



ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE MOHAMMED V DE
RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET
DE PHARMACIE RABAT



Année : 2022

Mémoire N° : MS021

Mémoire de fin d'études

Pour L'obtention du Diplôme National

de Spécialité Médicale en **ANALYSES BIOLOGIQUES MEDICALES**

Intitulé

**COMPARAISON ENTRE LES KITS FILMARRAY
BIOFIRE RP2.1 ET MASCIR 2.0 POUR LA
DETECTION DU SARS-COV-2.**

Elaboré par :
Docteur Tazi Sophia

Sous la direction du
Professeure SEFFAR Myriame

Remerciements

**A NOTRE MAITRE ET ENCADRANT
MADAME LE PROFESSEUR MYRIAME SEFFAR PROFESSEUR
DE MICROBIOLOGIE**

Nous vous remercions vivement de nous avoir confié ce travail riche d'intérêt et d'avoir veillé à son élaboration avec beaucoup de patience et tout autant de rigueur. Nous vous remercions pour votre disponibilité en dépit de vos obligations professionnelles et vos innombrables conseils. Votre bienveillance, votre sens de l'écoute et votre confiance nous ont profondément marqués.

*Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude, tout en vous témoignant notre respect le plus profond et nos remerciements les plus sincères.
Puisse ce travail, et ce qui s'en suivra, être à la hauteur de la confiance que vous nous avez accordée.*

**A NOTRE MAITRE
MADAME LE PROFESSEUR HAKIMA KABBAJ PROFESSEUR DE
MICROBIOLOGIE**

Nous vous remercions pour votre aide précieuse pour la réalisation de ce travail, pour votre sens du partage, votre dévouement indéfectible et votre sollicitude à notre égard.

Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude, tout en vous témoignant notre respect le plus profond et nos remerciements les plus sincères.

A TOUS NOS MAITRES

Qui nous ont guidés avec bienveillance et compréhension pour l'acquisition du savoir nécessaire à l'exercice de notre profession. Nous espérons être dignes de leur confiance et à la hauteur de leurs attentes. Veuillez trouver ici, l'expression de notre dévouement, de notre reconnaissance et de notre grande gratitude.

A TOUTE L'EQUIPE DU LABORATOIRE CENTRAL DE VIROLOGIE

Sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACE-2 : Angiotensin Converting Enzyme 2
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : Acide ribonucléique
CDC : Centers for Disease Control and prevention
CHU : Centre Hospitalo-Universitaire
CI : Contrôle Interne
CLIA : Chemiluminescent Immunoassays
CNQ : Contrôle National de Qualité
CNR : Centre National de Référence
COVID-19 : Coronavirus Disease 2019
Ct : Cycle threshold
E : Enveloppe
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assays
FA : FilmArray
FDA : Food and Drug Administration
FHR : Fusion à Haute Résolution
HAS : Haute Autorité de Santé
HCoV : Human Coronavirus
HE : Héماغglutinine-Estérase
HIS : Hôpital Ibn Sina
HER : Hôpital d'Enfants de Rabat
HEY : Hôpital El Ayachi de Salé
IC : Contrôle Interne
Ig : Immunoglobuline
IND : Indéterminé
kb : Kilobases
LAMP : Loop-Mediated Isothermal Amplification

LCV : Laboratoire Central de Virologie
LOD : Limit Of Detection
M : Membrane
MERS : Middle East Respiratory Syndrome
MERS-CoV : Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
N : Nucléocapside
N : Négatif
NR : Non renseigné
NSB : Niveau de Sécurité Biologique
NSP : Protéines non structurales
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : Open Reading Frame
ORL : Oto-rhino-laryngologique
P : Positif
P (1,2,3,4) : Services de Pédiatrie
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pf : Positif faible
PIV 3 : Parainfluenza virus 3
pp : Polyprotéines
PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
RBD : Receptor Binding Domain
RdRp/R : ARN polymérase ARN-dépendante
RNA : Ribonucleic Acid
RP : Respiratory Panel
RT : Reverse Transcription
RT-LAMP : Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification
RT-PCR : Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction
S : Spike
S1 : Sous-unité 1 de la glycoprotéine Spike
S2 : Sous-unité 2 de la glycoprotéine Spike

SARS : Severe Acute Respiratory Syndrome

SARS-CoV-1 : Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1

SARS-CoV-2 : Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

SFM : Société Française de Microbiologie

SHOP : Service d'Hémo-Oncologie Pédiatrique

TAAN : Tests d'Amplification d'Acides Nucléiques

Taq : *Thermus aquaticus*

TDR : Tests de Diagnostic Rapide

Tf : Température de fusion

Tm : Melting Temperature

VOC : Variants Of Concern

VOI : Variants Of Interest

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

VRS : Virus respiratoire syncytial

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| I - Introduction : | 16 |
| II - Matériels et méthodes : | 16 |
| 1 – Type d'étude : | 16 |
| 2 – Échantillons inclus : | 16 |
| 3 – Recueil des données : | 17 |
| 4 – Méthodes d'étude : | 18 |
| 4.1 – PCR FilmArray BioFire® RP 2.1 Plus : | 18 |
| 4.1.1 – Principe : | 18 |
| 4.1.2 – Technique : | 20 |
| 4.1.3 – Interprétation : | 20 |
| 4.2 – RT-PCR MAScIR SARS-CoV-2 M kit 2.0 : | 21 |
| 4.2.1 – Principe : | 21 |
| 4.2.2 – Technique : | 21 |
| 4.2.3 – Interprétation : | 23 |
| 4.3 – RT-PCR ARGENE® SARS-CoV-2 R-GENE : | 24 |
| 4.3.1 – Principe : | 24 |
| 4.3.2 – Technique : | 25 |
| 4.3.3 – Interprétation : | 25 |
| III - Résultats : | 26 |
| 1 – Evaluation des performances du FilmArray RP 2.1 comparativement au kit MAScIR 2.0 : | 26 |
| 2 – Caractéristiques des échantillons positifs : | 26 |
| 2.1 – Profil épidémio-clinique : | 26 |
| 2.2 – Résultats FilmArray : | 29 |
| 2.3 – Résultats MAScIR 2.0 : | 31 |
| 2.4 – Comparaison des résultats entre les deux méthodes : | 33 |
| 2.5 – Caractéristiques des échantillons discordants et comparaison sur ARGENE : | 35 |

| | |
|--|----|
| 3 – Caractéristiques des échantillons négatifs :..... | 39 |
| IV – Discussion :..... | 41 |
| 1 – Partie théorique: SARS-CoV-2 et COVID-19 : | 41 |
| 1.1 – Historique :..... | 41 |
| 1.2 – Caractères virologiques du SARS-CoV-2 : | 42 |
| 1.2.1 – Taxonomie :..... | 42 |
| 1.2.2 – Structure :..... | 42 |
| 1.2.3 – Cycle de multiplication intracellulaire :..... | 43 |
| 1.2.4 – Variations génétiques du SARS-CoV-2 :..... | 44 |
| 1.3 – Epidémiologie :..... | 45 |
| 1.4 – Diagnostic clinique : | 45 |
| 1.5 – Diagnostic radiologique :..... | 45 |
| 1.6 – Diagnostic biologique :..... | 46 |
| 1.6.1 – Diagnostic virologique direct :..... | 46 |
| 1.6.1.1 – Tests moléculaires : | 46 |
| 1.6.1.2 – Tests antigéniques : | 51 |
| 1.6.1.3 – Culture virale :..... | 51 |
| 1.6.2 – Diagnostic virologique indirect :..... | 51 |
| 1.6.2.1 – Cinétique des anticorps :..... | 51 |
| 1.6.2.2 – Tests sérologiques : | 52 |
| 1.6.2.3 – Indications des tests sérologiques :..... | 52 |
| 1.6.3 – Stratégie diagnostique : place des différents tests :..... | 52 |
| 2 – Discussion de nos résultats :..... | 53 |
| 2.1 – Performances du FilmArray dans d’autres séries :..... | 54 |
| 2.2 – Sources des discordances :..... | 54 |
| 2.2.1 – Différence de sensibilité analytique :..... | 54 |
| 2.2.2 – Différence de cibles :..... | 56 |
| 2.2.3 – Réactions croisées :..... | 57 |
| 2.2.4 – Autres causes :..... | 58 |
| 2.3 – Détection d’autres virus sur FilmArray : | 58 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 2.4 – Limites de notre étude : | 59 |
| V - Conclusion : | 60 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau I: Protocole de la RT-PCR MAScIR SARS-CoV-2 M kit 2.0 [6]. | 22 |
| Tableau II: Critères d'interprétation de la RT-PCR MAScIR 2.0 [6]. | 23 |
| Tableau III: Protocole de la RT-PCR ARGENE® SARS-CoV-2 R-GENE [8]. | 25 |
| Tableau IV: Critères d'interprétation de la RT-PCR ARGENE® SARS-CoV-2 R-GENE. ... | 25 |
| Tableau V: Nombre d'échantillons positifs et négatifs sur FilmArray RP 2.1 et sur MAScIR 2.0. | 26 |
| Tableau VI: Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des échantillons discordants, ainsi que leurs résultats sur les trois méthodes utilisées. | 38 |
| Tableau VII: Classification et années d'identification des sept coronavirus humains [1]. | 42 |
| Tableau VIII: Performances du FilmArray évaluées dans d'autres séries, comparativement à la nôtre [30-33]. | 54 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1: Bon de demande d'examen sur FilmArray RP 2.1..... | 18 |
| Figure 2: FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus..... | 19 |
| Figure 3: Panel des agents pathogènes respiratoires détectés par la PCR FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus [5]..... | 19 |
| Figure 4: Représentation schématisée de la cassette de réaction du FilmArray RP2.1 [5]..... | 20 |
| Figure 6: Compte-rendu d'une PCR FilmArray RP 2.1 : Résultat positif pour le SARS-CoV-2. | 21 |
| Figure 7: Extracteurs utilisés au laboratoire pour la RT-PCR MAScIR 2.0 : A : GenePure Pro® (BioEr®), B : BigFish®, C : Maxwell® RSC Instrument (Promega®) et D : Molarray®. | 22 |
| Figure 8: Deux thermocycleurs utilisés au laboratoire pour la RT-PCR MAScIR 2.0 : A : QuantStudio™ 5 DX Real-Time PCR System Applied Biosystems™ et B : Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (Bioneer™)..... | 23 |
| Figure 9: Courbes d'amplification et fiche de lecture d'une RT-PCR MAScIR 2.0. | 24 |
| Figure 10: Répartition des patients positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray par tranches d'âges. | 27 |
| Figure 11: Répartition des échantillons positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray par service de provenance. | 27 |
| Figure 12: Prévalence des différents signes cliniques recensés chez les patients positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray..... | 28 |
| Figure 13: Délais entre la date du début de la symptomatologie (=J0) et celle du prélèvement chez les patients positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray..... | 28 |
| Figure 14: Répartition dans le temps des échantillons positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray. | 29 |
| Figure 15: Répartition des résultats positifs sur FilmArray selon le nombre de sondes de SARS-CoV-2 positives. | 30 |
| Figure 16: Prévalence des autres virus respiratoires détectés parmi les échantillons positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray. VRS : Virus respiratoire syncytial. | 30 |

| | |
|--|----|
| Figure 17: Résultats de la RT-PCR MAScIR 2.0 des échantillons positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray..... | 31 |
| Figure 18: Répartition des échantillons concordants selon le nombre de gènes détectés sur MAScIR 2.0. | 32 |
| Figure 19: Répartition des échantillons selon leurs Ct pour les gènes S et R sur MAScIR 2.0, incluant les Ct>37..... | 33 |
| Figure 20: Répartition des résultats obtenus sur MAScIR 2.0 selon le nombre de sondes détectées sur FilmArray. | 34 |
| Figure 21: Répartition des échantillons concordants selon le nombre de sondes détectées sur chacune des deux méthodes. | 35 |
| Figure 22: Répartition des échantillons discordants selon le nombre de sondes détectées sur FilmArray..... | 36 |
| Figure 23: Répartition des résultats des échantillons testés sur ARGENE selon le nombre de sondes détectées sur FilmArray..... | 36 |
| Figure 24: Prévalence des autres virus respiratoires détectés sur FilmArray parmi les échantillons négatifs sur MAScIR 2.0..... | 37 |
| Figure 25: Répartition par tranches d'âges des patients négatifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray..... | 39 |
| Figure 26: Répartition des échantillons négatifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray par service de provenance. | 40 |
| Figure 27: Répartition des échantillons négatifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray selon le nombre de virus respiratoires détectés. | 40 |
| Figure 28: Prévalence des autres virus respiratoires identifiés parmi les échantillons négatifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray. | 41 |
| Figure 29: Structure du SARS-CoV-2 [12]..... | 43 |
| Figure 30: Organisation génomique du SARS-CoV-2 [1]..... | 43 |
| Figure 31: Cycle de multiplication intracellulaire du SARS-CoV-2 [12]..... | 44 |
| Figure 32: Etapes de la RT-PCR [1]. | 48 |
| Figure 33: Courbe d'amplification d'une (RT-)PCR en temps réel [24]. | 49 |

Figure 34: Courbes de fusion d'une (RT-)PCR avec analyse FHR [4]..... 49
Figure 35: Cinétique des marqueurs diagnostiques en fonction du stade de l'infection [10].. 53

I - INTRODUCTION :

A l'origine d'une pandémie mondiale quelques mois seulement après son identification, le SARS-CoV-2 a requis la mise en place rapide d'outils diagnostiques appropriés et efficaces, dont la RT-PCR qui représente le gold standard.

Ainsi, de nombreux kits ont été développés qui, à défaut d'être approuvés à proprement parler, se sont vus octroyer des autorisations d'utilisation d'urgence par les divers organismes de réglementation. Au sein de la panoplie de tests mis sur le marché, les performances diagnostiques peuvent s'avérer très variables, a fortiori lorsque les tests comparés sont basés sur deux principes distincts, comme dans le cas de notre travail [1-3]. Ce dernier a eu pour objectif d'évaluer les performances de la PCR multiplexe FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus (RP2.1 Plus), pour la détection du SARS-CoV-2, comparativement à la méthode de référence de notre laboratoire, reposant sur le kit MAScIR SARS-CoV-2 M kit 2.0 ; la présence de résultats discordants ayant justifié le recours, par la suite, à un test complémentaire de comparaison via le kit ARGENE® SARS-CoV-2 R-GENE.

II - MATERIELS ET METHODES :

1 – TYPE D'ETUDE :

Il s'agit d'une étude rétrospective, descriptive, s'étalant sur une période de dix mois, allant du 1^{er} Janvier au 31 Octobre 2021 et menée au sein du Laboratoire Central de Virologie (LCV) du CHU Ibn Sina de Rabat.

2 – ÉCHANTILLONS INCLUS :

Il s'agissait d'écouvillons nasopharyngés prélevés sur des patients hospitalisés au niveau des différents services du CHU Ibn Sina et acheminés au LCV dans des milieux de transport viral (SOTHEMA® ou Pharma5®), contenant du sérum physiologique stérile. La PCR FilmArray était réalisée dès réception de l'échantillon ; la RT-PCR MAScIR, si prescrite par le médecin, était réalisée immédiatement ou après conservation de l'échantillon quelques heures à +4°C ; ou, si non demandée initialement, après décongélation de l'échantillon conservé à -70°C dans la sérothèque du laboratoire.

La première étape de l'étude a consisté en l'inclusion de tous les échantillons positifs pour le SARS-CoV-2 sur le FilmArray RP 2.1. Parmi ces derniers, ceux n'ayant pas fait l'objet initialement d'une RT-PCR MAScIR 2.0 en ont bénéficié dans un second temps. Cinq échantillons, en quantité insuffisante, ont été exclus de l'étude à ce stade.

La deuxième partie de l'étude a consisté à inclure des échantillons négatifs pour le SARS-CoV-2 sur FilmArray RP 2.1, en nombre égal aux positifs retenus, choisis aléatoirement parmi ceux ayant bénéficié d'une RT-PCR MAScIR 2.0 conjointe.

La troisième partie du travail, n'incluant que les échantillons dont les deux résultats étaient discordants, a consisté en la réalisation d'une RT-PCR ARGENE R-GENE pour tout échantillon en quantité suffisante.

3 – RECUEIL DES DONNEES :

Pour chacun des échantillons inclus, les données épidémiologiques, cliniques et paracliniques du patient, renseignées sur le bon de demande d'examen (Figure 1) ont été colligées.

Les résultats de la PCR FilmArray RP 2.1 ont été recherchés sur le logiciel FilmArray connecté à l'automate, ceux des RT-PCR MAScIR 2.0 et ARGENE ont été recueillis depuis les fiches de lecture des différentes séries.

La base de données de l'étude, retranscrite dans un tableau Microsoft EXCEL, comprenait :

- La date d'examen et le numéro d'échantillon
- L'âge et le sexe du patient
- Le service de recueil de l'échantillon
- La date de début de la symptomatologie et les différents signes cliniques
- Les résultats de la PCR FilmArray RP 2.1 : sondes positives pour le SARS-CoV-2 (Spike S, Membrane M) et présence ou non d'autres pathogènes
- Les résultats de la RT-PCR MAScIR 2.0 : Ct des gènes Spike S et ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp ou R) et interprétation du résultat (Positif, positif faible ou négatif)
- Les résultats de la RT-PCR ARGENE R-GENE : Ct des gènes Nucléocapside N et RdRp et interprétation du résultat (Positif, positif faible ou négatif)
- Les résultats d'éventuelles RT-PCR SARS-CoV-2 antérieures ou ultérieures.

| FICHE D'EXPLOITATION RENSEIGNEMENTS CLINIQUES PCR MULTIPLEX PANEL RESPIRATOIRE | | | |
|--|--|--|--|
| Identification du patient | | | |
| Nom : | Prénom : | Sexe : | |
| DDN : | Age : | Hôpital : | Service : |
| Données cliniques | | | |
| Motif d'hospitalisation : | | Date d'hospitalisation : / / | |
| Date du début des symptômes : / / | | | |
| - Fièvre <input type="checkbox"/> | - Température : °C | - Céphalées <input type="checkbox"/> | - Myalgies /arthralgies <input type="checkbox"/> |
| - Toux <input type="checkbox"/> | - Mal de gorge <input type="checkbox"/> | - Rhinorrhée <input type="checkbox"/> | - Anosmie <input type="checkbox"/> |
| | | | - Agueusie <input type="checkbox"/> |
| - Fréquence respiratoire : | | - Auscultation pulmonaire : | |
| - Difficulté respiratoire <input type="checkbox"/> | - SDRA <input type="checkbox"/> | Défaillance multi-viscérale <input type="checkbox"/> | |
| - Convulsions <input type="checkbox"/> | - Troubles de la conscience <input type="checkbox"/> | | |
| - Signes digestifs <input type="checkbox"/> | Autres : | | |
| - Oxygénothérapie <input type="checkbox"/> | - Assistance respiratoire <input type="checkbox"/> | | |
| - Vaccination anti-Grippe durant la saison actuelle <input type="checkbox"/> | | | |
| Données radiologiques | | | |
| - Radiographie thoracique : | | | |
| - TDM thoracique | | | |
| Comorbidités et facteurs de risque | | | |
| Maladie respiratoire chronique <input type="checkbox"/> | | Maladie cardiaque chronique <input type="checkbox"/> | |
| Diabète <input type="checkbox"/> type : | | HTA <input type="checkbox"/> | |
| Tabagisme <input type="checkbox"/> | | Grossesse <input type="checkbox"/> | |
| | | Immunodépression <input type="checkbox"/> | |
| Bilan biologique | | | |
| - Leucocytes : /mm ³ | | - PNN : /mm ³ | |
| - CRP : | | - Lymphocytes : /mm ³ | |
| - Procalcitonine : | | | |
| Données virologiques | | | |
| Date du prélèvement : | | | |
| Ecouvillonnage nasopharyngé <input type="checkbox"/> | | Autre : | |
| Résultat de la PCR multiplex : | | | |
| Evolution du patient | | | |
| - Guérison <input type="checkbox"/> | | - Décès <input type="checkbox"/> | |
| | | - Transfert : <input type="checkbox"/> | |

Code : HSR - LCV / PTAN / FIC - 009 Version 01 Date d'application 30/12/2020 Numéro de page : 2 / 2

Figure 1: Bon de demande d'examen sur FilmArray RP 2.1.

4 – METHODES D'ETUDE :

4.1 – PCR FilmArray BioFire® RP 2.1 Plus :

4.1.1 – Principe :

Il s'agit d'un système fermé et autonome, conçu pour la recherche simultanée de 23 pathogènes : quatre bactéries et 19 virus dont le SARS-CoV-2 (Figure 3). Cet équipement est basé sur le principe de la PCR nichée, incluant une PCR 1 multiplexe et une PCR 2 monoplexe réalisée en triplicats, avec détection en point final de la fluorescence émise par un agent intercalant, permettant ainsi l'établissement de courbes de fusion d'ADN et l'identification subséquente de l'agent pathogène selon la température de fusion (T_f). La détection du SARS-CoV-2 repose sur la recherche des gènes S et M [4,5].



Figure 2: FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus.

| Virus | Bactéries |
|---|---------------------------------|
| Adenovirus (Adénovirus) | <i>Bordetella parapertussis</i> |
| Coronavirus 229E | <i>Bordetella pertussis</i> |
| Coronavirus HKU1 | <i>Chlamydia pneumoniae</i> |
| Coronavirus NL63 | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
| Coronavirus OC43 | |
| Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient) (MERS-CoV) | |
| Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère) (SARS-CoV-2) | |
| Human Metapneumovirus (Métapneumovirus humain) | |
| Human Rhinovirus/Enterovirus (Entérovirus/rhinovirus humains) | |
| Influenza A (Virus de la grippe A), y compris les sous-types H1, H3 et H1-2009 | |
| Influenza B (Virus de la grippe B) | |
| Parainfluenza Virus 1 (Virus parainfluenza 1) | |
| Parainfluenza Virus 2 (Virus parainfluenza 2) | |
| Parainfluenza Virus 3 (Virus parainfluenza 3) | |
| Parainfluenza Virus 4 (Virus parainfluenza 4) | |
| Respiratory Syncytial Virus (Virus respiratoire syncytial) | |

Figure 3: Panel des agents pathogènes respiratoires détectés par la PCR FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus [5].

4.1.2 – Technique :

300µl d'échantillon respiratoire sont ajoutés à un tampon et injectés dans une cassette (Figure 4) contenant tous les réactifs nécessaires pour la PCR. Le temps de manipulation est réduit, de l'ordre de quelques minutes.

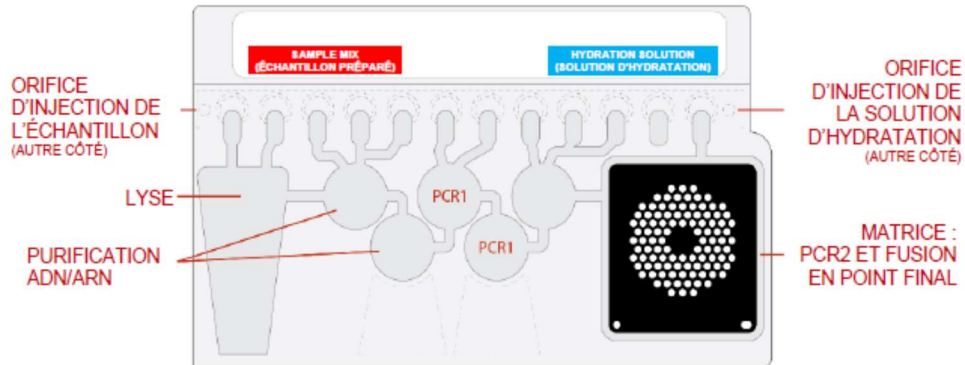


Figure 4: Représentation schématisée de la cassette de réaction du FilmArray RP2.1 [5].

4.1.3 – Interprétation :

Chaque test inclut deux contrôles : RNA Process Control et PCR2 Control. L'échec d'un des deux contrôles invalide le test.

L'interprétation est automatisée et le résultat est qualitatif, la positivité d'une cible impliquant qu'au moins deux des trois courbes de fusion aient une Tf similaire et la détection d'un organisme impliquant la positivité d'au moins une de ses sondes, en l'occurrence : S ou M pour le SARS-CoV-2 [4,5].

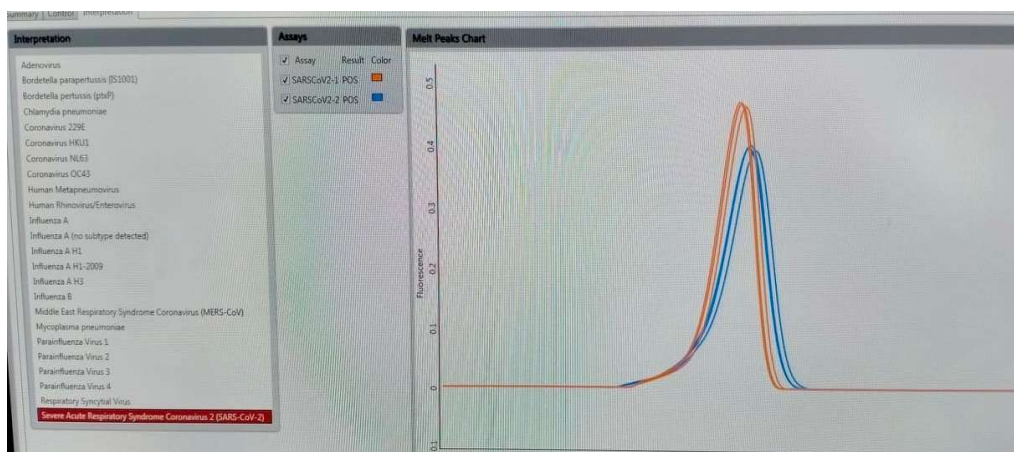


Figure 5: Analyse des courbes de fusion des sondes du SARS-CoV-2 sur FilmArray RP 2.1 : Résultat positif pour le SARS-CoV-2, pour les deux sondes.

| Detected: | Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) | Controls: | Passed |
|-------------------|--|------------------|--------|
| Equivocal: | None | | |
| Result Summary | | | |
| Viruses | | | |
| Not Detected | Adenovirus | | |
| Not Detected | Coronavirus 229E | | |
| Not Detected | Coronavirus HKU1 | | |
| Not Detected | Coronavirus NL63 | | |
| Not Detected | Coronavirus OC43 | | |
| Not Detected | Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) | | |
| ✓ Detected | Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) | | |
| Not Detected | Human Metapneumovirus | | |
| Not Detected | Human Rhinovirus/Enterovirus | | |
| Not Detected | Influenza A | | |
| Not Detected | Influenza B | | |
| Not Detected | Parainfluenza Virus 1 | | |
| Not Detected | Parainfluenza Virus 2 | | |
| Not Detected | Parainfluenza Virus 3 | | |
| Not Detected | Parainfluenza Virus 4 | | |
| Not Detected | Respiratory Syncytial Virus | | |
| Bacteria | | | |
| Not Detected | <i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001) | | |
| Not Detected | <i>Bordetella pertussis</i> (ptxP) | | |
| Not Detected | <i>Chlamydia pneumoniae</i> | | |
| Not Detected | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | | |

Figure 6: Compte-rendu d'une PCR FilmArray RP 2.1 : Résultat positif pour le SARS-CoV-2.

4.2 – RT-PCR MAScIR SARS-CoV-2 M kit 2.0 :

4.2.1 – Principe :

Il s'agit d'une RT-PCR triplexe, ciblant deux gènes viraux du SARS-CoV-2 (RdRp et S), ainsi qu'un contrôle interne cellulaire. Le test est adaptable sur de nombreux thermocycleurs, après une phase préalable d'extraction [6].

4.2.2 – Technique :

L'extraction a été réalisée sur l'un des différents automates du laboratoire : Molarray®, Maxwell® RSC Instrument (Promega®), GenePure Pro® (BioEr®), ou BigFish®, à partir de 200 ou 300 µl d'échantillon, additionnés ou non de protéine kinase. Certains de ces extracteurs fonctionnent sur plaques de 16 échantillons (BioEr, BigFish et Molarray), d'autres par cassettes unitaires (Maxwell). Par la suite, un volume de 6,5 µl d'éluat était ajouté à 3,5 µl de mix réactionnel, en vue de procéder à l'amplification, réalisée sur l'un des trois thermocycleurs suivants : ABI 7500 FAST Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), QuantStudio™ 5 DX Real-Time PCR System Applied Biosystems™, ou Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (Bioneer™), selon le protocole suivant [6] :

Tableau I: Protocole de la RT-PCR MAScIR SARS-CoV-2 M kit 2.0 [6].

| Stage | Etape | Température | Temps |
|----------------|-------------------------|-------------|-------------|
| Hold | Reverse transcription | 50°C | 5 minutes |
| Hold | Activation | 95°C | 20 secondes |
| Cycles (40) | Dénaturation | 95°C | 3 secondes |
| | Hybridation/ Elongation | 60°C | 30 secondes |



Figure 7: Extracteurs utilisés au laboratoire pour la RT-PCR MAScIR 2.0 : A : GenePure Pro® (BioEr®), B : BigFish®, C : Maxwell® RSC Instrument (Promega®) et D : Molarray®.



Figure 8: Deux thermocycleurs utilisés au laboratoire pour la RT-PCR MAScIR 2.0 : A : QuantStudio™ 5 DX Real-Time PCR System Applied Biosystems™ et B : Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (Bioneer™).

4.2.3 – Interprétation :

Chaque microplaque de 96 puits incluait trois contrôles: un positif, un négatif et un négatif d'extraction. Une fois ces derniers validés, l'interprétation du résultat des échantillons, fonction du Ct de chaque cible et de l'aspect de la courbe d'amplification, se faisait conformément aux instructions du fabricant, selon les critères suivants [6] :

Tableau II: Critères d'interprétation de la RT-PCR MAScIR 2.0 [6].

| | RdRp (Ct) | S (Ct) | IC(Ct) | Résultat |
|---|------------------|---------------|---------------|------------------------|
| 1 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 35 | Positif |
| 2 | ≤ 37 | IND | ≤ 35 | Positif |
| 3 | IND | ≤ 37 | ≤ 35 | Positif |
| 4 | IND | IND | ≤ 35 | Négatif |
| 5 | ≤ 37 | ≤ 37 | IND | Non valide (Re-tester) |
| 6 | IND | IND | IND | Non valide (Re-tester) |

RdRp : gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante ; S : gène de la protéine Spike ; Ct : Cycle threshold ; IC : Contrôle interne ; IND : Indéterminé.

En plus des critères sus-cités, les seuils de Ct établis par la SFM pour ce kit ont également été considérés, en vue de permettre une interprétation semi-quantitative du résultat, ce dernier étant positif lorsque le Ct d'au moins une sonde était ≤ 30 (correspondant à une excrétion virale significative ou forte) et positif faible lorsque le Ct le plus bas était $30 < Ct \leq 37$ (correspondant à une faible excrétion virale) [7]. Les échantillons positifs faibles, sans antécédent de PCR, étaient repassés pour exclure une éventuelle contamination de l'échantillon.

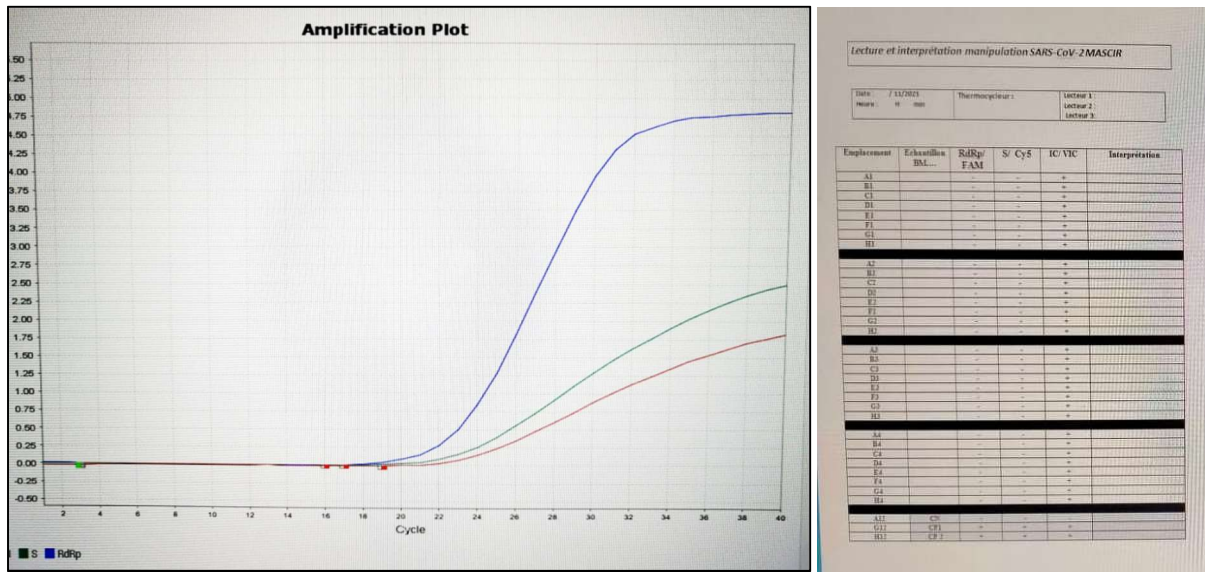


Figure 9: Courbes d'amplification et fiche de lecture d'une RT-PCR MAScIR 2.0.

4.3 – RT-PCR ARGENE® SARS-CoV-2 R-GENE :

4.3.1 – Principe :

Ce test inclut une RT-PCR1 triplexe visant à détecter les gènes N et RdRp du SARS-CoV-2 et un contrôle interne à ARN exogène, selon la technologie TaqMan, accessoirement complétée, selon son résultat, par une RT-PCR2 ciblant le gène Enveloppe E, spécifique du sous-genre *Sarbecovirus* [8]. Dans notre étude, nous n'y avons eu recours pour aucun échantillon.

4.3.2 – Technique :

L'extraction a été réalisée sur BigFish®, à partir de 200 µl d'échantillon, additionnés de 10 µl de contrôle interne. Après ajout de 10 µl d'éluat à 15 µl de mix réactionnel, l'amplification a été faite sur le QuantStudio™ 5 DX selon le protocole suivant [8] :

Tableau III: Protocole de la RT-PCR ARGENE® SARS-CoV-2 R-GENE [8].

| Stage | Etape | Température | Temps |
|----------------|-----------------------|-------------|-------------|
| Hold | Reverse transcription | 50°C | 5 minutes |
| Hold | Activation | 95°C | 15 minutes |
| Cycles (45) | Dénaturation | 95°C | 10 secondes |
| | Hybridation | 60°C | 40 secondes |
| | Elongation | 72°C | 25 secondes |

4.3.3 – Interprétation :

La validation du contrôle négatif requiert un $Ct \leq 36$ pour le contrôle interne sans détection des deux autres cibles ; celle du contrôle positif un $Ct < 34$ pour les gènes N et RdRp, sans amplification du contrôle interne. Pour chaque échantillon, l'interprétation s'est faite selon les critères suivants [8] :

Tableau IV: Critères d'interprétation de la RT-PCR ARGENE® SARS-CoV-2 R-GENE [8].

| | Ct | | | |
|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|
| N | <40 | - ou ≥ 40 | - ou ≥ 40 | - ou ≥ 40 |
| RdRp | / | + | - | - |
| CI échantillon - CI contrôle négatif | / | $\leq 3 Ct$ | $\leq 3 Ct$ | $> 3 Ct$ |
| | Interprétation | | | |
| | Positif | Positif | Négatif | Résultat invalide |

N : gène de la Nucléocapside ; RdRp : gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante ; Ct : Cycle threshold ; CI : Contrôle interne.

Enfin, selon les recommandations de la SFM pour ce kit, les échantillons étaient considérés positifs quand le Ct le plus bas était ≤ 34 et positifs faibles quand ce dernier était > 34 [7].

III - RESULTATS :

Pendant la période de l'étude, 595 PCR ont été réalisées sur le FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus, dont 85 étaient positives pour le SARS-CoV-2, soit une prévalence de l'ordre de 14,3%.

1 – EVALUATION DES PERFORMANCES DU FILMARRAY RP 2.1 COMPARATIVEMENT AU KIT MASCIR 2.0 :

Dans notre travail, n'ont été inclus que 80 échantillons parmi ceux positifs, en raison de la quantité insuffisante des cinq autres pour faire l'étude comparative. Dans un second temps, 80 échantillons négatifs testés conjointement sur les deux méthodes ont été inclus.

Parmi les échantillons positifs, 59 étaient concordants (73,8%), dont 42 étaient positifs et 17 positifs faibles sur MAScIR 2.0. Parmi les échantillons négatifs, aucun résultat discordant n'a été recensé.

Tableau V: Nombre d'échantillons positifs et négatifs sur FilmArray RP 2.1 et sur MAScIR 2.0.

| | | MAScIR SARS-CoV-2 M kit 2.0 | |
|-----------------------------------|---|-----------------------------|-----------|
| | | + | - |
| FilmArray BioFire® RP 2.1 Plus | + | 59 | 21 |
| | - | 0 | 80 |

Ainsi, la sensibilité et la spécificité du FilmArray ont été évaluées respectivement à 100% et 79,2%. Les valeurs prédictives positive et négative, quant à elles, ont été estimées à 73,8% et 100% respectivement.

2 – CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS POSITIFS :

2.1 – Profil épidémio-clinique :

Les 80 échantillons positifs de notre étude concernaient 75 patients, âgés de 1 mois à 86 ans, avec un âge moyen estimé à 45,2 ans, dont 38 étaient de sexe masculin et dont quatre avaient deux prélèvements positifs chacun, séparés par un intervalle de 0 à 12 jours. Le dernier échantillon, quant à lui, consistait en un échantillon de contrôle national de qualité (CNQ), reçu en vue d'évaluer la RT-PCR MAScIR 2.0 et qui a été testé, a posteriori, sur FilmArray.

Sur les 79 demandes d'examens reçues, la symptomatologie clinique a été rapportée dans 58 cas, avec la dyspnée, la fièvre et la toux en tête des signes les plus recensés. Le délai du prélèvement par rapport à la date du début de la symptomatologie, renseigné à 53 reprises, s'étendait entre 0 et 29 jours, avec une moyenne évaluée à 6,1 jours.

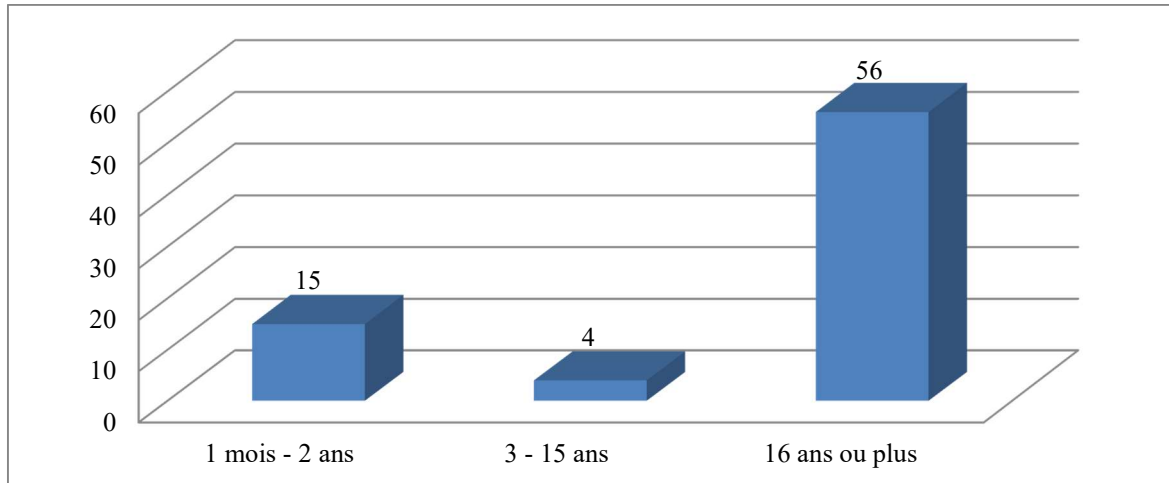


Figure 10: Répartition des patients positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray par tranches d'âges.

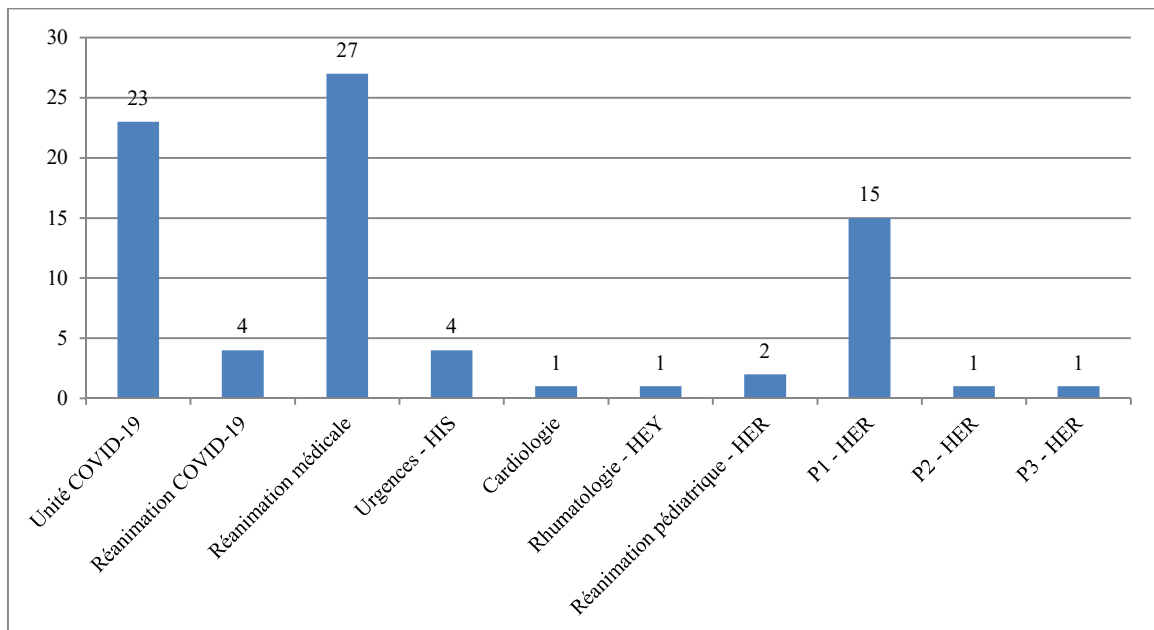


Figure 11: Répartition des échantillons positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray par service de provenance.

COVID-19 : Coronavirus Disease 2019 ; P : Service de Pédiatrie ; HIS : Hôpital Ibn Sina ; HEY : Hôpital El Ayachi de Salé ; HER : Hôpital d'Enfants de Rabat.

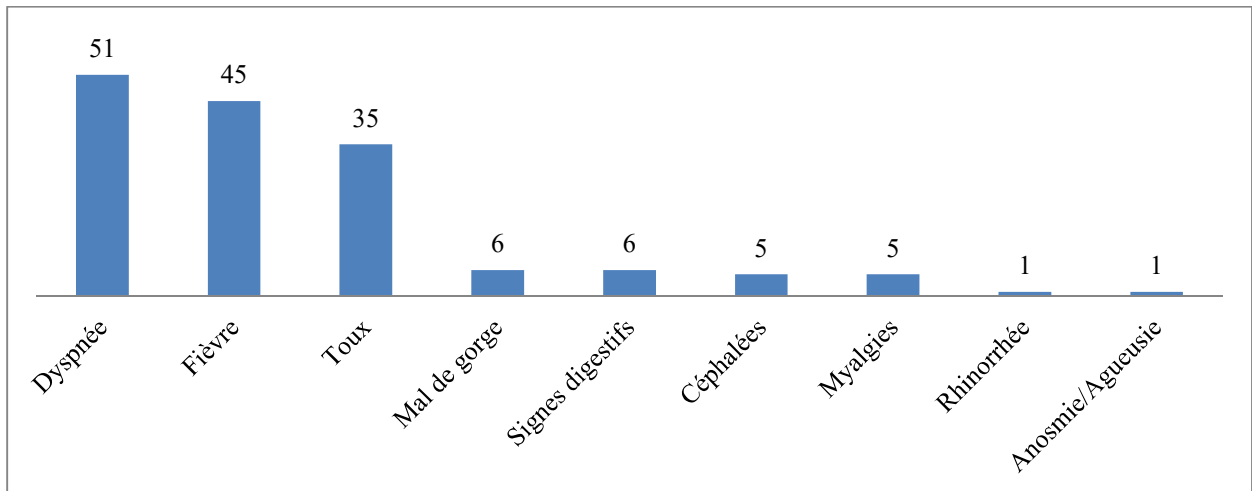


Figure 12: Prévalence des différents signes cliniques recensés chez les patients positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray.

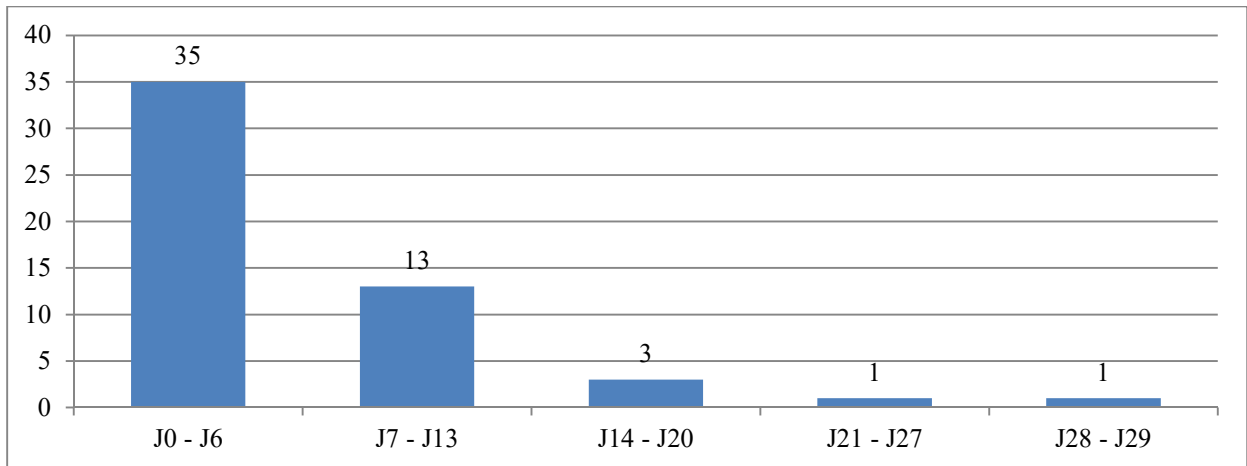


Figure 13: Délais entre la date du début de la symptomatologie (=J0) et celle du prélèvement chez les patients positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray.

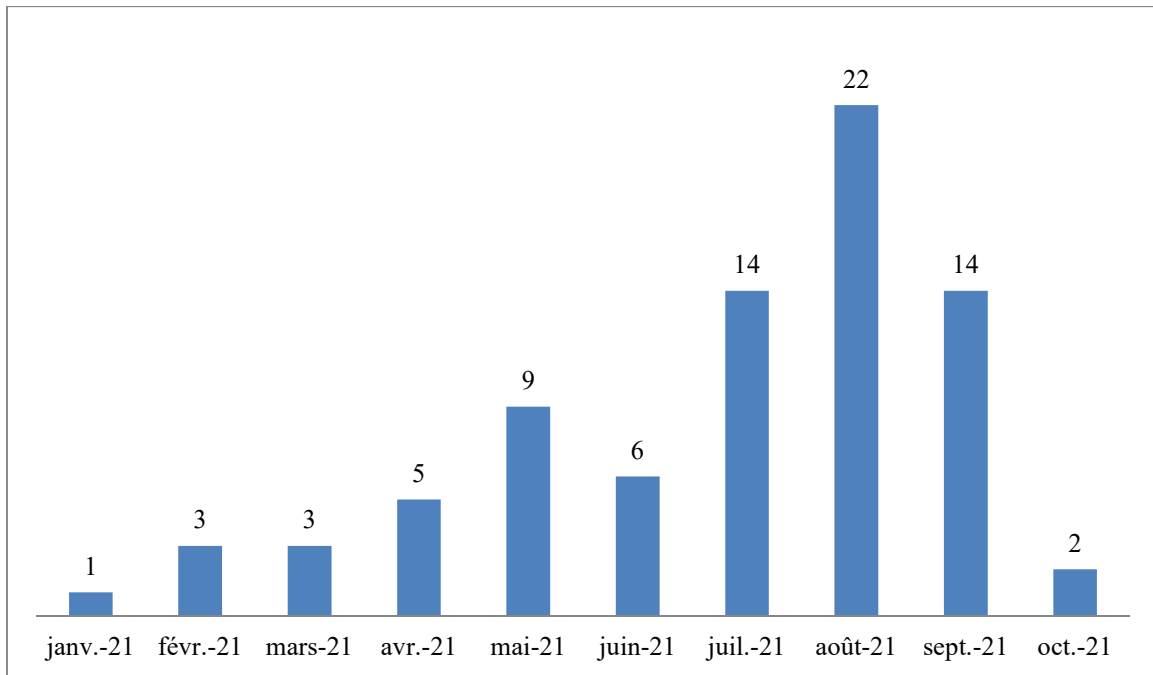


Figure 14: Répartition dans le temps des échantillons positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray.

2.2 – Résultats FilmArray :

Parmi les 80 échantillons, 63 étaient positifs pour les deux sondes du SARS-CoV-2, soit 78,8%.

Dans 19 échantillons, soit 23,8% des cas, d'autres agents pathogènes ont été identifiés : il s'agissait d'un seul virus dans 15 cas (79%), et de deux autres virus dans les quatre autres cas (21%). En outre, aucun agent bactérien n'a été mis en évidence.

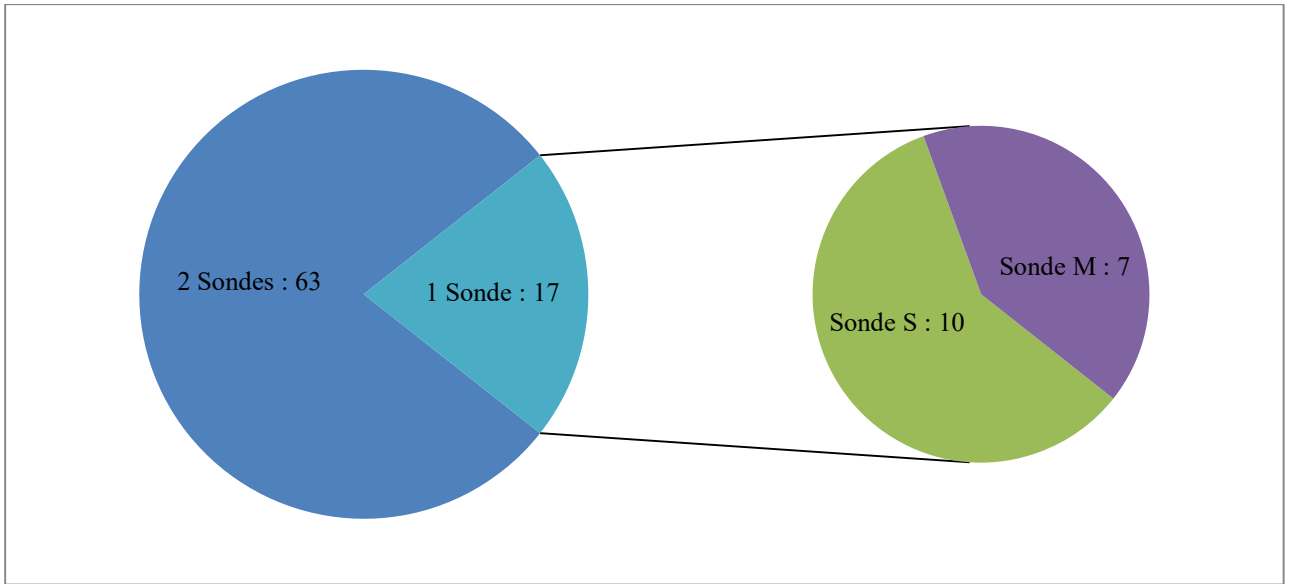


Figure 15: Répartition des résultats positifs sur FilmArray selon le nombre de sondes de SARS-CoV-2 positives.

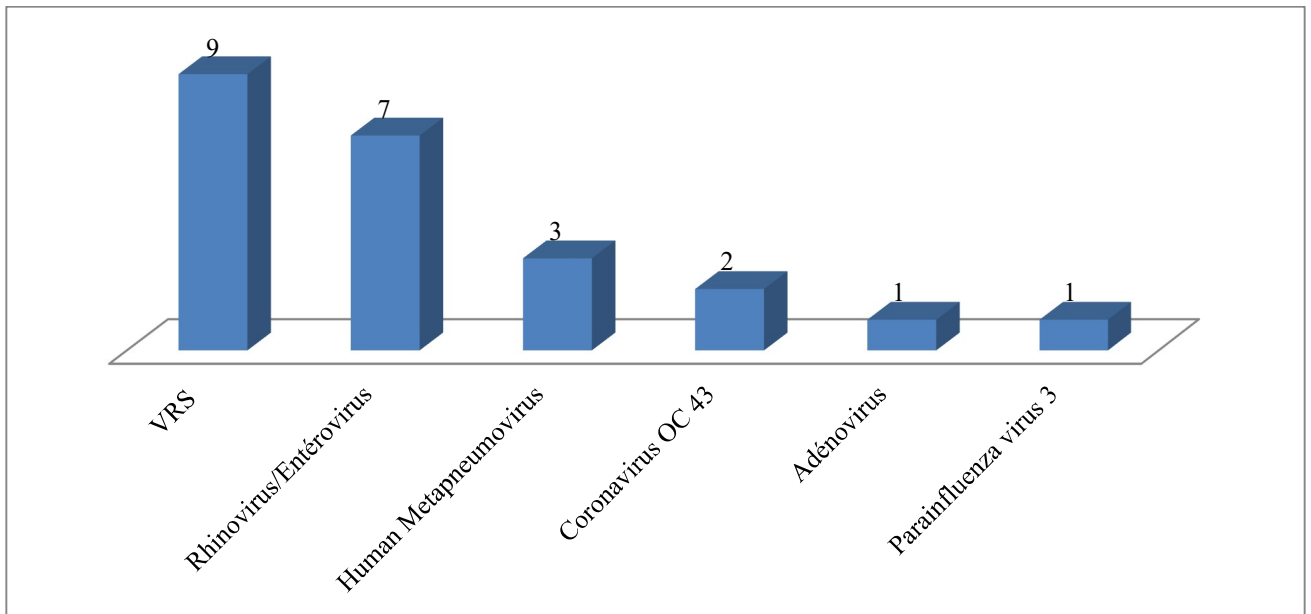


Figure 16: Prévalence des autres virus respiratoires détectés parmi les échantillons positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray.

VRS : Virus respiratoire syncytial.

2.3 – Résultats MAScIR 2.0 :

Dans 59 cas sur 80, les résultats concordaient avec ceux du FilmArray, se répartissant entre 42 résultats positifs ($Ct \leq 30$), et 17 positifs faibles ($30 < Ct \leq 37$).

Sur les échantillons positifs, prélevés en moyenne 6,4 jours après le début de la symptomatologie (N=28), les deux gènes S et R étaient unanimement positifs, avec des Ct oscillant entre 13 et 30 pour le gène S et entre 12 et 30 pour le gène R, et des moyennes de Ct évaluées respectivement à 22,7 et à 22,3 pour les gènes S et R.

Sur les échantillons positifs faibles prélevés en moyenne 6,3 jours après le début de la symptomatologie (N=11), les deux gènes ont été détectés dans neuf cas, le gène S uniquement dans trois cas et le gène R uniquement dans cinq cas, le Ct étant ≥ 35 chaque fois qu'un seul gène était positif. En outre, ce groupe incluait le contrôle national de qualité.

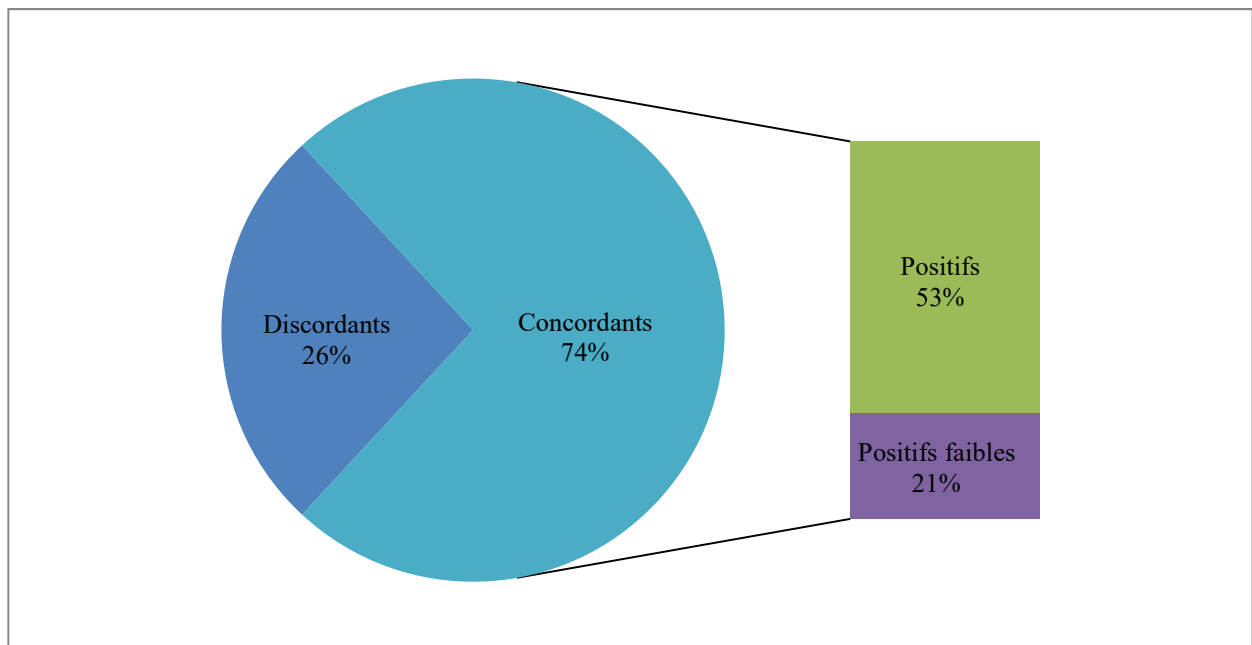


Figure 17: Résultats de la RT-PCR MAScIR 2.0 des échantillons positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray.

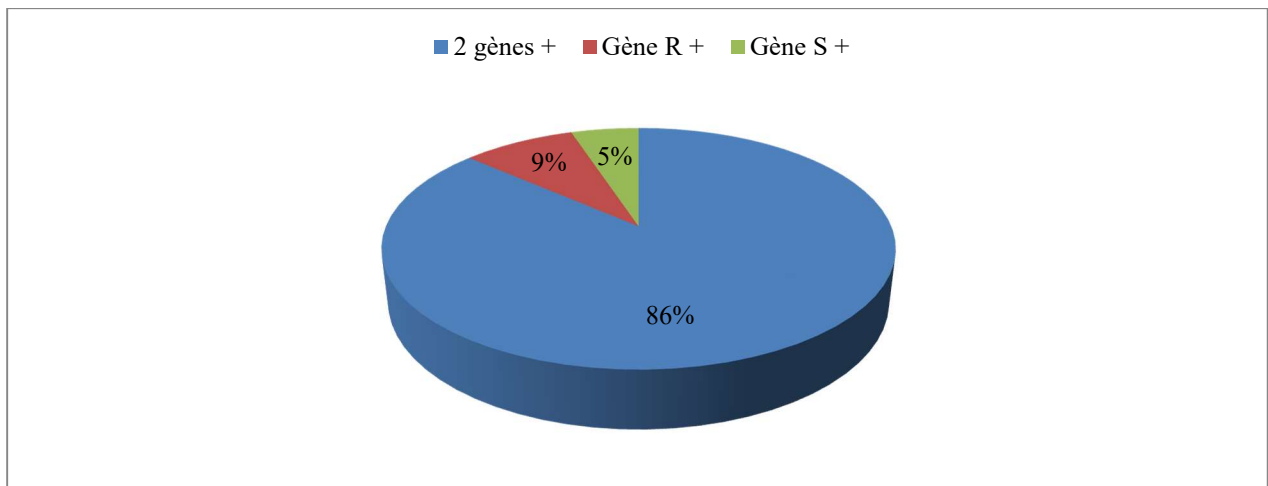


Figure 18: Répartition des échantillons concordants selon le nombre de gènes détectés sur MAScIR 2.0.

R : gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante ; S : gène de la protéine Spike.

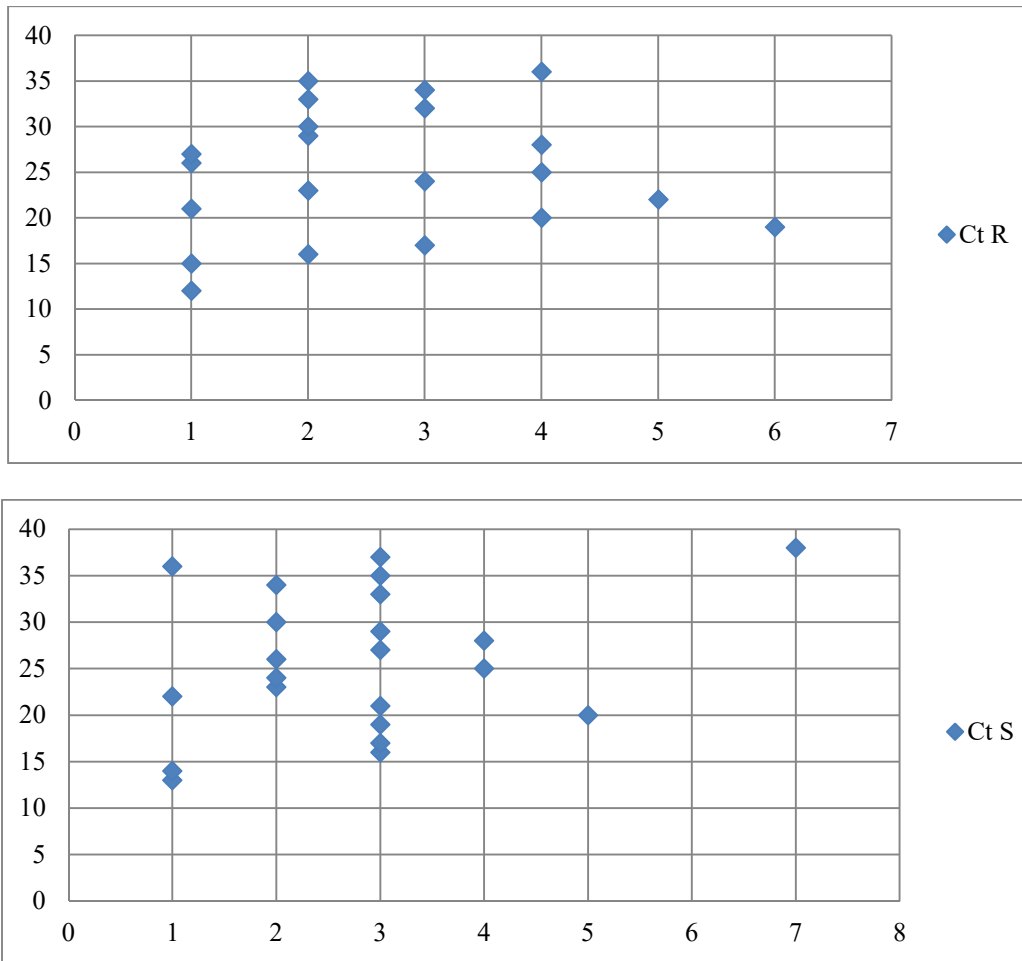


Figure 19: Répartition des échantillons selon leurs Ct pour les gènes S et R sur MAScIR 2.0, incluant les Ct > 37.

Ct : Cycle threshold ; R : gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante ; S : gène de la protéine Spike.

Enfin, 21 prélèvements négatifs étaient recensés, prélevés en moyenne 5,6 jours après le début de la symptomatologie (N=14), incluant cinq échantillons où le gène S était détecté au-delà du seuil de positivité (Ct=38).

2.4 – Comparaison des résultats entre les deux méthodes :

Selon le nombre de sondes positives sur FilmArray, le taux de discordance allait de 12,7% en présence des deux sondes, à 42,9% et 100% en cas de détection isolée de la sonde M ou S respectivement.

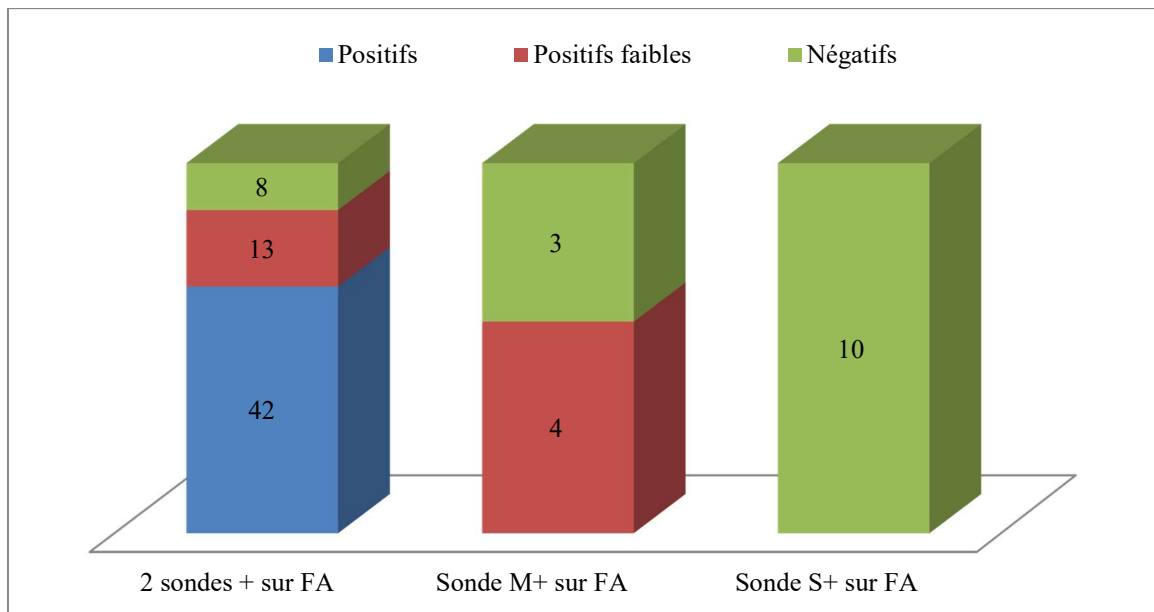


Figure 20: Répartition des résultats obtenus sur MAScIR 2.0 selon le nombre de sondes détectées sur FilmArray.

FA : FilmArray ; M : gène de la protéine de Membrane ; S : gène de la protéine Spike.

La positivité concomitante des gènes S et R sur MAScIR 2.0 était notée dans 92,7% des cas où les 2 sondes étaient détectées sur FilmArray, mais jamais en présence d'une seule sonde sur ce dernier.

Dans les 4 cas concordants où seule la sonde M était détectée sur FilmArray, les Ct de la sonde R étaient ≥ 36 sur MAScIR. Enfin, le gène S, seule cible commune entre les deux méthodes, était unanimement négatif sur MAScIR chaque fois qu'il l'était sur FilmArray ; bien que, dans un cas, il ait été détecté avec un Ct situé au-delà du seuil de positivité (Ct = 38).

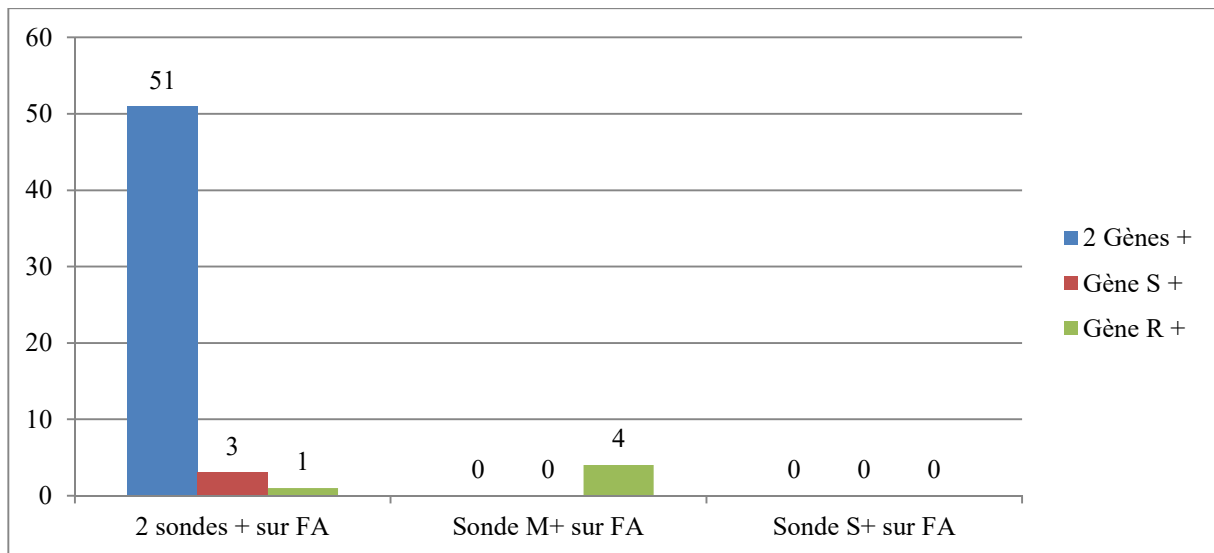


Figure 21: Répartition des échantillons concordants selon le nombre de sondes détectées sur chacune des deux méthodes.

FA : FilmArray ; M : gène de la protéine de Membrane ; S : gène de la protéine Spike ; R : gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante.

Enfin, la détection d'autres virus respiratoires sur FilmArray passait de 11,8% à 57,1% des cas sur les prélèvements concordants et discordants respectivement.

2.5 – Caractéristiques des échantillons discordants et comparaison sur ARGENE :

Sur FilmArray, parmi ces 21 échantillons, les deux sondes étaient positives dans huit cas, la sonde S seule dans dix cas et la sonde M seule dans les trois derniers cas.

Sur MAScIR, le gène S a été détecté avec un Ct situé au-delà du seuil de positivité sur cinq échantillons, tous positifs en S sur FilmArray.

Sur ARGENE, seuls onze échantillons ont pu être testés, la quantité étant insuffisante pour les autres. Six résultats concordaient avec ceux du FilmArray, dont cinq étaient positifs et un positif faible ; parmi ces six échantillons, seul un n'était positif que pour un gène, en l'occurrence le gène N. Les six échantillons confirmés positifs en ARGENE, étaient tous positifs pour les deux sondes en FilmArray. Parmi les cinq échantillons confirmés négatifs en ARGENE, quatre étaient positifs pour seulement une sonde sur deux en FilmArray.

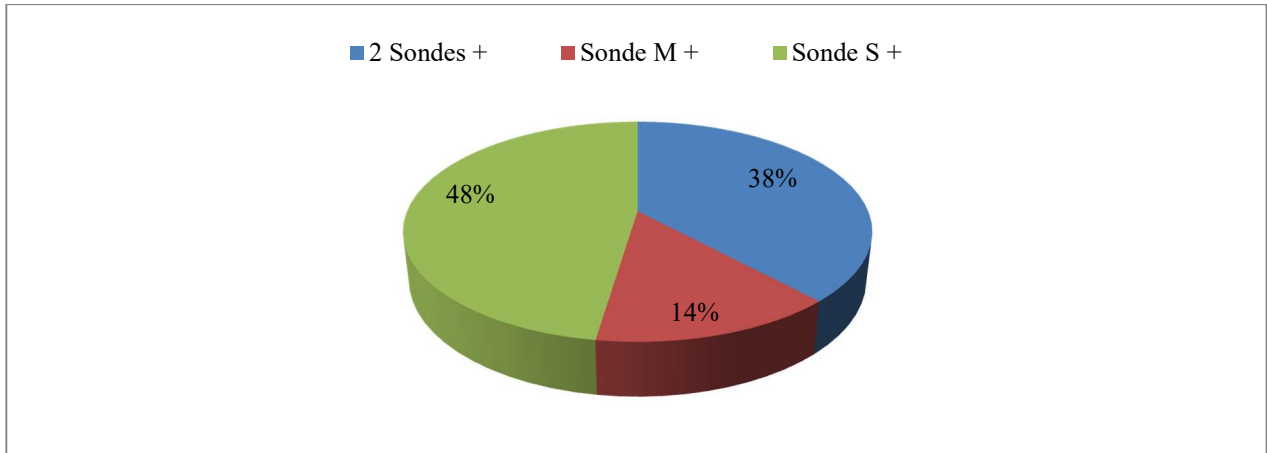


Figure 22: Répartition des échantillons discordants selon le nombre de sondes détectées sur FilmArray.

M : gène de la protéine de Membrane ; S : gène de la protéine Spike.

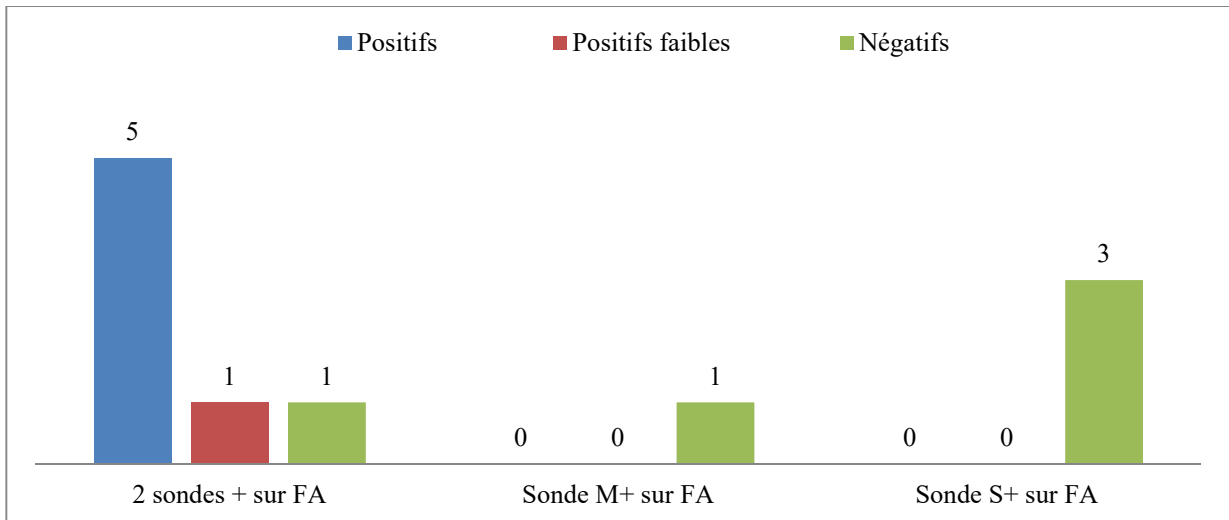


Figure 23: Répartition des résultats des échantillons testés sur ARGENE selon le nombre de sondes détectées sur FilmArray.

FA : FilmArray ; M : gène de la protéine de Membrane ; S : gène de la protéine Spike.

Sur douze échantillons, soit dans 57,1% des cas, d'autres virus respiratoires ont été détectés sur FilmArray, au nombre de deux dans quatre cas et d'un seul virus dans les huit autres. Parmi ces derniers, les VRS et rhinovirus/entérovirus caracolaient en tête de liste. Il est à noter qu'un autre coronavirus, le HCoV OC43, a été détecté sur deux échantillons prélevés

sur deux patients distincts ; dont l'un chez qui une seconde PCR sur FilmArray, réalisée deux jours plus tard, n'a détecté que le HCoV OC43.

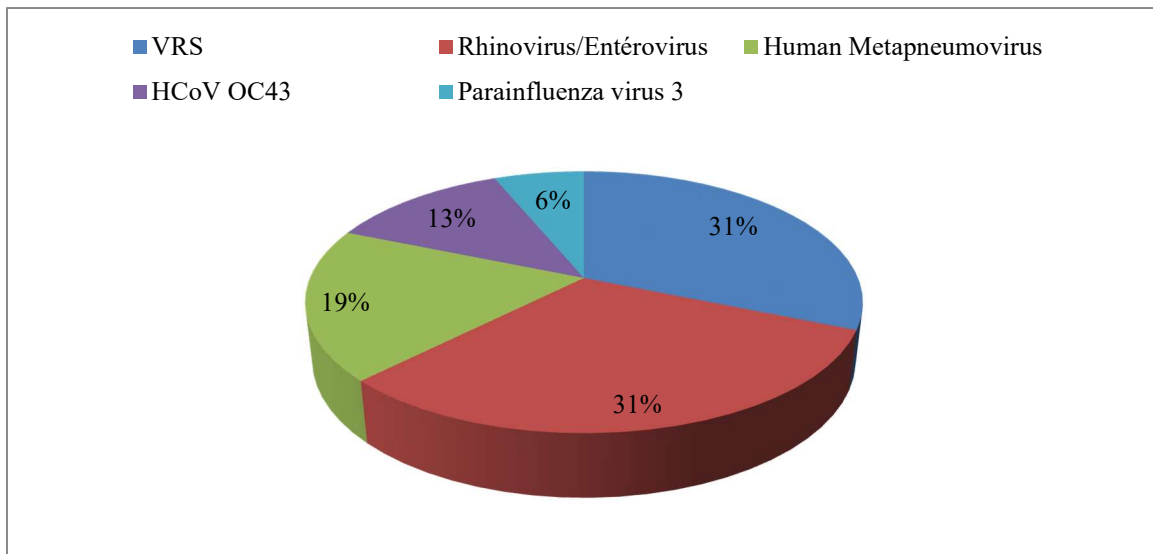


Figure 24: Prévalence des autres virus respiratoires détectés sur FilmArray parmi les échantillons négatifs sur MAScIR 2.0.

VRS : Virus respiratoire syncytial ; HCoV : Human Coronavirus.

Parmi ces 21 patients, cinq ont bénéficié d'une autre RT-PCR, réalisée par l'un ou l'autre test, sur un échantillon prélevé quelques jours avant ou après celui inclus dans notre étude.

Tableau VI: Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des échantillons discordants, ainsi que leurs résultats sur les trois méthodes utilisées.

| N° | FilmArray | | | MAScIR 2.0 | | | ARGENE | | | Autres échantillons respiratoires reçus | Age | Délai du prélèvement après symptomatologie |
|----|-----------|---|--------------------------|------------|------|----------|-----------|------|----------|---|---------|--|
| | S | M | Autres pathogènes | Ct S | Ct R | Résultat | Ct N | Ct R | Résultat | | | |
| 38 | + | + | VRS | - | - | Ne | 30 | 30 | P | 0 | 61 ans | J3 |
| 11 | + | + | Métapneumo-virus | - | - | Ne | 33 | 32 | P | 0 | 18 mois | J5 |
| 81 | + | + | Métapneumo-virus | - | - | Ne | 33 | 33 | P | 0 | 1 an | NR |
| 9 | + | + | Rhino/Entéro-virus + VRS | - | - | Ne | 34 | 34 | P | 0 | 9 mois | NR |
| 39 | + | + | VRS | 37,9 | - | Ne | 34 | - | P | 0 | 60 ans | J2 |
| 20 | + | + | 0 | - | - | Ne | 37 | 36 | Pf | 0 | 48 ans | NR |
| 82 | + | + | 0 | - | - | Ne | - | - | Ne | J-6 : RT-PCR MAScIR + | 71 ans | J10 |
| 37 | - | + | 0 | - | - | Ne | - | - | Ne | 0 | 79 ans | J2 |
| 41 | + | - | 0 | 38 | - | Ne | - | - | Ne | 0 | 27 ans | J29 |
| 53 | + | - | Rhino/Entéro-virus + VRS | - | - | Ne | - | - | Ne | 0 | 8 mois | NR |
| 67 | + | - | OC43 + PIV3 | - | - | Ne | - | - | Ne | 0 | 58 ans | J5 |
| 52 | + | + | Rhino/Entéro-virus + VRS | - | - | Ne | Non testé | | | 0 | 5 ans | J1 |
| 80 | + | - | 0 | 38 | - | Ne | Non testé | | | 0 | 78 ans | J3 |
| 1 | + | - | 0 | 38 | - | Ne | Non testé | | | 0 | 18 mois | NR |
| 17 | + | - | Métapneumo-virus | - | - | Ne | Non testé | | | J-5 : RT-PCR MAScIR - | 61 ans | J2 |
| 55 | + | - | 0 | - | - | Ne | Non testé | | | J+4 : RT-PCR MAScIR - | 40 ans | J3 |
| 69 | + | - | 0 | - | - | Ne | Non testé | | | 0 | 48 ans | NR |
| 73 | + | - | Rhino/Entéro-virus | - | - | Ne | Non testé | | | 0 | 27 ans | NR |
| 74 | + | - | 0 | 38 | - | Ne | Non testé | | | 0 | 18 ans | J1 |
| 36 | - | + | Rhino/Entéro-virus | - | - | Ne | Non testé | | | J-1 : RT-PCR MAScIR Pf | 3 ans | J6 |
| 79 | - | + | OC43 | - | - | Ne | Non testé | | | J+2 : RT-PCR MAScIR - et OC43 seul sur FA | 64 ans | J6 |

Ct : Cycle threshold ; S : gène de la protéine Spike ; M : gène de la protéine de Membrane ; RdRp : gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante ; N : gène de la Nucléocapside ; VRS : Virus respiratoire syncytial ; PIV 3 : Parainfluenza virus 3 ; P : Positif ; Pf : Positif faible ; Ne : Négatif ; RT-PCR : Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction ; FA : FilmArray ; NR : Non renseigné. Non testé : en raison de la quantité insuffisante de l'échantillon.

3 – CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS NEGATIFS :

Ces prélèvements étaient ceux de sujets majoritairement de sexe masculin (N=49), d'âges compris entre 1 jour et 84 ans, avec une majorité de nourrissons (51,2%).

Sur 14 échantillons, aucun agent pathogène n'a été détecté ; les autres échantillons ayant permis d'identifier un à trois virus, avec une large prédominance du virus respiratoire syncytial et du rhinovirus/entérovirus. Aucun agent bactérien n'a, par ailleurs, été recensé.

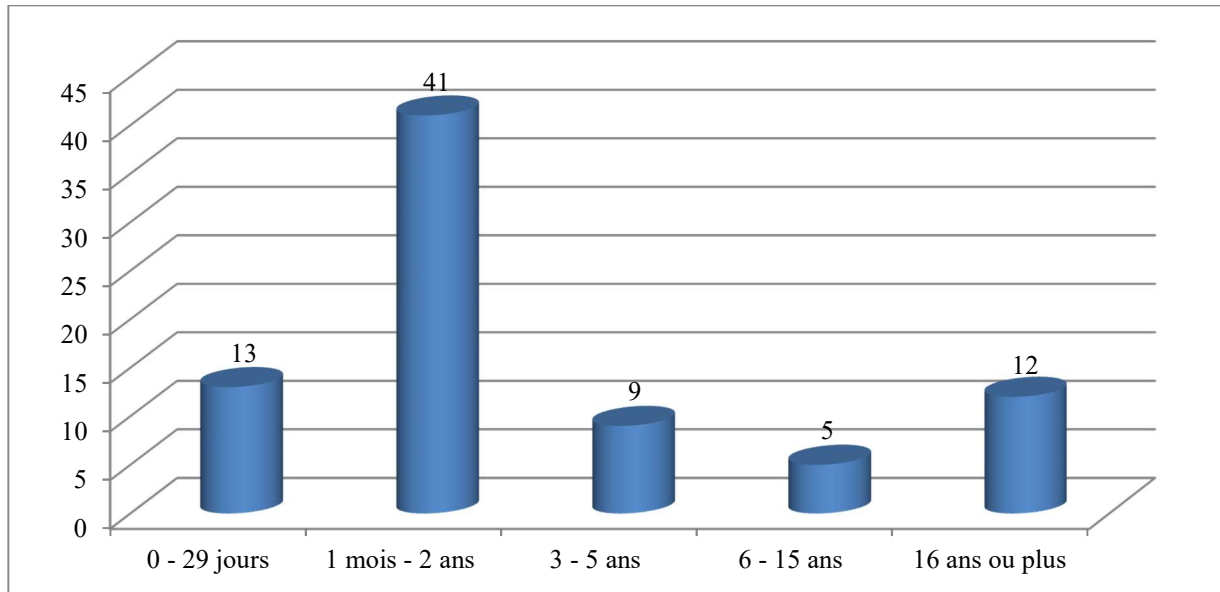


Figure 25: Répartition par tranches d'âges des patients négatifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray.

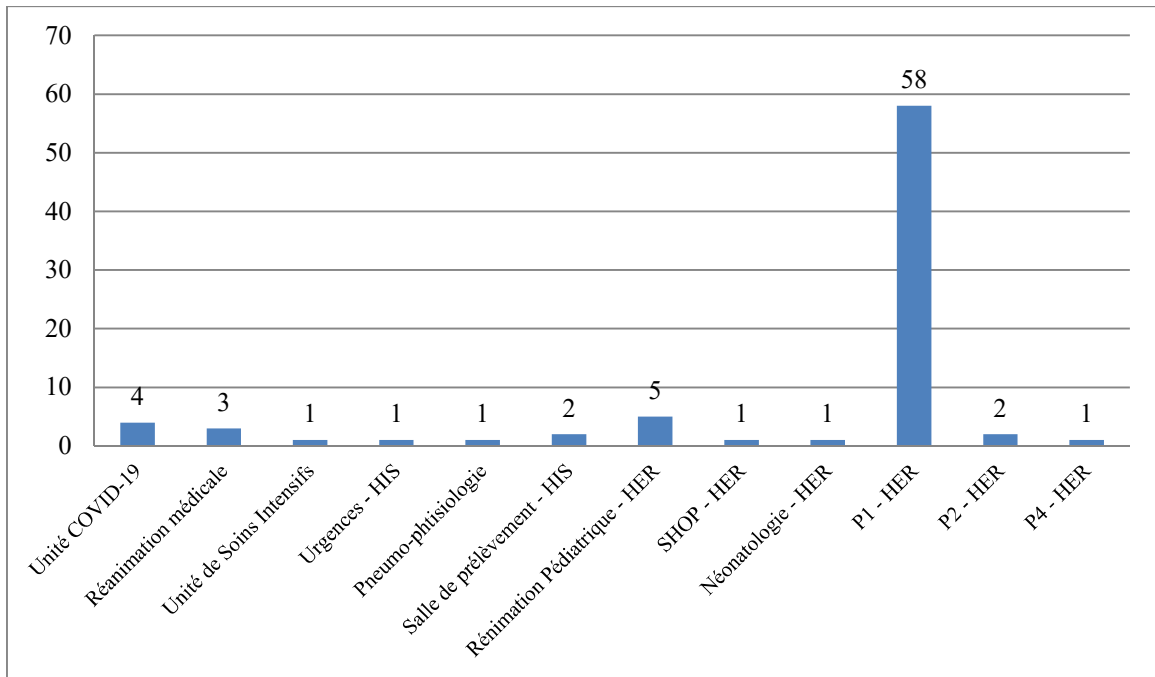


Figure 26: Répartition des échantillons négatifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray par service de provenance.

COVID-19 : Coronavirus Disease 2019 ; HIS : Hôpital Ibn Sina ; HER : Hôpital d'Enfants de Rabat ; SHOP : Service d'Hémo-Oncologie Pédiatrique ; P : Service de Pédiatrie.

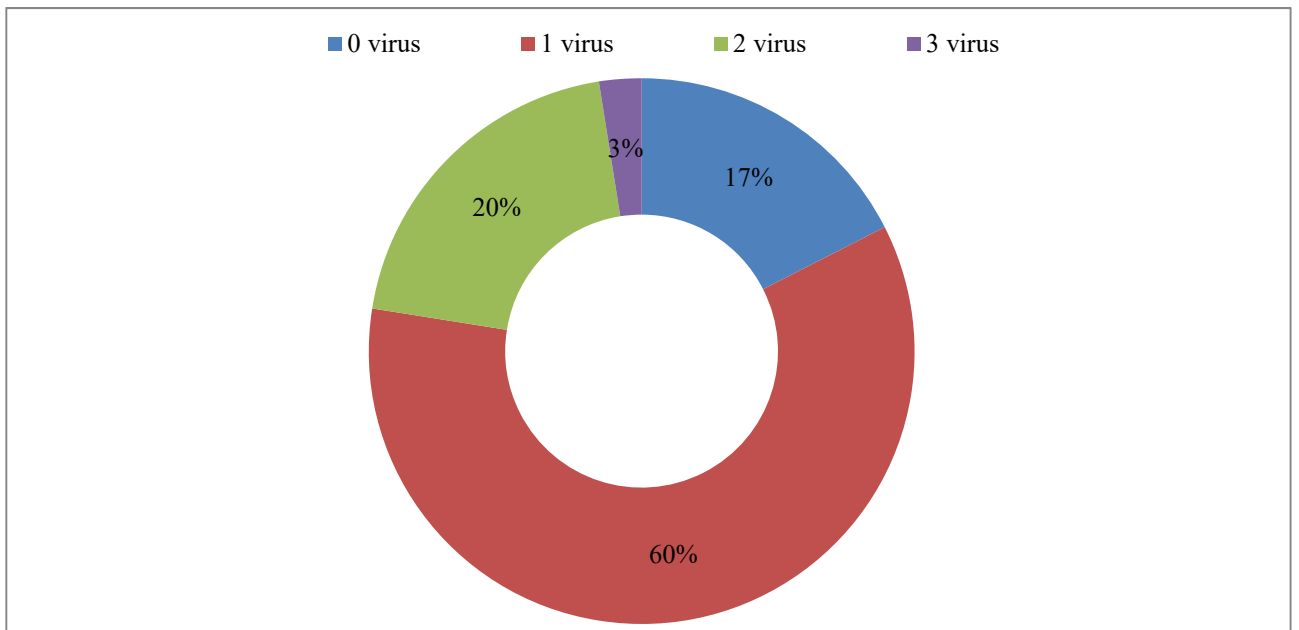


Figure 27: Répartition des échantillons négatifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray selon le nombre de virus respiratoires détectés.

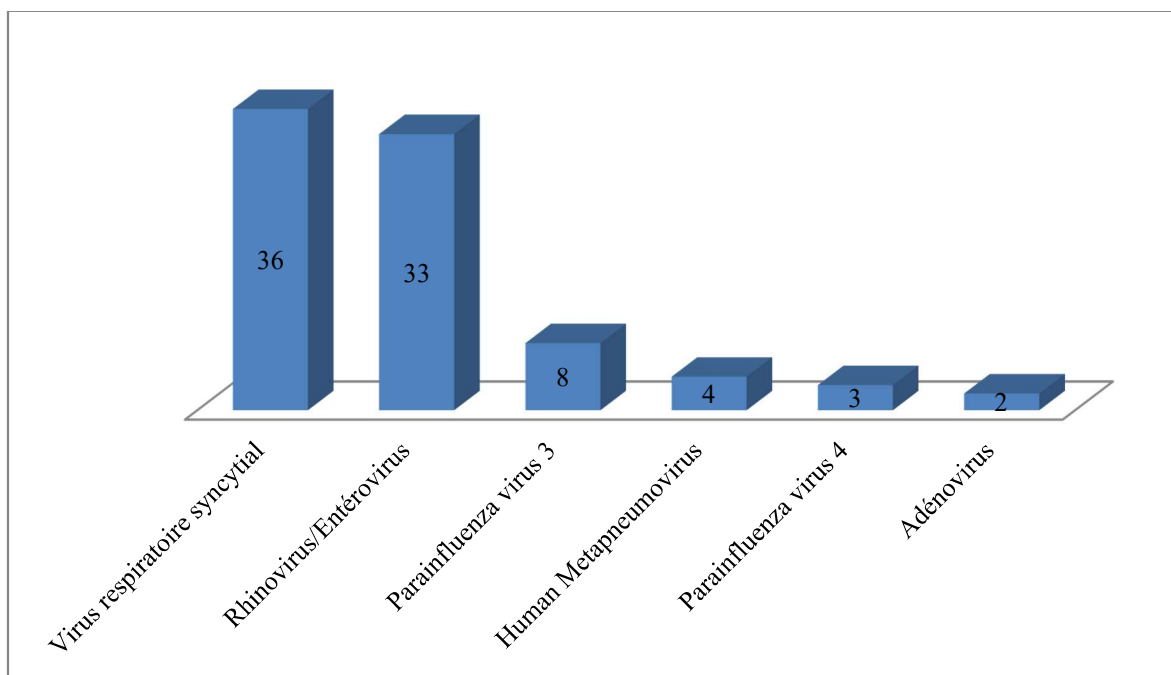


Figure 28: Prévalence des autres virus respiratoires identifiés parmi les échantillons négatifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray.

IV – DISCUSSION :

1 – PARTIE THEORIQUE: SARS-COV-2 ET COVID-19 :

1.1 – Historique :

Fin Décembre 2019, un cluster de pneumonies d'étiologie inconnue, apparu en Chine a permis l'identification subséquente, moins d'un mois plus tard, d'un nouveau coronavirus, le SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome-related CoronaVirus-2), agent causal de la COVID-19 (Coronavirus Disease 2019). L'extension large et rapide de cette maladie émergente a mené l'OMS à en reconnaître le caractère pandémique le 11 Mars 2020 [9-11].

En date du 31 Décembre 2021, soit tout juste deux ans après son émergence, plus de 286 millions de cas d'infection à SARS-CoV-2 ont été enregistrés dans le Monde, avec plus de 5 millions de décès recensés.

1.2 – Caractères virologiques du SARS-CoV-2 :

1.2.1 – Taxonomie :

Le SARS-CoV-2 appartient à la famille des *Coronaviridae*, au genre *Betacoronavirus* et au sous-genre *Sarbecovirus*. Septième espèce responsable d'infections humaines au sein de cette famille, il a pour prédécesseurs : les HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 et HCoV-OC43, virus endémiques, à l'origine d'infections bénignes des voies aériennes supérieures ; de même que les SARS-CoV-1 et MERS-CoV, virus zoonotiques plus virulents, d'évolution épidémique. Parmi ces derniers, le SARS-CoV-1 en est le plus proche d'un point de vue génétique [12,13].

Tableau VII: Classification et années d'identification des sept coronavirus humains [1].

| <i>Alphacoronavirus</i> | <i>Betacoronavirus</i> | |
|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| HCoV-229E (1966) HCoV-NL63 (2004) | Clade A | HCoV-OC43 (1967) HCoV-HKU1 (2005) |
| | Clade B | Sars-CoV (2003) Sars-CoV-2 (2019) |
| | Clade C | Mers-CoV (2012) |

HCoV : coronavirus humains ; SARS : severe acute respiratory syndrome ;
MERS : Middle East respiratory syndrome.

1.2.2 – Structure :

Le SARS-CoV-2 est un virus enveloppé, sphérique, de diamètre oscillant entre 80 et 200 nm, formé de l'intérieur vers l'extérieur par : un ARN monocaténaire de polarité positive, entouré d'une capsidie hélicoïdale formée de protéine N (Nucléoprotéine), une membrane formée de protéine M, puis une enveloppe lipidique dans laquelle sont enchâssées la petite protéine d'enveloppe (E), l'hémagglutinine-estérase (HE) et la glycoprotéine trimérique S (Spike). Cette dernière, formant une large couronne à la surface du virus, est formée de 2 sous-unités : S1 et S2.

Le génome, linéaire et non segmenté, d'environ 30 kb, comprend deux régions non codantes en 5' et en 3' et une partie codante divisée en plusieurs sections. Les deux premiers tiers du génome sont constitués de deux grandes régions chevauchantes, ORF1a et ORF1b, codant le complexe de réplication-transcription, dont le gène RdRp codant l'ARN polymérase ARN-

dépendante. Le dernier tiers du génome code les protéines de structure (S, E, M, N) et des protéines non structurales [1,12].

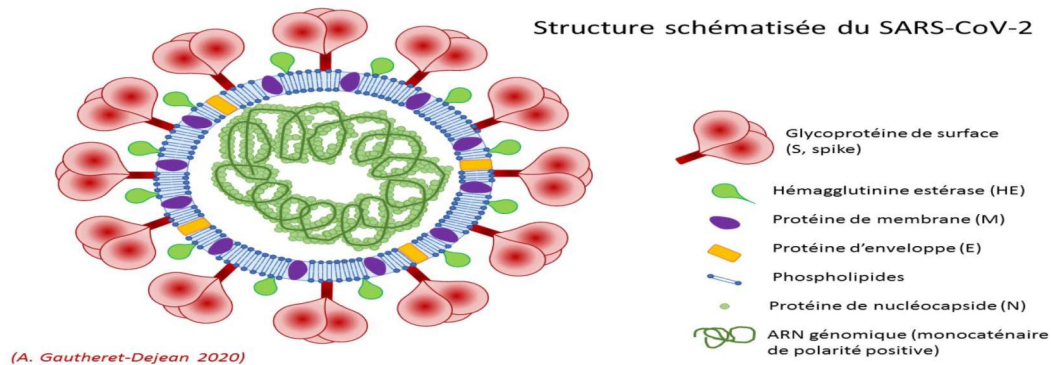


Figure 29: Structure du SARS-CoV-2 [12].

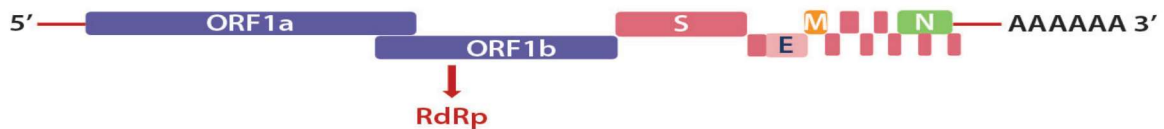


Figure 30: Organisation génomique du SARS-CoV-2 [1].

ORF : Open Reading Frame ; RdRp : gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante ; S : gène de la protéine Spike ; E : gène de la protéine d'Enveloppe ; M : gène de la protéine de Membrane ; N : gène de la Nucléocapside.

1.2.3 – Cycle de multiplication intracellulaire :

L'attachement du virus aux cellules-hôtes requiert la co-expression, par ces dernières, du récepteur ACE-2 et d'une protéase transmembranaire à sérine responsable du clivage de la protéine S, dont la sous-unité S1 se fixe sur le récepteur ACE-2 via son RBD (Receptor Binding Domain), tandis que la sous-unité S2 permet la fusion entre la membrane plasmique et l'enveloppe virale.

Après pénétration par endocytose, puis décapsidation, l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme. Les ORF1a et ORF1b sont traduits en polyprotéines clivées par des protéases virales, induisant la formation du complexe réplisome-transcriptase, qui permet la synthèse d'ARN génomiques et d'ARN subgénomiques messagers. Après encapsidation des nouveaux

génomés, puis enveloppement dans l'appareil de Golgi, les nouveaux virions sortent des cellules par exocytose, en induisant la lyse (Figure 31).

Ainsi, le large tropisme cellulaire du SARS-CoV-2 est inhérent à l'expression de l'ACE-2 à la surface des cellules des tractus respiratoire et digestif, des cellules endothéliales, des cellules épithéliales des tubules rénaux et des neurones [12,14,15].

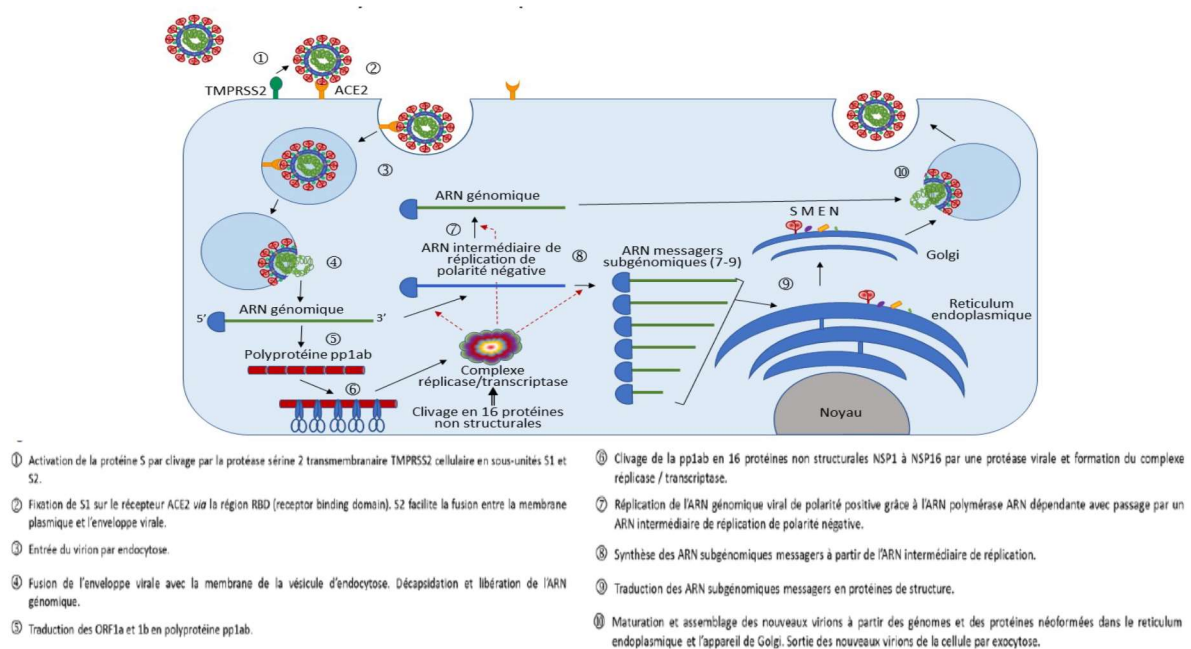


Figure 31: Cycle de multiplication intracellulaire du SARS-CoV-2 [12].

ARN : Acide ribonucléique ; ACE-2 : Angiotensin Converting Enzyme 2 ; pp : Polyprotéines ; S : protéine Spike ; M : protéine de Membrane ; E : protéine d'Enveloppe ; N : Nucléocapside.

1.2.4 – Variations génétiques du SARS-CoV-2 :

Depuis la première publication du génome du SARS-CoV-2 en Janvier 2020 par Zhu et al, plusieurs études portant sur sa variabilité génétique ont vu le jour, bien que le SARS-CoV-2 soit muni d'une activité correctrice maintenant son taux de mutations à un niveau relativement faible. Parmi ces dernières, celles portant sur le gène S, fréquemment recensées, sont particulièrement inquiétantes, la protéine S constituant à la fois le site de liaison au récepteur cellulaire et l'épitope des anticorps neutralisants.

Ainsi, en Juin 2020, un groupe de travail de l'OMS a été créé en vue d'assurer le suivi de l'évolution de deux principaux types de variants : les variants à suivre ou VOI (Variants of

Interest) ; et les variants préoccupants ou VOC (Variants of Concern) définis comme des VOI ayant fait preuve d'une augmentation de transmissibilité, de virulence, ou d'une mise à mal de l'efficacité des outils diagnostiques, thérapeutiques ou vaccinaux, ou des mesures de santé publique entreprises jusqu'alors. Les VOC sont, à ce jour, au nombre de cinq, dont le dernier en date, omicron, est associé à une plus grande transmissibilité [1,12,13,16,17].

1.3 – Epidémiologie :

La transmission interhumaine du SARS-CoV-2 est principalement aérienne, assurée par les sujets infectés, symptomatiques ou non, avec une excrétion virale précoce au niveau des voies respiratoires hautes, pouvant précéder la symptomatologie de 48 heures. Le contact avec les surfaces contaminées est également impliqué à moindre mesure, tandis que le risque de transmission verticale semble minime [14,18,19].

1.4 – Diagnostic clinique :

D'une durée médiane de 5 jours, la période d'incubation oscille entre 1 et 14 jours. De présentation clinique polymorphe, la COVID-19 se manifeste habituellement par un tableau de pneumopathie aspécifique, se révélant le plus souvent par : une dyspnée, une toux et/ou de la fièvre. Le large éventail de symptômes extra-respiratoires, parfois isolés, englobe, quant à lui, des signes digestifs, ORL dominés par l'anosmie et la dysgueusie, neurologiques, cardiovasculaires à type de myocardites, rénaux, ou encore dermatologiques.

Ses deux principales complications sont : la détresse respiratoire, survenant habituellement après 7 à 10 jours d'évolution dans le cadre d'un orage cytokinique, et la maladie thromboembolique, dont les principaux facteurs de risque sont : l'âge, les pathologies cardiovasculaires (obésité, hypertension artérielle, diabète, tabac), les pneumopathies et néphropathies chroniques et les néoplasies.

La persistance prolongée des symptômes, plusieurs semaines ou mois après l'infection, définit le « COVID long » [13,14,18,19].

1.5 – Diagnostic radiologique :

La tomodensitométrie thoracique peut poser le diagnostic de la COVID-19, indépendamment des résultats virologiques, en présence d'un contexte clinique et/ou épidémiologique évocateur et d'images caractéristiques, consistant généralement en un aspect en verre dépoli,

avec possibilité d'extension multilobaire, inconstamment associé à des images de condensations [14,18].

1.6 – Diagnostic biologique :

Aux côtés du diagnostic virologique de certitude, les signes biologiques aspécifiques consistent surtout en une lymphopénie, un syndrome inflammatoire plus ou moins marqué, et une augmentation des D-Dimères [14,18].

Le diagnostic virologique peut être direct, reposant sur la mise en évidence du génome ou des protéines virales, ou l'isolement du virus en culture cellulaire ; ou indirect via la recherche d'anticorps sériques.

1.6.1 – Diagnostic virologique direct :

1.6.1.1 – Tests moléculaires :

a/ Principes et méthodes :

a.1/ RT-PCR :

a.1.1/ Phase préanalytique :

La présentation clinique et le délai depuis l'apparition des symptômes conditionnent le choix des prélèvements ; ceux provenant des voies respiratoires supérieures, et principalement les écouvillons nasopharyngés, étant plus fiables à un stade précoce, tandis que les prélèvements des voies respiratoires inférieures, à types d'expectorations spontanées, d'aspiration endotrachéale ou de lavage broncho-alvéolaire, sont plus adaptés pour un diagnostic tardif, ou si les premiers sont négatifs [10,13].

Les prélèvements salivaires, plus simples à réaliser et à moindre risque pour le personnel soignant, paraissent moins fiables, bien que, selon la méta-analyse de la HAS, les RT-PCR salivaires semblent conserver une sensibilité satisfaisante évaluée à 85% [10,20,21].

Les écouvillons doivent être placés immédiatement dans un tube contenant un milieu de transport ou une solution saline stérile et acheminés au laboratoire le plus rapidement possible, ce dernier devant disposer d'un niveau de sécurité biologique 2 (NSB-2) pour la réalisation des tests moléculaires par RT-PCR, tandis qu'un niveau de sécurité biologique 3 (NSB-3) est requis pour l'isolement en culture cellulaire [9,13].

Comme préconisé par l'OMS, les écouvillons doivent être conservés à 2-8 °C avant analyse et à -70 °C pour un délai de plus de 12 jours [13].

a.1.2/ Phase analytique :

Méthode de référence pour le diagnostic de l'infection à SARS-CoV-2, la RT-PCR inclut deux étapes :

- Extraction :

Ce processus, visant à obtenir un éluat d'ARN viral concentré, comporte quatre étapes clés, à savoir : la lyse cellulaire, la dénaturation protéique, la purification, puis l'éluat de l'ARN, via des colonnes de silice ou par adsorption sur billes magnétiques.

- Amplification :

A partir de la région cible de l'ARN viral, flanquée d'amorces, la transcriptase inverse synthétise un ADN complémentaire monocaténaire, converti, via la Taq polymérase, en ADN double brin, constituant la matrice pour la PCR. Cette dernière consiste en la répétition, un nombre « n » de fois, de cycles thermiques en 3 étapes, à savoir : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation, en vue d'obtenir 2ⁿ amplicons. Selon le nombre d'amorces-sondes utilisées, la PCR peut être mono- ou multiplexe.

- Détection :

Pour les RT-PCR en temps réel, le suivi de la fluorescence émise par un colorant ou une sonde incorporés dans le mélange réactionnel, est assuré tout au long de la réaction. La sonde Taqman, formée d'un fluorophore et d'un quencher, dont l'hydrolyse, en phase de polymérisation, permet l'émission de fluorescence, est le système de détection le plus souvent utilisé [9,22].

Les PCR basées sur une analyse de fusion à haute résolution (FHR) reposent, quant à elles, sur l'utilisation de fluorochromes s'intercalant au double brin d'ADN amplifié, dont la dénaturation, suite à l'augmentation de la température, provoque une chute de la fluorescence [23].

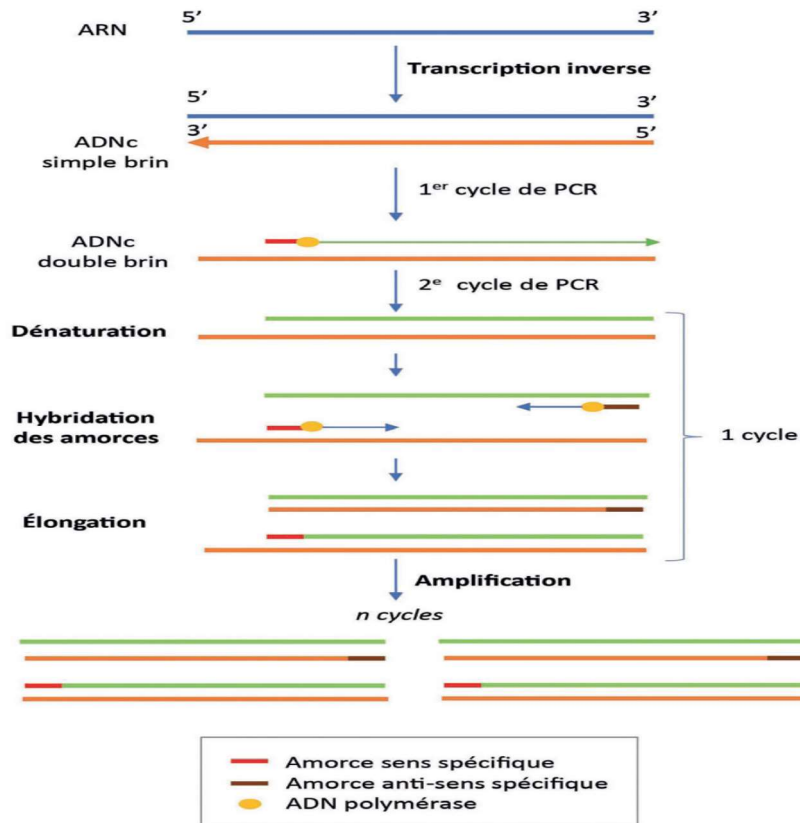


Figure 32: Etapes de la RT-PCR [1].

ARN : Acide ribonucléique ; ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire ; PCR : Polymerase Chain Reaction.

a.1.3/ Phase post-analytique :

Pour les RT-PCR en temps réel, l'interprétation tient compte, à la fois, de l'aspect de la courbe d'amplification avec ses 3 phases successives : exponentielle, la plus reproductible, linéaire et en plateau ; et de la valeur du cycle seuil ou Ct (Cycle Threshold), défini comme le nombre de cycles requis pour que la fluorescence émise dépasse la ligne seuil et qui est inversement proportionnel à la charge virale [24].

Pour chaque kit, la valeur du Ct est à interpréter selon les instructions du fabricant.

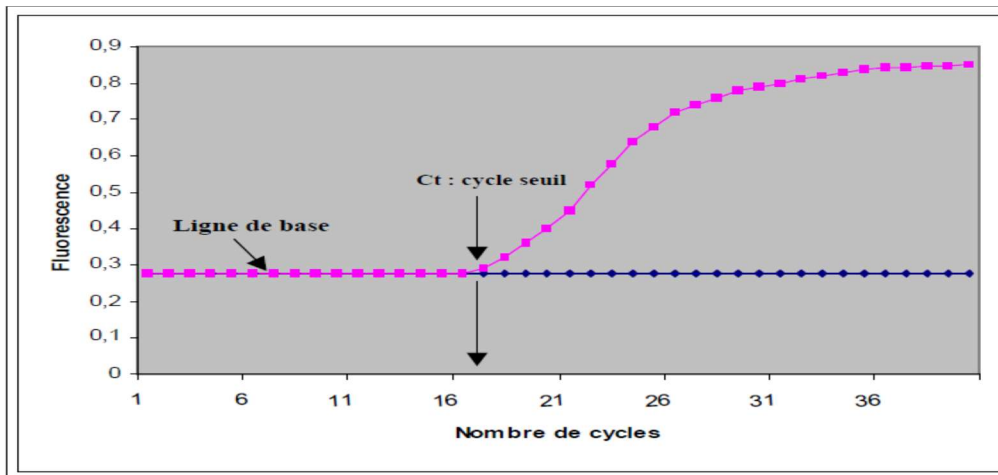


Figure 33: Courbe d'amplification d'une (RT-)PCR en temps réel [24].

Pour les RT-PCR avec analyse de fusion à haute résolution, l'analyse des courbes permet de révéler un pic de fusion obtenu à la température de fusion ou T_m , caractéristique de la taille et de la séquence de l'amplicon, et donc spécifique de l'agent pathogène recherché [23].

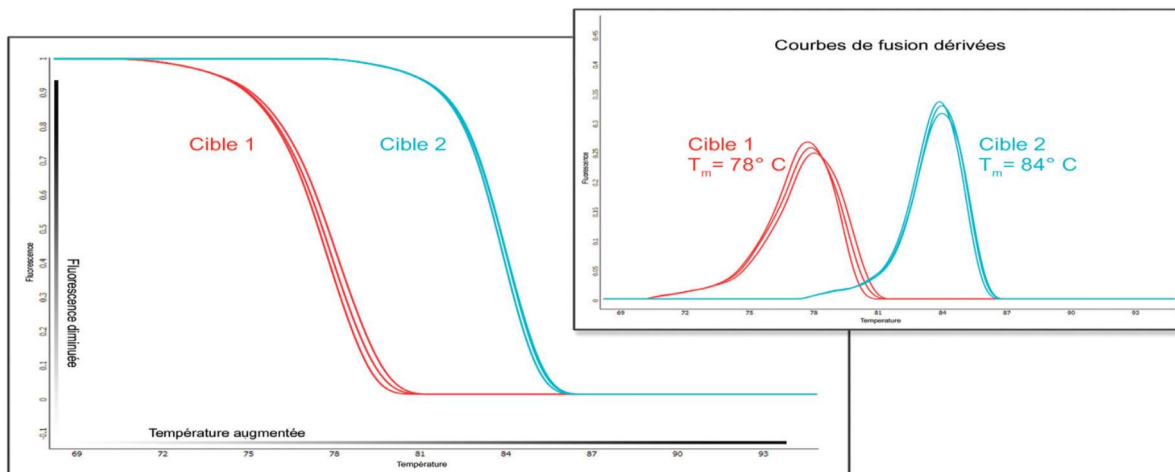


Figure 34: Courbes de fusion d'une (RT-)PCR avec analyse FHR [4].

L'ARN du SARS-CoV-2 peut être détecté dans les voies respiratoires supérieures 1 à 3 jours avant l'apparition des symptômes, avec un pic de charge virale au moment de leur apparition et un délai de positivité largement variable selon les études. Au-delà de la première semaine, les prélèvements profonds s'avèrent plus sensibles [10,13]. Néanmoins, un test positif ne permet pas de préjuger de la contagiosité du patient [1,11].

a.2/ Autres tests moléculaires :

a.2.1/ RT-LAMP ou Amplification isotherme médiée par boucle de transcription inverse :

Technique d'apparition récente, elle repose sur l'amplification isotherme (~63°C), par ADN polymérase, d'une séquence cible, via l'utilisation de quatre amorces (paires d'amorces externes et internes) ciblant des régions génomiques distinctes et lui conférant, de fait, une grande spécificité. La détection peut être faite en temps réel ou en point final avec visualisation d'une turbidité ou d'une coloration de l'échantillon. Bénéficiant de l'exemption de la phase d'extraction et des cycles thermiques, elle permet l'obtention de résultats ultra-rapides, de l'ordre de quelques minutes. Elle a également l'avantage de pouvoir être délocalisée.

Elle peut être réalisée sur échantillon nasopharyngé ou salivaire; mais, de sensibilité inférieure à la RT-PCR, elle est à privilégier chez les patients symptomatiques [9,14,22].

a.2.2/ RT-PCR avec séquençage génomique :

Elle fait appel à des méthodes capables de détecter des mutations spécifiques, mais uniquement à des fins de dépistage, avec nécessité de recourir au séquençage pour confirmer la présence d'un variant donné. Ces techniques pourraient s'avérer utiles pour étudier la dynamique de la pandémie et réorienter, a posteriori, les politiques de santé publique [13,25].

b/ Indications et intérêt des tests moléculaires :

Pour l'OMS comme pour le CDC, les tests d'amplification d'acides nucléiques (TAAN), avec la RT-PCR en chef de file, sont les méthodes de référence pour le diagnostic de la COVID-19 et ce, au vu de leurs grandes sensibilité, spécificité et reproductibilité [9,22]. L'OMS préconise l'utilisation des gènes RdRp, E, N et S dans différentes combinaisons, l'utilisation de deux cibles indépendantes au minimum étant fortement recommandée [10,13].

c/ Limites des tests moléculaires :

Les méthodes moléculaires sont souvent coûteuses en temps, en réactifs et en personnel hautement qualifié, autant de ressources pouvant faire défaut en situation de pandémie [22].

Qui plus est, de nombreuses causes, surtout inhérentes à la phase préanalytique, pourraient en diminuer la sensibilité. Les paramètres analytiques, sources d'interférences, incluent, quant à eux, l'efficacité de l'extraction, le choix des amorces et cibles, le protocole du test et la méthode de détermination du Ct. Ainsi, selon l'étude de Kucirka et al, le taux de faux négatifs s'élèverait à 38% le jour de l'apparition des symptômes et à 20% trois jours plus tard. D'autres études font état de prévalences de faux négatifs allant de 1 à 30% [10,13,26-28].

1.6.1.2 – Tests antigéniques :

De nombreux tests de diagnostic rapide (TDR), généralement basés sur le principe de l'immunochromatographie, permettent la détection des antigènes du SARS-CoV-2 à partir d'échantillons respiratoires ou salivaires.

Si leur sensibilité semble fluctuante comparativement à la RT-PCR, leur spécificité, invariablement élevée, a été évaluée à 99,6% en moyenne dans la revue de littérature de Cochrane de Mars 2021. Qui plus est, leur performance optimale en début d'infection sous-tend la recommandation de la HAS quant à leur utilisation dans les quatre premiers jours suivant le début des symptômes, avec confirmation par RT-PCR des tests négatifs, particulièrement chez les sujets à risque [10,13,14,20].

L'OMS, quant à elle, a fixé des valeurs seuils minimales acceptables pour la sensibilité (≥ 80 %) et la spécificité (≥ 97 %) des TDR antigéniques, dont elle recommande l'utilisation, en cas d'indisponibilité des tests moléculaires, chez les sujets symptomatiques, ou asymptomatiques s'il s'agit de cas contacts ou de sujets fréquemment exposés [20,25].

1.6.1.3 – Culture virale :

Réalisée à l'aide de cellules Vero dans des laboratoires de NSB-3, elle permet l'isolement du virus en quelques jours à des fins de recherche, mais n'est pas recommandée à visée diagnostique [10,13].

1.6.2 – Diagnostic virologique indirect :

1.6.2.1 – Cinétique des anticorps :

Les anticorps sont généralement détectables dès la seconde semaine d'infection, les IgM apparaissant à partir de J7 et les IgG à compter de J10 (Figure 35). Les facteurs corrélés positivement au pourcentage de séroconversion et au taux d'anticorps étant : la sévérité de la maladie, l'âge et le sexe masculin [10,12,13].

1.6.2.2 – Tests sérologiques :

Ils incluent les tests automatisables permettant (ou non) le titrage immunoenzymatique (ELISA) ou par chimiluminescence (CLIA) des anticorps et les tests unitaires qualitatifs, basés sur un principe immuno-chromatographique. La plupart des tests ciblent les protéines S ou N, permettant de détecter, selon les trousse, les Ig totales, les IgG ou les IgM. L'intérêt de la détection des IgA n'est, quant à lui, pas établi. Ces anticorps, témoins du contact avec le SARS-CoV-2, ne doivent pas être assimilés aux anticorps neutralisants, dirigés contre la protéine S.

Les performances de ces tests varient dépendamment des groupes dépistés, du délai du prélèvement par rapport au début de l'infection et de la protéine virale ciblée. La HAS a ainsi fixé des valeurs seuils minimales, établies à 98% pour la spécificité clinique et à 90 ou 95%, selon l'usage du test, pour la sensibilité clinique [1,10,12,13].

1.6.2.3 – Indications des tests sérologiques :

Nullement adaptés au diagnostic précoce de l'infection, ils sont indiqués, selon les recommandations de la HAS de Juin 2021, dans les situations suivantes :

- Diagnostic initial de patients symptomatiques avec amplification génique négative
- Diagnostic de rattrapage de patients symptomatiques, n'ayant pu bénéficier d'un test moléculaire ou antigénique préalable
- Détection pré-vaccinale d'anticorps chez les sujets immunocompétents, sans antécédent connu d'infection à SARS-CoV-2 [29].

L'OMS, quant à elle, souligne l'intérêt, si forte suspicion clinique et RT-PCR négative, de rechercher une séroconversion ou une ascension des titres d'anticorps sur deux échantillons, l'un prélevé en phase aiguë et l'autre 2 à 4 semaines plus tard [13].

1.6.3 – Stratégie diagnostique : place des différents tests :

Selon des études de modélisation mathématique, l'approche la plus efficace pour réduire la transmission du SARS-CoV-2 est celle alliant l'élargissement de la couverture de dépistage et la diminution des délais de rendu des résultats. La prévalence de l'infection influe également sur la stratégie à adopter. Ainsi, la spécificité élevée des TAAN en fait la méthode de choix quand la prévalence est faible ; tandis que les tests antigéniques, confirmés au mieux par TAAN si négatifs, sont à privilégier si la prévalence est élevée, avec priorisation du dépistage

des sujets symptomatiques [13,20,25]. Enfin, un résultat négatif est toujours à corrélérer au contexte clinico-radiologique, la sérologie gardant tout son intérêt en cas de forte suspicion clinique [10].

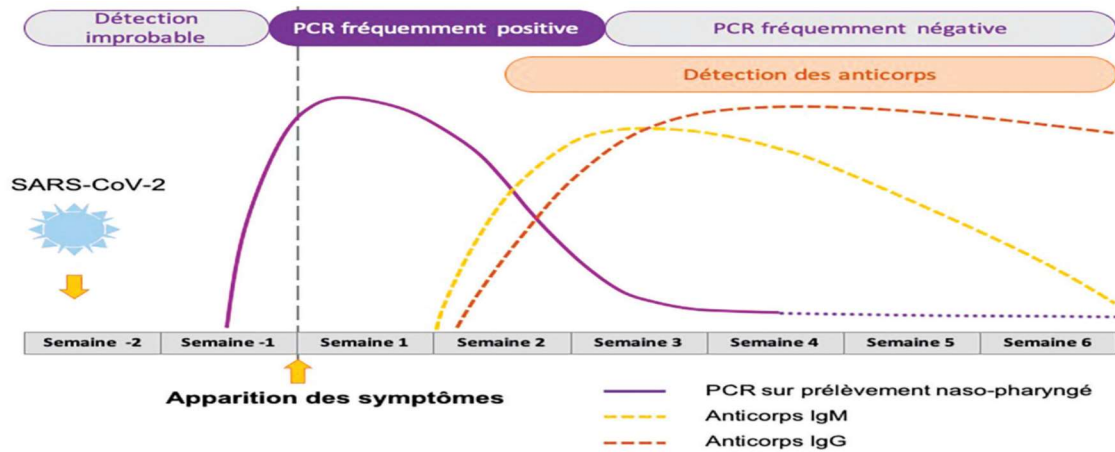


Figure 35: Cinétique des marqueurs diagnostiques en fonction du stade de l'infection [10].

PCR : Polymerase Chain Reaction ; SARS-CoV-2 : Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 ; Ig : Immunoglobuline.

2 – DISCUSSION DE NOS RESULTATS :

Dans notre étude, deux tests de PCR, reposant sur deux principes distincts, ont été comparés : le premier étant le FilmArray BioFire® RP 2.1 Plus, système intégré, permettant un diagnostic syndromique via une PCR mutliplexe qualitative ; et le second étant MAScIR 2.0, RT-PCR en temps réel selon la technologie TaqMan, test de référence de notre laboratoire, à résultat semi-quantitatif, interprété, dans notre travail, selon les résultats de son évaluation par le CNR France.

En effet, les valeurs de Ct n'étant pas superposables entre les différents tests au vu de nombreuses variables analytiques, la SFM a élaboré un abaque des valeurs de Ct, établies comparativement à la méthode de référence IP2/IP4 du CNR et permettant la catégorisation de l'excrétion virale [7].

2.1 – Performances du FilmArray dans d’autres séries :

Dans notre étude, la spécificité et la valeur prédictive positive du FilmArray ont toutes deux été estimées à moins de 80% en raison des nombreux « faux positifs » recensés, des valeurs bien en-deçà de celles évaluées dans d’autres séries (Tableau VIII).

Tableau VIII: Performances du FilmArray évaluées dans d’autres séries, comparativement à la nôtre [30-33].

| Auteurs | Nombre d'échantillons | | Test de comparaison | | Résultats | | | |
|----------------------------|--|----------|---|--------------------|-----------|-------|-------------|-------------|
| | Positifs | Négatifs | Nom du test | Cibles recherchées | VPP | VPN | Sensibilité | Spécificité |
| Eckbo et al. [30] | 25 | 5 | PCR maison | RdRp et E | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Creager et al. [31] | 50 | 50 | Hologic Panther Fusion SARS-CoV-2 (15 échantillons) | ORF1ab | 100% | 98% | 97,9% | 100% |
| | | | PCR maison (15 échantillons) | N1 et N2 | | | | |
| | | | Roche Cobas SARS-CoV-2 (20 échantillons) | ORF1a et E | | | | |
| Johnson et al. [32] | 16 | 17 | GeneXpert Xpert Xpress SARS-CoV-2/Flu/RSV | E et N2 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Jian et al. [33] | 125 (50 virus sauvages et 75 variants alpha) | 200 | PCR maison | ORF1ab et E | 100% | 99,5% | 99,2% | 100% |
| Notre étude | 80 | 80 | MAScIR SARS-CoV-2 M kit 2.0 | RdRp et S | 73,8% | 100% | 100% | 79,2% |

VPP : Valeur prédictive positive ; VPN : Valeur prédictive négative ; PCR : Polymerase Chain Reaction ; ORF : Open Reading Frame ; RdRp : gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante ; S : gène de la protéine Spike ; N : gène de la Nucléocapside ; E : gène de la protéine d'Enveloppe.

2.2 – Sources des discordances :

Plusieurs facteurs sont susceptibles d'être à l'origine de ces discordances, parmi lesquels :

2.2.1 – Différence de sensibilité analytique :

Reflète de la sensibilité analytique des tests, la LOD (ou limite de détection) correspond à la plus faible concentration de la cible pouvant être détectée dans $\geq 95\%$ des réplicats.

Selon les données des fabricants de nos trois tests, la LOD a été évaluée à 160, 500 et 380 copies/ml de milieu de transport, pour le FilmArray RP 2.1, MAScIR 2.0 et ARGENE respectivement [5,6,8]. Celle du FilmArray RP 2.1 a, par ailleurs, été estimée dans deux séries à 250 et à 302 copies/ml [33,34].

Si la différence est notable entre les kits, celle de MAScIR étant trois fois supérieure à celle du FilmArray, la comparaison de la LOD, évaluée via l'utilisation de matériaux non standardisés, ne saurait être si simple, d'autant que cette dernière est souvent exprimée par différentes unités [9,35]. Toutefois, la FDA, via le développement d'un panel de référence, de même que le Coronavirus Standards Working Group ont entrepris des efforts dans ce sens [36-38].

Ainsi, à la lumière de ces données, on peut supposer que les échantillons discordants étaient, du moins en partie, faussement négatifs sur MAScIR 2.0 en raison d'une faible charge virale, ce d'autant que, dans 62% des cas, une seule sonde était détectée sur FilmArray. Toutefois, si cette théorie ne peut être affirmée en raison de l'expression qualitative du résultat du FilmArray, elle peut être étayée par de nombreux points relevés dans notre étude, à savoir :

- La positivité de six échantillons (54,5%) parmi les onze testés sur ARGENE, dont la limite de détection est intermédiaire entre celles de nos deux tests
- La détection, au-delà du seuil de positivité, du gène S dans cinq échantillons discordants sur MAScIR 2.0
- La présence, dans deux cas discordants, de résultats antérieurs positifs sur MAScIR 2.0, reflétant, a priori, une fin d'infection chez ces malades, la PCR ayant tardé à se négativer sur le test le plus sensible.

Cette capacité du FilmArray à détecter des charges virales résiduelles en fin d'infection est bien illustrée par l'observation de Hirotsu et al, relevant la positivité inconstante du FilmArray entre J28 et J44 après admission, dont un prélèvement discordant sur le kit de RT-PCR utilisé dans l'étude comparative ; le résultat étant, par ailleurs, unanimement positif sur FilmArray avant ce délai [39].

L'impact analytique de cette différence de LOD ne saurait être négligé, les résultats de l'étude d'Arnaout et al suggérant que toute augmentation de 10 fois de la LOD augmente le taux de faux négatifs de 13% [35]. Toutefois, l'impact clinique des tests de sensibilité diminuée reste à définir, car, s'il est probable que de fortes charges virales soient corrélées à une plus grande infectiosité [20], les échantillons faiblement positifs, quant à eux, sont souvent prélevés sur des patients en fin d'infection, dont la contagiosité n'est pas avérée [31].

En effet, si certaines études ont fait état d'un portage viral prolongé, jusqu'à plus de 60 jours après le début des symptômes [7,40-42] ; d'autres révèlent que l'isolement viral en culture est peu probable au-delà de 8-9 jours après le début des symptômes, ayant été évalué à 6% à J10, bien qu'ayant été possible à partir d'échantillons prélevés à J20 [7,41-43]. L'étude de Singanayagam et al, quant à elle, a évalué la probabilité de culture virale à 8% en cas de Ct>35 [43].

En outre, ces arguments illustrent bien tout l'intérêt de disposer de résultats semi-quantitatifs, à interpréter en fonction du contexte clinico-épidémiologique de chaque patient.

L'argument de la discordance attribuée à des charges virales résiduelles en fin d'infection ne saurait cependant être retenu dans plusieurs cas discordants, dont dix prélevés dans les cinq premiers jours après le début de la symptomatologie, parmi lesquels trois étaient positifs sur ARGENE. Qui plus est, nous n'avons pas noté de différence significative en termes de délais moyens entre le prélèvement et le début de la symptomatologie entre les échantillons concordants et discordants, bien que les informations recensées ne soient pas exhaustives. Par ailleurs, parmi les six échantillons positifs sur ARGENE, un seul était positif faible, suggérant donc un grand manque de sensibilité de MAScIR 2.0, laissant supposer un impact clinique plus important, à même d'entraver les efforts de lutte contre cette pandémie. D'autres évaluations seraient utiles pour corroborer ce point.

2.2.2 – Différence de cibles :

Le choix des cibles d'un test est un élément clé pouvant impacter les résultats. Il est ainsi rapporté dans la littérature que l'utilisation d'amorces ciblant le gène E offre une plus grande sensibilité aux tests, ce dernier étant, qui plus est, moins sujet aux mutations ; mais une moindre spécificité, car il est commun aux *Sarbecovirus*. Les gènes ORF1ab, S et N, assurant une plus grande spécificité aux tests, sont toutefois plus enclins à muter [34,44-47].

Le suivi de l'évolution génomique du SARS-CoV-2 s'avère donc crucial, pour s'assurer des bonnes performances des tests en dépit des mutations, ou pour en modifier les cibles, le cas échéant [44]. Jian et al ont notamment testé 75 échantillons positifs pour le variant alpha du SARS-CoV-2, portant une mutation sur le gène S, sur le FilmArray RP 2.1 Plus. Aucun faux négatif n'a été recensé, bien que, dans un cas, seul le gène M ait été détecté [33]. Dans notre étude, certains échantillons testés sur le kit MAScIR, ont été séquencés et retrouvés positifs

pour les variants delta ou omicron, ce qui permet d'affirmer que ce kit garde sa fiabilité et n'est pas affecté par ces mutations.

La cinétique de l'infection semble également affecter la positivité des diverses sondes, comme en témoigne l'étude de Reina et al. Cette dernière retrouvait la présence concomitante des trois gènes recherchés, notamment E, N et RdRp, dans 84% des cas en première semaine d'infection et dans seulement 42% des cas en deuxième semaine d'infection, pendant laquelle le gène N était détecté isolément dans 28,5% des échantillons [48]. De même, dans l'observation de Lv et al, il a été rapporté, sur des prélèvements séquentiels, la positivité initiale isolée du gène N, puis, celle associée du gène ORF1ab une semaine plus tard [49].

L'ensemble de ces arguments sous-tend la recommandation de la HAS quant à l'utilisation de deux sondes cibles au minimum dans les tests de PCR [1].

Dans notre étude, les taux de discordance passent de 12,7% et 14,3% en présence des deux sondes sur FilmArray, à 76,5% et 100% en présence d'une seule, pour MAScIR 2.0 et ARGENE respectivement. Les gènes ciblés par les trois tests étant différents, sans aucune cible commune entre ARGENE et FilmArray notamment, cette discordance serait plutôt attribuable à l'évolution cinétique des cibles au cours de l'infection.

Par ailleurs, nous avons recensé quatre cas où seule la sonde M était détectée sur FilmArray et seule la sonde RdRp était positive sur MAScIR 2.0, dont un cas avec un Ct du gène S à 38. Ces échantillons, ayant été prélevés à J5 et J20 du début de la symptomatologie, dans 2 et 1 cas respectivement, et étant tous positifs faibles sur MAScIR, une clairance précoce du gène S en fin d'infection serait plus probable qu'une mutation de ce dernier, bien que cette théorie ne puisse être exclue sans plus d'investigations.

2.2.3 – Réactions croisées :

Parmi les cas discordants de notre série, il a été noté la détection du coronavirus HCoV OC43 à deux reprises. Ce dernier était associé au virus parainfluenza 3 dans un échantillon confirmé négatif par ARGENE, dans le premier cas (n°67 – Tableau VI) ; tandis que dans le second cas (n°79 – Tableau VI), sa détection, initialement conjointe à celle du SARS-CoV-2, puis isolée sur un second prélèvement testé deux jours plus tard sur FilmArray, a soulevé la question d'une éventuelle réaction croisée (sur le 1^{er} échantillon) entre ces deux agents appartenant à la

même famille *Coronaviridae* et au même genre *Betacoronavirus*, ce d'autant que l'échantillon initial n'avait pu être testé sur ARGENE.

Si aucune des séries sus-citées (Tableau VIII) ne relève un cas similaire, la spécificité y étant unanimement estimée à 100% [30-33] ; la possibilité d'une réaction croisée avec un autre coronavirus a été évoquée dans l'observation d'Otsuka et al, qui a rapporté un cas d'infection à HCoV NL63, avec une PCR faussement positive pour le SARS-CoV-2 sur deux kits différents, avec un seul gène détecté, notamment N1. Cette éventualité n'a cependant pas été retenue par les auteurs qui, après avoir recherché des séquences génomiques de l'HCoV NL63 susceptibles de correspondre aux amorces utilisées, ont conclu à une contamination de l'échantillon. En outre, le diagnostic d'infection à HCoV NL63 avait été redressé par le FilmArray RP 2.1 Plus [50]. Dans le cas sus-cité, une contamination de l'échantillon, confortée par la négativité des deux prélèvements sur MAScIR 2.0, paraît probable. Ceci est appuyé par les recommandations du fabricant pour une désinfection fréquente des équipements et surfaces de travail et l'utilisation de PSM classe 2 lors de la manipulation des échantillons.

2.2.4 – Autres causes :

Enfin, d'autres causes, pouvant être à l'origine des discordances, sont à évoquer, à savoir :

- ➔ Une éventuelle contamination des échantillons testés sur FilmArray, comme évoquée plus haut.
- ➔ Une possible altération des échantillons avant le test comparatif, certains n'ayant été testés sur MAScIR 2.0 et ARGENE qu'après un délai de conservation à -70°C.
- ➔ Une mauvaise performance de l'un des extracteurs utilisés, dont l'impact n'a pu être évalué séparément dans notre travail ; l'étude de Nalla et al démontrant, par ailleurs, l'influence que cette phase peut avoir sur la sensibilité de la PCR [51].

2.3 – Détection d'autres virus sur FilmArray :

Dans notre étude, d'autres agents pathogènes ont été recensés dans près de 24% des cas positifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray et dans 11,8% des 59 cas concordants ; ces deux valeurs étant bien plus élevées que celles rapportées dans d'autres séries, où les taux étaient estimés aux alentours de 3%. Les agents prédominants varient selon les études, certaines notant une prédominance du VRS, tandis que, dans d'autres, le rhinovirus/entérovirus et

l'adénovirus étaient majoritaires [52-54]. Les variations saisonnières et géographiques, de même que les critères d'inclusion des patients, dont l'âge, pourraient expliquer ces différences.

S'il est admis que les cas de coinfections existent et sont à même d'influencer la morbi-mortalité liée à la COVID-19, on ne peut toutefois affirmer, sur la base de nos résultats, s'il s'agissait de véritables coinfections ou d'infections séquentielles [33,52]. En effet, l'accès aux Ct (non autorisé sur les versions actuelles du FilmArray) devrait pouvoir permettre de faire la différence.

2.4 – Limites de notre étude :

Notre étude souffre de certains écueils n'ayant pas permis d'élucider l'origine de toutes les discordances recensées, à savoir :

- Son caractère monocentrique et rétrospectif, certains tests de comparaison ayant été réalisés après un certain délai.
- Le nombre limité d'échantillons, dont certains, en quantité insuffisante, n'ont pu être testés sur ARGENE.
- Le manque de renseignements épidémiologiques et clinico-radiologiques, à même d'orienter l'interprétation des résultats.
- L'absence d'évaluation de l'impact de chacun des extracteurs.
- Le recours à un test non validé dans notre laboratoire (ARGENE) pour la comparaison des deux autres, test dont la LOD est inférieure à celle du kit MAScIR mais supérieure à celle du FilmArray.

Au vu de la LOD nettement plus basse pour le FilmArray par rapport au kit MAScIR, la conduite à tenir la plus appropriée pour ces cas discordants semble être celle de retenir un résultat positif pour le SARS-CoV-2 sur FilmArray, quel que soit le nombre de sondes détectées. Ceci correspond également aux recommandations figurant sur la notice du fabricant.

V - CONCLUSION :

A la lumière de toutes ces données, il semble difficile de faire la part, a fortiori pour les échantillons discordants non testés sur ARGENE, entre des faux positifs du FilmArray et des faux négatifs du kit MAScIR 2.0, sans plus d'investigations. Si le résultat semi-quantitatif de la RT-PCR MAScIR 2.0 s'avère plus informatif que celui, strictement qualitatif, du FilmArray, la plus grande sensibilité de ce dernier prévaut en l'absence de corrélation strictement établie entre valeur du Ct et infectiosité.

Dans l'attente d'une standardisation des RT-PCR pour le diagnostic de l'infection à SARS-CoV-2, et au vu des évaluations limitées des divers tests avant leur mise sur le marché, les études comparatives entre les différentes méthodes et les programmes d'évaluation externe de la qualité s'avèrent cruciaux.

Il apparaît clair, en tout cas, que l'interprétation d'une RT-PCR ne saurait se faire isolément du contexte clinico-épidémiologique du patient et que des prélèvements itératifs sont fortement conseillés en cas de doute persistant, surtout quand on sait l'effet délétère qu'un résultat erroné peut avoir sur les efforts entrepris en vue de lutter contre cette pandémie.

RESUME

Titre : Comparaison entre les kits FilmArray BioFire RP2.1 et MAScIR 2.0 pour la détection du SARS-CoV-2.

Auteur : TAZI Sophia

Encadrant : Pr SEFFAR Myriame

Mots-clés : SARS-CoV-2 - RT-PCR - FilmArray BioFire RP 2.1 - MAScIR 2.0 - Discordances

Introduction : La RT-PCR représente le gold standard pour le diagnostic des infections à SARS-CoV-2, mais l'absence de standardisation des tests, dont les performances diagnostiques peuvent s'avérer très variables, complique l'interprétation des cas discordants qui peuvent se rencontrer. Notre travail a eu pour objectif d'évaluer les performances du FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus, pour la détection du SARS-CoV-2, comparativement à la méthode de référence de notre laboratoire, reposant sur le kit MAScIR 2.0.

Matériels et méthodes : Nous avons mené une étude rétrospective, s'étalant sur une période de dix mois, au Laboratoire Central de Virologie du CHU Ibn Sina, Rabat. Nous avons inclus des écouvillons nasopharyngés, positifs et négatifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus, dont les résultats ont été comparés à ceux de la RT-PCR MAScIR SARS-CoV-2 M kit 2.0, dont ils ont bénéficié initialement, ou après décongélation des échantillons. Tout échantillon, dont les deux résultats étaient discordants et la quantité suffisante, a ensuite fait l'objet d'une RT-PCR ARGENE® SARS-CoV-2 R-GENE.

Résultats : Parmi les échantillons négatifs en SARS-CoV-2 sur FilmArray RP 2.1, aucun résultat discordant n'a été recensé. Parmi les échantillons positifs en SARS-CoV-2, seuls 73,8% avaient un résultat concordant sur MAScIR 2.0. Le taux de discordance allait de 12,7% en présence des deux sondes sur FilmArray RP 2.1, à 42,9% et 100% en cas de détection isolée de la sonde M ou S respectivement. Ainsi, la sensibilité et la spécificité du FilmArray RP 2.1 ont été évaluées respectivement à 100% et 79,2% et les valeurs prédictives positive et négative à 73,8% et 100% respectivement. Parmi les 21 échantillons discordants, seuls onze ont été testés sur ARGENE, dont six avaient un résultat positif concordant avec celui du FilmArray RP 2.1.

Conclusion : En raison de la plus faible LOD du FilmArray RP 2.1 comparativement à MAScIR 2.0, il semble plus approprié, pour ces cas discordants, de retenir le résultat positif pour le SARS-CoV-2 sur FilmArray RP 2.1, quel que soit le nombre de sondes détectées.

ABSTRACT

Title : Comparative performance evaluation of FilmArray BioFire RP2.1 and MAScIR 2.0 assays for SARS-CoV-2 detection.

Author : TAZI Sophia

Supervisor : Pr SEFFAR Myriame

Keywords : SARS-CoV-2 - RT-PCR - FilmArray BioFire RP 2.1 - MAScIR 2.0 - Discrepancies

Introduction : RT-PCR is the gold standard for the diagnosis of SARS-CoV-2 infections, but the lack of standardization of assays, whose diagnostic performance may widely vary, complicates the interpretation of the discrepancies that may be encountered. Our study aimed to evaluate the performance of FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus assay for the detection of SARS-CoV-2, in comparison to our laboratory's reference test: MAScIR SARS-CoV-2 M kit 2.0.

Materials and methods : We conducted a retrospective study over a ten-month period at the Central Laboratory of Virology of Ibn Sina University Hospital of Rabat. We included nasopharyngeal swabs, positive and negative for SARS-CoV-2 on FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus, which were subjected to MAScIR 2.0 RT-PCR, initially or after a freeze-thaw cycle. Their results were compared, and each discrepant sample with sufficient volume underwent a third test, using ARGENE® SARS-CoV-2 R-GENE.

Results : Among the 80 SARS-CoV-2 negative samples on FilmArray RP 2.1, there were no discordant results. Of the 80 SARS-CoV-2 positive samples on FilmArray RP 2.1, only 73.8% had a concordant result on MAScIR 2.0. The discordance rates ranged from 12.7% when both targets were detected on FilmArray RP 2.1, to 42.9% and 100% when only M or S gene was detected, respectively. Thus, compared to our laboratory's reference test, the sensitivity and specificity of FilmArray RP 2.1 were 100% and 79.2% respectively, and its positive and negative predictive values were 73.8% and 100% respectively. Of the 21 discordant samples, only eleven were tested on ARGENE, six of which had a positive result concordant with that of FilmArray RP 2.1.

Conclusion : Given the higher analytical sensitivity of FilmArray RP 2.1 comparatively to MAScIR 2.0, it seems more relevant to retain the positive result for SARS-CoV-2 on FilmArray RP 2.1 for the discordant samples of our series, regardless of the detection of one or both targets on the latter assay.

ملخص :

العنوان: مقارنة بين عدة FilmArray BioFire RP2.1 و عدة MAScIR 2.0 للكشف عن SARS-CoV-2

الكاتبة: تازي صوفيا

المشرفة: الأستاذة السفار مريم

الكلمات المفتاحية: SARS-CoV-2 - RT-PCR - FilmArray BioFire RP 2.1 - MAScIR 2.0 - تعارض

تمثل الـ RT PCR المعيار النموذجي لتشخيص عدوى SARS-CoV-2، لكن الافتقار إلى توحيد الاختبارات، التي يمكن أن يكون أداؤها التشخيصي متبايناً للغاية، يعقد تفسير الحالات المتضاربة التي يمكن مواجهتها. هدفت دراستنا إلى تقييم أداء FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus، للكشف عن SARS-CoV-2، مقارنة بالطريقة المرجعية لمختبرنا، بناءً على عدة MAScIR 2.0.

لقد أجرينا دراسة بأثر رجعي، امتدت على فترة عشرة أشهر، في المختبر المركزي لعلم الفيروسات بالمستشفى الجامعي ابن سينا بالرباط. قمنا بتضمين عينات من مسحات أنفية بلعمية إيجابية وسلبية لـ SARS-CoV-2 على FilmArray BioFire® Respiratory Panel 2.1 Plus، والتي تمت مقارنة نتائجها بنتائج RT-PCR MAScIR SARS-CoV-2 M kit 2.0، حيث تم اختبارها منذ البداية أو بعد إذابة العينات. أي عينة كانت نتائجها متعارضة وكمية العينة كانت كافية، خضعت بعد ذلك لـ RT-PCR ARGENE® SARS-CoV-2 R-GENE.

من بين العينات السلبية لـ SARS-CoV-2 على FilmArray RP 2.1، لم يتم تحديد أي نتائج متعارضة. من بين العينات الإيجابية لـ SARS-CoV-2، كانت 73.8% فقط من العينات نتيجتها متوافقة على MAScIR 2.0. تراوح معدل التناقض من 12.7% في وجود كلا المجسبين على FilmArray RP 2.1، إلى 42.9% و 100% في حالة الكشف المعزول للمجس M أو S على التوالي. وهكذا، تم تقييم حساسية وخصوصية FilmArray RP 2.1 عند 100% و 79.2% على التوالي والقيم التنبؤية الإيجابية والسلبية عند 73.8% و 100% على التوالي. من بين 21 عينة مختلفة نتائجها، تم اختبار 11 عينة فقط على ARGENE، ستة منها كانت لها نتيجة إيجابية متوافقة مع تلك الخاصة بـ FilmArray RP 2.1.

نظرًا للمستوى المنخفض LOD الخاص بـ FilmArray RP 2.1 مقارنةً بـ MAScIR 2.0، يبدو أنه من الأنسب، بالنسبة لهذه الحالات المتعارضة، الاحتفاظ بالنتيجة الإيجابية لـ SARS-CoV-2 على FilmArray RP 2.1، بغض النظر عن عدد المجسات التي تم اكتشافها.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] : Lefeuvre C, Przyrowski É, Ataire-Marchais V. Aspects virologiques et diagnostic du coronavirus Sars-CoV-2. Actual Pharm. 2020 Oct;59(599):18-23. doi: 10.1016/j.actpha.2020.08.005.
- [2] : Joyce N, Seim L, Smerina M. The Dynamics of SARS-CoV-2 (RT-PCR) Testing. Case Rep Med. 2021 May 22;2021:6688303. doi: 10.1155/2021/6688303.
- [3] : Williams E, Bond K, Chong B, Giltrap D, Eaton M, Kyriakou P, et al. Implementation and evaluation of a novel real-time multiplex assay for SARS-CoV-2: in-field learnings from a clinical microbiology laboratory. Pathology. 2020 Dec;52(7):754-9. doi: 10.1016/j.pathol.2020.08.004.
- [4] : BioFire Diagnostics, LLC. Manuel d'utilisation de l'automate FilmArray CE IVD. https://www.biomerieux.ca/sites/subsidiary_ca/files/filmarray_v2.0_manuel_utilisateur_fr_1.pdf
- [5] : BioFire Diagnostics, LLC. BioFire Respiratory Panel 2.1 (RP2.1) Instructions for Use. <https://docs.biofire.com/wp-content/uploads/BFR0000-8303-BioFire-RP2.1-Panel-Instructions-for-Use-EUA-EN.pdf>
- [6] : Moldiag. MAScIR SARS-CoV-2 M kit2.0 pour Diagnostic In Vitro (IVD). Fiche Technique.
- [7] : Haute Autorité de Santé. Avis SFM du 25/09/2020 relatif à l'interprétation de la valeur de Ct (estimation de la charge virale) obtenue en cas de RT-PCR SARS-CoV-2 positive - Version 4 du 14/01/2021. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2021/01/Avis-SFM-valeur-Ct-excre%CC%81tion-virale--Version-def-14012021_V4.pdf
- [8] : bioMérieux SA. ARGENE® SARS-COV-2 R-GENE® Instructions for Use. <https://www.fda.gov/media/137742/download>
- [9] : Yu CY, Chan KG, Yean CY, Ang GY. Nucleic Acid-Based Diagnostic Tests for the Detection SARS-CoV-2: An Update. Diagnostics (Basel). 2021 Jan 1;11(1):53. doi: 10.3390/diagnostics11010053.
- [10] : Hantz S. Diagnostic biologique de l'infection à Sars-CoV-2 : stratégies et interprétation des résultats. Rev Francoph Lab. 2020 Nov;2020(526):48-56. doi: 10.1016/S1773-035X(20)30313-0.

- [11] : Smithgall MC, Dowlathshahi M, Spitalnik SL, Hod EA, Rai AJ. Types of Assays for SARS-CoV-2 Testing: A Review. Lab Med. 2020 Sep 1;51(5):e59-e65. doi: 10.1093/labmed/lmaa039.
- [12] : Haute Autorité de Santé. Aspects immunologiques et virologiques de l'infection par le SARS-CoV-2 – Variabilité génétique, réponses immunitaires, plateformes vaccinales et modèles animaux. 25 novembre 2020. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2020-11/rapport_-_immunit_e_au_cours_de_linfection_par_le_sars-cov-2_2020-11-30_17-25-10_860.pdf
- [13] : Organisation Mondiale de la Santé. Tests diagnostiques pour le dépistage du SARS-CoV-2 : orientations provisoires. 11 septembre 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/335724/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [14] : Basille D, Andrejak C. Infection à SARS-CoV-2 : connaissances au 15 avril 2021. Rev Mal Respir. 2021;38(6):616-25. doi:10.1016/j.rmr.2021.04.014.
- [15] : Jamaï Amir I, Lebar Z, Yahyaoui G, Mahmoud M. Covid-19 : virologie, épidémiologie et diagnostic biologique. Option/Bio. 2020 July-August;31(619):15–20. doi: 10.1016/S0992-5945(20)30178-1.
- [16] : Organisation Mondiale de la Santé. Suivi des variants du SARS-CoV-2. <https://www.who.int/fr/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
- [17] : Organisation Mondiale de la Santé. Relevé Epidémiol Hebdo. 21 décembre 2021;71:1-15. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---21-december-2021>
- [18] : Desvaux É, Faucher JF. Covid-19 : aspects cliniques et principaux éléments de prise en charge. Rev Francoph Lab. 2020 Nov;2020(526):40-7. doi: 10.1016/S1773-035X(20)30312-9.
- [19] : Mahieu R, Dubée V. Caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la Covid-19. Actual Pharm. 2020 Oct;59(599):24-6. doi: 10.1016/j.actpha.2020.08.006.
- [20] : Graham M, Ballard SA, Pasricha S, Lin B, Hoang T, Stinear T, et al. Use of emerging testing technologies and approaches for SARS-CoV-2: review of literature and global experience in an Australian context. Pathology. 2021 Oct;53(6):689-99. doi: 10.1016/j.pathol.2021.08.001.
- [21] : Haute Autorité de Santé. Méta-analyse de l'intérêt diagnostique des tests RT-PCR salivaires de détection du SARS-CoV-2. Février 2021. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3237008/fr/meta-analyse-de-l-interet-diagnostique-des-tests-rt-pcr-salivaires-de-detection-du-sars-cov-2

[22] : Mattioli IA, Hassan A, Oliveira ON Jr, Crespilho FN. On the Challenges for the Diagnosis of SARS-CoV-2 Based on a Review of Current Methodologies. ACS Sens. 2020 Dec 24;5(12):3655-77. doi: 10.1021/acssensors.0c01382.

[23] : Gilles-Manz S. Criblage de mutations par courbe de fusion en haute résolution (HRM) – Application en Oncologie : précision et performance de la technique par comparaison avec les méthodes classiques de séquençage en vue de son accréditation COFRAC. Ingénierie biomédicale. 2012. hal-01466472.

[24] : Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnology. 2002;2(2):2-11.

[25] : Organisation Mondiale de la Santé. Recommandations pour les stratégies de dépistage et les capacités de diagnostic du SARS-CoV-2 à l'échelle nationale. Orientations provisoires. 25 juin 2021. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/342903/WHO-2019-nCoV-lab-testing-2021.1-fre.pdf>

[26] : Rabaan AA, Tirupathi R, Sule AA, Aldali J, Mutair AA, Alhumaid S, et al. Viral Dynamics and Real-Time RT-PCR Ct Values Correlation with Disease Severity in COVID-19. Diagnostics (Basel). 2021 Jun 15;11(6):1091. doi: 10.3390/diagnostics11061091.

[27] : Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. Ann Intern Med. 2020 Aug 18;173(4):262-7. doi: 10.7326/M20-1495.

[28] : Kanji JN, Zelyas N, MacDonald C, Pabbaraju K, Khan MN, Prasad A, et al. False negative rate of COVID-19 PCR testing: a discordant testing analysis. Virol J. 2021 Jan 9;18(1):13. doi: 10.1186/s12985-021-01489-0.

[29] : Haute Autorité de Santé. Avis n° 2021.0042/AC/SEAP du 17 juin 2021 du collège de la Haute Autorité de santé relatif aux modifications des conditions d'inscription sur la liste des actes et prestations mentionnée à l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale, de la détection des anticorps sériques dirigés contre le coronavirus SARS-CoV-2. 17 juin 2021. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3272801/fr/avis-n-2021-0042/ac/seap-du-17-juin-2021-du-college-de-la-has-relatif-aux-modifications-des-conditions-d-inscription-sur-la-lap-mentionnee-a-l-article-l-162-1-7-du-css-de-la-detection-des-anticorps-seriques-diriges-contre-le-coronavirus-sars-cov-2

[30] : Eckbo EJ, Locher K, Caza M, Li L, Lavergne V, Charles M. Evaluation of the BioFire® COVID-19 test and Respiratory Panel 2.1 for rapid identification of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swab samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2021 Mar;99(3):115260. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115260.

- [31] : Creager HM, Cabrera B, Schnaubelt A, Cox JL, Cushman-Vokoun AM, Shakir SM, et al. Clinical evaluation of the BioFire® Respiratory Panel 2.1 and detection of SARS-CoV-2. *J Clin Virol*. 2020 Aug;129:104538. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104538.
- [32] : Johnson G, Zubrzycki A, Henry M, Ranadheera C, Corbett C, Meyers AFA, et al. Clinical evaluation of the GeneXpert® Xpert® Xpress SARS-CoV-2/Flu/RSV combination test. *J Clin Virol Plus*. 2021;1:100014. doi: 10.1016/j.jcvp.2021.100014.
- [33] : Jian MJ, Chung HY, Chang CK, Lin JC, Yeh KM, Chen CW, et al. Clinical Comparison of Three Sample-to-Answer Systems for Detecting SARS-CoV-2 in B.1.1.7 Lineage Emergence. *Infect Drug Resist*. 2021 Aug 17;14:3255-61. doi: 10.2147/IDR.S328327.
- [34] : Yanson K, Laviers W, Neely L, Lockamy E, Castillo-Hernandez LC, Oldfield C, et al. Performance Evaluation of the BD SARS-CoV-2 Reagents for the BD MAX System. *J Clin Microbiol*. 2021 Nov 18;59(12):e0101921. doi: 10.1128/JCM.01019-21.
- [35] : Arnaout R, Lee RA, Rye Lee G, Callahan C, Yen CF, Smith KP, et al. SARS-CoV2 Testing: The Limit of Detection Matters. Preprint. *bioRxiv*. 2020;2020.06.02.131144. Published 2020 Jun 4. doi:10.1101/2020.06.02.131144.
- [36] : U.S. Food & Drug Administration. SARS-CoV-2 Reference Panel Comparative Data. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-reference-panel-comparative-data>
- [37] : Coronavirus Standards Working Group. A COVID-19 Diagnostic Standards Development Partnership. <https://jimb.stanford.edu/covid-19-standards>
- [38] : Coronavirus Standards Working Group. CSWG RNA Harmonization Study – preliminary results. <https://msalit.shinyapps.io/RNAstudy/>
- [39] : Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Amemiya K, Nagakubo Y, Hosaka K, et al. Analysis of a persistent viral shedding patient infected with SARS-CoV-2 by RT-qPCR, FilmArray Respiratory Panel v2.1, and antigen detection. *J Infect Chemother*. 2021 Feb;27(2):406-9. doi: 10.1016/j.jiac.2020.10.026.
- [40] : Ridgway JP, Shah NS, Robicsek AA. Prolonged Shedding of SARS-CoV-2 RNA among Patients with COVID-19. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020 Oct;41(10):1235-6. doi: 10.1017/ice.2020.307.
- [41] : Widders A, Broom A, Broom J. SARS-CoV-2: The viral shedding vs infectivity dilemma. *Infect Dis Health*. 2020 Aug;25(3):210-5. doi: 10.1016/j.idh.2020.05.002.
- [42] : Sohni Y. Variation in LOD Across SARS-CoV-2 Assay Systems: Need for Standardization. *Lab Med*. 2021;52:107-15. doi: 10.1093/labmed/lmaa103.

- [43] : Singanayagam A, Patel M, Charlett A, Lopez Bernal J, Saliba V, Ellis J, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill.* 2020 Aug;25(32):2001483. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483. Erratum in: *Euro Surveill.* 2021 Feb;26(7).
- [44] : Mushtaq MZ, Shakoor S, Kanji A, Shaheen N, Nasir A, Ansar Z, et al. Discrepancy between PCR based SARS-CoV-2 tests suggests the need to re-evaluate diagnostic assays. *BMC Res Notes.* 2021 Aug 17;14(1):316. doi: 10.1186/s13104-021-05722-5.
- [45] : Koyama T, Platt D, Parida L. Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Bull World Health Organ.* 2020 Jul 1;98(7):495-504. doi: 10.2471/BLT.20.253591.
- [46] : Wang R, Hozumi Y, Yin C, Wei GW. Mutations on COVID-19 diagnostic targets. *Genomics.* 2020 Nov;112(6):5204-13. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.09.028.
- [47] : Habibzadeh P, Mofatteh M, Silawi M, Ghavami S, Faghihi MA. Molecular diagnostic assays for COVID-19: an overview. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2021 Sep;58(6):385-98. doi: 10.1080/10408363.2021.1884640.
- [48] : Reina J, Suarez L. Evaluación de diferentes genes en la detección por RT-PCR del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias y su evolución en la infección. *Rev Esp Quimioter.* 2020 Aug;33(4):292-3. doi: 10.37201/req/045.2020.
- [49] : Lv DF, Ying QM, Weng YS, Shen CB, Chu JG, Kong JP, et al. Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clin Chim Acta.* 2020 Jul;506:172-5. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.032.
- [50] : Otsuka Y, Hagiya H, Nakano Y, Omura D, Hasegawa K, Yamada H, et al. A patient with human coronavirus NL63 falsely diagnosed with COVID-19; Lesson learned for the importance of definitive diagnosis. *J Infect Chemother.* 2021 Jul;27(7):1126-8. doi: 10.1016/j.jiac.2021.05.001.
- [51] : Nalla AK, Casto AM, Huang MW, Perchetti GA, Sampoleo R, Shrestha L, et al. Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays Using Seven Different Primer-Probe Sets and One Assay Kit. *J Clin Microbiol.* 2020 May 26;58(6):e00557-20. doi: 10.1128/JCM.00557-20.
- [52] : Chung HY, Jian MJ, Chang CK, Lin JC, Yeh KM, Chen CW, et al. Novel dual multiplex real-time RT-PCR assays for the rapid detection of SARS-CoV-2, influenza A/B, and respiratory syncytial virus using the BD MAX open system. *Emerg Microbes Infect.* 2021 Dec;10(1):161-6. doi: 10.1080/22221751.2021.1873073.

[53] : Marshall NC, Kariyawasam RM, Zelyas N, Kanji JN, Diggle MA. Broad respiratory testing to identify SARS-CoV-2 viral co-circulation and inform diagnostic stewardship in the COVID-19 pandemic. *Virology*. 2021;18(93). <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01545-9>.

[54] : Hazra A, Collison M, Pisano J, Kumar M, Oehler C, Ridgway JP. Coinfections with SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020 Oct;41(10):1228-9. doi: 10.1017/ice.2020.322.