	IP2	IP4	
S 10-3	Positif	Positif	Présent	Positif	23,4	22,6	surnageant de culture virale dilué à 10-3 en SPB
S 10-4	Positif	Positif	Présent	Positif	27,4	26,6	surnageant de culture virale dilué à 10-4 en SPB
S 10-5 (A)	Positif	Positif	Présent	Positif	30,9	30,0	surnageant de culture virale dilué à 10-5 en SPB
S 10-5 (B)	Négatif	Négatif	Présent	NR	NR	NR	surnageant de culture virale dilué à 10-5 en SPB
S 10-5 (C)	Négatif	Négatif	Présent	NR	NR	NR	surnageant de culture virale dilué à 10-5 en SPB
S 5x10-6	Négatif	Négatif	Présent	Positif	31,9	31,0	surnageant de culture virale dilué à 5x10-6 en SPB
S 10-6	Négatif	Négatif	Présent	Positif	33,4	32,2	surnageant de culture virale dilué à 10-6 en SPB
S 5x10-7	Négatif	Négatif	Présent	Positif	36,1	34,4	surnageant de culture virale dilué à 5x10-7 en SPB
S 10-7	Négatif	Négatif	Présent	Pos Lim	Négatif	36,5	surnageant de culture virale dilué à 10-7 en SPB
P0 10-1	Positif	Positif	Présent	Positif	22,3	21,4	prélèvement respiratoire positif dilué à 10-1 en SPB
P0 10-2	Positif	Positif	Présent	Positif	25,9	25,0	prélèvement respiratoire positif dilué à 10-2 en SPB
P0 10-3	Positif	Positif	Présent	Positif	30,0	29,2	prélèvement respiratoire positif dilué à 10-3 en SPB
P0 10-4	Négatif	Négatif	Présent	Positif	33,0	32,0	prélèvement respiratoire positif dilué à 10-4 en SPB
P0 5x10-5	Négatif	Négatif	Présent	Positif	34,5	33,3	prélèvement respiratoire positif dilué à 5x10-5 en SPB
P0 10-5	Négatif	Négatif	Présent	Positif	37,1	37,2	prélèvement respiratoire positif dilué à 10-5 en SPB
P0 5x10-6	Négatif	Négatif	Présent	Pos Lim	Négatif	37,3	prélèvement respiratoire positif dilué à 5x10-6 en SPB
Témoin négatif	Négatif	Négatif	Présent	NR	NR	NR	témoin négatif du kit

Abréviations : Pos Lim : Positif en limite de détection, NR ; Non réalisé ; SPB : *sample-preparation buffer*

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

- pour les dilutions en SPB de surnageants de culture virale, détection :
 - o pour les dilutions 10^{-3} à 5×10^{-7} sur les deux cibles;
 - o pour la dilution 10^{-7} , limite de détection (1 cible sur 2 détectée)
- pour les dilutions en SPB du prélèvement respiratoire positif:
 - o pour les dilutions 10^{-1} à 10^{-5} sur les deux cibles ;
 - o pour la dilution 5×10^{-6} , limite de détection (1 cible sur 2 détectée)

Le test AmpliFlow® SARS-CoV-2 détecte l'ARN viral du SARS-CoV-2 :

- pour les dilutions en SPB des surnageants de culture virale, détection :
 - o pour les dilutions 10^{-3} à 10^{-4} sur l'ensemble des passages testés
 - o pour la dilution 10^{-5} (Ct entre 30,0 et 30,9 avec la technique CNR), limite de détection (1 détection sur 3 tests)
 - o pour les dilutions $5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-6} , $5 \cdot 10^{-7}$ et 10^{-7} : absence de détection
- pour les dilutions en SPB du prélèvement respiratoire positif, détection :
 - o pour les dilutions 10^{-1} à 10^{-3} sur l'ensemble des passages testés
 - o pour la dilution 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} et $5 \cdot 10^{-6}$, absence de détection

Durée du test : 45 minutes minimum. Plusieurs échantillons sont analysables simultanément.

Le test Ampliflow®-SARS-CoV-2 Detection Test présente :

- **une sensibilité inférieure à celle de la technique de référence CNR IPP** : des échantillons détectés avec des Ct compris entre 30 et 31 avec la technique de référence CNR IPP sont détectés une fois sur 3 avec le test Ampliflow®-SARS-CoV-2 Detection Test.

CONCLUSIONS

En résumé, le test AmpliFlow® SARS-CoV-2 est un test **très simple à utiliser**. Il s'agit d'un test **LAMP** destiné à être utilisé directement à partir d'écouvillons naso-pharyngés. **Le CNR n'a pas évalué ce test directement à partir d'écouvillons naso-pharyngés comme recommandé par le fournisseur**. Mais cette évaluation directement sur écouvillons naso-pharyngés a été réalisée par le fournisseur BIOTEM et le laboratoire de virologie de Bichat : <https://www.BIOTEM.fr/wp-content/uploads/2020/11/AmpliFlow-Etude-Clinique.pdf>

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.