



**STPI**  
Société Tunisienne  
de Pathologie Infectieuse

# **Diagnostic virologique du SARS-CoV-2: quelle démarche en Tunisie**

**Dr Salma MHALLA**

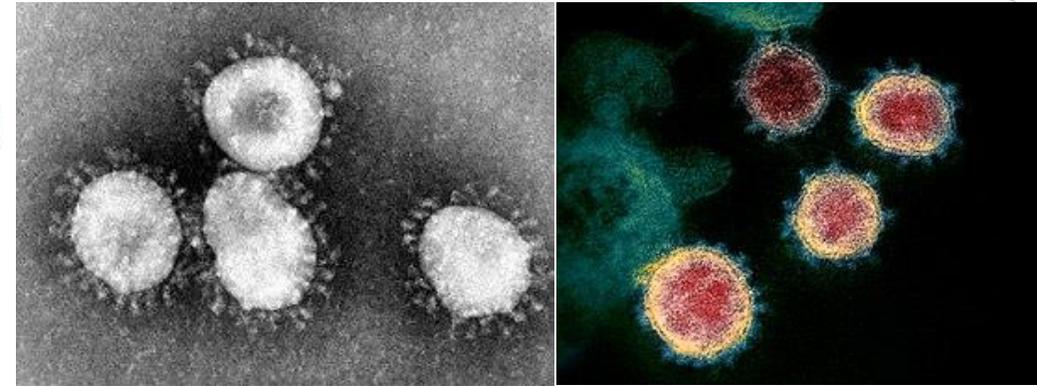
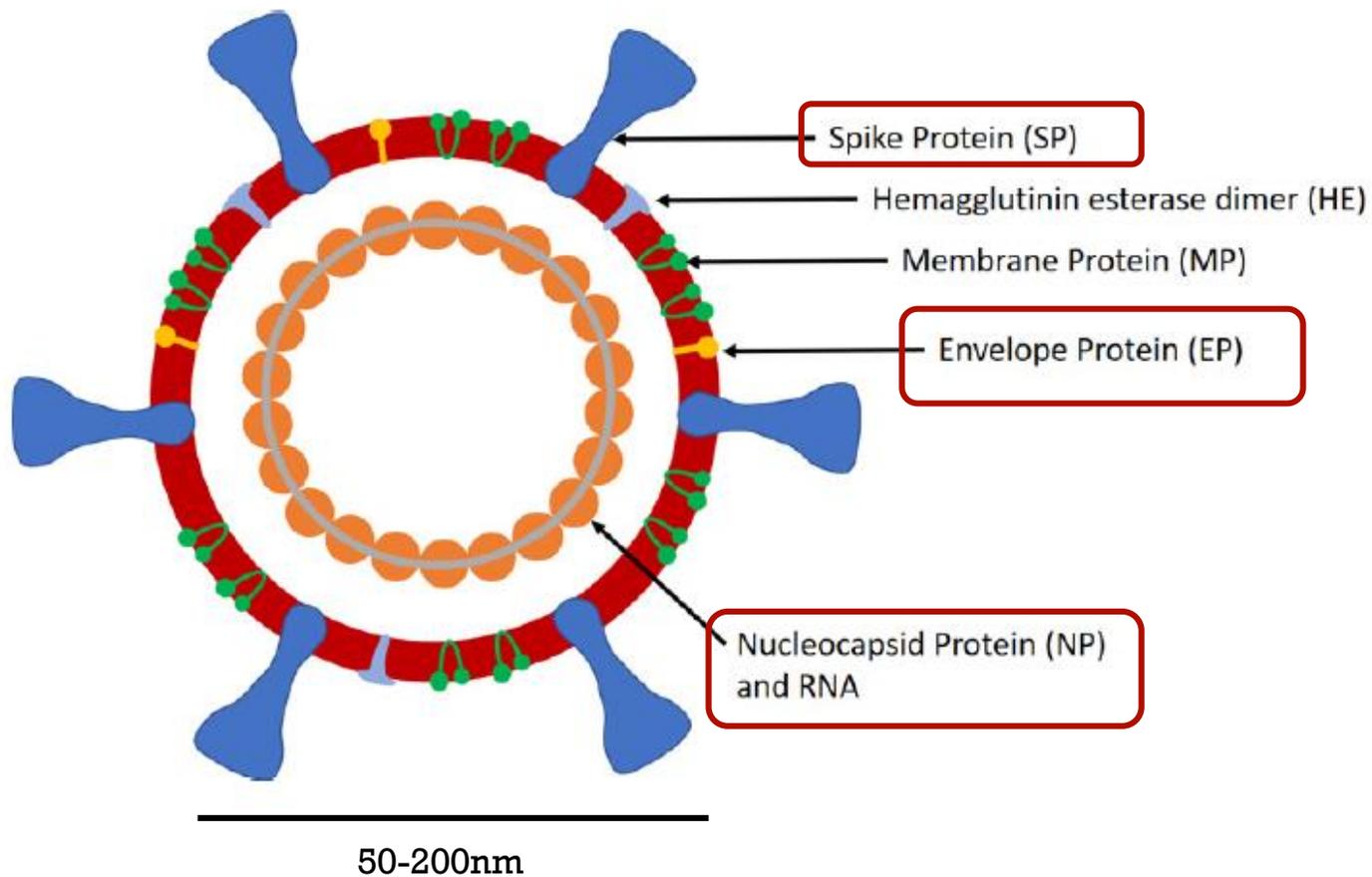
Professeur Agrégé en Microbiologie Hopital Fattouma Bourguiba de Monastir

Société Tunisienne de Pathologies Infectieuses

Collège de Maladies Infectieuses, Microbiologie, Parasitologie et Mycologie

# Généralités

- **Coronavirus: zoonose,**
- **7 virus connus pathogènes pour l'homme :**
  - **4 bénins, agents du rhume: 229-E, OC43, HKU1, NL63**
  - **3 hautement pathogènes: SARS-CoV-1, le MERS CoV et le SARS-CoV-2**



 **diagnostics**

Editorial

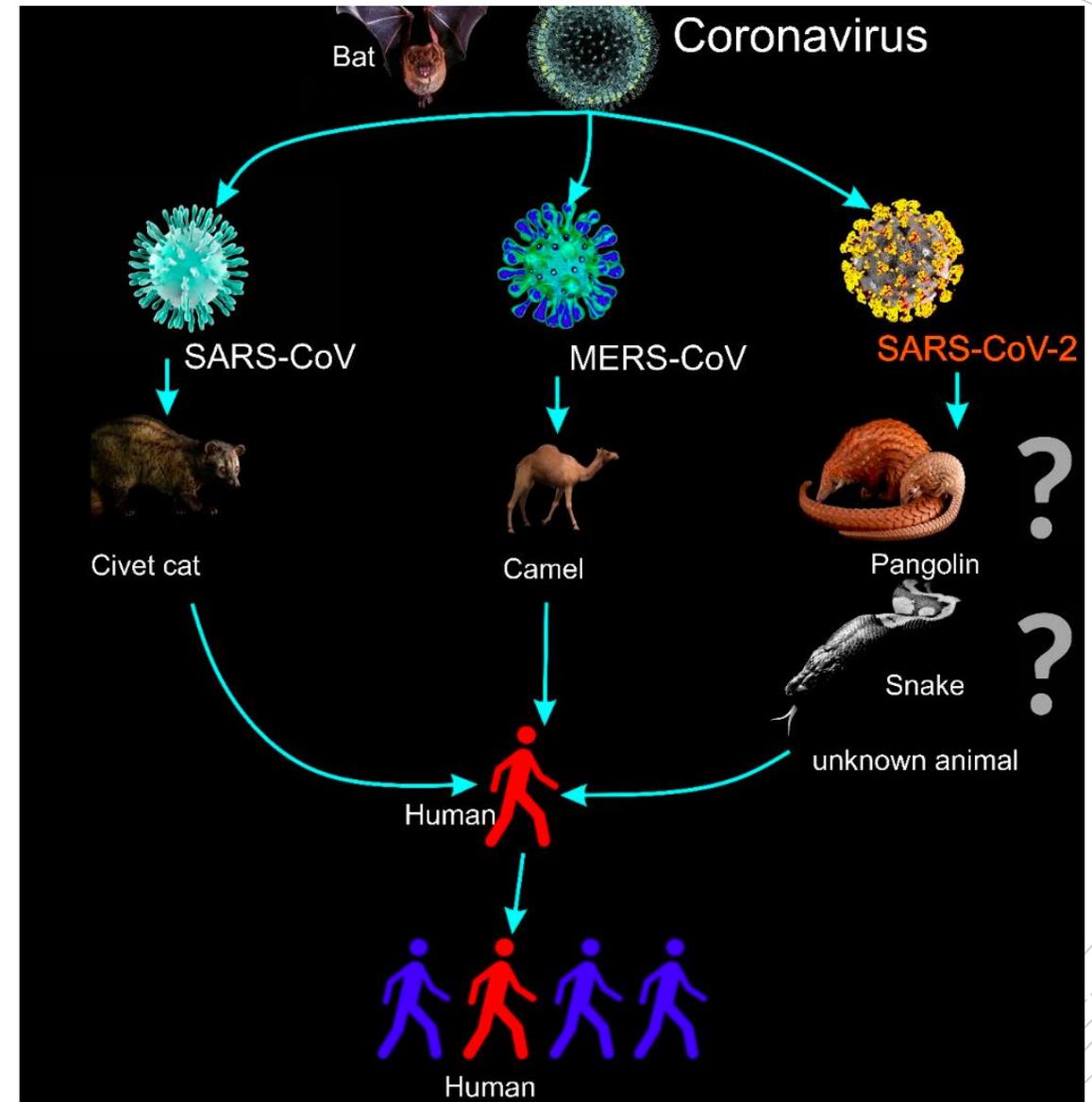
**In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends**

- Enveloppe, ARN,
- Le récepteur cellulaire serait l'**ACE2**; protéine présente sur des cellules épithéliales alvéolaires AT2 du poumon, entérocytes, cellules du rein
- Affinité importante pour les ACE2 pulmonaire

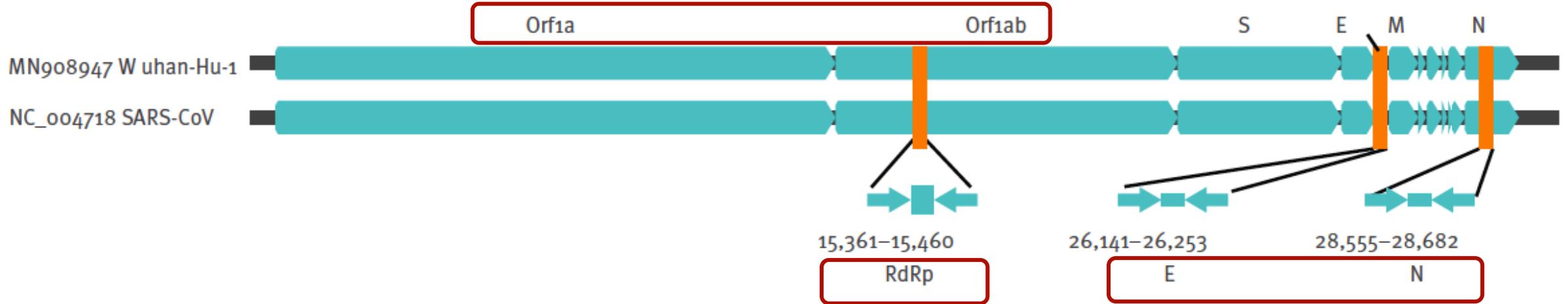
- Séquençage complet du génome: 30.000 nucléotides
- Nouveau betacoronavirus, sous genre: sarvecovirus
- Semblable à 82 % avec celui de SARS-CoV-1
- Origine coronavirus de chauves-souris

Lu and coll  
The Lancet

- Franchissement barrière espèce avec succession d'événements rares
- ➔ 75% des maladies émergentes (ESB, grippe aviaire, MERS-CoV, SARS-CoV...)



■ Gènes ciblés par la RT-PCR: N, E et RdRP



E: envelope protein gene; M: membrane protein gene; N: nucleocapsid protein gene; ORF: open reading frame; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase gene; S: spike protein gene.

Numbers below amplicons are genome positions according to SARS-CoV, GenBank NC\_004718.

# Virulence

Les caractéristiques d'un virus dangereux :

- transmission respiratoire
- taux de reproduction de base ( $R_0$ )  $> 2$  ;
- taux de mortalité supérieur à  $1/1000$  ;
- temps de génération inférieure à 3 jours ;
- **contagion avant l'apparition des symptômes.**

## SARS-CoV-2

- **Oui**
- **$>2$**
- **$>1/1000$**
- **$> 3j$**
- **Oui**

# **Diagnostic virologique**

- **Confirmation du diagnostic du CoVID-19**
- **Situation d'urgence**
- **Bonnes pratiques du laboratoire**

## **Indications :**

- **Confirmer l'infection chez toutes les personnes qui répondent à la définition du cas suspect**
- **Faire le screening autour des cas confirmés**
- **Suivre des malades confirmés convalescents avec/ou sans traitement**
- **Confirmer la guérison des malades positifs**
- **Réaliser un diagnostic différentiel surtout si signes atypiques/de gravités.**

# Phase préanalytique

## Le prélèvement

- Détermine 90% de la fiabilité du diagnostic virologique
- **Où prélever?**

Virémie transitoire

Prélèvement respiratoires hauts (naso-pharyngés ou de gorge): début  
prélèvement des voies respiratoires basses (crachats, lavage broncho-  
alvéolaire, aspiration trachéale) : atteinte parenchymateuse

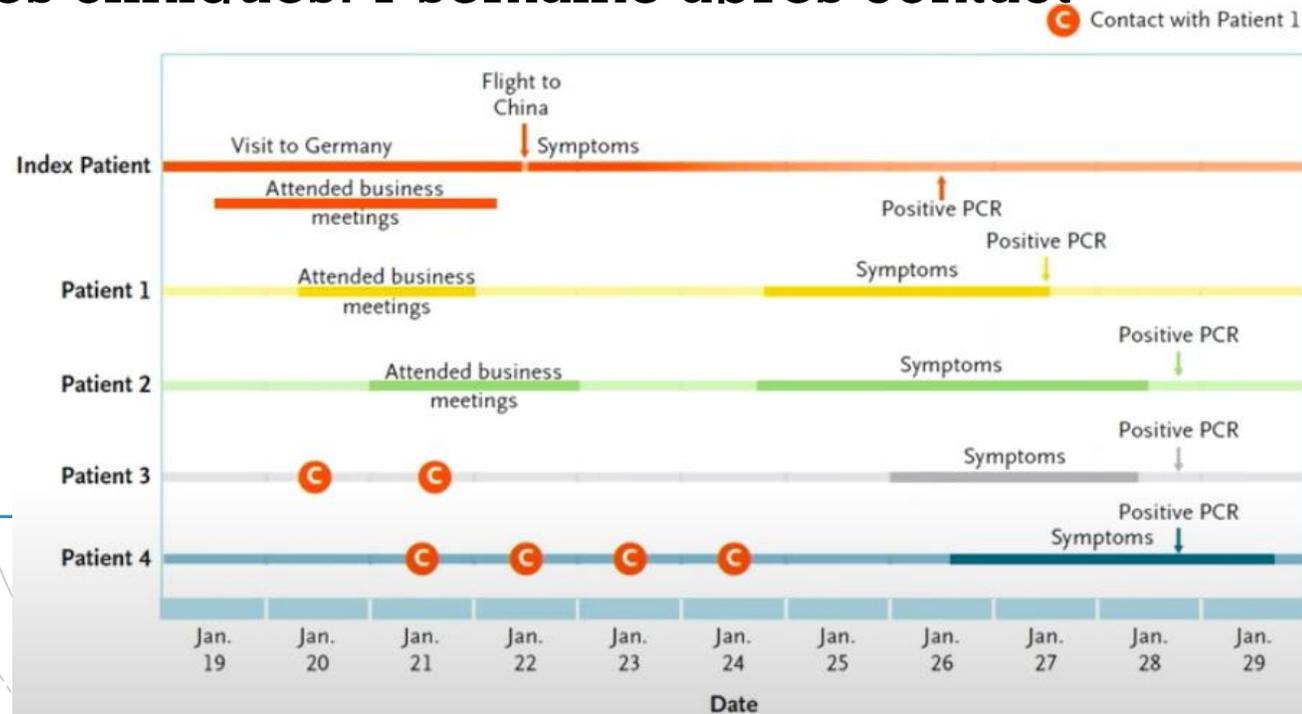
# Le prélèvement

## ■ Quand prélever?

Timing idéal non encore connu

Patient peut être contagieux même avant les signes cliniques

Absence signes cliniques: 1 semaine après contact



# Le prélèvement

- Qui prélève ?
- Personnel habilité
- Respect des condition de sécurité (EPI)
- respect de la procédure

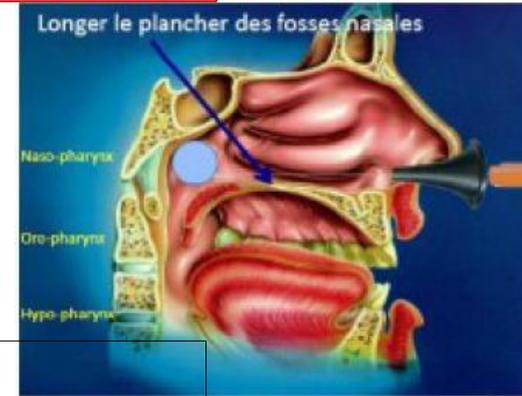
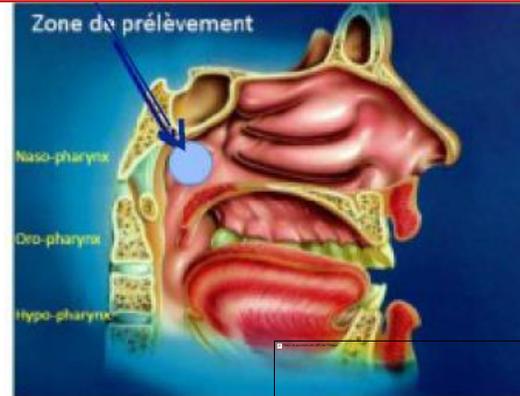


Ministère de la Santé	PROCEDURE DE REALISATION ET DE TRANSPORT D'UN PRELEVEMENT NASOPHARYNGE POUR LA DETECTION MOLECULAIRE DU SARS-CoV-2	Volet : Rôle du laboratoire
2P2R « SARS-CoV-2 »		
<b>OBJET</b>		
Cette procédure décrit les modalités de réalisation et de transport d'un prélèvement nasopharyngé pour la détection moléculaire du nouveau coronavirus « SARS-CoV-2 ».		
<b>DOMAINE D'APPLICATION</b>		
Tout patient répondant à la définition de cas suspect <sup>3</sup> , les contacts étroits d'un cas confirmé, les clusters de cas d'infection respiratoire aiguë et les cas de syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) sévère		
<b>RESPONSABILITES</b>		
Le prélèvement doit être réalisé par un médecin ou par un autre professionnel de santé formé sur les techniques de prélèvement et de l'utilisation des équipements de protection individuelle (EPI).		
<b>MATERIEL</b>		
<ul style="list-style-type: none"><li>- Fiche de demande d'analyse virologique (pièce jointe)</li><li>- Solution hydro-alcoolique</li><li>- Milieu de transport virologique (type VTM pour Viral Transport Medium) muni d'un écouvillon flexible stérile (vérifier la date d'expiration), fourni par le ShocRoom du ministère de la santé.</li><li>- Equipement de protection individuelle (EPI) : blouse à usage unique, masque type FFP2, gants à usage unique, lunettes de protection.</li><li>- Glacière avec brique de glace pour le transport</li><li>- Equipements : réfrigérateur +4°C si le transport est différé</li></ul>		
<b>Protocole</b>		
<ul style="list-style-type: none"><li>- Remplir soigneusement la fiche de demande d'analyse virologique ;</li><li>- Étiqueter correctement le tube VTM, en indiquant le nom et le prénom du patient ;</li><li>- Prendre le temps de se laver les mains ou à défaut appliquer une solution hydro-alcoolique sur des mains propres et porter l'équipement de protection individuelle nécessaire ;</li><li>- Placer confortablement le patient en position assise, dos contre le dossier du siège ;</li><li>- Rassurer le patient, placer l'écouvillon sur sa joue et y marquer la distance (d) allant de la base du nez jusqu'au lobe de l'oreille homolatérale ;</li><li>- Marquer sur l'écouvillon la moitié de la distance mesurée (d/2) ;</li><li>- Incliner la tête du patient en arrière et soulever la pointe du nez pour dégager l'orifice du nez ;</li><li>- Tenir l'écouvillon par l'extrémité distale de la tige entre le pouce, l'index et le majeur (comme un stylo) et l'insérer au niveau d'une narine, perpendiculairement au plan de la face, jusqu'à la zone marquée ;</li><li>- Tourner la tige à droite et à gauche plusieurs fois pour recueillir le maximum de cellules infectées ;</li><li>- Plonger l'écouvillon dans le tube VTM en tenant la tige de l'écouvillon à proximité de l'extrémité supérieure du tube ;</li><li>- Casser la tige en laissant le bout de l'écouvillon plongé dans le liquide, puis bien fermer le tube ;</li><li>- En attendant son transport au laboratoire de Microbiologie de l'hôpital de Charles Nicolle de Tunis, garder le tube au réfrigérateur à +4°C.</li></ul>		
<b>Transport du prélèvement</b>		
<ul style="list-style-type: none"><li>- Transporter le tube VTM, dans les plus brefs délais, dans une glacière (+4°C) ;</li><li>- Le transport doit être soumis à la réglementation sanitaire internationale concernant le transport des substances infectieuses. Il est donc impératif d'utiliser un système de triple emballage ++, comprenant :<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Le tube VTM (récipient primaire) ;</li><li>▪ Une boîte secondaire étanche, résistante aux chocs, avec un matériau absorbant en quantité suffisante, dans laquelle est inséré le tube VTM ;</li><li>▪ Un emballage tertiaire (sac zippé à double compartiment comportant l'étiquetage réglementaire obligatoire) : Le tube VTM placé dans la boîte étanche doit être placé dans le compartiment à zippe du sac ; la fiche de demande virologique doit être placée dans l'autre compartiment</li><li>▪ L'identification du patient doit être également marquée sur l'emballage externe</li><li>▪ Il est nécessaire d'informer à l'avance le laboratoire de l'arrivée de l'échantillon.</li></ul></li></ul>		

<sup>3</sup> Selon la définition officielle du ministère de la santé

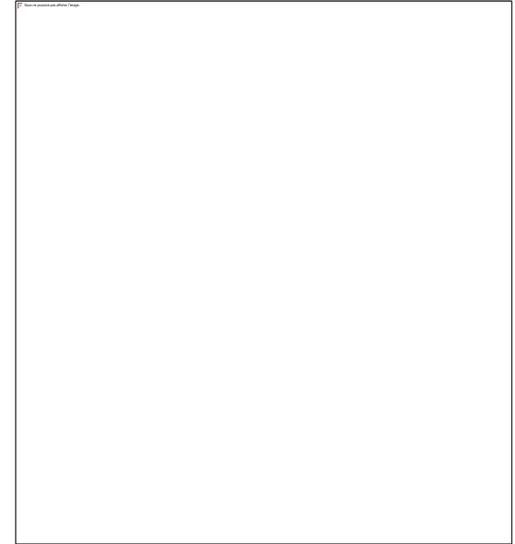
# Comment prélever ?

## Écouvillonnage naso-pharyngée

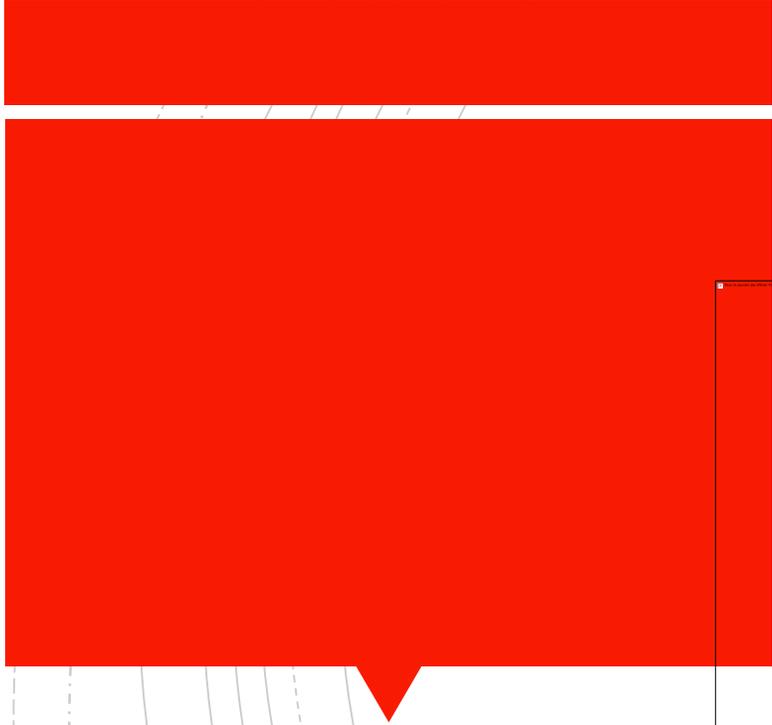


- L'écouvillon doit être gardé en place pendant quelques secondes.
- L'écouvillon doit être retiré lentement en le pivotant légèrement.
- L'extrémité de l'écouvillon doit être placée dans un flacon contenant un milieu de transport viral, et ensuite la tige de l'applicateur doit être brisée.

- Acheminement rapide à +4°C (éviter les pneumatiques)
- Renseignements cliniques++
- Triple emballage si virus hautement pathogène
- On peut les garder dans ce milieu :
  - À au réfrigérateur 2j,
  - À – 70°C si retard de transfert



# **Laboratoire de sécurité biologique niveau 2**



# Phase analytique et post-analytique

## La RT-PCR

- Est le gold standard (avec séquençage)
- Plusieurs protocoles: cible 1-3 gènes
- Extraction – ARN – rétrotranscription en ADN – Amplification et détection en temps réel

## **RT-PCR: avantages et limites**

### **Avantages**

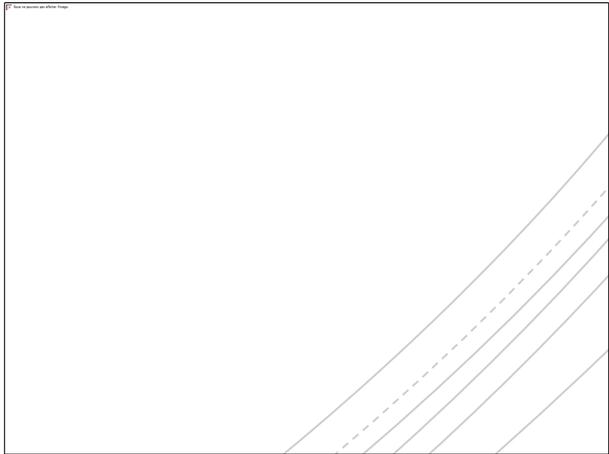
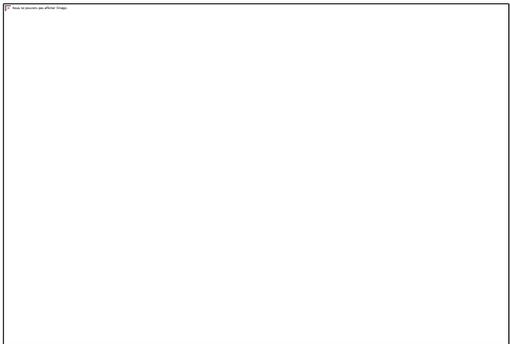
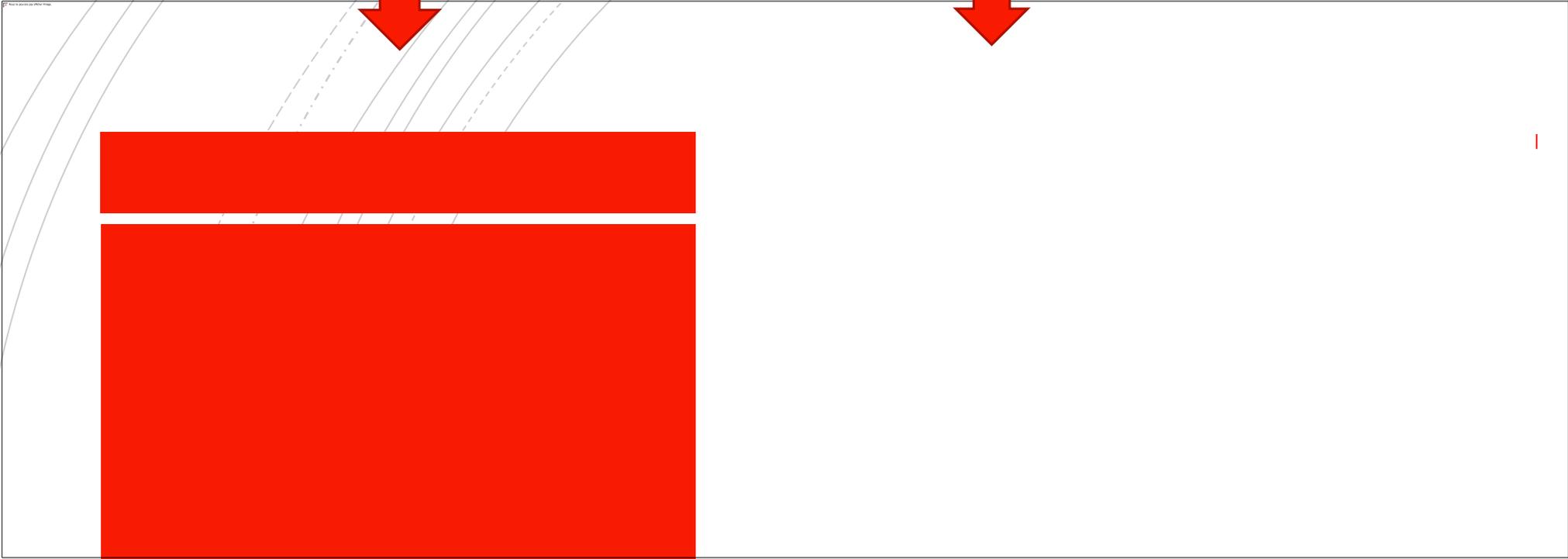
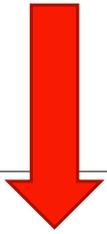
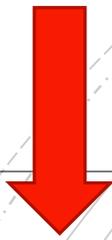
- Spécificité ~100%
- Sensibilité 100-400copies/mL selon les Kits
- Grandes séries
- Automatisable
- Peut être quantitative (pronostic et suivi ttt)
- Renseigne sur la contagiosité du patient
- Confirme guérison (2 à 48h)

### **Limites**

- Laborieuse
- Délai long (6-24h selon les séries)
- Infrastructures: biosécurité (LSB2)
- Interprétation délicate des gènes

# RT-PCR: faux négatifs

Causes	Solutions
une charge virale faible	Refaire, changer de site TDM
une mauvaise qualité du prélèvement (prélèvement pauvre en cellules),	refaire, changer de site
Un moment inapproprié du prélèvement (trop précoce ou trop tardif),	Refaire TDM
la présence d'inhibiteurs de la PCR (sang, virucides, héparine...),	Refaire
des conditions inadéquates d'acheminement du prélèvement	Respecter la procédure



# Phase analytique et post-analytique

## Autres tests

- **Directs:** culture pas en routine (LBS3)  
détection des antigènes sur prélèvements respiratoires: TROD
- **Indirects:** détection des anticorps spécifiques dans le sang: IE ou TROD: IgG/M
- Rapides, faciles mais....

## Phase analytique et post-analytique

### Détection des antigènes:

- **Se positivent à la phase aigue** mais:
  - Sensibilité moyenne (34-80%) selon les firmes : (faux négatifs)
  - Spécificité bonne : mais réactions croisées (faux positifs)
- ➔ sont encore en cours de validation



## **Phase analytique et post-analytique**

### **Détection des anticorps:**

- **Se positivent à la phase tardive (10-20j)**
- risque de faux négatifs (fenêtre sérologique)
- Utilité en rétrospectif : études épidémiologiques
- Manque de spécificité : Possibles réactions croisées (faux positifs)
- Pas d'idée sur la contagiosité
- Est ce que les IgG sont protectrices ??

## Quelle stratégie actuellement ?

### ■ En phase aigue:

- **RT-PCR ++**: confirmation diagnostique, suivi, guérison
- Utiliser les PCR rapides dans les laboratoires équipés
- Si développement de tests rapides avec meilleures sensibilité et spécificité
  - ➔ détection des antigènes pour le diagnostic en urgence
    - si positifs ➔ diagnostic
    - Si négatifs ➔ faire RT-PCR
- Tests sérologiques peuvent être utiles en cas de forte suspicion clinique ou radiologique avec RT-PCR négatives (résultat négatif ➔ refaire)

## Quelle stratégie actuellement ?

- **En phase tardive :**

- détection des anticorps pour enquêtes épidémiologiques rétrospectives
- dépistage la population dans les zones à forte diffusion

A red speech bubble with a white outline and a small tail pointing downwards. The word "Merci" is written in white, sans-serif font in the center of the bubble. The background features faint, curved lines in the corners.

Merci