



Stratégie du Diagnostic virologique du SARS-CoV-2

Groupe de travail

- | | | |
|-------------------------|-------------------------|------|
| - Dr. Lamia Thabet | Médecin microbiologiste | STPI |
| - Dr. Salma Mhalla | Médecin virologue | STPI |
| - Dr. Neila Hannachi | Médecin virologue | STPI |
| - Dr Habiba Nijaa | Médecin virologue | STPI |
| - Dr. Héla Karray Hakim | Médecin Virologue | STPI |
-

Introduction

Depuis le passage de l'épidémie de COVID-19 au stade trois en Tunisie, il devient impératif d'adapter la stratégie du diagnostic virologique adoptée par différents acteurs intervenant dans la prise en charge des malades.

Ce document fournit les indications et la démarche du diagnostic virologique du SARS-CoV-2. Ce document est assujéti à d'éventuelles révisions en cas d'émergence de nouvelles données scientifiques ou des recommandations des experts internationaux.

Actuellement, la recherche du génome viral par RT-PCR dans les prélèvements respiratoires reste la technique de choix pour confirmer le diagnostic d'une infection aigue par le SARS-CoV-2. Elle se fait obligatoirement dans un laboratoire de niveau 2 de sécurité biologique. Elle peut néanmoins manquer de sensibilité notamment à la phase avancée de l'infection et dépend étroitement de la qualité du prélèvement. La détection des antigènes du virus sur les prélèvements respiratoires est une technique rapide et simple d'utilisation, cependant elle manque de spécificité mais surtout de sensibilité. La

détection des anticorps spécifiques anti SARS-CoV-2 a un intérêt diagnostique dans la phase tardive de la maladie et présente également un intérêt épidémiologique.

1- Prélèvements:

La virémie étant transitoire et la charge virale dans les liquides biologiques étant faible, le diagnostic se fait préférentiellement à partir de prélèvements respiratoires hauts (naso et/ou oropharyngés). Actuellement plusieurs sociétés savantes avancent l'apport du prélèvement salivaire, cependant, une meilleure sensibilité a été démontrée pour le prélèvement nasopharyngés quand il est bien conduit. Un prélèvement peut être réalisé au niveau des voies respiratoires basses notamment en cas d'atteinte du parenchyme pulmonaire (crachats, lavage broncho-alvéolaire, aspiration trachéale). Le prélèvement de selles peut également être envisagé à partir de la deuxième semaine du début des signes cliniques, cependant la décharge virale est inconstante et ce prélèvement n'est pas préconisé pour le diagnostic de routine. En post mortem, pourront être réalisés un prélèvement respiratoire ou un fragment de tissu pulmonaire.

1-1- Prélèvements respiratoires : doit se faire par un personnel de la santé formé, dans un espace isolé, avec respect des conditions de sécurité (port des moyens de protection individuelle) et de la procédure. On procédera au recueil par écouvillonnage nasopharyngé ± oropharyngé, en utilisant un écouvillon à embout dacron/polyester, les écouvillons en bois étant non adaptés au diagnostic par biologie moléculaire. La procédure est la suivante :

- introduire l'écouvillon dans la narine parallèlement au plan du plancher buccal jusqu'au nasopharynx,
- le maintenir sur place pendant 5-10 secondes, effectuer des rotations afin de prélever le maximum de cellules, puis le retirer.
- pour augmenter la sensibilité, on peut procéder au prélèvement concomitant de l'oropharynx, dans ce cas-là on réutilise le même écouvillon.
- Décharger l'écouvillon dans le milieu de transport virologique (VTM) dans lequel on coupe le bout distal et refermer le tube.
- Une aspiration nasopharyngée peut être réalisée notamment chez les enfants

Le prélèvement doit être acheminé avec un triple emballage et adressé dans les plus brefs délais vers l'un des laboratoires autorisés à réaliser le diagnostic. En cas d'empêchement, le prélèvement pourra être gardé entre 2-8°C pendant un maximum de 12j (2j s'il s'agit de prélèvements respiratoires bas et 24h en cas de biopsie), sinon il sera conservé à -70°C. La fiche de demande d'analyse virologique et la fiche de renseignements relatives au patient accompagnent chaque prélèvement.

1-2- Prélèvement sanguin : destiné aux études sérologiques peut être réalisé sur du sang total (par ponction veineuse ou au doigt) idéalement sur deux prélèvements ; l'un fait dès le début des signes cliniques et l'autre lors de la période de convalescence (après 2-4 semaines) afin de rechercher une éventuelle séroconversion.

Le sérum tout comme les prélèvements de selles peuvent être conservés à 2-8°C pendant 5 jours maximum. Pour un stockage à long terme, les échantillons doivent être

conservés en dessous de -70°C. Le sang capillaire prélevé au bout du doigt doit être testé immédiatement.

1-3- Prélèvement salivaire : ces prélèvements sont actuellement de plus en plus discutés notamment pour les personnes qui tolèrent mal le prélèvement naso-pharyngé et en vue de généraliser le dépistage par autotest. Globalement, ces derniers arborent une spécificité supérieure à 95%, mais la sensibilité reste inférieure à celle obtenue avec un prélèvement naso-pharyngé.

2- Équipement et Sécurité au laboratoire :

Etant donné la nature des échantillons biologiques manipulés et la nécessité d'une biosécurité maximale, le diagnostic virologique ne peut être réalisé que dans les laboratoires spécialisés qui répondent à des conditions strictes de sécurité et d'organisation. Les mesures de protection doivent être déterminées en fonction de l'évaluation du risque. Toute analyse de prélèvements hautement à risque tels que les prélèvements respiratoires, qu'ils soient destinés à l'analyse par biologie moléculaire ou à la détection des antigènes viraux doit être faite dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 (LSB2). La culture virale, qui est non pratiquée pour le diagnostic de routine, est réalisée obligatoirement dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (LSB3)

Tous les déchets de laboratoire doivent être gérés par le laboratoires lui-même ou par un organisme habilité à le faire.

3- Méthodes diagnostiques:

3-1- La RT-PCR en temps réel:

Le diagnostic de référence de l'infection à SARS-CoV-2 demeure la RT-PCR par technique de PCR en temps réel (RT-PCR).

Différents protocoles ont été proposés pour la détection de l'ARN viral par technique RT-PCR en temps réel. Ces protocoles diffèrent par les gènes viraux détectés (gène RdRP (gène RNA dépendent RNA polymérase) 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).

Selon l'OMS, un diagnostic optimal devrait être réalisé avec des tests détectant au moins deux cibles indépendantes du génome du SRAS-CoV-2, cependant, dans les régions à forte transmission du SRAS-CoV-2, un algorithme simple pourrait être adopté avec une seule cible. Dans ce dernier cas, l'OMS recommande de mettre en place une stratégie pour surveiller les mutations susceptibles d'affecter les performances du test. Par ailleurs, en l'absence de la circulation connue du SRAS-CoV-1 dans le monde, il est possible d'utiliser une séquence spécifique du sous-genre *sarbecovirus*. La FDA (Food and Drug Administration) estime qu'un test SARS-CoV-2 correctement validé détectant une cible virale unique pourrait fournir des performances acceptables.

Des techniques de RT-PCR « maisons » ont été développées depuis le démarrage de l'épidémie et elles ont été validées dans plusieurs laboratoires spécialisés. Depuis, des

kits commerciaux ont été développés et plusieurs ont été validés par les organismes internationaux (IVD, CE, FDA...) et ont eu la permission d'être utilisés dans un contexte d'urgence (FDA-Emergency Use Only). L'interprétation des résultats doit tenir compte des instructions d'utilisation du fabricant. Ces kits se basent le plus souvent sur des étapes séparées d'extraction du génome viral, d'amplification et de révélation par RT-PCR en temps réel. Certains systèmes de RT-PCR sont disponibles et intègrent ces étapes en une seule totalement automatisée, en circuit clos (système de cartouche par exemple). Ces RT-PCR rapides permettent de raccourcir considérablement la durée de l'analyse avec un résultat pouvant être obtenu en moins d'une heure, toutefois ils ne sont pas adaptés à un débit élevé de prélèvements. D'autres systèmes de détection génomique sont en cours d'évaluation, certains se basent sur l'amplification du génome directement sur le prélèvement respiratoire, sans passer par l'étape d'extraction de l'ARN viral ; mais ces techniques présentent plusieurs limites et notamment le manque de sensibilité.

Les critères de choix du kit doivent se baser sur la disponibilité des équipements et sur la validité sur les automates. Le choix doit également tenir compte des sensibilités et spécificités analytiques du kit. La sensibilité analytique ou limite de détection (LOD) pour un test moléculaire ayant eu l'autorisation EUA (Emergency Use Authorization) devrait varier entre 50 et 1000 copies / mL ; en pratique plusieurs tests disponibles ont des sensibilités de moins de 500 copies/mL.

La sensibilité clinique des RT-PCR est autour de 90%. Plusieurs facteurs interviennent et peuvent expliquer un résultat négatif chez une personne infectée, notamment:

- Prélèvement mal réalisé ou de qualité défectueuse (importance de réaliser un prélèvement riche en cellules).
- Type du prélèvement respiratoire (charge virale variable, pouvant être plus élevée dans les voies aériennes supérieures qu'au niveau des voies aériennes basses)
- Conditions de conservations et de transports inadéquates
- Date du prélèvement trop précoce ou trop tardive par rapport au contagement ou à l'apparition des symptômes
- Raisons techniques, par exemple : inhibition de la PCR, sensibilité analytique du test insuffisante, mutations virales...

La spécificité approche les 100%, elle est liée à l'absence démontrée de réactions croisées avec les autres coronavirus ou avec les autres virus respiratoires. Des pratiques rigoureuses dans les techniques de prélèvement et de biologie moléculaire sont strictement nécessaires pour éliminer les risques de contamination.

Ainsi la présence d'un test positif confirme le diagnostic mais la négativité du test ne l'élimine pas. Des fluctuations entre résultats positifs et négatifs sont également possibles. Il peut être utile de refaire un test sur un autre prélèvement devant une PCR négative en présence d'un contexte clinique suspect, ou bien lorsqu'il y a un résultat non concluant (douteux) ou une inhibition de la PCR.

Par ailleurs, la guérison et la contagiosité ne doivent pas être corrélées à la négativation des PCR. La détection d'ARN viral peut être observée au-delà du 30^{ième} jour sans que le virus ne soit infectieux, la transmission n'a été documentée que très exceptionnellement au-delà du 8^{ème} jour d'infection de cas identifiés, (sauf situation particulière comme l'immunodépression). La culture cellulaire serait plus indicatrice d'infectiosité du virus que la RT PCR.

3-2 Les tests rapides d'orientation diagnostic (TROD)

Afin d'élargir le diagnostic jusqu'au dépistage large 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 et laborieuses que la RT-PCR, mais leur utilisation doit répondre à des indications précises et strictes avec une interprétation prudente.

a- Les tests de détection d'antigènes viraux (TROD- Ag):

Il s'agit de méthodes de diagnostic direct permettant de rechercher les antigènes de SARS-COV-2 sur un prélèvement respiratoire et doivent être réalisés dans un laboratoire LSB2 en respectant les normes de biosécurité. La plupart des TROD-Ag proposés sur le marché reposent sur des techniques immuno-chromatographiques. C'est une méthode rapide (résultat en 10 à 15 min), peu coûteuse, simple d'utilisation, et offrant la possibilité d'élargir l'accès aux tests et de réduire les retards de diagnostic. Cependant, la sensibilité de ces tests est très variable (de 0 à 94%) et dépend de la charge virale qui se positive avant la déclaration de la maladie et augmente progressivement pour atteindre son maximum dans les 5-7 jours suivant le début des signes cliniques. De plus ces tests pourraient donner des résultats faussement positifs en reconnaissant les antigènes de coronavirus autres que le SARS-CoV-2. Selon l'OMS, l'utilisation des TROD-Ag peut être envisagée dans les pays ou les zones qui connaissent une transmission communautaire généralisée, où les laboratoires de diagnostic peuvent être surchargés et où il n'est plus possible de tester les cas suspects par RT-PCR à condition de bien choisir le TROD-Ag (sensibilité $\geq 80\%$ et spécificité $\geq 97\%$ par rapport à la RT-PCR). Dans ces circonstances, et vue le contexte épidémiologique, si le test est positif, le diagnostic d'infection par le SARS-COV-2 est retenu. Par contre, si le test est négatif on devrait continuer par une RT-PCR, vu le taux relativement bas de la sensibilité.

b- Les tests sérologiques de détections des anticorps :

Ils détectent les anticorps spécifiques du SARS-CoV-2 de type IgM et IgG. Ils se font sur prélèvement de sang. Ces tests ne permettent pas le diagnostic d'une infection en phase aiguë, sauf dans le rare cas d'une séroconversion observé sur deux prélèvements faits à 2-3 semaines d'intervalles, période nécessaire au début de l'excrétion des anticorps. Cette dernière semble corrélée à la sévérité de la forme clinique ; elle serait de 5j dans les formes sévères et irait jusqu'à 4 semaines dans les formes fustes. Il faut également savoir que le taux des anticorps peut diminuer voire disparaître notamment chez la patients asymptomatiques, expliquant un test sérologique négatif chez les patients confirmés par RT PCR. Bien qu'aucun cas de réinfection n'ait été jusque-là documenté, le risque reste méconnu, du moins à long terme.

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

Ces tests restent intéressants notamment lors des phases tardives de la maladie pour une recherche rétrospective de l'exposition ou en cas de négativité de la RT-PCR malgré une forte suspicion de COVID-19. Ces tests sérologiques permettent également d'assurer des études épidémiologiques

4- Indications et stratégie du diagnostic virologique :

- Les nouvelles recommandations du ministère de la santé réservent l'indication d'un test par RT-PCR dans les situations suivantes :

(ces indications sont susceptibles d'évoluer en fonction de l'actualisation des connaissances et des données épidémiologiques)

4-1- Chez les personnes symptomatiques suspectes d'infection par le SARS-COV-2 :

- Toute personne présentant des signes cliniques évocateurs de COVID-19, sans autres étiologies expliquant la symptomatologie

- Toute personne symptomatique ayant été exposée à un cas confirmé COVID positif

- Toute personne hospitalisée pour détresse respiratoire aiguë inexplicée

- La présence de cas regroupés d'infections respiratoires aiguës même en l'absence de voyage ou de contact avec un cas confirmé de COVID.

4-2- Personnel de santé asymptomatique ou pauci-symptomatique : ayant eu une exposition à un cas COVID-19 confirmé (contact qui s'est prolongé pendant plus de 15 min à moins de un mètre et sans moyens de protection adéquats)

4-3- Ne sont plus des indications de diagnostic de SARS-CoV-2 par PCR

- Les sujets asymptomatiques ayant eu un contact avec un cas confirmé identifiés lors du « contact tracing »

- Les deux RT-PCR à 24h d'intervalle pour le contrôle des cas COVID-19 positifs

- Concernant la sérologie, vu le délai important de positivité des anticorps (entre 2 à 3 semaines), et vu la difficulté de détecter une séroconversion, elle n'est pas indiquée pour le diagnostic de la phase aiguë. Cependant, elle pourrait être envisagée à posteriori pour des études épidémiologiques.

- Les TROD-Ag n'ont pour le moment pas d'indication pour le diagnostic de routine en Tunisie.

Références :

1. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. World Health Organization [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. Diagnostic testing for SARS-CoV-2. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1302661/retrieve>
3. Diagnostic testing and screening for SARS-CoV-2. European Centre for Disease Prevention and Control (Updated on September 11, 2020). <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/diagnostic-testing>
4. Food and drug administration, FAQs on Testing for SARS-CoV-2. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/faqs-testing-sars-cov-2>
5. 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).
6. 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.
7. 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> (Updated on January 23, 2020).
8. 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).
9. CDC Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), updated as of April 29, 2020 - <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
10. 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 Mar 17;323(11):1061-1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585.
11. 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.];
12. 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.

13. Michael J. Loeffelholza and Yi-Wei Tang, Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections – the state of the art, *Emerging Microbes & Infections*, 2020.
14. 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.
15. https://www.corisbio.com/pdf/Products/SARS-COVID-19_20200326_3.pdf
16. 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.
17. Michael P. Motley et al, Review of Viral Testing (Polymerase Chain Reaction) and Antibody/Serology Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 for the Intensivist. *Crit Care Explor.* 2020 Jun; 2(6): e0154.
18. Hafsa A et al, Recent Advances in Molecular diagnosis curbing the COVID-19. *Int J Infect Dis* . 2020 Aug;97:322-325.
19. AT Xiao et al, False negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: Rather than recurrence *J Med Virol* . 2020 Apr 9;10.1002/jmv.25855.
20. Stratégie et modalités d'isolement Avis n°9 du Conseil scientifique COVID-19 (France) 3 Septembre 2020
21. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019 [published online ahead of print, 2020 Mar 28]. *Clin Infect Dis.* 2020;ciaa344. doi:10.1093/cid/ciaa344