BioGoM Paris
Biologie Génomique Médicale

ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS

Laboratoire de Virologie Hôpital Bichat Claude Bernard

Evaluation du kit AmpliFlow® SARS-CoV-2 (BIOTEM)

Objectif principal de l'évaluation :

Le produit évalué est le kit AmpliFlow® SARS-CoV-2 commercialisé par la société BIOTEM et développé en collaboration avec l'Ecole Normale Supérieur Paris Saclay (inventeur du test) et le laboratoire de Virologie de l'hôpital Bichat Claude Bernard (conseil, évaluation initiale du premier prototype).

Le kit AmpliFlow® SARS-CoV-2 permet de détecter la présence du virus dans des prélèvements nasopharyngés par amplification de son génome par la technologie LAMP (loop-mediated isothermal amplification) sans extraction au préalable des acides nucléiques.

Deux cibles distinctes sont détectées et amplifiées dans l'ORF1ab.

La notice préconise pour une détection optimale de décharger les écouvillons nasopharyngés dans un tampon spécifique fourni par le kit : le *Sample Preparation Buffer* (SPB).

La révélation des amplicons obtenus par la LAMP est réalisée par une technique immuno-chromatographique dans une chambre de détection fermée et à usage unique pour éviter les risques de contamination. Un contrôle interne apparait sur la bandelette de révélation finale et permet de s'assurer du bon déroulement du test et de la bonne migration de l'échantillon.

L'objectif de l'évaluation présentée ici est de déterminer les performances du kit AmpliFlow® SARS-CoV-2 pour le diagnostic rapide de l'infection par le SARS-CoV-2 à partir de prélèvements nasopharyngés.

Cette évaluation a été réalisée au laboratoire de virologie à l'hôpital Bichat Claude Bernard les 9 et 10 novembre 2020.

Méthode :

Echantillons :

Les échantillons testés sont des reliquats des prélèvements nasopharyngés, à visée diagnostique ou de dépistage, prélevés à l'hôpital Bichat Claude Bernard du 6 au 9 novembre 2020. Ces prélèvements ont été acheminés au laboratoire de Virologie en milieu de transport virologie (VTM) (CytoSwab® référence 2118-0019 – Cytotest, China ; ou eSwab™ référence ESWBR1 – Copan, Italie).
Les prélèvements ont été testés par une RT-PCR de référence (Cobas® SARS-CoV-2, NeumoDx™ SARS-CoV-2 Assay, Simplexa® COVID-19 Direct Kit), puis conservés à +4°C jusqu'à réalisation de l'évaluation (<96h).

Les tests avec le kit AmpliFlow® SARS-CoV-2 ont été réalisés sur ces échantillons en milieu de transport virologique, puis sur des dilutions au 1/10^{e} pour les faibles charges virales (Ct fort) ou au 1/100^{e} pour les fortes charges virales (Ct faibles). Les dilutions ont été réalisées dans le Sample Preparation Buffer (SPB) fournit par le fabricant comme tampon à utiliser pour le prélèvement en lieu et place de milieux de transports virologiques.

Protocole :

Les échantillons ont été testés selon le protocole de la notice du kit AmpliFlow® SARS-CoV-2 en ajoutant 25 µL du VTM ou de la dilution obtenue en SPB à 5µL de tampon de lyse. Après une incubation de 5 min à 65°C, 10 µL de lysat ont été ajoutés à 35 µL de master mix préparés extemporanément. Après une nouvelle incubation de 30 min à 65°C, les tubes ont été introduits dans des chambres de détection pour permettre la lecture de la bandelette de révélation après 3 min d'incubation.

Résultats :

Les résultats détaillés pour chaque prélèvement sont indiqués dans la table ci-après.

Sensibilité :

La sensibilité est calculée en comparant les résultats obtenus avec le kit AmpliFlow® SARS-CoV-2 avec une RT-PCR de référence (Cobas® SARS-CoV-2, NeumoDx™ SARS-CoV-2 Assay, Simplexa® COVID-19 Direct Kit). La sensibilité est donnée par le ratio : VP / (VP+FN), avec VP signifiant « Vrai Positif » et FN « Faux Négatif ».

2 seuils de positivité ont été retenus pour évaluer la sensibilité, correspondant aux seuils décris dans l'Avis du 25 septembre 2020 de la Société Française de Microbiologie (SFM) relatif à l'interprétation de la valeur de Ct (estimation de la charge virale) obtenue en cas de RT-PCR SARS-CoV-2 positive sur les prélèvements cliniques réalisés à des fins diagnostiques ou de dépistage », p. Version 1, sept. 2020 (https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/09/Avis-SFM-valeur-Ct-excrétion-virale- -Version-Finale-25092020.pdf).

Pour un seuil à 33 Ct (excrétion virale significative), la sensibilité du kit AmpliFlow® SARS-CoV-2 était de 29/29 échantillons soit 100%.
Pour un seuil à 37 Ct (excrétion virale modérée voire très faible), la sensibilité du kit AmpliFlow® SARS-CoV-2 était de 36/38 échantillons soit 94,7%.

Spécificité :

La spécificité a été évaluée sur 25 prélèvements :

- 11 prélèvements nasopharyngés négatifs avec la PCR de référence
- 14 prélèvements nasopharyngés congelés positifs pour un coronavirus humain
    - 1 prélèvement HKU1 positif
    - 5 prélèvements OC43 positif
    - 7 prélèvements 229E positif
    - 1 prélèvement OC43 positif

Ces 25 prélèvements ont tous été retrouvés négatifs par la technique du kit AmpliFlow® SARS-CoV-2, soit une spécificité de 100% sur cet échantillon.

La spécificité étant donnée par le ratio VN/(VN+FP)
VN : Vrai Négatif
FP : Faux Positif

ID	Sexe	Age	Date de prélèvement	Milieu de transport (VTM)	RT-PCR	Ct	VTM-pur Résultat AmpliFlow	Dilution 1/10e - SPB		Dilution 1/100e - SPB	
								Ct dilués *	Résultat AmpliFlow	Ct dilués *	Résultat AmpliFlow
11028682	F	89	08/11/2020	eSwab	NeumoDx (Cible N)	11.6	-	ND		18.2	+
11027363	M	22	07/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	13.0	+	ND		19.6	+
11032861	F	40	09/11/2020	eSwab	NeumoDx (Cible N)	15.7	+	ND		22.3	+
11027384	F	23	07/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	17.6	+	ND		24.2	+
11024177	F	52	06/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	17.9	+	ND		24.5	+
11023105	F	87	06/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	18.3	+	ND		24.9	+
11023123	M	94	06/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	19.1	+	ND		25.7	+
11027504	M	83	07/11/2020	eSwab	Simplexa (Cible S)	19.3	-	ND		25.9	+
11026346	M	44	06/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	19.4	+	ND		26.0	+
11024574	M	79	06/11/2020	Citoswab	Simplexa (Cible S)	19.4	+	ND		26.0	+
11022304	M	74	06/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	20.1	+	ND		26.7	+
11026264	F	21	06/11/2020	Citoswab	Simplexa (Cible S)	20.7	+	ND		27.3	+
11022675	F	53	06/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	21.0	+	ND		27.6	+
11023382	M	90	06/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	21.0	+	ND		27.6	+
11022617	M	75	05/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	22.2	+	25.5	+	28.8	+
11021465	F	84	06/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	23.5	-	26.8	+	30.1	+
11026428	F	70	07/11/2020	Citoswab	Simplexa (Cible S)	23.7	+	27.0	+	30.3	+
11023735	F	62	06/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	24.9	+	28.2	+	31.5	+
11023129	F	56	06/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	25.1	-	28.4	+	31.7	+
11026390	F	65	06/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	25.3	+	28.6	+	31.9	+
11022427	F	58	06/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	25.9	-	29.2	+	32.5	+
11025272	M	55	06/11/2020	Citoswab	Simplexa (Cible S)	28.9	-	32.2	+	35.5	-
11024271	F	77	06/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	29.8	-	33.1	+	ND	
11025250	M	68	06/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	30.2	-	33.5	+	ND	
11025141	F	46	06/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	30.3	-	33.6	+	ND	
11027652	F	70	07/11/2020	Citoswab	Simplexa (Cible S)	30.8	+	34.1	+	ND	
11022592	F	96	06/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	31.7	-	35.0	+	ND	
11025312	M	70	06/11/2020	Citoswab	NeumoDx (Cible N)	31.7	-	35.0	+	ND	
11027651	F	57	07/11/2020	Citoswab	Simplexa (Cible S)	32.3	-	35.6	+	ND	
11022576	M	39	06/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	33.4	-	36.7	-	ND	
11024479	F	56	06/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	33.9	-	37.2	-	ND	
11022801	F	62	06/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	35.1	-	38.4	-	ND	
11021640	M	52	05/11/2020	Citoswab	Cobas (cible E)	36.9	-	40.2	-	ND	

Table 1. Résultats de la comparaison entre la RT-PCR de référence et la RT-LAMP AmpliFlow®. NR : non réalisé.

* Ct dilués obtenus en tenant compte du facteur de dilution en SPB du prélèvement initial (3,3 Ct pour une dilution au 1/10^{e}).

Conclusion et interprétation des résultats :

La notice du kit AmpliFlow® SARS-CoV-2 préconise pour une utilisation optimale de décharger les écouvillons nasopharyngés dans un tampon spécifique fourni par le kit : le *Sample Preparation Buffer* (SPB).

Nous confirmons qu'une utilisation sur milieu de transport virologique (VTM) n'est pas recommandée en raison des inhibitions observées. Ces inhibitions sont probablement présentes à différents niveaux en fonction de la composition de chaque VTM.

Sur les 41 prélèvements positifs dilués en SPB, conformément aux recommandations du fabricant, nous avons obtenus de bonnes performances de la technique :

- Sensibilité pour des Ct<33 *(excrétion virale significative)* : _____29/29 (100%)
- Sensibilité pour des Ct<37 *(excrétion virale modérée voire très faible)* : _____36/38 (94,7%)
- Spécificité : _____25/25 (100%)

Aussi, le kit AmpliFlow® SARS-CoV-2 présente des performances légèrement en deçà de la RT-PCR et dans les valeurs attendues pour les techniques de RT-LAMP ou RT-PCR sans extraction. Ces performances sont satisfaisantes pour le dépistage du SARS-CoV-2 en utilisant le Sample Preparation Buffer fourni.

Néanmoins, en cas de résultats négatif sur des patients à de fortes suspicions diagnostiques et à distance des premiers symptômes, une confirmation du résultat par RT-PCR sur prélèvement nasopharyngé ou profond est recommandée.

Dr Benoit Visseaux

Dr Benoit VISSEAUX
Laboratoire de Virologie
HOPITAL BICHAT - CLAUDE BERNARD
46, rue Henri Huchard
75877 PARIS Cedex 18

Paris, le 12/11/2020 -