

# **EVALUATION DE L 'AUTOMATE M10 DANS LE DIAGNOSTIC DU VIRUS SARS COV2 ET DE LA TUBERCULOSE**

**Dr. Imen BOUZOUITA (Ph.D)**

Laboratoire de microbiologie –LNR de la tuberculose,  
Hôpital Abderrahman Mami de pneumologie - Ariana

# EVALUATION DE L'AUTOMATE M10 DANS LE DIAGNOSTIC DU SARS-COV-2



# Introduction

- **Pandémie COVID:** crise sanitaire mondiale de cette époque  
764 474 387 personnes ont été infectées par le SARS CoV2 dans le monde / 26 Avril 2023 (OMS, 1<sup>er</sup> Mai 2023).
  - **6 915 286 décès**
- En Tunisie, 1 152 483 cas d'infection par le virus ont été confirmés avec ≈30 milles décès (OMS, 1<sup>er</sup> Mai 2023).
- **Diagnostic du Virus SARS Cov2:**
  - Imagerie: (Rx, Scanner)
  - Tests sérologiques
  - Tests antigéniques
  - Tests moléculaires (ARN du virus):  
RT-PCR , LoopAMP.....

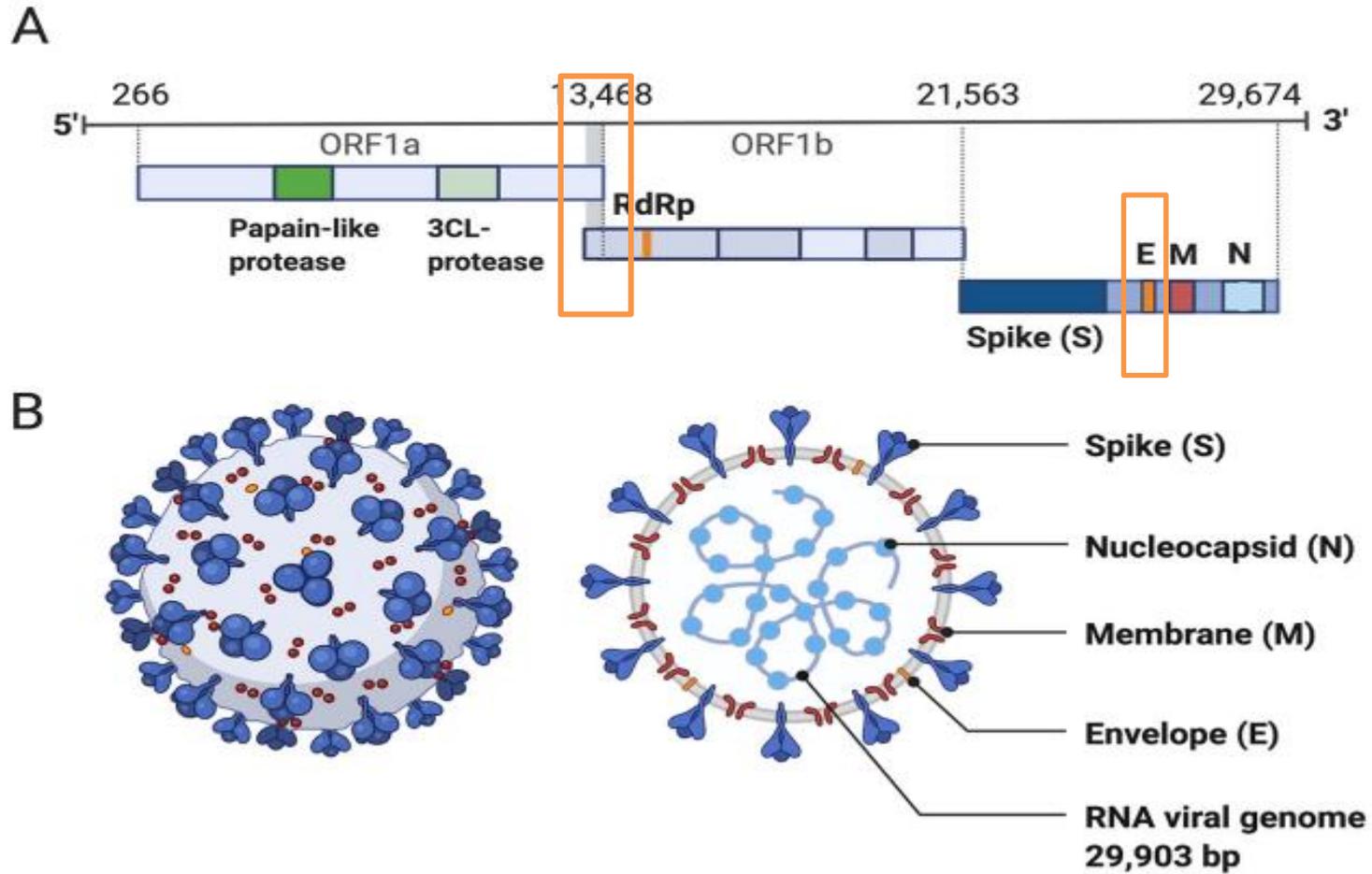
 Evaluation du test moléculaire STANDARD™ M10 SARS-CoV-2 dans le diagnostic du Virus SARS CoV2

# Caractéristiques du test STANDARD™ M10 SARS-CoV-2

- STANDARD M10 : des cartouches de PCR pour la mesure quantitative du virus SARS-CoV-2 à partir d'échantillons naso/ oro-pharyngés.
- STANDARD M10: facilement modulable (1-8)
- la limite de détection (LOD) est de **100 copies/mL**
- Extraction + amplification de l'ARN viral + interprétation des résultats **(30 à 60 min)**
- La cartouche, contient des amorces et des sondes ciblant des régions sur les gènes : **ORF1ab, E**



SARS-CoV-2 Viral Genome and Pathogenesis



Structure et génome du virus SARS CoV2 (Rand et al.,2021)

Réalisation du test

# 1/ Démarrage du système STANDARD M10 :

1/ Allumer l'automate :  
Connecter la console M10 avec  
ses 2 modules, puis les allumer  
en appuyant sur le bouton.



2/ S'identifier :  
Entrer l'identifiant et le mot de  
passe.



3/ Sélectionner le module à  
utiliser.  
Sélectionner le module  
disponible de l'écran d'accueil :  
L'indicateur de statut clignote  
en vert et la porte s'ouvre  
automatiquement.



4/ Scanner/Saisir l'identifiant  
du patient/échantillon.

Scannez l'identifiant du patient  
à l'aide du lecteur de code à  
barres intégré à la console M10  
ou tapez-le à l'aide du clavier  
virtuel.



5/ Scanner le code à barre de la  
cartouche du test à utiliser.

Après avoir scanner la  
cartouche, l'automate passe  
automatiquement à l'étape  
suivante



6/ Guide de chargement des  
échantillons :

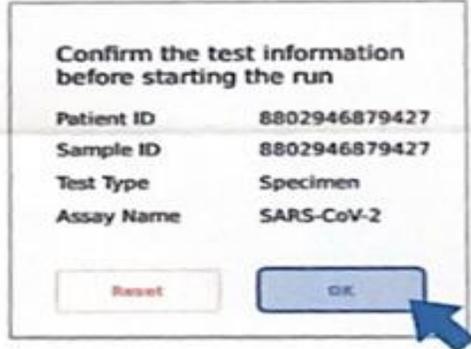
Regarder le guide animé pour  
la préparation de la cartouche  
et le chargement de  
l'échantillon. Toucher l'écran  
pour continu



# Chargement et exécution du test

|  |   |  |   |
|--|---|--|---|
| <p>1/ Retirer l'agrafe de sécurité de la cartouche :</p>  | <p>2/ Percer la cartouche : Appuyez sur le couvercle pour percer la cartouche scellée.</p>  | <p>3/ ouvrir le couvercle et distribuer 600ul de l'échantillon dans la chambre à échantillon</p>  | <p>4/ fermer le couvercle de la cartouche</p>  |
|--|---|--|---|

## 3/Exécution d'un test

|  |   |  |
|--|---|--|
| <p>1/ charger la cartouche dans le module : placer la cartouche dans le module M10 correspondant et fermer la porte manuellement.</p>  <p>* la chambre de PCR de la cartouche doit être en face de</p> | <p>2/ Confirmer le test : Après avoir confirmé les informations sur l'échantillon et la cartouche, appuyez sur le bouton « OK ».</p>  | <p>3/ Démarrer l'exécution : Le temps restant est affiché sur l'écran de la console M10</p>  |
|--|---|--|

## Early Call Function 30 ~ 60 minutes (in case of Positive)

Jun 15 03:22 PM admin

Run Test

Sample Cartridge Specimen Loading Running

### Running

22min

! Early Detection Call  
E  
Target signal reached the predetermined threshold before the whole assay have been completed.

Sample ID : LSH TEST  OC

Assay Name : SARS-CoV-2

STOP

Aug 18 02:00 PM admin

Review

Summary Amplification Details

**Test Information**

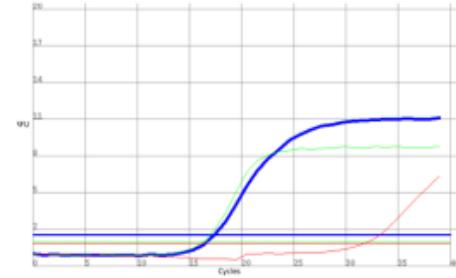
|             |                    |
|-------------|--------------------|
| Assay Name  | SARS-CoV-2         |
| Sample ID   | LSH TEST           |
| Test Type   | Specimen           |
| Run Started | 2021/8/18 11:50:55 |
| Run ended   | 2021/8/18 12:49:50 |
| User        | admin              |

**Result**

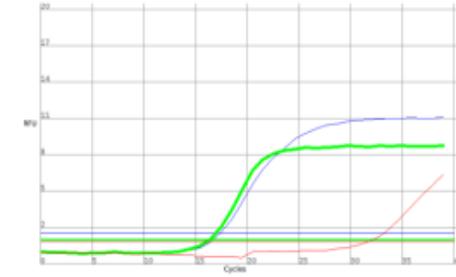
|        | Valid      |
|--------|------------|
| ORF1ab | + 17.09 Ct |
| E      | + 16.85 Ct |
| IC     | + 31.54 Ct |

Report Back

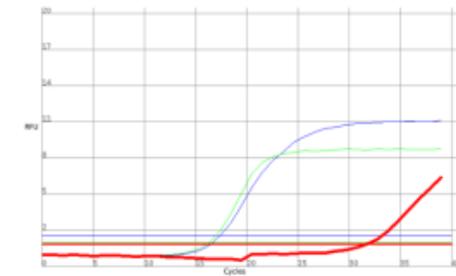
ORF1ab



E gene



IC



# STANDARD™ M10 SARS-CoV-2

## Interprétation

Deux gènes sont ciblés par ce test

- Gène *ORF1ab*
- Gène *E*

| Résultat                   | <i>ORF1ab</i> | <i>E</i> | CI  |
|----------------------------|---------------|----------|-----|
| SARS-CoV2 Positif          | +             | +/-      | +/- |
| SARS-CoV2 Positif Probable | -             | +        | +/- |
| SARS-CoV2 Négatif          | -             | -        | +   |
| invalide                   | -             | -        | -   |

CI: contrôle interne

# METHODOLOGIE

- **Réalisation de l'étude**

Prélèvements naso-pharyngés

- **Nombre de tests effectués : 190**

Patients suspects de la COVID 19 et consultant aux urgences de l'hôpital A.Mami de l'Ariana

- **Période** : du 20-07-2022 au 30-08-2022.

- Toutes les analyses sont réalisées à l'aveugle sans connaissance préalable des résultats du test de référence

## Test RT-PCR de référence Neoplex™ COVID-19 Detection Kit (Genematrix)

- Le test RT-PCR de référence utilisé: Kit Neoplex® COVID-19 FAST (96 Tests): *RdRp* et *N*
  - Prélèvements naso-pharyngés:
  - Extraction de l'ARN viral: Automate GenProof: 30 mn
  - Amplification: Automate D-LAB Accurate 96
- Délais : 2H20

# RESULTATS

## Standard M10 :

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| Nb de résultats positif :           | 59  |
| Nb de résultat présomptif positif : | 8   |
| Nb de résultats négatif :           | 118 |
| Nb d'erreur :                       | 1   |
| Nb de résultats invalides :         | 4   |

⇒ % de Résultats (+) : 31.1%

⇒ % de (+) et Présomptif (+): 35.3%

⇒ % de résultats (-) : 62.1 %

⇒ % d'erreurs : 0.5%

⇒ % de résultats invalides: 2.1%

## RT-PCR classique :

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| Nb de résultats positif :       | 58  |
| Nb de résultat positif faible : | 16  |
| Nb de résultats négatif :       | 116 |

⇒ %% de résultats + :30.5%

⇒ % de Total + : 38.9%

⇒ % de résultats - : 61.1 %

# Résultats comparés des deux tests

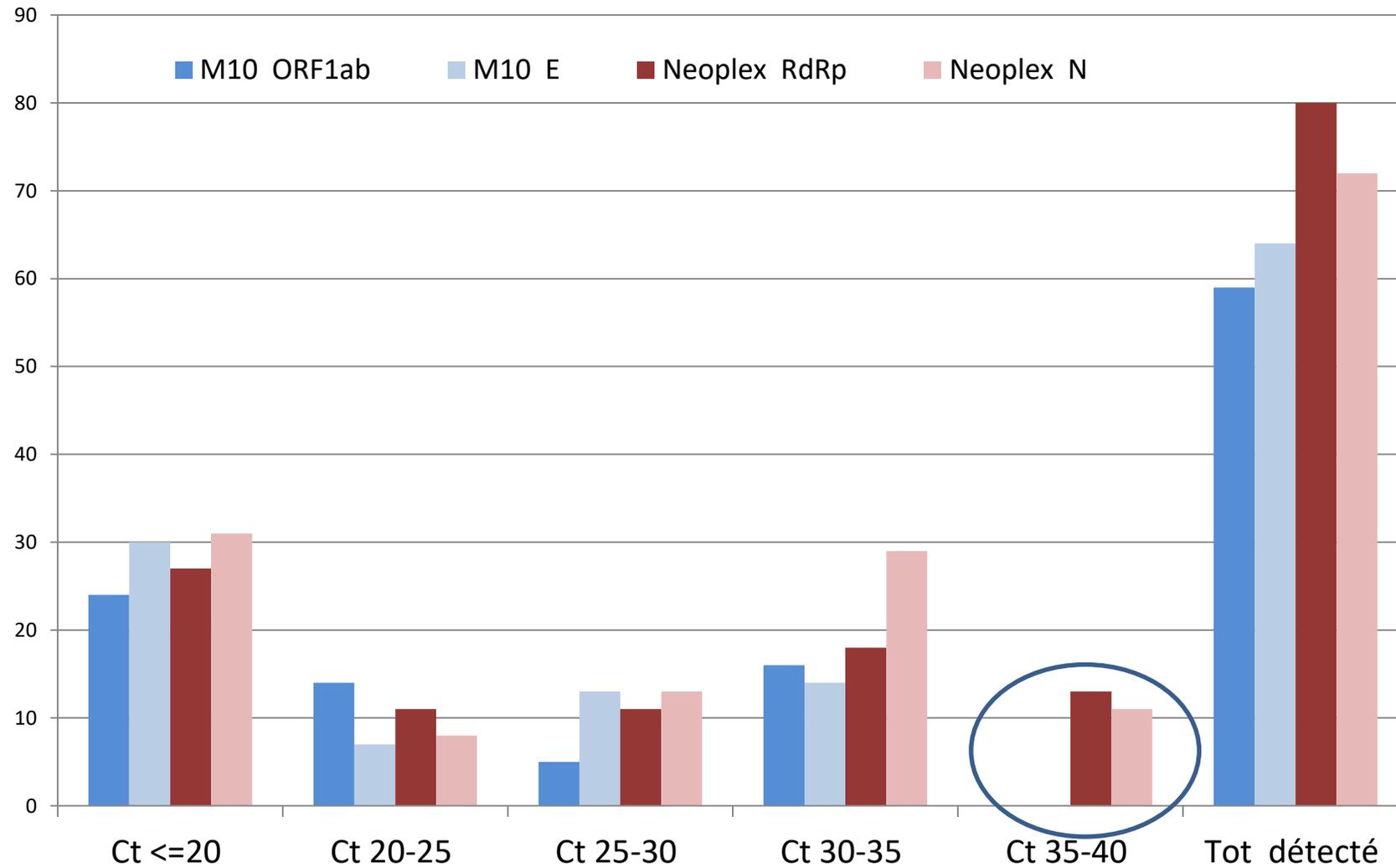
|     |                  | Neoplex® COVID-19 FAST |                  |       |
|-----|------------------|------------------------|------------------|-------|
|     |                  | Résultat positif       | Résultat négatif | Total |
| M10 | Résultat positif | 63                     | 4                | 67    |
|     | Résultat négatif | 9                      | 109              | 118   |
|     | Total            | 72                     | 113              | 185   |

# Analyse des résultats

## Faux positifs (4)

- 4 Positifs par le test M10 non confirmés par le test de référence:
  - 3 : **gène E** seul (CT > 33): **probablement +**
  - 1 : + **gène *ORF1ab*** ( CT 33,95)
  
- **Faux négatifs (9)**
  - 8 /9 : **positifs faibles**
  - 1/9 : **positif** (CtN: 29,62 , CtRdRp:31,94)

# Analyse des résultats



# Analyse des résultats

## Sensibilité des différents gènes détectés

|                  |        | RT-PCR, N (%) |              | M10, N (%) |              |
|------------------|--------|---------------|--------------|------------|--------------|
|                  |        | Detected      | Not Detected | Detected   | Not Detected |
| Positif<br>N=72  | E      | -             | -            | 61 (84.7%) | 11 (15.27%)  |
|                  | ORF1ab | -             | -            | 58 (80.5%) | 14 (19.4%)   |
|                  | N      | 72 (100%)     | 0 (%)        | -          | -            |
|                  | RdRp   | 72 (100%)     | 0 (%)        | -          | -            |
| Negatif<br>N=113 | E      | -             | -            | 3 (3%)     | 110 (97%)    |
|                  | ORF1ab | -             | -            | 1 (1%)     | 112 (99%)    |
|                  | N      | 21 (18.5%)    | 92 (81.5%)   | -          | -            |
|                  | RdRp   | 8 (7%)        | 105 (93%)    | -          | -            |

# Paramètres de comparaison des concordances entre les deux kits

| Paramètres                                | %      |
|---|--------|
| Sensibilité                               | 87.50% |
| Spécificité                               | 96.46% |
| Valeur prédictive positive (VPP)          | 94.02% |
| Valeur prédictive négative (NPV)          | 92.37% |
| Pourcentage de concordance positive (PCP) | 87.50% |
| Pourcentage de concordance négative (PCN) | 96.46% |
| Pourcentage de concordance global (PCG)   | 92.97% |
| Coefficient de Cohen                      | 0.809  |

# Données de la littérature

| Etudes                             | Nb  | Test de référence                              | Sensibilité | Spécificité |
|------------------------------------|-----|--|-------------|-------------|
| Domnich A, et al<br>2022; Italie   | 500 | Allplex<br>(Seegene, Seoul,<br>Korea)          | 100%        | 100 %       |
| Sin Youn Ham et al,<br>2022; Corée | 80  | STANDARD™ M<br>nCoV real-time<br>detection kit | 100%        | 100 %       |
| Colagrossi L et al<br>2022; Italie | 616 | XpertR Xpress<br>SARS-CoV-2                    | 96.5%       | 98.4%       |
| Présente étude 2022,<br>Tunisie    | 190 | Neoplex® COVID-<br>19 FAST                     | 87.6%       | 96.4%       |

# Avantages

- Bonnes performances: sensibilité ↑, spécificité ↑
- Facile à utiliser
- Rapide: les résultats obtenus en moins d'une heure (30 à 60 min) => Il peut donc être utilisé en cas d'urgence
- Automatisé et réalisé dans une seule cartouche => la contamination croisée est réduite
- Convient à une utilisation « Point of care »
- Configuration modulaire évolutive jusqu'à 8 modules

# Inconvénients

- Coût ?!
- Débit limité => **Non adapté aux séries et aux laboratoires travaillant à haut débit**
- Système fermé => **Utilisation obligatoire de cartouches fournies par le fournisseur**
- L'éluat ne peut être récupéré => **Difficultés de compléter par un séquençage**
- Sensibilité réduite dans les prélèvements à faible charge virale → Son utilisation peut poser des problèmes au stade précoce et tardif de l'infection

# EVALUATION DU STANDARD™ M10 MDR-TB DANS LE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE



# Introduction

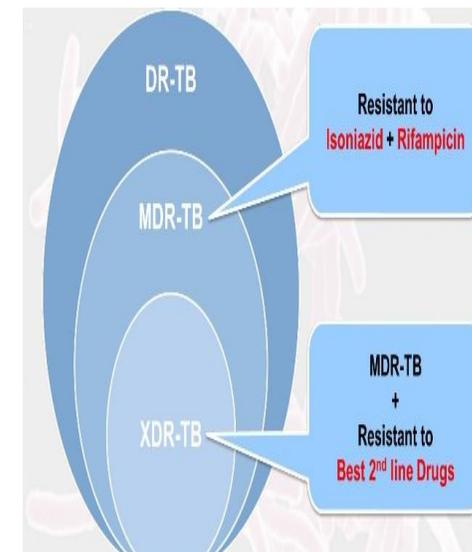
- La Tuberculose (TB) : un problème majeur de santé publique dans le monde: 10.6 millions de nouveaux cas, 1.6 million de décès en 2021 (OMS, 2022).

- Incidence de la TB en Tunisie: 36 cas/100 000 habitants en 2021(OMS, 2022)

- TB → complexe *M. tuberculosis* (CMT)  
- *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* → TB Chez l'Homme

- La coïnfection TB-VIH + Emergence des souches résistantes (**MDR** et XDR)  
→ aggraver la situation actuelle

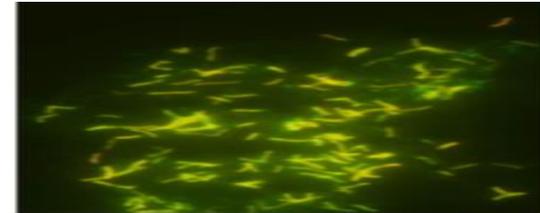
**Tunisie: 20 MDR /an**



# Diagnostic bactériologique de la tuberculose

- **Microscopie**

- Microscopie conventionnelle (ZN)
- Microscopie LED (Light-emitting diode) à Fluorescence (coloration à l'auramine)



➔ **Rapide, sensibilité réduite (5000/10000 bacilles/ml), ne différencie pas entre les mycobactéries et au CMT les mycobactéries non tuberculeuses**

- **Culture**

- Culture en milieu solide (LJ)
- Culture en milieu liquide commercialisé (MGIT 960)

➔ **Technique de référence, sensibilité ↑ (100 bacilles/ml), très lente (quelques semaines à 3 mois)**



# Diagnostic phénotypique de la tuberculose résistante

-Méthode des proportions en milieu solide (L.J)

Délai: **2 mois!!!**

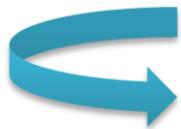
Coût: +

-Antibiogramme en milieu liquide  
MGIT 960 (Automate)

Méthode de référence (OMS)

Délai : 7 à 21 jours

Coût: ++++++



**Laboratoire de sécurité de type P3**



# Diagnostic moléculaire de la tuberculose

| Tests moléculaires  | Diagnostic de la TB | Diagnostic de la résistance   | Nbre d'étape |
|---|---------------------|-------------------------------|--------------|
| GeneXpert MTB/RIF, GeneXpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, USA)         | Oui                 | Oui : RIF                     | 1            |
| GeneXpert MTB/XDR (Cepheid, USA)                                  | -                   | Oui: INH, FQ, ATB injectables | 1            |
| LoopAMP TB (LAMP-TB) (Eiken)                                      | Oui                 | Non                           | 1            |
| Truenat ( Molbio , India), Truenat MTB plus<br>Truenat MTB-RIF Dx | Oui<br>-            | Non<br>Oui: RIF               | 2            |
| <b>Standard M 10 MDR-TB</b>                                       | <b>Oui</b>          | <b>OUI: RIF+INH</b>           | <b>1</b>     |
| RealTime MTB (Abbott Molecular)<br>RealTime MTB RIF/INH           | Oui<br>-            | Non<br>Oui: RIF, INH          | 2            |
| FluoroType® MTB( Bruker-Hain Diagnostics)<br>FluoroType MTBDR     | Oui<br>-            | Non<br>Oui: RIF+INH           | 2            |
| BD MAX™ MDR-TB (BD,USA)   | Oui                 | Oui: RIF+INH                  | 1            |
| Cobas® MTB assay<br>Cobas MTB RIF/INH assay                       | Oui<br>-            | Non<br>Oui: RIF+INH           | 2            |
| GenoType MTBDR <i>plus</i> V2                                     | -                   | Oui: RIF, INH                 |              |
| GenoType MTBDR <i>sl</i> V2                                       | -                   | Oui: FQ+ATB injectables       |              |

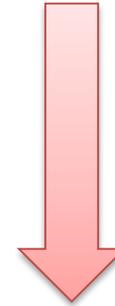
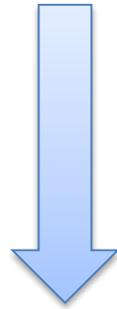
# Présentation du test M10 MDR-TB

- Cartouches : système fermé
- Extraction + amplification de l'ADN du CMT (PCR en temps réel)
- Détecte le Complexe *M. tuberculosis* (CMT) + la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide en une seule réaction (80min) directement à partir des prélèvements pulmonaires (Crachats) : non décontaminés ou décontaminés (culot)
- Détection du CMT  IS6110+IS1081 (↑ sensibilité)
- Rifampicine  la région hot spot du gène *rpoB*
- Isoniazide  codon 315 du gène *katG* + promoteur *inhA*

# Réalisation du test

Crachats non décontaminés  
V>0.4 mL

Crachats décontaminés: culots  
V> 0.4mL



**Prétraitement**  
**Réactif: Fluidifiant**

- Tampon phosphate /H2O2 0.067M  
Ratio 1/2
- Vortexer pendant 10S

Ratio 1/2  
Ratio 1/3 (si le PV est très visqueux)

Vortexer+ incubation 15 min  
à T° ambiante

Transférer 1.4 mL dans le filtre fixé au niveau de la cartouche



# Méthodologie

- **Réalisation de l'étude** : Prélèvements pulmonaires (Crachats)
- **Nombre de tests effectués** : 100 Cr: 100 patients
- **Période** : du 04-01-2023 au 24-04-2023.
- **Critères d'inclusion**:
  - Diagnostic de la TB:
    - Fortes suspicions de TB pulmonaire  
(Patients qui n'ont pas reçu un TT antituberculeux durant les 6 derniers mois)
  - Recherche de gènes de résistance:
    - Echec, interruption de traitement, rechute...
    - Patients déjà connus: avec une résistance confirmée à la RIF et ou l'INH (ATB classique ou techniques moléculaires) TTT < 31Jours

## Méthodologie (2)

- Microscopie: Coloration à l'auramine /ZN
- Techniques de référence:
  - Culture**: milieu solide+ liquide (en cours)
  - Antibiogramme** en milieu liquide MGIT 960 (en cours)
  - GenoType MTBDR*plus* + séquençage
- Diagnostic moléculaire: le GeneXpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, USA)

# Résultats préliminaires

## Comparaison Microscopie Versus M10 MDR-TB

| MICROSCOPIE | M10 MDR TB | Nbre     |
|-------------|------------|----------|
| +           | +          | 47 (47%) |
| -           | +          | 10 (10%) |
| -           | -          | 39 (39%) |
| +           | -          | 4 (4%)   |

## Résistances détectées par le test M10 MDR-TB

|     | Résistance indéterminée | sensible | résistant |
|-----|-------------------------|----------|-----------|
| RIF | 25 (43.85%)             | 27       | 5         |
| INH | 17 (28.8%)              | 33       | 7         |

RIF: Rifampicine, INH: Isoniazide

**2 MDR**

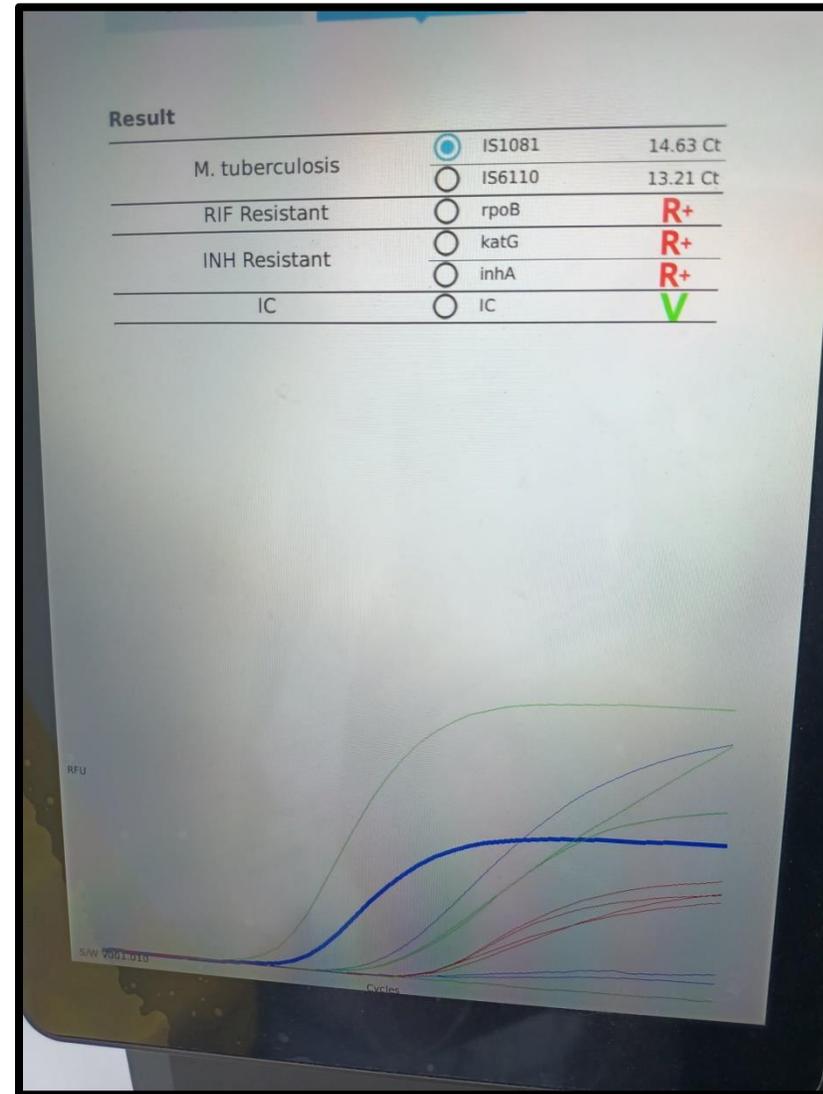
User admin

**Result**

|          |            |
|----------|------------|
| Pathogen | V IC Valid |
| MTB      | +          |
| RIF      | R+         |
| INH      | R+         |

\*MTB Positive  
RIF resistance detected  
INH resistance detected

Report



Détection d'un cas MDR par le test M10 MDR-TB

## Conclusions préliminaires

- 10 % des Pvts : Microscopie **négative** + M10 MDR-TB **positive** → à confirmer par la culture
- 4 Pvts avaient une Microscopie **positive** + test M10 MDR-TB **négatif** → des mycobactéries non tuberculeuses?!
- 0% d'erreurs et de tests invalides
- De nouveaux kits mis au point pour améliorer la détection des résistances et des MDR, Expertise en cours...

MERCI POUR VOTRE ATTENTION