



**AP-HP.
Hôpitaux universitaires
Henri-Mondor**

Évaluation de la performance diagnostique d'un test antigénique ELISA automatisé pour le diagnostic de l'infection COVID-19

**Dr Slim FOURATI¹, Pr Étienne AUDUREAU²,
Pr Stéphane CHEVALIEZ¹, Pr Jean-Michel PAWLOTSKY¹**

¹Laboratoire de Virologie, Département « Prévention, Diagnostic et Traitement des Infections » et ²Service de Santé Publique

Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris
Institut Mondor de Recherche Biomédicale (INSERM U955) et Université Paris-Est-Créteil

Version : 11 janvier 2021

Préparation des collections d'échantillons et réalisation des tests :
Mme Souraya KHOUIDER, Mme Aurélie GOURGEON, Mme Camille LANGLOIS, Mr Arnaud GALBIN, Mr Julien LORENZIO (Ortho Clinical Diagnostics) et Mr Alexandre SOULIER

La technique de référence pour le diagnostic d'infection par le virus « Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 » (SARS-CoV-2), responsable de la « Coronavirus Disease 2019 » (COVID-19), est fondée sur les techniques d'amplification génique, « polymerase chain reaction » (PCR) ou réaction de polymérisation en chaîne et amplifications isothermiques de type « transcription-mediated amplification » (TMA) ou « loop-mediated isothermal amplification » (LAMP), qui permettent la détection de l'ARN viral à partir d'un prélèvement naso-pharyngé.

La réalisation des tests PCR ou TMA requiert un matériel coûteux et des personnels formés et doit se faire au sein de laboratoires de biologie médicale accrédités. Le résultat n'est disponible qu'après 4 à 6 heures pour la plupart des tests et environ 60 minutes pour les tests les plus rapides. Les performances des tests PCR/TMA (très grandes sensibilité et spécificité) en font cependant l'outil le mieux adapté au diagnostic de l'infection.

Les tests antigéniques sont, comme les tests PCR, des tests directs qui détectent un composant des particules virales, en l'occurrence des protéines virales exprimant des antigènes. Ils sont a priori moins sensibles que les tests PCR, car ils n'impliquent pas d'étape d'amplification. Ils sont aujourd'hui commercialisés sous la forme de tests rapides antigéniques (TRA) individuels. Plus récemment, des tests « enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA) automatisés, réalisables sur des plateformes intégrées automatisées à haut débit, ont été développés pour la détection d'antigènes du SARS-CoV-2.

La place des tests antigéniques dans le diagnostic et le dépistage de la maladie COVID-19 dépend étroitement de leur capacité à identifier les sujets infectés (sensibilité) et les sujets non infectés (spécificité). Au cours de deux évaluations indépendantes de 6 puis 9 TRA COVID-19, notre laboratoire a identifié deux groupes de TRA : ceux dont les performances apparaissaient comme « suffisantes » pour répondre aux indications de leur utilisation telles que définies par la Haute Autorité de Santé (HAS), et ceux dont les performances apparaissaient « insuffisantes », soit en termes de sensibilité, soit en termes de spécificité.

L'étude présentée ici a évalué les performances d'un nouveau test antigénique de type ELISA, le test VITROS SARS-CoV-2 d'Ortho Clinical Diagnostics, sur la plateforme intégrée automatisée à haut débit VITROS 3600.

Objectif

L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative) du test antigénique VITROS SARS-CoV-2 d'Ortho Clinical Diagnostics réalisé sur prélèvement naso-pharyngé, en deux parties:

1) Une **étude rétrospective** de sensibilité sur prélèvements congelés provenant de sujets ayant une présence d'ARN confirmée (RT-PCR SARS-CoV-2 positive), testés alors qu'ils présentaient des symptômes au moment de la première vague épidémique française (entre mars et avril 2020).

2) Une **étude prospective** systématique de la sensibilité et de la spécificité, en double de l'activité de routine diagnostique du laboratoire de virologie, incluant l'ensemble des sujets prélevés dans le cadre du soin pour une recherche d'ARN du SARS-CoV-2 par TMA et/ou RT-PCR entre le 18 novembre et le 3 décembre 2020 (à l'exclusion des weekends et des lundis, pour des raisons d'organisation interne).

Matériel et Méthodes

L'étude a porté sur des prélèvements naso-pharyngés collectés en deux cohortes, l'une rétrospective et l'autre prospective :

- **Cohorte rétrospective :** 147 échantillons naso-pharyngés congelés à -80°C dans du sérum physiologique, **testés positifs pour l'ARN du SARS-CoV-2 par PCR** (RT-PCR « maison » développée par le CNR des virus respiratoires de l'Institut Pasteur ou RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR, Altona Diagnostics, Allemagne) entre mars et avril 2020. La sélection des échantillons de l'étude rétrospective a été faite de façon randomisée après stratification sur les valeurs de Ct. Les résultats discordants entre un test PCR positif, défini par un Ct <30, et un test antigénique VITROS négatif ont été contrôlés par un deuxième test PCR.
- **Cohorte prospective :** 1759 échantillons naso-pharyngés frais, adressés au laboratoire de virologie de façon consécutive, non sélectionnée du mardi matin au vendredi midi entre le 18 novembre et le 3 décembre 2020 pour recherche d'ARN viral par une technique de biologie moléculaire (technologie TMA, Aptima™ SARS CoV-2, Panther™ system, Hologic, USA ; ou RT-PCR, Alinity m SARS-CoV-2®, Abbott Molecular, USA). Les échantillons positifs par le test TMA ont été retestés par RT-PCR (RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR, Altona Diagnostics, Allemagne) pour la détermination de la valeur du Ct. Le milieu de transport utilisé était un milieu de transport viral commercial (Greiner Bio One® ou Labo Moderne LMR®, Ozyme®). La recherche d'antigène du SARS-CoV-2 par ELISA a été réalisée dans les 2 à 8 heures suivant l'arrivée du prélèvement au laboratoire.

L'évaluation a porté sur le test antigénique ELISA VITROS SARS-CoV-2 d'Ortho Clinical Diagnostics sur l'appareil à haut débit VITROS 3600. Le test a été réalisé à partir d'un volume de milieu de transport viral de 400 µL, en suivant le protocole recommandé par le fournisseur.

Les trousse évaluées ont été fournies gratuitement par la société Ortho Clinical Diagnostics, qui a également mis à disposition un technicien pour la durée de l'étude afin de renforcer l'équipe de l'hôpital Henri Mondor pour l'analyse des échantillons.

Résultats

Les résultats sont présentés ci-dessous pour chaque test.

- 1) La **sensibilité** correspond au pourcentage de résultats positifs du test ELISA parmi les cas identifiés comme positifs pour l'ARN [i.e., vrais positifs/(vrais positifs + faux négatifs)], indiquée en rouge dans les tableaux.
- 2) La **spécificité** correspond au pourcentage de résultats négatifs du test ELISA parmi les sujets témoins identifiés comme négatifs pour l'ARN [i.e., vrais négatifs/(vrais négatifs + faux positifs)], indiquée en bleu dans le tableau correspondant.

I. Étude rétrospective : Évaluation de la sensibilité

Le tableau ci-dessous présente la sensibilité du test VITROS pour la détection de l'antigène du SARS-CoV-2 par ELISA en fonction du délai par rapport à l'apparition des symptômes et du Ct au sein de la cohorte rétrospective.

Cohorte rétrospective		Sensibilité		
	N=147	n Ag+/N PCR+	% Ag positifs	IC95%
Délai d'apparition des symptômes				
Délai 0-3 jours	18/25	72,0%	50,6%	87,9%
Délai 4-7 jours	17/22	77,3%	54,6%	92,2%
Délai 8-11 jours	12/20	60,0%	36,1%	80,9%
Délai ≥12 jours	2/4	50,0%	6,8%	93,2%
Délai ≤7 jours	35/47	74,5%	59,7%	86,1%
Asymptomatiques	0/1	0,0%	0,0%	97,5%
Symptômes non renseignés	64/75	85,3%	75,3%	92,4%
Valeur de Ct				
Ct ≤20	20/21	95,2%	76,2%	99,9%
Ct 21-25	46/46	100,0%	92,3%	100,0%
Ct 26-30	30/32	93,8%	79,2%	99,2%
Ct 31-35	15/35	42,9%	26,3%	60,6%
Ct 36-39	2/13	15,4%	1,9%	45,4%
Ct ≤35	111/134	82,8%	75,4%	88,8%
Ct ≤33	105/113	92,9%	86,5%	96,9%
Ct ≤30	96/99	97,0%	91,4%	99,4%
Ct ≤25	66/67	98,5%	92,0%	100,0%
Ct 31-33	9/14	64,3%	35,1%	87,2%
Ct 34-35	6/21	28,6%	11,3%	52,2%
% invalides	0/147	0,0%		

Sensibilité versus PCR pour Ct ≤25 : **98,5%** ; pour Ct ≤30 : **97,0%** ; pour Ct ≤33 : **92,9%** ; pour Ct ≤35 : **82,8%**

II. Étude prospective : Évaluation de la sensibilité et de la spécificité

Du 18 novembre au 3 décembre 2020, l'ensemble des échantillons naso-pharyngés testés dans le cadre du soin pour la recherche de SARS CoV-2, du mardi matin au vendredi midi, par TMA (Panther) ou RT-PCR (Alinity m) ont été parallèlement testés sur le système VITROS pour la recherche d'antigène SARS-CoV-2 par ELISA.

Au total, 1763 échantillons non sélectionnés ont été testés de manière prospective en première intention par TMA, RT-PCR ou LAMP. L'ARN du SARS-CoV-2 était:

- Présent dans 145/1763 (8,2%) échantillons.
- Absent dans 1614/1763 (91,5%) échantillons.
- Résultat ininterprétable dans 4/1763 (0,2%) échantillons.

1) Spécificité : Parmi les 1614 tests négatifs pour la recherche d'ARN viral en biologie moléculaire, tous ont également été trouvés négatifs par le test antigénique VITROS (**spécificité =100%**, CI95% : 99,8-100%).

2) Sensibilité : Au total, 145 échantillons ont été trouvés consécutivement positifs pour la recherche d'ARN viral par technique de biologie moléculaire. Ceux diagnostiqués par TMA ont été vérifiés à l'aide d'un deuxième test fondé sur la RT-PCR (Altona), qui a permis la détermination du Ct, non disponible avec le test TMA : Au total, 113 échantillons avaient un Ct ≤40 par la technique RT-PCR de contrôle et étaient donc considérés comme POSITIFS ; 32 prélèvements avaient un Ct ≥40 en RT-PCR de contrôle et auraient donc été considérés comme NÉGATIFS en PCR (la technique TMA est connue pour être plus sensible que la PCR et détecter des quantités très faibles d'ARN).

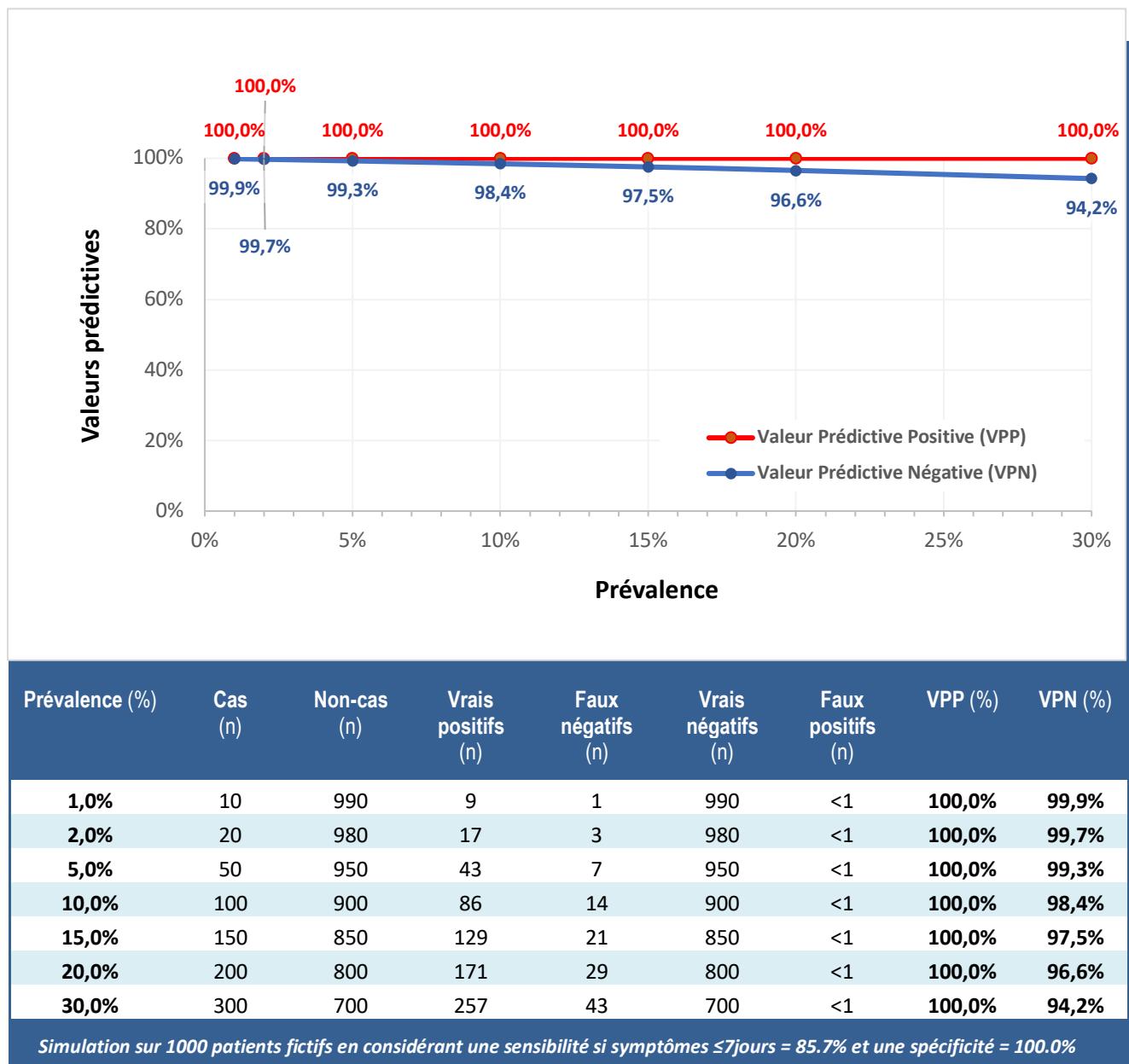
Le tableau ci-dessous présente la sensibilité du test VITROS pour la détection de l'antigène du SARS-CoV-2 par ELISA en fonction du délai par rapport à l'apparition des symptômes et du Ct au sein de la cohorte prospective.

		Sensibilité			
		n Ag+/ N PCR+	% Ag positifs	IC95%	
Cohorte prospective	Global	N=145			
	Délai d'apparition des symptômes				
	Délai 0-3 jours	40/48	83,3%	69,8%	92,5%
	Délai 4-7 jours	8/8	100,0%	63,1%	100,0%
	Délai 8-11 jours	6/8	75,0%	34,9%	96,8%
	Délai ≥12 jours	3/12	25,0%	5,5%	57,2%
	Délai ≤7 jours	48/56	85,7%	73,8%	93,6%
	Asymptomatiques	30/43	69,8%	53,9%	82,8%
	Symptômes non renseignés	15/25	60,0%	38,7%	78,9%
	Ct value				
	Ct ≤20	23/23	100,0%	85,2%	100,0%
	Ct 21-25	37/38	97,4%	86,2%	99,9%
	Ct 26-30	24/24	100,0%	85,8%	100,0%
	Ct 31-35	16/22	72,7%	49,8%	89,3%
	Ct 36-39	1/6	16,7%	0,4%	64,1%
	Ct ≥40	2/32	6,3%	0,8%	20,8%
	Ct ≤35	100/107	93,5%	87,0%	97,3%
	Ct ≤33	95/100	95,0%	88,7%	98,4%
	Ct ≤30	84/85	98,8%	93,6%	100,0%
	Ct ≤25	60/61	98,4%	91,2%	100,0%
	Ct 31-33	11/15	73,3%	44,9%	92,2%
	Ct 34-35	5/7	71,4%	29,0%	96,3%
	% invalides	0/145	0,0%		

Sensibilité versus PCR pour Ct ≤25 : **98,4%** ; pour Ct ≤30 : **98,8%** ; pour Ct ≤33 : **95,0%** ; pour Ct ≤35 : **93,5%**

III. Valeur prédictive positive (VPP) et valeur prédictive négative (VPN) en fonction de la prévalence de l'infection

Les résultats ci-dessous (figure et tableau) montrent l'évolution des valeurs prédictives positive (en rouge) et négative (en bleu) du test ELISA VITROS en fonction de la prévalence de l'infection dans la population testée : simulation sur la base des valeurs de sensibilité et de spécificité observées chez les sujets symptomatiques depuis moins de 7 jours de la cohorte prospective.



Synthèse

- La **spécificité** du test antigénique ELISA VITROS SARS CoV-2, évaluée de façon prospective sur une large série d'échantillons, était de 100% (IC95% : 99,8-100,0%).
- La **sensibilité** du test ELISA VITROS SARS CoV-2 était élevée par rapport à la RT-PCR, à la fois dans la cohorte rétrospective et dans la cohorte prospective en vie réelle:
 - o Sensibilités de 98,5% et 98,4%, respectivement dans les cohortes rétrospective et prospective, pour les charges virales ≤ 25 Ct, c'est-à-dire les charges virales élevées correspondant aux patients les plus contagieux.
 - o Sensibilités de 97,0% et 98,8%, respectivement dans les cohortes rétrospective et prospective, pour les charges virales ≤ 30 Ct.
 - o Sensibilités de 92,9% et 95,0%, respectivement dans les cohortes rétrospective et prospective pour les charges virales ≤ 33 Ct (Avis du 25/09/2020 de la Société Française de Microbiologie : « Si la valeur de Ct est ≤ 33 , la présence d'ARN viral détecté est compatible avec une excrétion virale significative »).
 - o Sensibilités de 82,8% et 93,5%, respectivement dans les cohortes rétrospective et prospective, pour les charges virales ≤ 35 Ct (limite considérée par différentes instances internationales comme définissant une excréption virale significative).
 - o La sensibilité était bonne dans la population de sujets asymptomatiques.

Remarques

- L'évaluation de deux cohortes, l'une rétrospective sur prélèvements congelés, l'autre prospective sur prélèvements frais, a permis de mieux comprendre l'impact potentiel de la congélation sur la détection d'antigènes. A ce titre, on ne notait pas de différence substantielle de sensibilité de détection de l'antigène SARS-CoV-2 par le test ELISA VITROS SARS CoV-2 entre les deux cohortes pour des Ct ≤ 25 , ≤ 30 et ≤ 33 , correspondant pour cette dernière à la définition de la SFM de la présence d'ARN viral compatible avec une excrétion virale significative. Les résultats portant sur les plages spécifiques de Ct entre 34 et 35 et entre 36 et 39, correspondant à de très faibles charges virales, suggéraient un effet possible de la congélation-décongélation sur la sensibilité de détection de l'antigène lorsqu'il est présent en très faibles quantités.
- La valeur du Ct est une mesure indirecte de la quantité d'ARN viral présent dans l'échantillon, elle peut varier d'un test RT-PCR à l'autre et ne mesure pas exactement la charge virale en l'absence de gamme standard évaluée en parallèle.

Conclusions

Le test ELISA VITROS SARS CoV-2 présente à la fois une excellente spécificité et une excellente sensibilité, en comparaison à la recherche d'ARN viral par RT-PCR, pour identifier la présence du virus SARS-CoV-2 dans des prélèvements naso-pharyngés de sujets infectés ayant une charge virale considérée comme compatible avec une excrétion virale significative.

Le test VITROS SARS CoV-2 est un test ELISA automatisé à haut débit qui peut être implanté facilement dans les laboratoires possédant l'appareil VITROS 3600. **Les performances observées dans cette évaluation à la fois rétrospective et prospective**

indiquent que ce test peut être utilisé dans les laboratoires de biologie médicale, à la place ou en complément des tests RT-PCR selon une stratégie qui reste à définir, pour permettre d'augmenter le nombre d'examens réalisés.

D'autres tests ELISA pour la détection d'antigènes du SARS-CoV-2 sont en développement et devront être évalués selon des modalités similaires. Leur implémentation pourrait permettre d'améliorer l'accès au diagnostic de COVID-19 au cours des prochains mois.