

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 de BIOASTER et du CNR IPP

Evaluation réalisée le 01 octobre 2021 et le 18 novembre 2021

Nom du Kit : AmpliFlow® – SARS-CoV-2 Detection Test (BIO.056.96). Pour test salivaire.

Fournisseur : BIOTEM

Laboratoires Investigateurs

BIOASTER

40 avenue Tony Garnier
69007 Lyon
France

Contact BIOASTER

Dr Amy Hesketh

amy.hesketh@bioaster.org

04 69 85 34 47

Laboratoire associé au Centre National de Référence des virus des infections respiratoires

Pr Bruno Lina

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

Olivier Delelis, DR2 CNRS.
Clémence Richetta, MCU ENS Paris Saclay.
Equipe Biophotonique des Interactions Moléculaires
Ecole Normale Supérieure Paris Saclay
LBPA-Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée
4 Avenue des Sciences
91190 Gif sur Yvette
delelis@lbpa.ens-cachan.fr

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 de référence utilisée à BIOASTER et au CNR de Lyon, à partir de **dilutions de surnageant de culture de virus SARS-CoV-2 à différentes concentrations en matrice salivaire** ainsi que sur des **échantillons de salive positives** issus de patients infectés par le SARS-CoV-2.

MATERIELS ET METHODES

Panel d'échantillons testés

- Gamme de dilution en matrice salivaire :

Les différentes dilutions de surnageant de culture de virus SARS-CoV-2 ont été réalisées à partir de l'échantillon CNR VIR 2820/20 titrant à $2,67.10^5$ particules virales/ml (PFU/ml). Cet échantillon a été dilué en série au dixième et au cinquième en Milieu Essentiel Minimum (MEM). 100 µl de ces dilutions de surnageant de culture de virus SARS-CoV-2 ont été ajoutés à 900 µl de salive provenant d'individus testés négatifs par RT-qPCR pour la COVID-19. La gamme ainsi obtenue couvre des échantillons allant de $2,67.10^3$ PFU/ml à $2,67.10^{-2}$ PFU/ml. La concentration maximale ($2,67.10^3$ PFU/ml) utilisée correspond à un échantillon clinique salivaire fortement positif au SARS-CoV-2.

Cette gamme de dilutions en matrice salivaire permet de couvrir une large gamme de Ct (Ct 21 à Ct 38) et d'évaluer une limite de détection du test.

- Echantillons de salive natives issus de patients infectés par le SARS-CoV-2 :

Les échantillons utilisés sont issus du contrat de collaboration de recherche COVISAL.

Les tests doivent être effectués sur des salives natives non diluées. Certains milieux de transport ou milieux de culture contenant notamment du rouge de phénol peuvent interférer avec le test LAMP et diminuer la sensibilité de la détection. Seules les dilutions en PBS sont préconisées et n'affectent pas les résultats.

Technique de référence CNR IPP

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)

- Site BIOASTER :
 - Extraction avec QIAamp Viral RNA Mini Kit (Réf : QIAGEN 52906) selon le protocole du fournisseur à partir de 140 µL de prélèvement ; éluat de 60 µL.
 - SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Ref: Invitrogen 1732-020)
 - Amplifications sur StepOnePlus™ Real-Time PCR System Applied Biosystems™ (à partir de 5 µL d'éluat).
- Site CNR Lyon :
 - Extraction avec EMAG® bioMérieux selon la technique du fournisseur à partir de 200µL de prélèvement ; éluat de 50µL

- 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

L'évaluation du test AmpliFlow® a permis de faire les observations suivantes :

- **test très simple à utiliser,**
- test ne nécessitant pas d'extraction au préalable des acides nucléiques,
- permet de rendre un résultat qualitatif (rendu positif, négatif),
- basé sur la technologie d'amplification isothermale **LAMP** (*loop-mediated isothermal amplification*),
- **deux régions distinctes** sont détectées dans le gène ORF1ab,
- détection de l'ARN viral dans des microtubes fermés pour sanctuariser la lecture du résultat et **éviter la contamination du laboratoire avec les amplicons et la contamination inter-échantillons.**

- Le test comprend trois étapes :
 - Etape de lyse de 50 µL d'échantillon à tester
 - Etape d'amplification à partir de 4 µL du lysat précédent
 - Etape de révélation colorimétrique en microtube. Des contrôles positif (ARN synthétique SARS-CoV-2) et négatif (H₂O RNase- DNase-free) sont inclus dans le kit permettant de s'assurer du bon déroulement du test. Le changement de couleur (de rose à jaune) se produit en 10 à 30 minutes d'incubation à 65°C selon la quantité en ARN viral. Les échantillons négatifs restent négatifs jusqu'à 50 minutes d'incubation.

- **Lecture du résultat : visuelle d'après la couleur** obtenue après 30 minutes et 50 minutes d'incubation à 65°C.

RESULTATS

Résultats sur les gammes de dilution de surnageant viral en matrice salivaire

Nombre de particules virales (PFU/mL)	AmpliFlow® SARS-CoV-2 Detection Test					Technique de référence BIOASTER; Extraction QIAamp Viral RNA Mini Kit; Amplification StepOnePlus			Technique de référence CNR à Lyon; Extraction E-mag; Amplification QS5			Type d'échantillon (surnageant de culture virale dilué en salive négative) Dilution :
	Résultat final*	Résultat à 50 minutes	Résultat à 30 minutes	Couleur à 50 minutes	Couleur à 30 minutes	Résultat	IP2	IP4	Résultat	IP2	IP4	
2,67.10 ³	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	20,8	21,2	Positif	18,4	18,5	10-2
2,67.10 ³	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	NR	NR	NR	NR	NR	NR	10-2
2,67.10 ³	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	NR	NR	NR	NR	NR	NR	10-2
2,67.10 ²	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	24,5	24,6	Positif	22,1	22,0	10-3
2,67.10 ²	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	24,4	24,9	NR	NR	NR	10-3
2,67.10 ²	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	24,5	24,9	NR	NR	NR	10-3
5,34.10 ¹	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	25,5	25,9	Positif	23,5	23,4	5x10-4
5,34.10 ¹	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune	Positif	25,5	26,0	NR	NR	NR	5x10-4
5,34.10 ¹	Pos Lim	Positif	Négatif	Jaune/orangé	Rose/orangé	Positif	25,5	26,0	NR	NR	NR	5x10-4
2,67.10 ¹	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	28,1	28,5	Positif	25,9	25,9	10-4
2,67.10 ¹	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	27,9	28,4	NR	NR	NR	10-4
2,67.10 ¹	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	27,9	28,2	NR	NR	NR	10-4
5,34	Pos Lim	Positif	Négatif	Jaune/orangé	Rose	Positif	28,7	29,1	Positif	26,6	26,6	5x10-5
5,34	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	28,9	29,3	NR	NR	NR	5x10-5
5,34	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	28,8	29,2	NR	NR	NR	5x10-5
2,67	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	31,3	31,6	Positif	29,8	29,7	10-5
2,67	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	31,5	31,7	NR	NR	NR	10-5
2,67	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	31,3	31,6	NR	NR	NR	10-5
5,34.10 ⁻¹	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	32,4	32,7	Positif	30,8	30,8	5x10-6
5,34.10 ⁻¹	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	32,6	32,7	NR	NR	NR	5x10-6
5,34.10 ⁻¹	Pos Lim	Positif	Négatif	Jaune/orangé	Rose	Positif	32,7	32,9	NR	NR	NR	5x10-6

2,67.10 ⁻¹	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	34,8	35,5	Positif	33,1	32,9	10-6
2,67.10 ⁻¹	Pos Lim	Positif	Négatif	Jaune/orangé	Rose	Positif	34,6	35,3	NR	NR	NR	10-6
2,67.10 ⁻¹	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	34,9	34,9	NR	NR	NR	10-6
5,34.10 ⁻²	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	35,5	36,2	Positif	34,4	34,4	5x10 ⁻⁷
5,34.10 ⁻²	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	35,1	35,7	NR	NR	NR	5x10 ⁻⁷
5,34.10 ⁻²	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	35,8	36,4	NR	NR	NR	5x10 ⁻⁷
2,67.10 ⁻²	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	37,4	38,8	Pos Lim	négatif	38,1	10-7
2,67.10 ⁻²	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	37,9	38,5	NR	NR	NR	10-7
2,67.10 ⁻²	Pos Lim	Positif	Négatif	Jaune/orangé	Rose	Positif	38,0	39,4	NR	NR	NR	10-7
Témoin négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose							Témoin négatif du kit
Témoin positif	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune							Témoin positif du kit
MEM sans virus	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Négatif	Neg	Neg	NR	NR	NR	Témoin négatif interne
MEM + Salive neg	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Négatif	Neg	Neg	NR	NR	NR	Témoin négatif interne
H2O	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Négatif	Neg	Neg	NR	NR	NR	Eau
Neg extraction						Négatif	Neg	Neg	NR	NR	NR	Témoin nég d'extraction

*Pos Lim ; Positif en limite de détection, NR ; Non Réalisé

Pour les échantillons positifs avec le test AmpliFlow® – SARS-CoV-2 Detection Test, le temps moyen de changement de couleur est de 30 minutes d'incubation.

Pour les échantillons positifs limite avec le test AmpliFlow® – SARS-CoV-2 Detection Test le changement de couleur se produit entre 30 et 50 minutes d'incubation.

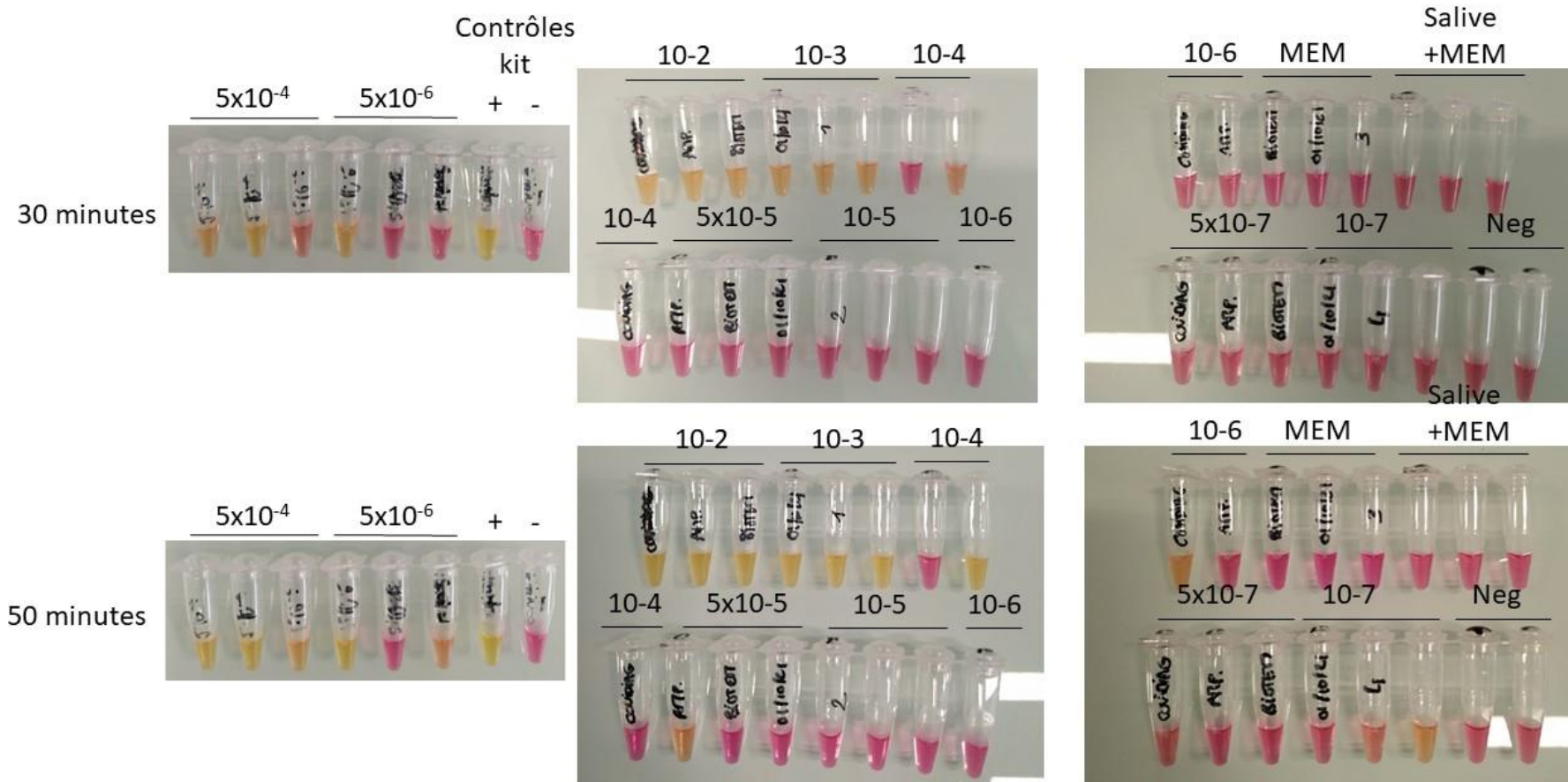


Figure 1 : Photo des tubes de réaction pour les gammes de dilutions en matrice salivaire (analyse en trois fois : 8 tubes, 16 tubes et 16 tubes)

- Calcul de concordance sur l'ensemble des échantillons :

	Nombre de positifs	Nombre de positifs limites	Nombre de négatifs	Pourcentage de concordance
AmpliFlow® – SARS-CoV-2 Detection Test	8	5	15	28.57%
RT-qPCR BIOASTER	28	0	0	

- Calcul de concordance dans la limite de sensibilité du test AmpliFlow® – SARS-CoV-2 Detection Test :

	Nombre de positifs	Nombre de positifs limites	Nombre de négatifs	Pourcentage de concordance
AmpliFlow® – SARS-CoV-2 Detection Test	6	1	0	85.71%
RT-qPCR BIOASTER	7	0	0	

Résultats sur les échantillons de salive issus de patients infectés par le SARS-CoV-2

N° ECHANTILLON CRB	Numéro échantillon barrette	AmpliFlow® SARS-CoV-2 Detection Test					Technique de référence CNR à Lyon; Extraction E-mag; Amplification QS5			Echantillon testé
		Résultat final	Résultat à 50 minutes	Résultat à 30 minutes	Couleur à 50 minutes	Couleur à 30 minutes	Résultat	IP2	IP4	
t-	1	Négatif	Négatif	Négatif	Rose/orangé	Rose	NR	NR	NR	Témoin négatif kit
t+	2	Positif	Positif	Positif	Jaune	Orangé	NR	NR	NR	Témoin positif kit
Témoin négatif	3	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Négatif	Neg	Neg	salive négative
ID0092	4	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	11,4	11,5	salive positive
ID0269	5	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	19,2	19,1	salive positive
ID0776	6	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	18,4	18,3	salive positive
ID0760	7	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	19,5	19,5	salive positive
ID0577	8	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	20,5	20,4	salive positive
ID0745	9	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	23,2	23,1	salive positive
ID0346	10	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	24,1	24,0	salive positive
ID0263	11	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	24,5	24,5	salive positive
ID0263 BIS	12	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé				
ID0169	13	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	27,2	27,2	salive positive
ID0169 BIS	14	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé				
ID0059	15	Négatif	Négatif (idem tube 18)	Négatif	Orangé	Rose	Positif	28,2	28,2	salive positive
ID0191 (muqueux)	16	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Négatif	Neg	Neg	salive attendue pos. faible non détecté
ID0177	17	Négatif	Négatif	Négatif	Rose/orangé	Rose	Positif	33,4	33,3	salive positive
Témoin négatif	18	Négatif	Négatif	Négatif	Orangé	Rose	Négatif	Neg	Neg	salive négative
ID0948	19	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé	Positif	28,8	28,8	salive positive
ID0948 BIS	20	Positif	Positif	Positif	Jaune	Jaune/orangé				
ID0567 (muqueux)	21	Négatif	Négatif (idem tube 18)	Négatif	Orangé	Rose	Positif	33,4	32,9	salive positive
ID0423	22	Négatif	Négatif	Négatif	Rose/orangé	Rose	Positif	35,8	35,0	salive positive

ID0726	23	Négatif	Négatif	Négatif	Rose	Rose	Positif	28,9	28,9	salive positive
Témoin négatif	24	Négatif	Négatif	Négatif	Rose/orangé	Rose	Négatif	Neg	Neg	salive négative

Remarque : La présence d'une couleur orangée dans certains témoins négatifs après 50 minutes d'incubation à 65°C a conduit à interpréter comme négatifs les échantillons présentant cette même couleur orangée à 50 minutes.

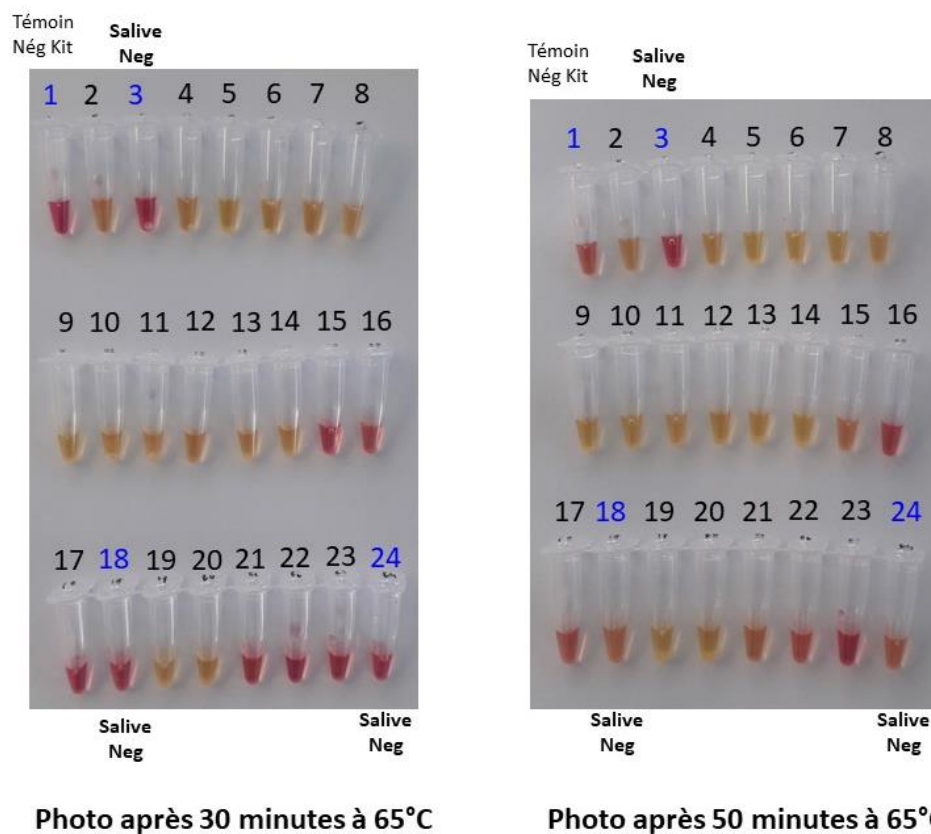


Figure 2 : Photo des tubes de réaction pour les échantillons de salive issus de patients (analyse de 24 tubes à la fois)

Concernant l'évaluation de la sensibilité analytique à partir des gammes de dilution en matrice salivaire, la technique de référence RT-qPCR de BIOASTER permet une détection de l'ARN du SARS-CoV-2 pour toutes les dilutions sur les deux cibles.

Le test AmpliFlow® – SARS-CoV-2 Detection Test permet une détection de l'ARN du SARS-CoV-2 :

- pour les dilutions 10^{-2} et 10^{-3} sur l'ensemble des réplicats
- pour la dilution 5×10^{-4} sur deux réplicats et limite de détection sur le troisième réplicat
- pour les dilutions 10^{-4} , 5×10^{-5} , 5×10^{-6} , 10^{-6} et 10^{-7} : limite de détection (1 détection et/ou 1 positif limite)
- pour les dilutions 10^{-5} et 5×10^{-7} : absence de détection

Le test AmpliFlow® présente une sensibilité inférieure à celle de la technique de référence RT-qPCR et montre une limite de détection de l'ordre de 25 particules virales/ml (Ct 28 en RT-qPCR). Dans cette limite de détection, la concordance entre le test AmpliFlow® – SARS-CoV-2 Detection Test et la RT-qPCR de référence est de 85.71%. De plus, le test AmpliFlow® – SARS-CoV-2 Detection Test était positif ou positif limite pour d'autres dilutions positives avec la technique de référence avec un Ct de 30,8 (détection 2 fois sur 3) ; 33,1 (1 fois sur 3) et 38,1 (1 fois sur 3).

Le LBPA (Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée) et la société Biotem ont réalisé de leur côté des expériences de sensibilité analytique en diluant de la salive montrant une meilleure sensibilité que celle observée dans la présente évaluation.

D'après l'expérience du LBPA, le fait d'avoir utilisé au départ comme source de virus, du surnageant de culture MEM contenant du rouge de phénol a pu, malgré la dilution importante réalisée, interférer avec le test LAMP et diminuer la sensibilité de la détection. Il est important d'utiliser des salives natives non diluées pour éviter toute interférence avec le test LAMP. Si une dilution doit être effectuée, seul du PBS doit être utilisé.

Concernant l'évaluation à partir d'échantillons de salive positives, le test AmpliFlow® – SARS-CoV-2 Detection Test permet une détection de l'ARN du SARS-CoV-2 pour les échantillons ayant un Ct <28 avec la technique de référence.

Pour trois échantillons salivaires détectés avec un Ct de 28,2, 28,8 et 28,9 avec la RT-PCR de référence, le test évalué a permis la détection dans deux cas sur trois. Les échantillons ayant un Ct de 32,9 à 35,0 étaient négatifs. Nous n'avons pas pu tester d'échantillon ayant un Ct de 30 à 32 avec la technique de référence.

Durée du test : 30 minutes minimum. Plusieurs échantillons sont analysables simultanément sans dépasser 24 échantillons à la fois. L'analyse de 24 échantillon prend environ 1h30.

L'interprétation de la couleur des échantillons est un peu subjective notamment pour les échantillons qui présentaient une couleur orangée en fin d'incubation. Il est utile de prendre une photo pour fixer le résultat dans les temps impartis à 30 minutes et à 50 minutes.

CONCLUSIONS

En résumé, le test AmpliFlow® – SARS-CoV-2 Detection Test est un test très simple à utiliser. Il s'agit d'un test RT-LAMP destiné à être utilisé en laboratoire directement à partir d'échantillons salivaires 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.