

Paris, le 25/02/2020

Déploiement du salivaire : CR des échanges entre les laboratoires de biologie médicale et les équipes de SALICOV

Les équipes des études SALICOV (APHP) et SAMILCOV (services de santé des armées) ont élaboré conjointement avec la SFM un document précisant les modalités concrètes de prélèvement et de traitement des échantillons de salive, qui sont essentielles pour garantir la bonne sensibilité du test (notamment en matière de dilution mais aussi de recueil du liquide salivaire).

Le présent document, présenté sous forme de FAQ, est issu d'échanges entre les équipes APHP et différents laboratoires de biologie médicale privés. Il a vocation à compléter ce tableau de présentation en précisant l'ensemble des éléments utiles aux laboratoires dans le cadre du déploiement des campagnes de dépistage salivaire.

Pour rappel, les techniques évaluées dans le cadre de l'étude SALICOV sont les suivantes :

- Automate COBAS 6800 de ROCHE (SALICOV)
- Automate et kit de Thermofisher avec au préalable utilisation du tampon Biomérieux pour la lyse et l'extraction sur automate et réactif MGI (SALICOV)

Cf annexe Tableau

1/ Modalités de dilution de la salive et stockage

- **Dilution de l'échantillon en milieu PBS sur site de prélèvement**

Si le prélèvement est dilué dans du PBS, cela occasionne-t-il des différences de performance ? Entre salive pure et une dilution 1/5 dans du PBS, il y avait des différences de Ct ? quelles modalités de stockage

Dans le cadre de SALICOV, la dilution réalisée est de 250 µL de salive dans 1000 µL de PBS. Dans ce cas de figure, tous les tests sont restés positifs, avec un différentiel de Ct allant de 1,1 à 1,8 lorsque cette dilution a été utilisée. En termes qualitatif, la sensibilité reste à 100% de performance.

La salive diluée en PBS peut se conserver à température ambiante ou +4°C pendant 5 jours

- **Dilution au tampon inactivant sur site de prélèvement**

Dans le cas où l'on utilise le tampon de lyse BioMérieux, quelle est leur stabilité en température ambiante ? Peut-on verser d'emblée le tampon de lyse dans l'échantillon au moment du prélèvement, ou le rajouter seulement au laboratoire pour protéger l'échantillon primaire?

Avec une dilution de 300 µL de salive dans 300 µL de tampon BioMérieux, l'étude SALICOV a démontré une stabilité à 24h en température ambiante, sans aucune modification du Ct. Ce délai de 24h est donc validé. Il reste donc possible d'acheminer les échantillons dilués au laboratoire, de les techniquer dans les 24 heures. Les études de stabilité à 48h, montrent en revanche une perte de Ct.

La salive diluée en tampon inactivant doit se conserver à température ambiante (à adapter selon les recommandations du fournisseur)



Quel volume de tampon de lyse BioMérieux doit être utilisé ? Quelle doit être la proportion de salive et tampon BioMérieux ?

L'étude SALICOV a validé une dilution au 1/2 avec les proportions suivantes : 300 µL de salive pure et 300 µL de tampon BioMérieux (cf tableau).

Globalement, il est en fait nécessaire de respecter un ratio salive/tampon BioMérieux a minima de 1 :1. Lors du transfert, il est suggéré d'utiliser une pipette de transfert qui soit calibrée afin d'assurer le respect de cette proportion.

Attention le volume de salive pure ne doit pas être supérieur au volume de tampon inactivant pour les raisons suivantes :

- Faible efficacité de l'inactivation virale
- Inhibition de l'extraction des acides nucléiques

2/ Kits d'amplification

Après la phase d'extraction avec kit et automate MGI, le protocole est-il identique que pour le nasopharyngé, ou un autre protocole a-t-il été utilisé ? Le kit d'amplification utilisé est-il indifférent dès lors qu'il a été validé sur nasopharyngé ?

Les protocoles utilisés pour les phases d'extraction et d'amplification sur prélèvement salivaire sont identiques à ceux du prélèvement nasopharyngé.

De manière subsidiaire, la HAS autorise les techniques jumelles - de celles déjà testées dans le cadre de l'étude française SALICOV (c'est-à-dire utilisant des techniques d'extraction validées pour l'utilisation de prélèvements salivaires), puissent être déployées sans difficulté dans la mesure où la technique utilisée pour l'étape d'amplification a bien fait l'objet d'une validation spécifique préalable pour les tests naso-pharyngés (sous réserve, bien-sûr, des préconisations techniques des fabricants concernant l'utilisation du couple extraction/amplification).

3/ Demandes complémentaires

Dans le cas où pourrait être validé un autre tampon que le tampon BioMérieux, qui démontrerait les mêmes performances, comment faire valider ce nouveau tampon ?

Il convient de communiquer au fournisseur ou au fabricant ces données pour mettre à jour la fiche technique et fournir ces éléments à l'ANSM. Le MSS est disponible pour assurer un lien entre fabricant, LBM et ANSM si besoin.

Les campagnes actuelles visant une population d'élèves scolarisés en primaire et en maternelle, un prélèvement par pipetage pourrait être nécessaire. Quelle expérience a-t-on de cette technique ?

Un troisième volet de l'étude SALICOV a été initié très récemment dans aux urgences pédiatriques de l'APHP pour évaluer ce point, en incluant plus de 1000 enfants. D'après les pédiatres, un prélèvement de salive à l'aide d'une pastette permettrait d'assurer un échantillon de qualité.

L'APHP a-t-elle testé la lyse mécanique par la chaleur ?



La lyse thermique n'a pour l'instant pas été évaluée mais des études sont en cours pour valider les performances analytiques selon le protocole suivant : prélèvement sur tube sec, ajout de PBS (dilution 1/5) puis chauffage à 56°C pendant 30 minutes. La validation de l'inactivation virale sur culture cellulaire devrait être faite par le CNR.

4/Autres modalités d'extraction du génome SARS CoV2 pour criblage variants

Cf annexe Tableau

Ce document pourra évoluer en fonction de la validation de trousse/techniques et des questions posées par les utilisateurs



Annexe Tableau Technique

Détection qualitative du génome SARS CoV2									
	Salive pure			Salive diluée 1/5 en PBS ou MTV			Salive diluée 1/7 en PBS ou M4RT (3mL de milieu dans 0,5 mL de salive)		
	Volume salive (µl)	Volume Tampon lyse (µl)	Dilution finale	Volume salive (µl)	Volume Tampon lyse (µl)	Dilution finale	Volume salive (µl)	Volume Tampon lyse (µl)	Dilution finale
Roche 6800	150	500	1/4	400	400	1/10			
MGI / thermofischer (tampon biomérieux)	300	300	1/2	300	300	1/10			
Extraction du genome pour criblage/sequencage Variants									
Qiasymphony (Qiagen)	300µl salive pure + 30µl PK 15 min à 56°C (inactivation pour sortir du P2) puis extraction 200µl avec protocole « Pathogen », élution 110µl								
EasyMag (Biomerieux)	200µl salive pure + 2ml de tampon, Protocol Specific_B_Assay V1.3.0; élution 50µl								