

# Stratégie du Diagnostic virologique du SARS-CoV-2

---

## Groupe de travail

- Dr. Lamia Thabet
  - Dr. Selma Mhalla
  - Dr. Neila Hannachi
  - Dr. Héla Karray Hakim
  - Dr. Abdelhalim Trabelsi
  - Dr. Hamdi Dhaouadi
  - Dr. Safa Msselmani
- 

## Introduction

La nouvelle pandémie en cours, causée par le nouveau virus SARS-CoV-2, pose un vrai challenge aux laboratoires de biologie puisque la confirmation de l'infection repose sur le diagnostic virologique. La Tunisie, à l'instar du reste du monde, doit clarifier sa stratégie en matière de diagnostic virologique de l'atteinte par ce virus pour les différents acteurs intervenant dans la prise en charge des malades COVID-19.

Ce document fournit des directives pour diagnostiquer COVID-19 dans des échantillons biologiques humains. Certaines données de ce document pourraient être révisées ultérieurement, avec l'émergence de nouvelles données scientifiques concernant le diagnostic virologique et sur la base des recommandations des experts internationaux.

## 1- Indications du diagnostic virologique:

Les tests de diagnostic virologique présentent plusieurs indications (qui sont susceptibles d'évoluer) :

- confirmer l'infection chez toutes les personnes qui répondent à la définition du cas suspect
- proposer la levée de la quarantaine chez les cas confirmés
- réaliser un screening chez les personnes en contact avec un cas confirmé

- réaliser un diagnostic différentiel chez les personnes qui présentent une symptomatologie évocatrice de COVID notamment les personnes fragilisées.

## 2- Prélèvements :

La virémie étant transitoire et la charge virale dans les liquides biologiques étant faible, le diagnostic se fait actuellement à partir de prélèvements respiratoires hauts (naso-pharyngés ou de gorge) ou sur un prélèvement des voies respiratoires basses (crachats, LBA, aspiration trachéale) en cas d'atteinte parenchymateuse.

Le prélèvement doit se faire par un personnel de la santé parfaitement informé :

- des conditions de sécurité à respecter : il doit être équipé des moyens de protection individuelle (gants, masque FFP2, lunettes, surblouse, calot),
- de la procédure : écouvillonnage nasopharyngé +/- de la gorge par un écouvillon à embout dacron/polyester, les écouvillons classiques étant non adaptés au diagnostic par biologie moléculaire. Le prélèvement doit être acheminé dans le milieu de transport virologique (VTM) avec un triple emballage et adressé dans les plus brefs délais vers l'un des laboratoires autorisés à réaliser le diagnostic. En cas de retard, le prélèvement pourra être conservé à +4°C pendant 48h. La fiche de demande d'analyse virologique et la fiche signalétique du patient accompagnent chaque prélèvement.

## 3- Equipement :

Etant donné la nature des échantillons biologiques manipulés et la nécessité de biosécurité maximale, le diagnostic virologique ne peut être réalisé que dans les laboratoires spécialisés qui répondent à des conditions très strictes de sécurité et d'organisation, en l'occurrence **un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 (LSB2)**. Remarque : la culture du virus est non pratiquée pour le diagnostic de routine et doit se faire dans un LSB3 (réf SFM).

## 4- Méthodes diagnostiques :

Depuis le début de l'épidémie et partout dans le monde, le diagnostic repose sur la biologie moléculaire (extraction du génome viral suivie d'une amplification et révélation par RT-PCR en temps réel).

Cependant, de plus en plus de tests sont actuellement proposés dans le but d'identifier les foyers, d'élargir le dépistage et de suivre le traitement.

Il s'agit de tests rapides (15 à 20 minutes) permettant de détecter soit les anticorps anti-SARS-CoV-2 de type IgM et IgG, soit les antigènes viraux.

#### 4-1- La RT-PCR en temps réel :

Différents protocoles ont été proposés pour la détection de l'ARN viral par RT PCR en temps réel [1-8]. Ces protocoles diffèrent par les gènes viraux détectés (gène RdRP (gène RNAdependent RNA polymerase) dans la région du cadre de lecture ouvert ORF1ab, le gène E (gène de la protéine d'enveloppe) et le gène N (gène de la protéine nucléocapside). La sensibilité analytique des réactifs ciblant les gènes RdRP et E est plus élevée (limite technique de détection de 3,6 et 3,9 copies par réaction) que celle du gène N (8,3 copies par réaction).

La RT-PCR a l'avantage de la spécificité qui serait de 100% (il y aurait zéro faux positifs) et de passer de grandes séries en même temps mais demande entre 3 et 6h pour obtenir le résultat sans compter l'acheminement du prélèvement.

Cependant, cette technique **manque de sensibilité** (faux négatifs). Les résultats faussement négatifs sont en rapport avec une charge virale faible, la qualité et le moment du prélèvement (c'est le cas lors de la phase précoce de contamination puis lors de la phase de disparition des symptômes), la présence d'inhibiteurs de la PCR, mutation du virus ainsi que les conditions de transport.

Afin de faciliter et d'élargir le diagnostic, des kits commerciaux de RT PCR sont disponibles et qui sont plus faciles à utiliser car déjà optimisés et prêts à l'emploi. Cependant, ces kits doivent être évalués et certains ont été cités par l'OMS comme étant des tests qu'on peut utiliser en routine.

Afin de réduire le délai de réponse, d'autres techniques de PCR sont disponibles et permettent de raccourcir considérablement la durée de l'analyse ; il **s'agit des PCR automatisées en circuit clos (système de cartouche)** avec un résultat obtenu en moins d'une heure pour certains. C'est une technique qui présente une bonne spécificité et une sensibilité acceptable, qui est simple et qui peut facilement être réalisée dans les laboratoires qui ne disposent pas d'un grand débit de demandes à condition qu'ils soient LBS2.

Par ailleurs, la détermination de la charge virale (CV) par une technique quantitative ou semi quantitative pourrait orienter la prise en charge en préconisant l'instauration d'un traitement en cas de CV élevée (ref 9).

## 4-2-Tests rapides:

Afin d'élargir le diagnostic jusqu'au dépistage massif de la population, d'autres tests dits rapides sont proposés. Il s'agit principalement des tests sérologiques qui détectent les anticorps anti-SARS-Cov-2 ou des tests qui détectent les antigènes viraux. Ces techniques sont rapides, moins onéreuses que la RT-PCR, simples d'utilisation mais leur utilisation doit être rationnelle et répondre à des indications strictes pour les raisons suivantes :

- en raison de l'urgence, on assiste à la multiplication des tests proposés sans qu'il y ait des études scientifiques avec assez de recul pour évaluer leur sensibilité et spécificité.
- le délai de positivité de ces tests qui est de 7 jours en moyenne après le début des signes cliniques, même si les tests qui détectent les antigènes permettent de raccourcir de délai, ce dernier resté décalé par rapport à la RT PCR et la sensibilité moins bonne. Ces tests ne pourront donc pas être utilisés pour confirmer le diagnostic des cas probables et doivent être interprétés avec prudence afin d'éviter les faux négatifs.

**a- Les tests de détection d'antigènes viraux** se font sur *prélèvement nasopharyngé*.

C'est une méthode **rapide, peu coûteuse, précoce, simple** d'utilisation et ne nécessitant pas un personnel spécialisé. Cependant, étant donné la nature du prélèvement analysé, ces tests doivent être réalisés dans un laboratoire LSB2.

La plupart des tests rapides proposés sur le marché sont immuno-chromatographiques. Ils pourraient être intéressants pour le dépistage de masse ou les situations d'urgence: si le test revient positif, on pourrait ne pas continuer par une RT-PCR, vu le taux de spécificité. Par contre, si le test revient négatif on devrait continuer par une RT-PCR, vu le taux relativement bas de la sensibilité.

**b-Les tests sérologiques** se font sur prélèvement de sang. Ils détectent les anticorps spécifiques du SARS-CoV-2 de type IgM et IgG.

Ces tests ne sont pas des tests diagnostiques à proprement parler. D'abord, parce que les anticorps ne sont pas produits dès le début de l'infection, mais un peu plus tard (à partir respectivement du 5<sup>ème</sup> jour et du 10<sup>ème</sup> jour du début de la symptomatologie pour les IgM et les IgG) et on peut ainsi passer à côté de cas infectés tout récemment. Ensuite, parce qu'ils ne permettent pas de savoir si une personne est encore contagieuse, contrairement aux tests PCR qui révèlent également la quantité de virus dans l'échantillon.

Un résultat positif de ces tests prouve cependant qu'une personne a eu le virus, qu'elle ait eu des symptômes ou non.

Ces tests sont donc intéressants :

- lors des phases plus tardives de la maladie ou
- pour la recherche rétrospective de l'exposition au virus chez des porteurs sains ou

- en cas de négativité de la RT-PCR alors que l'on a une forte suspicion de COVID-19 ou après disparition de l'excrétion virale dans les sécrétions respiratoires.

- surtout pour des études épidémiologiques pour évaluer la proportion d'habitants qui a déjà été infectée. En effet, si cette proportion monte à 90%, on pourra considérer que la population est immunisée ce qui est très utile lors de la phase de déconfinement.

Ces tests retrouvent également leur utilité chez le personnel soignant, pour ainsi déterminer lesquels d'entre eux seraient immunisés et pourraient soigner les malades, sans risques de contamination. Ils auront aussi une grande utilité pour estimer l'ampleur de l'épidémie.

Ces tests sérologiques peuvent être réalisés sur sang total (par ponction veineuse ou au doigt), sérum ou plasma. Les échantillons de sérum et de plasma peuvent être conservés à 2-8 ° C pendant 3 jours maximum. Pour un stockage à long terme, les échantillons doivent être conservés en dessous de -20 ° C. Le sang total prélevé par ponction veineuse doit être conservé à 2-8 ° C et le test doit être effectué dans les 2 jours. Il ne faut surtout pas congeler les échantillons de sang total. Le sang total prélevé au bout du doigt doit être testé immédiatement.

## Stratégie diagnostique proposée

**Nous proposons comme stratégie diagnostique la démarche suivante :**

1-La RT-PCR sur prélèvements respiratoires reste le gold standard pour :

- confirmer les cas suspects en phase aigue dans les laboratoires autorisés.
- confirmer la guérison des malades par au moins 2 RT-PCR négatives successives faites à 2 jours d'intervalle
- contrôler éventuellement l'évolution des patients traités ou convalescents (idéalement avec quantification de la charge virale)

2-La RT-PCR pourrait être élargie à plusieurs laboratoires avec la PCR automatisée en circuit clos (système de cartouche) **à condition qu'ils soient LSB2.**

3-Vu le coût et les délais de réponse de la RT-PCR, on pourrait envisager d'utiliser le test de détection rapide des antigènes viraux en première intention : si le test est positif, on pourra retenir l'atteinte par SARS-Cov-2 ; mais si le test est négatif, il ne devra pas éliminer le diagnostic et sera complété par une RT-PCR.

Ce test antigénique pourrait être indiqué aussi bien pour le diagnostic des cas suspects que pour les populations à risques asymptomatiques pour identifier plus facilement les clusters.

4-Le test rapide sérologique servira aux enquêtes épidémiologiques pour le personnel de santé et une partie de la population asymptomatique

5-Il faut conserver tous les prélèvements positifs à  $-80^{\circ}\text{C}$  en vue de constituer une banque de virus pour une étude génotypique future à l'échelle internationale

## Références :

1. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. [https:// www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117](https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117) (Updated on March 19, 2020).
2. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem*. 2020 Jan 31. pii: hvaa029. doi: 10.1093/ clinchem/hvaa029. (Epub ahead of print).
3. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RTPCR. *Euro Surveill* 2020; 25: 2000045.
4. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. Diagnostic detection of novel coronavirus 2019 by real time RT-PCR. [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/conventional-rt-PCR-followed-by-sequencing-for-detection-of-ncov-rirl-nat-inst-health-t. pdf](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/conventional-rt-PCR-followed-by-sequencing-for-detection-of-ncov-rirl-nat-inst-health-t.pdf) (Updated on January 23, 2020).
5. Institut Pasteur. Protocol: real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-PCR-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteurparis.pdf> (Updated on March 2, 2020).
6. Centers for Disease Control and Prevention. Real-time RT-PCR panel for detection 2019-Novel Coronavirus. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-PCR-panel-for-detection-instructions.pdf> (Updated on February 4, 2020).
7. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020 Feb 7. doi: 10.1001/ jama.2020.1585. (Epub ahead of print).
8. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; 382:727-33.];
- 9- Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y, et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clinica Chimica Acta*. 2020 ; 505 :172-5.
- 10-Michael J. Loeffelholza and Yi-Wei Tang, Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections – the state of the art, *Emerging Microbes & Infections*, 2020
- 11- Bo Diao, Kun Wen, Jian Chen, Yueping Liu, Zilin Yuan ,Chao Han et al., Diagnosis of Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection by Detection of Nucleocapsid Protein, medRxiv, 2020
- 12-[https://www.corisbio.com/pdf/Products/SARS-COVID-19\\_20200326\\_3.pdf](https://www.corisbio.com/pdf/Products/SARS-COVID-19_20200326_3.pdf)
- 13-Bicheng Zhang\* , Xiaoyang Zhou\* , Chengliang Zhu\* , Fan Feng, Yanru Qiu, Jia Feng et al., Immune phenotyping based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19, medRxiv, 2020.