



## Diagnostic virologique de l'infection par le SARS-CoV-2

### SARS-CoV-2 infection virological diagnosis

Thabet Lamia<sup>1</sup>, Mhalla Salma<sup>2</sup>, Naija Habiba<sup>3</sup>, Jaoua Mohamed amine<sup>1</sup>, Hannachi Naila<sup>4</sup>, Fki-Berrajah Lamia<sup>6</sup>, Toumi Adnene<sup>5</sup>, Karray-Hakim Hela<sup>6</sup>.

- 1- Laboratoire de Microbiologie médicale. Centre de Traumatologie et Grands brûlés Ben Arous
- 2- Laboratoire de Microbiologie. Hôpital Fattouma Bourguiba de Monastir
- 3- Laboratoire de Virologie. Hôpital Militaire Principal d'instruction de Tunis
- 4- Laboratoire de Microbiologie. Hôpital Farhat Hached de Sousse
- 5- Service des Maladies infectieuses. Hôpital Fattouma Bourguiba de Monastir
- 6- Laboratoire de Microbiologie, Unité de virologie. Hôpital Habib Bourguiba de Sfax

#### RÉSUMÉ

La confirmation de l'infection par le SARS-CoV-2 repose sur le diagnostic virologique. Devant l'urgence de la situation pandémique, de plus en plus de tests diagnostiques sont disponibles sans assez de recul sur leur fiabilité. Il est donc primordial de bien choisir le test à utiliser en fonction de sa sensibilité et de sa spécificité mais aussi en fonction du stade de la maladie.

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 aiguë 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 PCR rapide par système de cartouche permet de réduire les délais de réponse mais n'est pas adaptée aux laboratoires à grand débit de demandes. 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 et ne peut pas être utilisée à l'heure actuelle pour le diagnostic et la prise en charge des patients. La détection des anticorps spécifiques anti SARS-CoV-2 a un intérêt plutôt épidémiologique. La recherche doit être encouragée pour pallier aux limites des tests diagnostiques disponibles actuellement.

**Mots clés :** SARS-CoV-2, RT-PCR, détection antigénique, sérologie

#### SUMMARY

SARS-CoV-2 infection has to be confirmed by virological diagnosis. Multiple diagnostic tests are available without enough perspective on their reliability. Therefore, it is important to choose the most suitable test according to its sensitivity and specificity but also to the stage of the disease. Currently, the RT-PCR detection of the viral genome in respiratory samples is the most reliable test to confirm the diagnosis of an acute SARS-CoV-2 infection. It has to be done in Class II biological safety laboratory. However, it may lack sensitivity, particularly in the advanced phase of infection, and depends closely on the samples' quality. Rapid PCR by cartridge system reduces response times but is not suitable for laboratories with high throughput of requests. Detection of virus antigens on respiratory samples is a quick and easy to use technique; however it has not good specificity and sensitivity and cannot be used for diagnosis and patient management. The detection of specific antibodies against SARS-CoV-2 is better used for epidemiological analyses. Research should be encouraged to overcome the limits of the currently available diagnostic tests.

**Key words :** SARS-COV-2, RT-PCR, detection of viral antigens, specific antibodies

---

#### Correspondance

Lamia Thabet

Laboratoire de biologie médicale et banque du sang.

Centre de Traumatologie et Grands brûlés Ben Arous

Email : thabetlamia@gmail.com

## INTRODUCTION

Le diagnostic virologique est un outil incontournable dans la gestion de la nouvelle pandémie causée par le virus émergent SARS-CoV-2. En effet, la confirmation du diagnostic repose sur le diagnostic virologique qui doit répondre à l'urgence de la situation tout en obéissant aux règles de bonnes pratiques au laboratoire.

Ce document est une mise au point sur le diagnostic virologique du SARS-CoV-2 basée sur les recommandations des experts internationaux et adaptée au contexte tunisien.

### Indications du diagnostic virologique :

Les tests de diagnostic virologique présentent à l'heure actuelle plusieurs indications (1):

- 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 et guéris cliniquement
- 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.

### Phase pré-analytique :

#### Le prélèvement :

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-pharyngés ou de gorge) ou sur un prélèvement des voies respiratoires basses (crachats, lavage broncho-alvéolaire, aspiration trachéale) (2).

Le prélèvement respiratoire doit se faire par un personnel de la santé habilité, 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 ± de la gorge en utilisant un écouvillon à embout dacron/polyester, les écouvillons en bois 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 gardé à +4°C pendant 48h, 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.

Le prélèvement sanguin destiné aux études sérologiques peut être réalisé sur du sang total (par ponction veineuse ou au doigt) ; le sérum du patient peut être conservé 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 capillaire prélevé au bout du doigt doit être testé immédiatement.

### Sécurité au laboratoire :

Etant donné la nature des échantillons biologiques manipulés et la nécessité de d'une 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. Les mesures de protection doivent être déterminées en fonction de l'évaluation du risque (3). 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) (4).

Tous les déchets de laboratoire doivent être stérilisés en autoclave avant d'être évacués par le circuit habituel.

### Phase analytique et post analytique :

Depuis le début de l'épidémie et partout dans le monde, le diagnostic repose sur la recherche du génome viral par RT-PCR en temps réel qui reste à ce jour le gold standard. Cependant, de plus en plus de tests sont actuellement proposés dans le but d'identifier les foyers, d'élargir le dépistage ou de suivre le traitement. Il s'agit particulièrement des tests rapides permettant de détecter soit les antigènes viraux soit les anticorps anti-SARS-CoV-2 de type IgM et/ou de type IgG.

### La RT-PCR en temps réel :

Différents protocoles ont été proposés pour la détection de l'ARN viral par RT-PCR en temps réel. Tous ces protocoles reposent sur l'amplification des gènes conservés du

SARS-CoV-2. Il s'agit principalement des gènes **N** qui code pour les protéines de la nucléocapside, **RdRp** situé dans la région du cadre de lecture ouvert ORF1b qui code pour la polymérase RNA dépendante et **E** qui code pour la protéine d'enveloppe. La sensibilité analytique des réactifs ciblant les gènes RdRp et E est plus élevée (limite technique de détection est de respectivement 3,6 et 3,9 copies par réaction) que celle du gène N (8,3 copies par réaction) (5). Les critères de positivité de la RT-PCR sont la détection du gène ORF1b et/ou la détection des gènes N et E.

La RT-PCR a l'avantage de la spécificité qui serait de 100% et de passer de grandes séries cependant elle demande entre 3 et 6h pour obtenir le résultat sans compter le délai pour l'acheminement du prélèvement et la durée de l'étape d'extraction de l'ARN viral. Malgré sa grande spécificité, cette technique peut manquer de sensibilité (6). Les résultats faussement négatifs sont en rapport avec une charge virale faible, une mauvaise qualité du prélèvement (prélèvement pauvre en cellules), le moment du prélèvement (trop précoce ou trop tardif), la présence d'inhibiteurs de la PCR, ainsi que les conditions d'acheminement. Afin d'augmenter la sensibilité, certains auteurs recommandent de coupler deux types de prélèvements respiratoires hauts (écouvillonnage naso-pharyngé et oro-pharyngé acheminés dans le même milieu de transport virologique) ou de privilégier les prélèvements respiratoires profonds. D'autres recommandent de rechercher l'ARN viral sur plusieurs sites différents notamment dans les matières fécales et le sang. En effet parmi les patients présentant une RT-PCR positive dans les prélèvements respiratoires, 30 % à 40% avaient une RT-PCR positive dans le sang et 50 à 60% dans les selles (7). Par ailleurs, la détection de l'ARN viral dans les selles pourrait suggérer que la personne soit encore infectante et devrait rester en isolement.

#### **Techniques de PCR en circuit clos :**

Afin de réduire le délai de réponse, d'autres techniques de PCR automatisées en circuit clos (système de cartouche) permettent d'avoir des résultats en moins de 60 minutes (8,9) given serious cause for concern. SARS-CoV-2 is a human-to-human pathogen that caused fever, severe respiratory disease and pneumonia (known as COVID-19. Ces techniques permettent une approche syndromique par PCR multiplex, en détectant simultanément plusieurs agents pathogènes pour les voies respiratoires. Leur

utilisation se fait grâce à des appareils point-of-care test (POCT) qui incorporent l'extraction des acides nucléiques, l'amplification et la détection en une seule étape intégrée dans une cartouche.

Ces techniques présentent une bonne spécificité et une sensibilité acceptable et sont réalisables dans les LBS2 qui ne disposent pas d'un grand débit de demandes.

#### **Le séquençage du génome :**

Ce test a trouvé tout son intérêt dans l'identification initiale du virus au début de la pandémie grâce notamment aux séquenceurs de nouvelle génération et permet actuellement l'analyse des éventuelles mutations qui surviennent lors de l'évolution génétique du virus (10).

#### **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.

##### *\*Les tests de détection d'antigènes viraux*

Il s'agit de méthodes de diagnostic direct permettant de rechercher les antigènes de SARS-COV-2 sur un prélèvement respiratoire (11). La plupart des tests rapides proposés sur le marché sont immunochromatographiques. Cependant, si on se réfère aux expériences précédentes avec les virus respiratoires, la sensibilité de ces tests serait de 34 à 80% (12). Ainsi la moitié ou plus des patients infectés par le SARS-CoV-2 ne seront pas diagnostiqués par ces tests. De plus ces tests pourraient donner des résultats faussement positifs en reconnaissant les antigènes de coronavirus autres que le SARS-CoV-2 (13). Les recommandations d'utilisation des tests de détection d'antigènes viraux pour le diagnostic d'infection par le SARS-CoV-2 restent donc à *valider par des recherches plus approfondies* visant à mieux étudier leurs sensibilité et spécificité (13).

##### *\*Les tests sérologiques de détections des anticorps*

Outre les TROD, plusieurs techniques permettant la détermination des anticorps dans le sérum

ont été développées (immunochromatographie, ELISA, chimiluminescence,...) (14–16). Ces techniques recherchent les anticorps spécifiques de type IgM et IgG.

Ces tests ne sont pas destinés au diagnostic en phase aigue puisque les anticorps ne sont produits qu'au delà du 5<sup>ème</sup> jour pour les IgM et du 10<sup>ème</sup> jour pour les IgG à partir du début de la symptomatologie (7, 15). Ainsi, il serait possible d'avoir de faux négatifs en phase très précoce de l'infection. Cependant, la présence d'IgM spécifiques dans le sérum ou une augmentation du taux des IgG  $\geq 4$  sur deux prélèvements à 15 jours d'intervalle peuvent être utilisés dans le diagnostic des patients suspects avec RT-PCR négative arrivés à un stade évolué de l'infection (7).

Par ailleurs, la détection des IgG peut manquer de spécificité en raison de réactions croisées avec d'autres coronavirus et ne permet pas de déterminer si une personne est contagieuse ou à quel point l'immunité développée est protectrice (17). On ne peut donc pas, à moins de prouver le caractère immunisant du virus, se baser sur leur seule positivité pour lever l'isolement.

Sur la base des données actuelles, l'OMS ne recommande pas l'utilisation des tests de détection rapide d'anticorps mais encourage la poursuite des travaux visant à établir leur utilité dans la surveillance des malades et les études épidémiologique (18).

## CONCLUSION

Le diagnostic virologique du SARS-CoV-2 repose sur la détection du génome viral par RT-PCR sur prélèvements respiratoires en phase aigue dans les laboratoires autorisés. Cette technique sera également préconisée pour déterminer la guérison des malades et pour le suivi des patients traités ou convalescents, notamment par la quantification de la charge virale. Dans le cas où des tests de détection rapide des antigènes seraient disponibles avec une bonne sensibilité et spécificité, nous pourrions envisager leur utilisation dans les LSB2 ne disposant pas de plateforme de biologie moléculaire. Si le test est négatif, un complément d'analyse par une RT-PCR sera indiqué.

Les tests sérologiques serviront essentiellement aux enquêtes épidémiologiques, au diagnostic des malades fortement suspects avec PCR négatives surtout aux stades avancés de la maladie. Ils pourront également être utilisés pour le dépistage de masse de la population

surtout dans les zones à forte diffusion du virus afin de cerner la situation épidémiologique.

## RÉFÉRENCE

- Hong KH, Lee SW, Kim TS, Huh HJ, Lee J, Kim SY, Park JS, Kim GJ. Korean Society for Laboratory Medicine, COVID-19 Task Force and the Center for Laboratory Control of Infectious Diseases, the Korea Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea. *Ann Lab Med*. 2020 Mar 31. [Epub ahead of print]
- Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, St. George K, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/ COVID-19. *mBio*. 28 avr 2020; 11(2):mBio.00722-20, e00722-20.
- WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-eng.pdf [Internet]. [cité 9 avr 2020]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Fiche-COVID19\_V5.0-6.4.20.pdf [Internet]. [Cité 9 avr 2020]. Disponible sur : [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/Fiche-COVID19\\_V5.0-6.4.20.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/Fiche-COVID19_V5.0-6.4.20.pdf)
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* [Internet]. 23 janv 2020 [cité 9 avr 2020] ; 25(3). Disponible sur: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Wang Y, Kang H, Liu X, Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *Journal of Medical Virology* [Internet]. [cité 9 avr 2020];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.25721>
- handbook\_of\_covid-19\_prevention\_and\_treatment\_compressed\_-french.pdf [Internet]. [cité 9 avr 2020]. Disponible sur: [https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/handbook\\_of\\_covid-19\\_prevention\\_and\\_treatment\\_compressed\\_-french.pdf](https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/handbook_of_covid-19_prevention_and_treatment_compressed_-french.pdf)
- Yu L, Wu S, Hao X, Li X, Liu X, Ye S, et al. Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform: iLACO [Internet]. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*; 2020 févr [cité 9 avr 2020]. Disponible sur: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.02.20.20025874>
- Zhu X, Wang X, Han L, Chen T, Wang L, Li H, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticles-based biosensor for diagnosis

- of COVID-19 [Internet]. Infectious Diseases (except HIV/AIDS); 2020 mars [cité 9 avr 2020]. Disponible sur: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.03.17.20037796>
10. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW The Laboratory Diagnosis of COVID-19 Infection: Current Issues and Challenges. Clin Microbiol. 2020 Apr 3. pii: JCM.00512-20. [Epub ahead of print]
  11. Edward R. An overview of the rapid test situation for COVID-19 diagnosis in the EU/EEA. TECHNICAL REPORT. :3.
  12. Bruning AHL, Leeflang MMG, Vos JMBW, Spijker R, de Jong MD, Wolthers KC, et al. Rapid Tests for Influenza, Respiratory Syncytial Virus, and Other Respiratory Viruses: A Systematic Review and Meta-analysis. Clinical Infectious Diseases. 15 sept 2017;65(6):1026-32.
  13. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19 [Internet]. [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>
  14. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32065057>
  15. Xiao S-Y, Wu Y, Liu H. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. Journal of Medical Virology. 2020;92(5):464-7.
  16. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients | medRxiv [Internet]. [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.18.20038059v1>
  17. Petherick A. Developing antibody tests for SARS-CoV-2. The Lancet. avr 2020;395(10230):1101-2.
  18. WHO-2019-nCoV-Sci\_Brief-POC\_immunodiagnosics-2020.1-eng.pdf [Internet]. [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331713/WHO-2019-nCoV-Sci\\_Brief-POC\\_immunodiagnosics-2020.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331713/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-POC_immunodiagnosics-2020.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)