

Gilbert Greub¹, Onya Opota¹, René Brouillet¹, Katia Jaton¹

Diagnostic par RT-PCR de l'infection par le virus SARS-CoV-2

Très rapidement au début de l'épidémie due au nouveau coronavirus SARS-CoV-2, des amorces ont été décrites permettant aux laboratoires diagnostiques du monde entier, ayant des plateformes de diagnostic moléculaire, de rapidement implémenter une PCR diagnostique [1].

Comme d'autres centres, nous avons commandé les amorces proposées et les avons testées sur un aliquote d'ARN de virus reçu d'un centre de référence en Allemagne. D'emblée, nous avons noté une meilleure sensibilité de la PCR ciblant le gène E, codant pour une protéine de l'enveloppe et la moindre sensibilité des deux autres cibles ciblant le gène RdRp codant pour une ARN polymérase et le gène N codant pour une protéine de la nucléocapside.

Nous avons reçu les premiers échantillons de patients dès le 28 janvier et le 14 février, nous avons pu commencer à tester en parallèle notre PCR avec celles effectuées au centre national de référence (CRIVE) aux HUG, Genève. La validation de notre PCR s'est achevée le 28 février, nous permettant ainsi, avec l'aval de l'OFSP, de travailler de manière indépendante et réduisant ainsi le temps de rendu des résultats et les coûts liés à l'acheminement des échantillons par taxi à Genève. Dès le 25 février, suite au premier patient positif au Tessin, le nombre d'analyses s'est progressivement accru. Le vendredi 28 février, nous avons reçu au CHUV le premier patient diagnostiqué positif et nous avons dès ce jour reçu plusieurs prélèvements positifs. Comme le montre la figure 1, l'activité a ensuite augmenté de manière exponentielle pour atteindre un pic le mercredi 19 mars 2020, avec 1134 tests effectués ce jour-là.

Formation intensive pour augmenter la capacité

Une telle activité massive n'aurait pas été possible si nous n'avions pas en amont formé pour l'activité préanalytique des techniciens-nes provenant d'autres laboratoires du département, dont l'activité avait progressivement chuté suite à la baisse de l'activité

chirurgicale et ambulatoire. Environ 40 personnes ont été formées afin d'être disponibles en cas de besoin sur une période de deux semaines. Actuellement, 1^{er} mai, il y a encore 30 personnes de ce pool qui peuvent au besoin prendre en charge la préanalytique pour les demandes de RT-PCR pour le SARS-CoV-2 sur échantillons nasopharyngés. L'ensemble de l'activité spécifiquement analytique a été pris en charge par les techniciens-nes de notre laboratoire de biologie moléculaire. Ensuite, la validation bio-médicale des résultats ainsi que la diffusion de ces résultats aux différentes autorités ont été effectuées par l'équipe postanalytique constituée de biologistes et médecins, FAMH diplômés ou futur-e-s diplômés FAMH.

Différentes plateformes de diagnostic moléculaire automatisées

Outre l'accès à des ressources humaines suffisantes, l'autre élément majeur qui nous a permis de prendre en charge autant d'échantillons par jour, en l'absence d'une technique robotisée industrielle de type Cobas, était le fait que nous avons à Lausanne la chance d'avoir implémenté au cours de ces dernières années une plateforme de diagnostic moléculaire entièrement automatisée [2]. Cette plateforme constituée actuellement de deux robots MagNAPure 96, de trois robots Starlet et de deux instruments PCR QuantStudio 7 nous permet à toutes les étapes de l'extraction d'ARN à la one step RT-PCR de pouvoir poursuivre notre activité automatisée, même en cas de panne de l'un ou l'autre des automates. De surcroît, cette plateforme automatisée versatile et flexible, sur laquelle sont détectés à la fois virus, bactéries, champignons et parasites, nous a permis de garder des temps de rendu de résultats courts même lorsqu'il n'y avait au début que des tests sporadiques qui nous étaient demandés. En effet, chaque analyse spécifique pour un patient donné pouvait être traitée dans la même

série que l'ensemble des autres 105 PCR différentes proposées par notre laboratoire de diagnostic moléculaire. Cette flexibilité explique également que nous ayons eu en stock un nombre significatif d'embouts pour nos automates, de plastiques et de réactifs pour l'extraction d'ARN et de mélange réactionnel pour l'amplification; cette planification et réactivité nous a permis d'éviter la pénurie de matériel, pénurie rencontrée par de nombreux autres laboratoires en Suisse. Nous avons été par conséquent largement sollicités en début d'épidémie par de nombreux laboratoires partenaires confrontés à une pénurie soudaine de réactifs, et lié au fait qu'il a fallu attendre fin mars pour que la plupart des tests commerciaux soient disponibles. Cette importante capacité initiale à tester explique qu'en début d'épidémie, alors qu'il y avait 3815 cas décrits en Suisse, le canton de Vaud comptabilisait déjà plus de 1000 cas, alors qu'en incidence par habitant notre canton était légèrement moins touché que les cantons de Genève et du Tessin. Pendant quelques jours, notre centre a été celui qui réalisait le plus de tests par habitant au niveau mondial, très vite rattrapé et dépassé par d'autres pays dont la Suède par exemple (pays qui développe également beaucoup de tests moléculaires non commerciaux). Notre grande capacité à tester dès début mars et le fait d'avoir pu effectuer jusqu'à douze séries de 95 échantillons en un jour nous a permis de proposer des délais de rendu de résultats relativement courts à nos collègues cliniciens, ce qui a facilité le tri des patients aux urgences et a permis de limiter, grâce à une bonne fiabilité des tests utilisés, le risque d'avoir des cas contagieux hospitalisés dans la zone non COVID.

Et les résultats faux négatifs?

La sensibilité a été partiellement questionnée dans certains articles. Ces inquiétudes étaient partiellement justi-

¹ Institut de microbiologie de l'Université de Lausanne et Service de microbiologie du CHUV, Lausanne

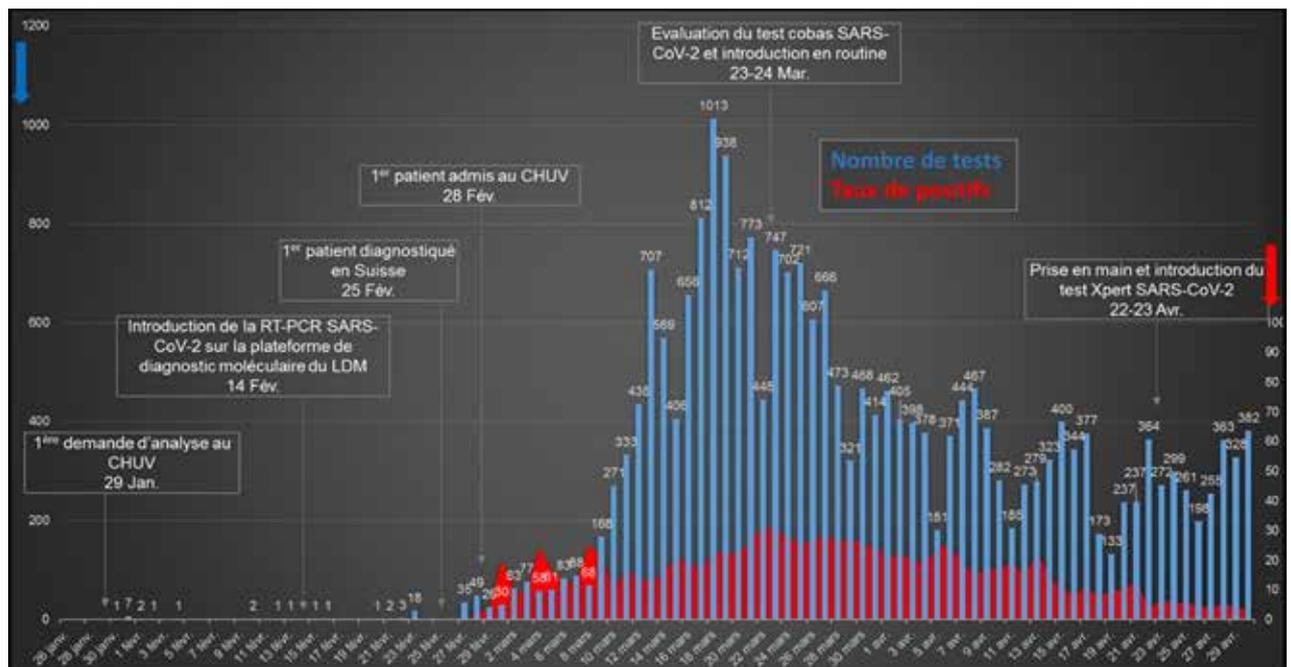


Figure 1. Le nombre total de tests (en bleu) de RT-PCR SARS-CoV-2 rendu par le laboratoire de diagnostic moléculaire du Service de microbiologie du CHUV entre le 28 janvier 2020 et le 29 avril. Notez la variation du pourcentage de positifs (en rouge), ainsi que les taux élevés en début d'épidémie par rapport au nombre de tests effectués.

fiées puisque au pic de l'épidémie, l'un des matériaux en pénurie était les frottis nasopharyngés et certains hôpitaux utilisaient alors des frottis cutanés au lieu de frottis nasopharyngés, ce qui conduisait à des prélèvements traumatiques et de médiocre qualité. Une analyse préliminaire effectuée sur 27 échantillons initialement positifs par RT-PCR et retestés dans les 72 heures qui suivirent le premier prélèvement a montré que ce test nasopharyngé était à nouveau positif pour 96% des situations (26/27). Les autres causes de résultats faux négatifs peuvent être liées au fait que la symptomatologie est parfois principalement digestive avec des diarrhées (sans excrétion virale au niveau nasal) ou parce que le patient a été échantillonné avant qu'il n'excrète le virus (par exemple lors de dépistage chez des patients asymptomatiques en contact avec un patient documenté positif), ou lorsque ces patients sont échantillonnés trop tardivement. Le coronavirus est relativement stable au niveau génétique et nous ne craignons pas de dérives majeures qui causeraient un faux négatif lié à une mutation simultanée au niveau de deux cibles de la RT-PCR. Compte tenu du manque relatif en réactifs, nous avons décidé, après avoir effectué les 1000 premiers tests, de transitoirement abandonner la 2^e cible et de n'utiliser plus que la PCR ciblant le gène E, plus sensible. Nous avons opté pour un contrôle régulier de l'émergence

d'éventuels mutants, en effectuant une fois par semaine une série de RT-PCR avec les deux RT-PCR en parallèle. Très rapidement, la disponibilité du test Cobas 6800, qui s'est révélé aussi sensible et spécifique que le test implémenté sur notre plateforme automatisée et qui contient de facto deux gènes cibles (ciblant le gène codant pour la protéine N et la protéine E), nous a permis d'abandonner cette surveillance prospective de l'apparition d'éventuels mutants. Depuis, nous avons également observé l'excellente sensibilité et spécificité du test rapide GeneXpert SARS-CoV-2 que nous utilisons dès le mercredi 22 avril. Ce test rapide moléculaire est utilisé en priorité pour dépister rapidement toute personne nécessitant une hospitalisation, y compris asymptomatique.

Actuellement, nous effectuons des RT-PCRs sur 3 plateformes différentes:

- la plateforme Cobas 6800 pour la majorité des prélèvements non urgents;
- la plateforme GeneXpert pour les prélèvements considérés comme urgents (hospitalisations non électives);
- la plateforme automatisée de notre institut (2) pour tous les prélèvements spéciaux (LCR, biopsies, etc.), les échantillons inhibés, et lors de pannes éventuelles.

Conclusions

Comme le démontrent les différents élé-

ments mentionnés ci-dessus, la RT-PCR joue un rôle majeur dans la prise en charge des patients, notamment dans la décision d'isolement, mais également pour confirmer le diagnostic d'une maladie qui ressemble beaucoup à d'autres maladies dues à des virus respiratoires. Cet article souligne aussi l'importance d'avoir au sein d'un hôpital universitaire une plateforme automatisée flexible qui permet de répondre à une demande accrue de manière efficace et d'avoir la compétence scientifique pour implémenter, évaluer et valider un nouveau test rapidement. Cette compétence est requise à répétition, puisque quasiment chaque année, un nouveau pathogène émergent est identifié et il nécessite la mise en place rapide de tests diagnostiques. En effet, la mise en place par les industriels de kits diagnostiques est souvent plus lente, puisqu'ils doivent passer par les différentes étapes prémarketing leur donnant les certifications CE ou FDA.

Correspondance
gilbert.greub@chuv.ch

Références

1. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-ncov) by real-time rtpcr. Euro Surveill 2020; 25.
2. Greub G, Sahli R, Brouillet R, Jaton K. Ten years of r&d and full automation in molecular diagnosis. Future Microbiol 2016; 11: 403-25.