



Diagnostic du Sars Cov2 en entreprise

Dr Laetitia Ninove

IHU Méditerranée Infection

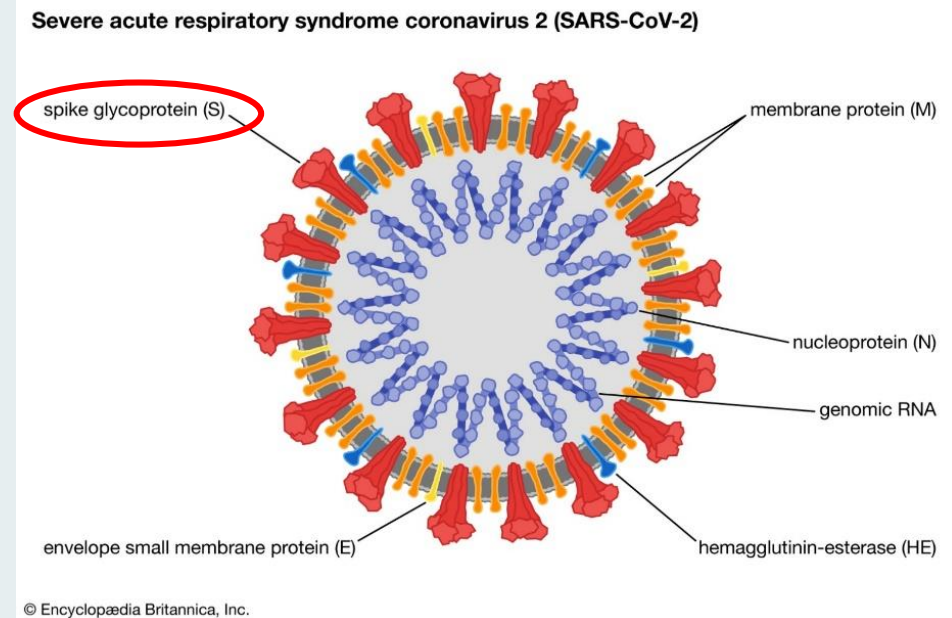
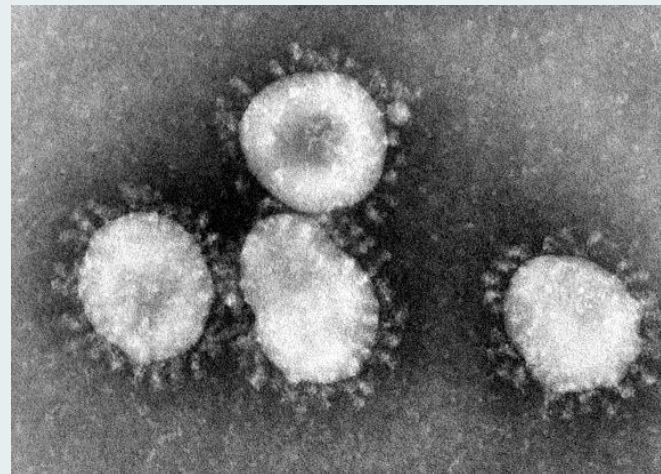
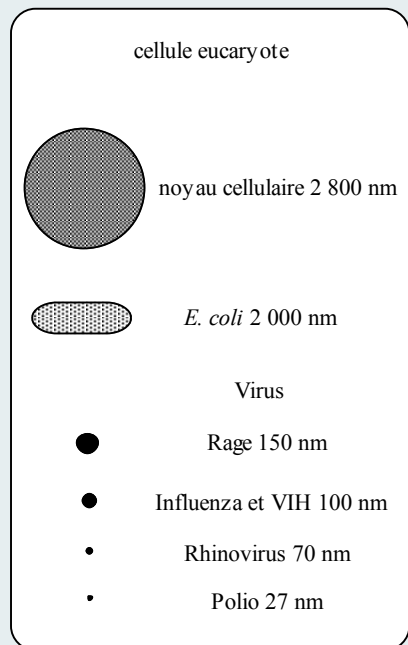
UMR190 – Unité des virus émergents

Marseille

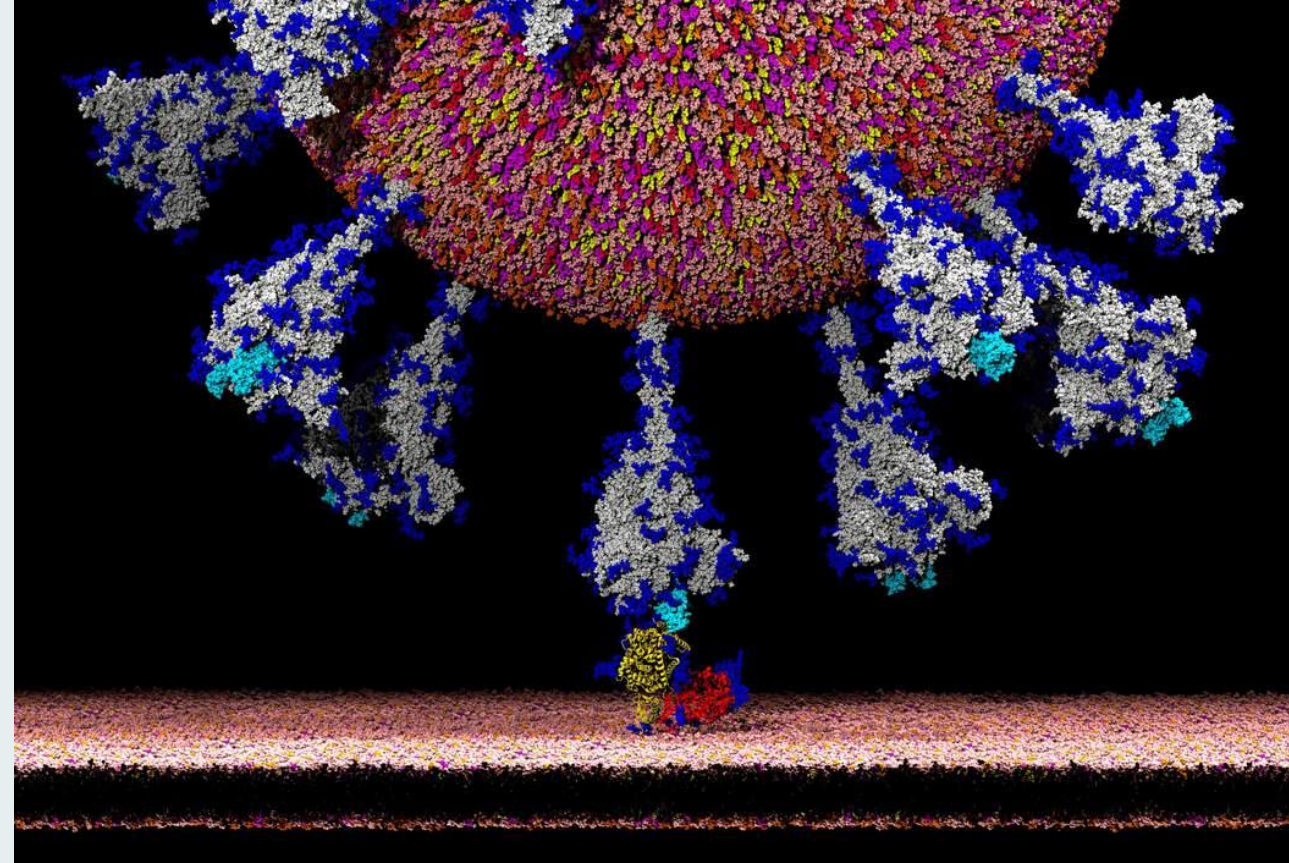
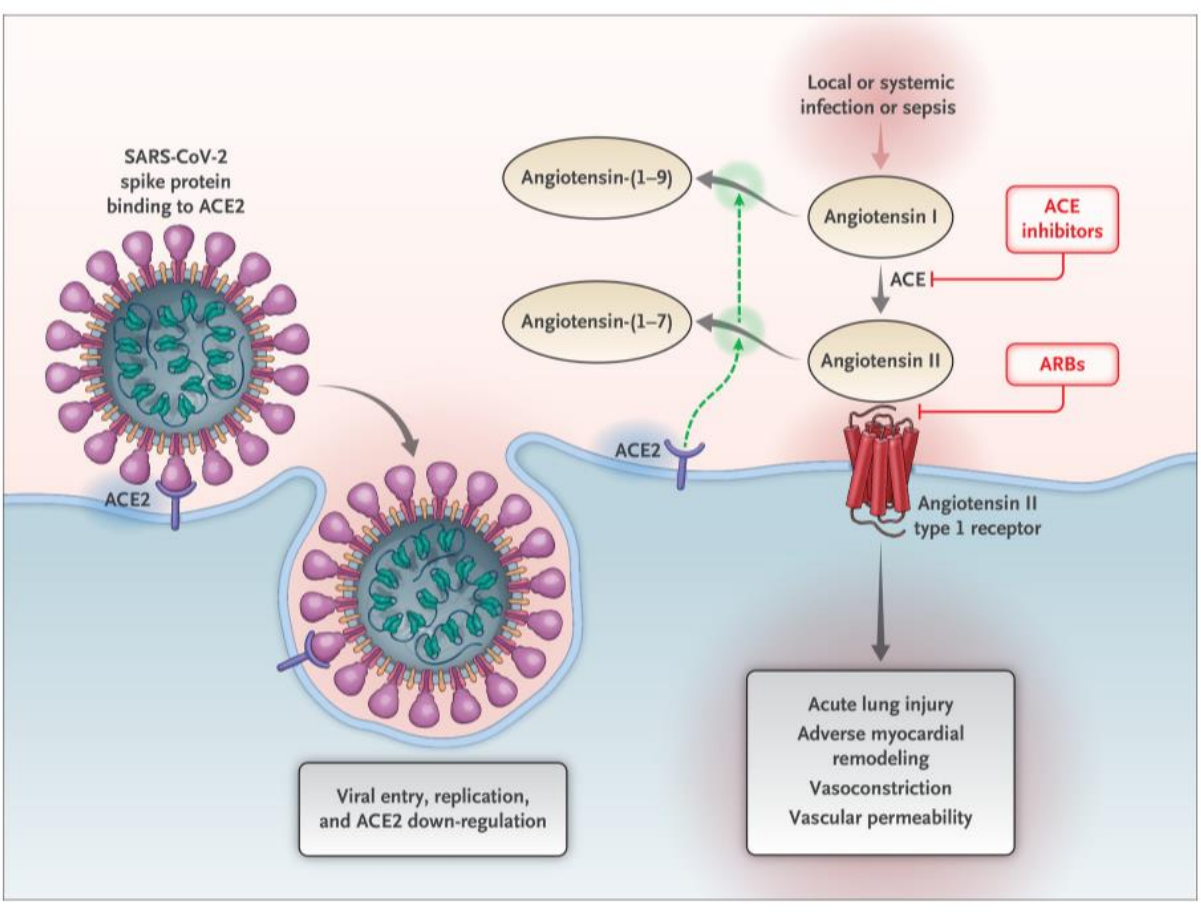
Coronavirus

- *Coronavirus* → « virus à couronne »
- Virus enveloppé à ARN non segmenté
- Protéine **S** « **spike** » d'enveloppe :
 - Tropisme, attachement, fusion, cible de la réponse immunitaire cellulaire/humorale
 - Régions hypervariables → échappement → plasticité de « S » (site de liaison au récepteur)
 - Adaptation à différents récepteurs → passage de la barrière d'espèces → émergence chez de nouveaux hôtes

10 000 nm

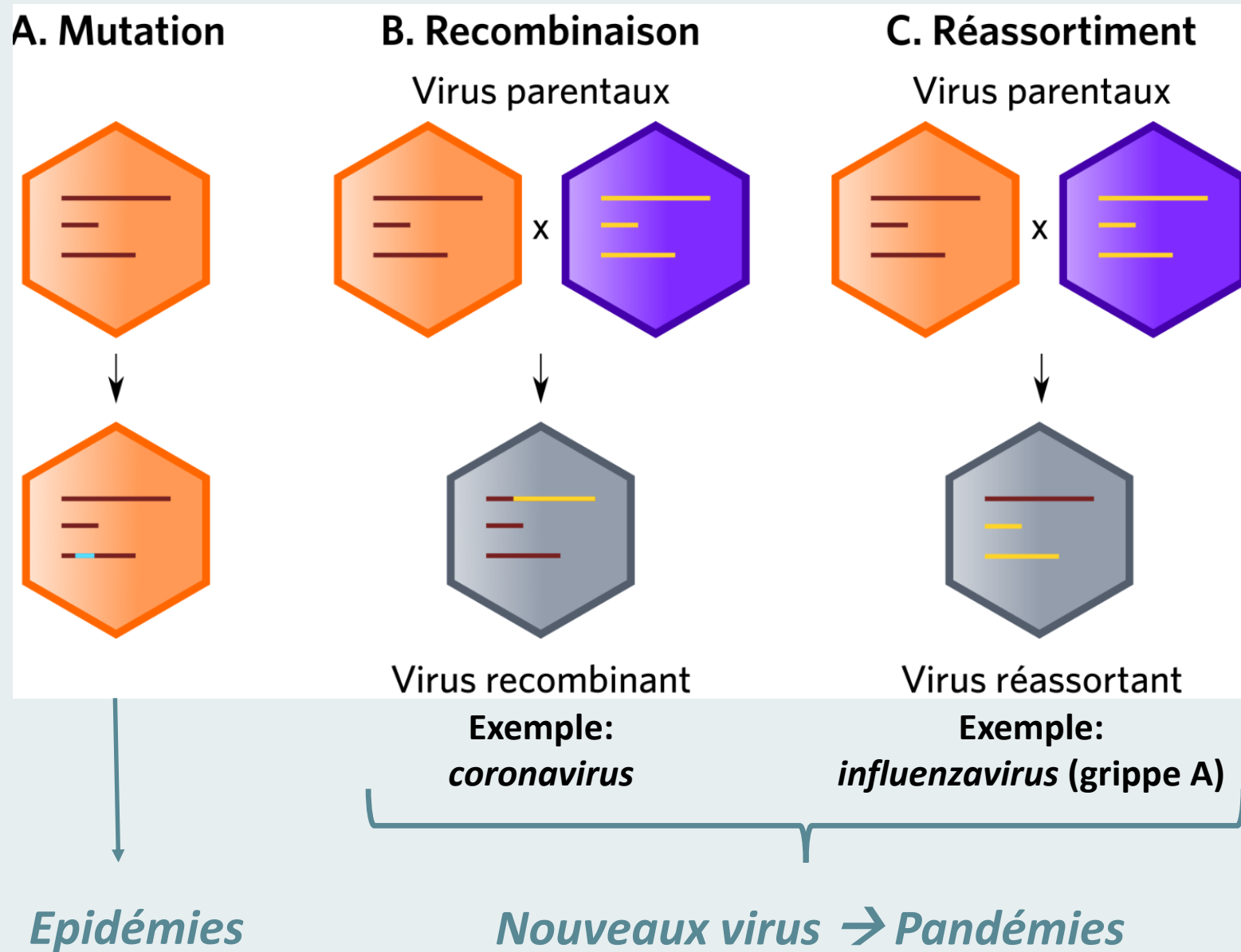


Récepteur cellulaire du Sars Cov2



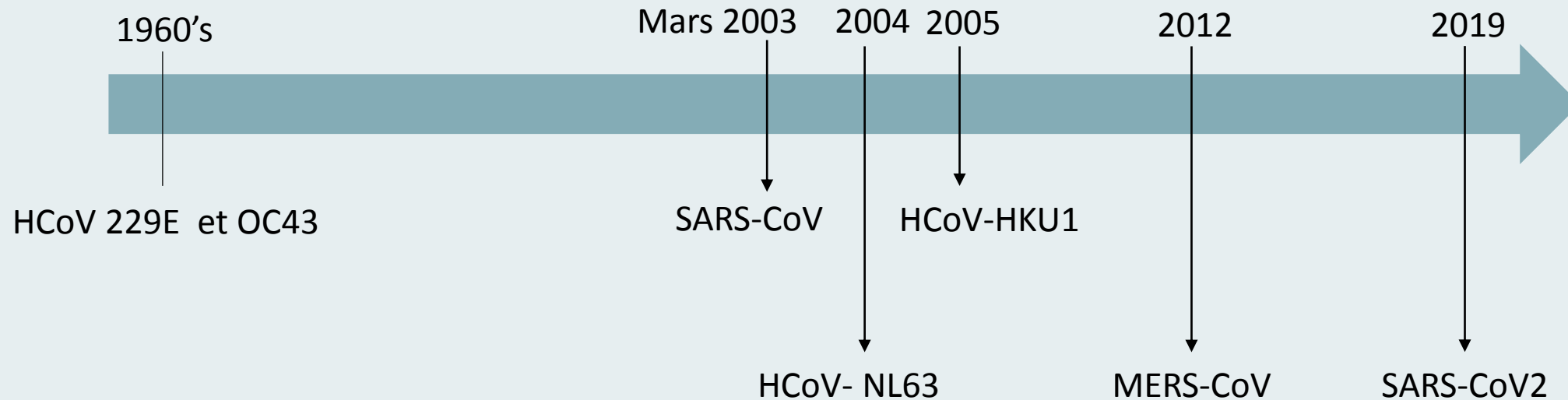
Interaction between SARS-CoV-2 and the Renin–Angiotensin–Aldosterone System.

Evolution d'un virus



Coronavirus HUMAINS

- Famille : *Coronaviridae*
- Genre :
 - *Alphacoronavirus* : 229E, NL63
 - *Betacoronavirus* : OC43, HKU1, SARS-CoV1 et 2, MERS-CoV



Infection à Sars Cov2

- Transmission

- En l'absence de mesures barrières → chaque patient infecte entre 2 et 3 personnes (R_0).
- Transmission **DIRECTE**: aérienne
 - Gouttelettes (diamètre $>5-10\mu\text{m}$) = toux +++ avec un contact rapproché ($<1\text{m}$) et durable ($>15\text{ min}$) avec un sujet contagieux.
 - Aérosols (diamètre $<5\mu\text{m}$) → persistance du virus en suspension dans l'air dans une pièce non ventilée, transmission contact $>1\text{ m}$.
- Transmission **INDIRECTE** : manu-portée par les surfaces inertes.

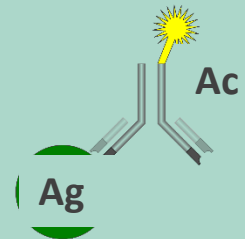
- Contagiosité : 2 jours avant l'apparition des symptômes et jusqu'à 7 à 10 jours après le début des symptômes.

- Durée incubation : en moyenne 5 à 6 jours (extrêmes de 2 à 12 jours)

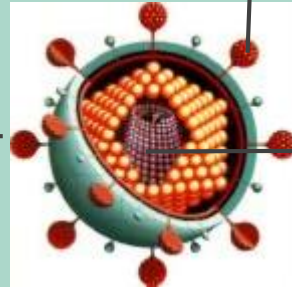
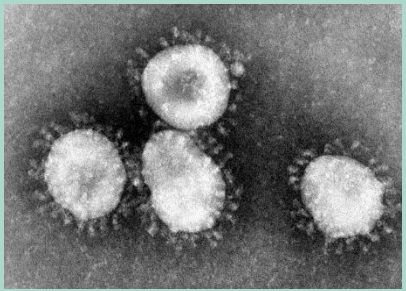
Diagnostic d'un virus

DIRECT

Détection des protéines (antigènes Ag)

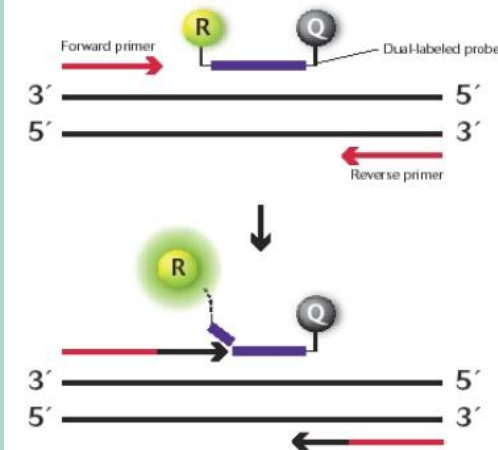


Microscopie électronique
(famille du virus)

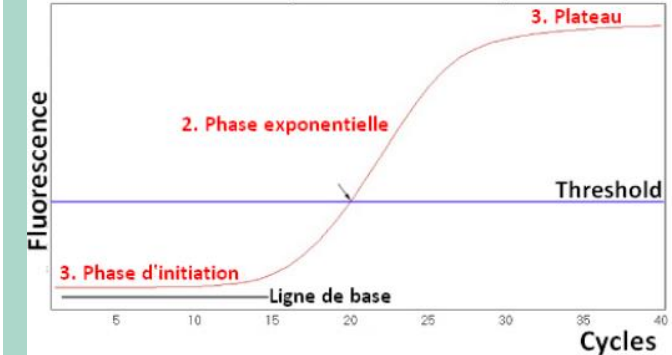


Détection du génome ADN ou ARN
Biologie moléculaire

TaqMan® detection



Courbe d'amplification d'une qPCR



INDIRECT

Détection des anticorps (Ac) = SEROLOGIE

Diagnostic DIRECT - prélèvement

- **Écouvillon naso-pharyngé +++**
- Alternative: écouvillon oro-pharyngé, aspiration naso-pharyngée, salive
- Prélèvement profond: lavage broncho-alvéolaire, aspiration trachéale, expectoration
- Prélèvement **précoce**



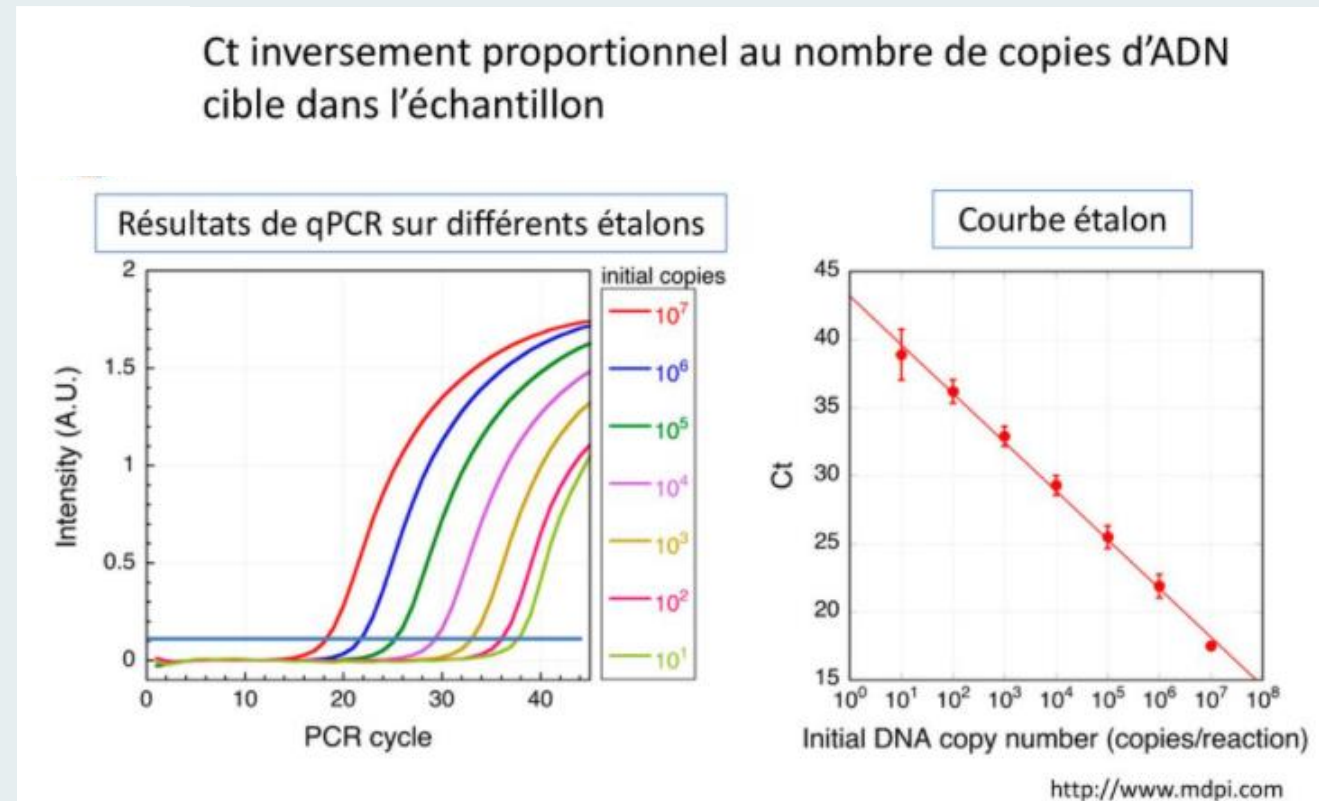
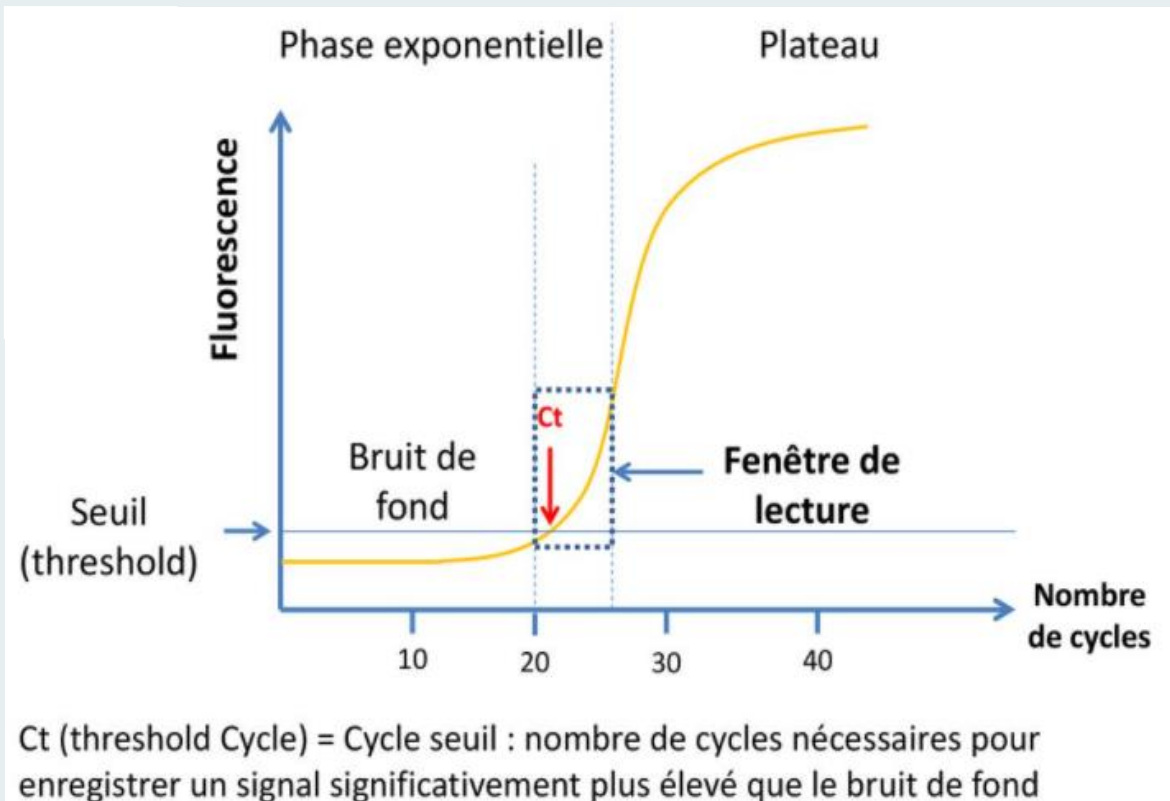
Écouvillon milieu de
transport Virus



Écouvillon nasopharynx

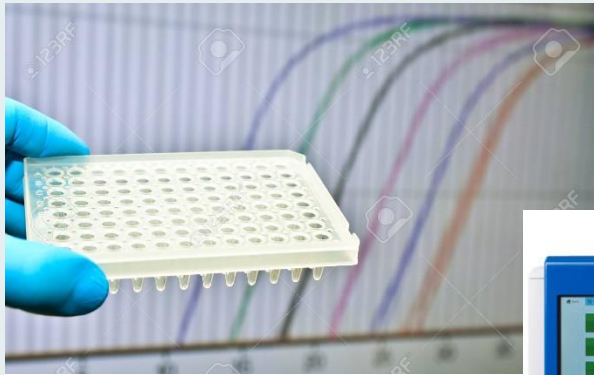
Diagnostic DIRECT – test de PCR

- **RT-PCR:** RT « réverse transcription » (ARN → cDNA) + PCR « amplification du génome »
- PCR « en temps réel » : sensibilité et spécificité +++
- Technique « gold standard »
- Semi-quantitative (Ct) – Quantitative (copies/ml)



Diagnostic DIRECT – test de PCR

- Plaque 96 puits → grandes séries (>5h)
- Automates « série random » (<5h)
- Test POC « unitaire » (<1h)



- Cible 1 seul gène (simplex)
- Cible 2 gènes ou plus (duplex, multiplex)
- Gènes cible :
 - enveloppe virale (E)
 - nucléocapside (N)
 - ARN dépendant de l'ARN polymérase (RdRp),...
- Sensibilités variables: gène cible, réactif fournisseur, simplex/duplex, technique de PCR...

Diagnostic DIRECT – test de PCR

- Test RT-PCR positif
 - Infection aiguë à Sars Cov2 (symptomatique ou asymptomatique)
 - 24 à 48 heures qui précèdent les premiers symptômes
 - Excrétion virale prolongée (valeur du Ct reflet de la charge virale)

→ Détection ARN: viabilité du virus? Contagiosité? → pas de corrélat entre valeur de Ct/CV et la contagiosité
- Test RT-PCR négatif
 - Absence de Covid-19 → rechercher autre étiologie
 - Période d'incubation ou Infection guérie
 - Au cours de la maladie, cas décrits d'excrétion virale très faible
 - Mauvaise réalisation du prélèvement, de la qualité du milieu de transport ou d'un délai d'acheminement trop long
 - limites de sensibilité du test

→ Un test négatif ne permet pas d'éliminer une infection à SARS-CoV-2.

Diagnostic DIRECT – test de PCR

- Comparaison 354 patients COVID-19+ : écouvillons naso-pharyngés (NP), nasaux auto-collectés (N) et salive (S) K. E. Hanson et al. JCM nov 2020
 - Concordance NP et N : 86,3%
 - Concordance NP et S : 93,8%
- Etude COVISAL → rapport HAS

Prélèvement salivaire:



- Uniquement patients **symptomatiques** non hospitalisés < J7 du début des symptômes et si contre-indication à la réalisation d'un prélèvement nasopharyngé
- Contre-indication en dépistage
- Alternative intéressante en cas de pénurie de matériel de prélèvement
- >30 minutes après dernière prise de boisson, d'aliment, cigarette, brossage des dents
- Crachat salivaire dans un flacon sec et stérile (1 mL)

Diagnostic DIRECT – test de PCR



Développer la qualité dans le champ
sanitaire, social et médico-social

Avis n° 2020.0049/AC/SEAP du 24 septembre 2020 du collège de la Haute Autorité de santé relatif à l'inscription sur la liste des actes et prestations mentionnée à l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale, de la détection du génome du virus SARS-CoV-2 par technique de transcription inverse suivie d'une amplification (RT-PCR) sur prélèvement oropharyngé

Prélèvement oropharyngé :

- Patients **asymptomatiques** < J7 du début des symptômes et si contre-indication à la réalisation d'un prélèvement nasopharyngé
- Performances comparables rapportées dans la littérature, des prélèvements de l'OP par rapport au NP, pour le diagnostic d'une infection par SARS-CoV-2 symptomatiques lors de la phase aiguë
- Réflexe nauséeux!

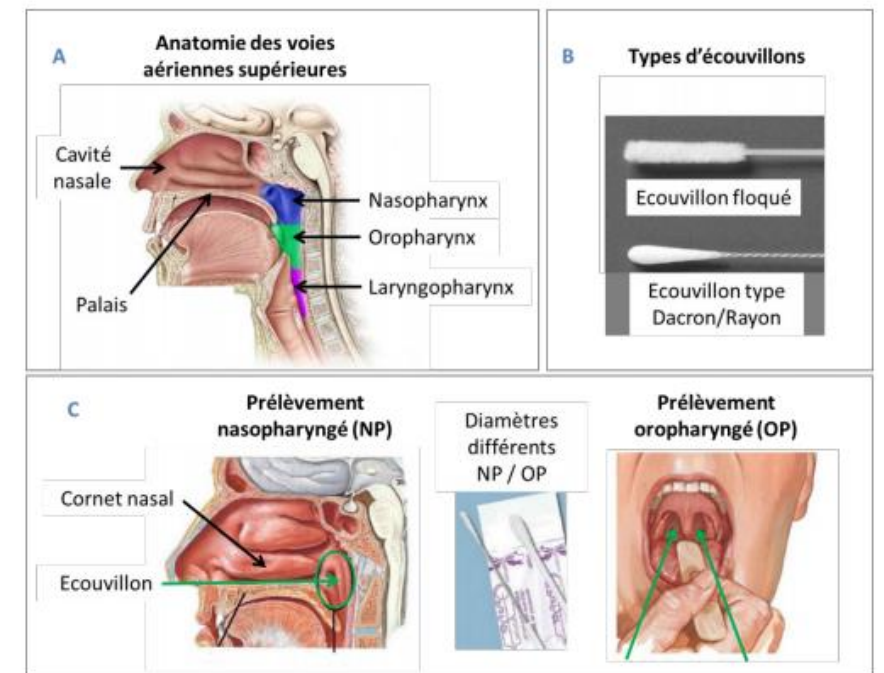
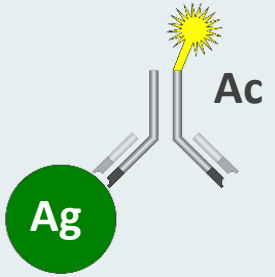


Figure 1. Rappels anatomiques de voies aériennes supérieures (A), types d'écouvillons à utiliser (B) et techniques de prélèvements (C). D'après : <https://www.mayoclinic.org/parts-of-the-throat-pharynx/img-20005644>.

Diagnostic DIRECT – détection antigénique



- Technique de RT-PCR :
 - Personnel habilité (laboratoire)
 - Automates et réactifs coûteux
 - Délais importants pour le rendu de résultats
 - Sensibilité → détection de faibles copies d'ARN viral → contagiosité?
- Détection antigénique:
 - Détection d'une protéine du Sars Cov2 (antigène Ag) avec un anticorps spécifique (Ac)
 - Sensibilité inférieure à la PCR → risque de faux négatifs si charge virale faible
 - Test rapide (<30 min)
 - Pas de qualification nécessaire pour réaliser le test
 - Peu coûteux
 - Détecte antigène viral (protéine) → détection contagiosité

Les caractéristiques des tests PCR et antigéniques			
PRÉLÈVEMENT NASO-PHARYNGÉ (TEST PCR)		TEST ANTIGÉNIQUE RAPIDE	
 Prélèvement nasal puis passage dans une machine	Type de prélèvement	Prélèvement nasal puis simple mélange avec un réactif	
3 heures environ	Durée d'analyse	15 à 30 minutes	
Moins de 36 heures dans 80% des cas	Délai avant le résultat	Peut être très court	
Détecte la présence ou non de l'ARN du virus	Résultat	Détecte la présence ou non des protéines du virus	
Test de référence	Avantages	Très rapide et sans passage dans une machine de laboratoire	
Délais de résultats longs	Inconvénients	Une personne peu infectée peut apparaître négative à ce test alors que la PCR l'aurait détectée	
Permet de recenser à grande échelle les cas positifs de manière plutôt fiable et précoce mais le délai de résultat est plus long	UTILISATION	Permet d'obtenir une réponse rapide afin qu'une personne porteuse puisse s'isoler immédiatement	

Rapport HAS

- <J4 des symptômes
- Si positif: pas de confirmation par RT-PCR
- Si négatif chez patient à risque de développer une forme grave de la maladie (>65 ans ou au moins un facteur de risque sur liste HCSP): contrôler par RT-PCR
- Recommandé pour le dépistages des personnes asymptomatiques HORS cas-contacts = populations avec un risque plus important/population générale (université, lycée, aéroport,...)
- NON recommandé pour les asymptomatiques cas-contact → RT-PCR

Diagnostic DIRECT – détection antigénique

- Exemple d'évaluation des performances d'un test antigénique
- Bonne spécificité
- Sensibilité augmente avec:
 - La charge virale
 - Prélèvement <3j après le début des symptômes

Spécificité					Sensibilité				VPP		VPN	
	N témoins	Témoins négatifs	IC 95%		N cas	% Cas positifs	IC 95%		Prévalence 1%	Prévalence 5%	Prévalence 1%	Prévalence 5%
Global	337	93,2%	89,9%	95,6%	291	60,1%	54,3%	65,8%	8,2%	31,8%	99,6%	97,8%
Par sous-groupes	Délai d'apparition des symptômes											
	Délai 0-3j				97	80,4%	71,1%	87,8%	10,7%	38,4%	99,8%	98,9%
	Délai 4-7j				102	61,8%	51,6%	71,2%	8,4%	32,3%	99,6%	97,9%
	Délai 8-11j				62	40,3%	28,1%	53,6%	5,7%	23,8%	99,4%	96,7%
	Délai ≥12j				23	30,4%	13,2%	52,9%	4,3%	19,1%	99,3%	96,2%
	Délai ≤7j				199	70,9%	64,0%	77,1%	9,5%	35,4%	99,7%	98,4%
	Ct value											
	Ct ≤20				39	100,0%	91,0%	100,0%	12,9%	43,6%	100,0%	100,0%
	Ct]20-25]				88	89,8%	81,5%	95,2%	11,8%	41,0%	99,9%	99,4%
	Ct]25-30]				72	65,3%	53,1%	76,1%	8,8%	33,6%	99,6%	98,1%
	Ct >30				88	11,4%	5,6%	19,9%	1,7%	8,1%	99,0%	95,2%
	Ct ≤33				241	71,8%	65,6%	77,4%	9,6%	35,7%	99,7%	98,4%
	Ct ≤25				127	92,9%	87,0%	96,7%	12,1%	41,8%	99,9%	99,6%
Ct ≤23				93	97,8%	92,4%	99,7%	12,7%	43,1%	100,0%	99,9%	
Sévérité												
Bénin				202	59,9%	52,8%	66,7%	8,2%	31,7%	99,6%	97,8%	
Sévère				88	61,4%	50,4%	71,6%	8,4%	32,2%	99,6%	97,9%	

Sensibilité globale versus PCR : 60,1% - Sensibilité pour Ct ≤33 : 71,8% - Spécificité : 93,2%

Diagnostic DIRECT – détection antigénique

Tests antigéniques utilisés pour identifier rapidement les personnes qui ont des niveaux élevés de virus = les plus susceptibles d'être infectieux pour les autres et les isoler de la communauté

→ permettrait de ralentir l'épidémie



Comment se déroule un test antigénique

1 Prélèvement nasopharyngé avec un coton-tige introduit dans le nez du patient.

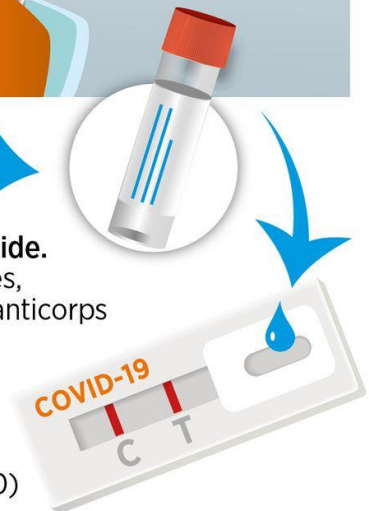


2 Le prélèvement est mélangé avec un réactif qui va détruire le virus tout en lui faisant libérer ses constituants, en l'occurrence des protéines spécifiques.

3 Quelques gouttes de la solution obtenue sont déposées sur le test rapide. Si les protéines sont présentes, elles vont interagir avec des anticorps et la bandelette va prendre une couleur rouge.

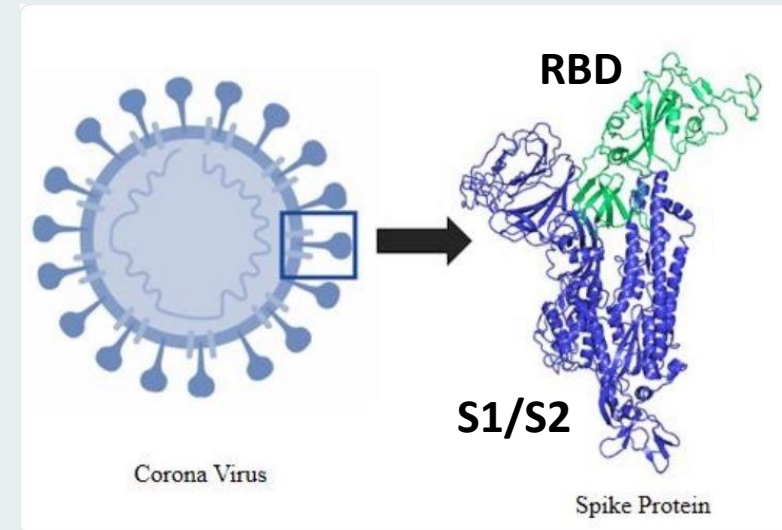
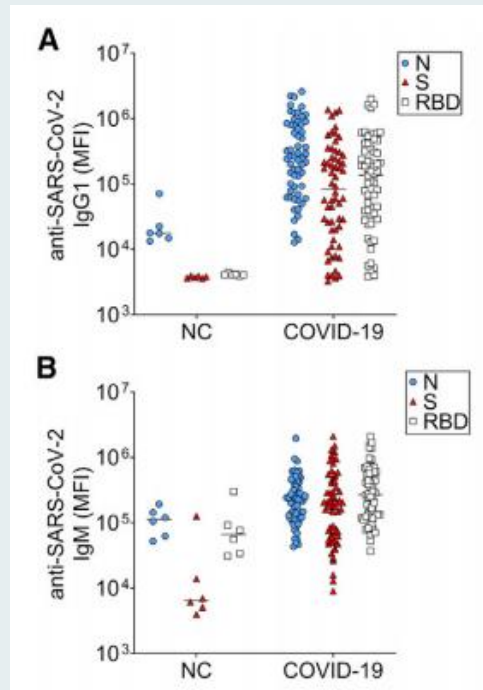
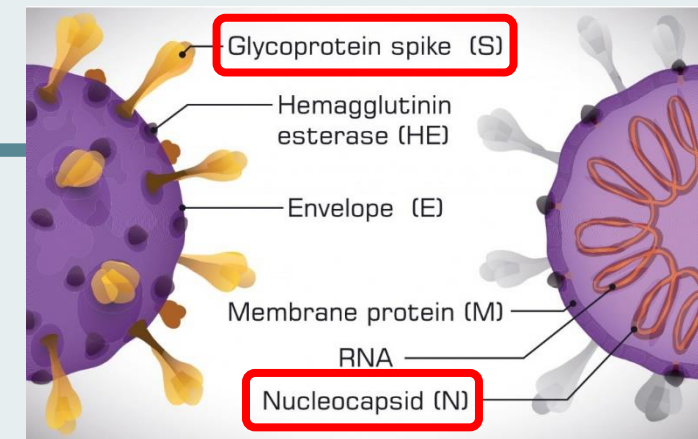


TEMPS : environ **15 min**
(parfois moins, parfois 30)



Diagnostic INDIRECT – sérologie

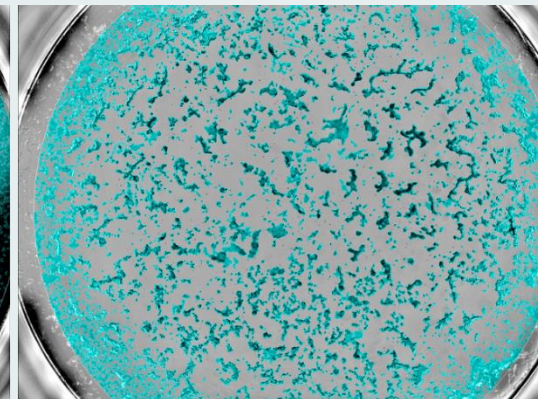
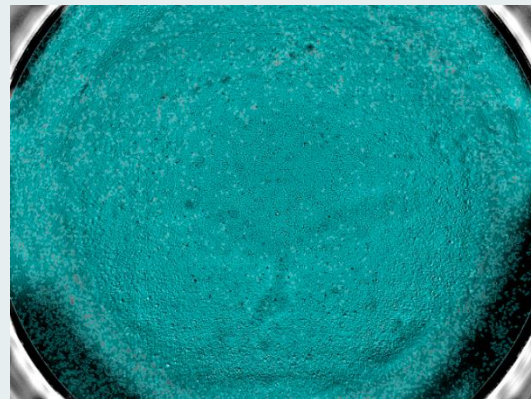
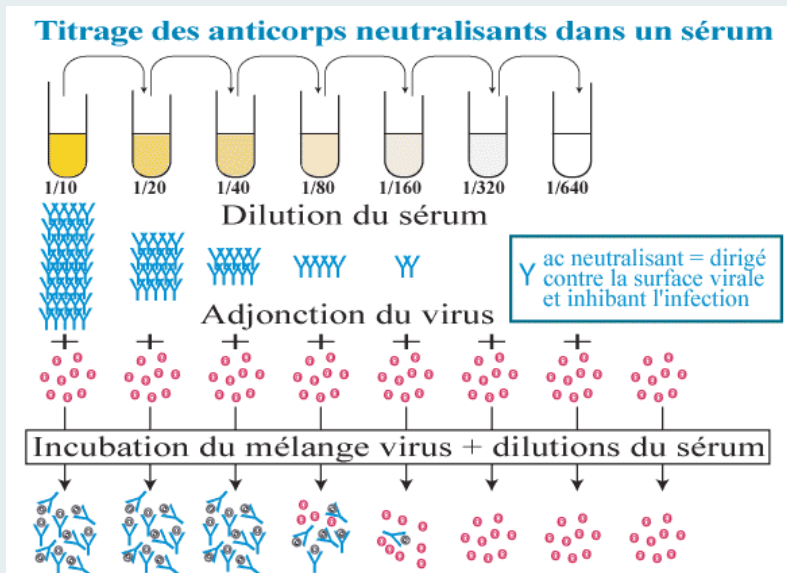
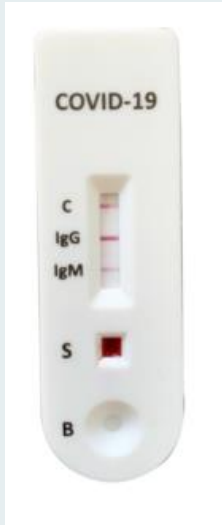
- Détection des anticorps anti-Sars Cov2
- L'antigène candidat privilégié est la protéine S (Spike) (entière ou partiel Receptor Binding domain)
→ production d'anticorps neutralisants.
- Autre cible envisagée = protéine N (nucleocapside).
→ But: éviter les faux positifs liés à des réactions croisées avec d'autres coronavirus (SARS-CoV, MERS-CoV et coronavirus humains).



Cible des anticorps neutralisants

Diagnostic INDIRECT – sérologie

- Sérum ou sang veineux capillaire
- Test ELISA
 - Automates random (nombreux fabricants): IgA, IgM, IgG
 - Test rapide immunochromatographique
- Test de séroneutralisation: anticorps neutralisants
 - Laboratoire habilité: culture du Sars Cov2 en laboratoire P3
 - Titre d'anticorps neutralisants positif $>1/40$

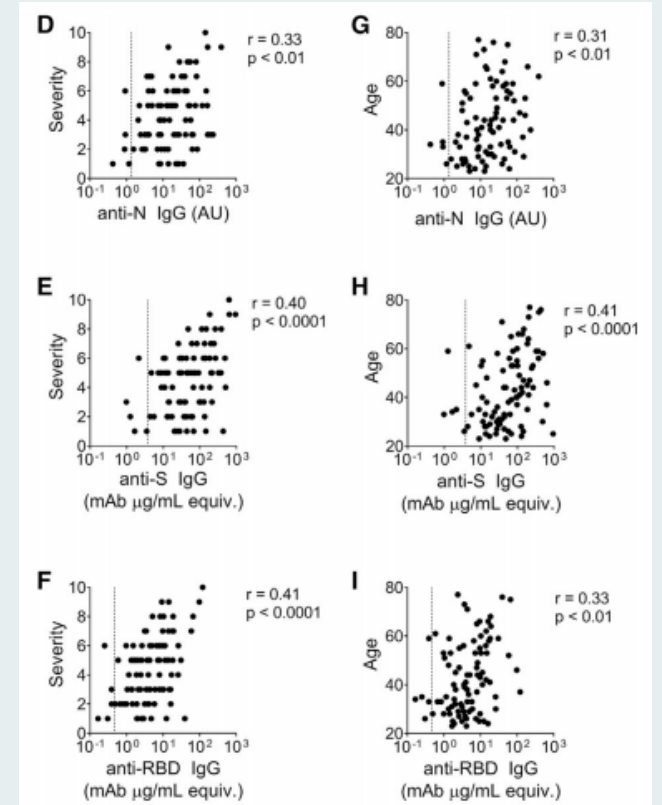
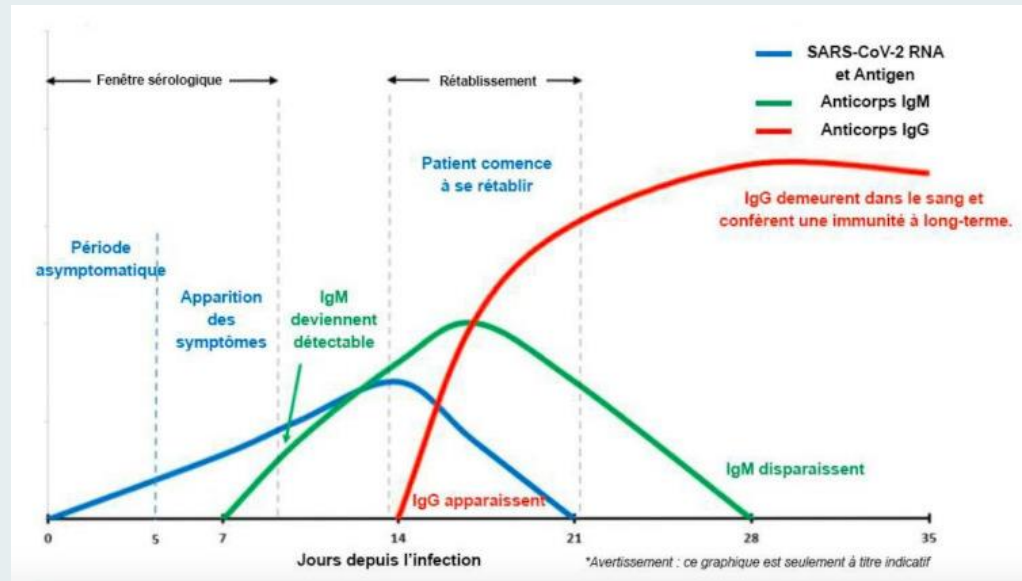


Diagnostic INDIRECT – sérologie

- Cible protéine N: durée médiane de détection après début des symptômes

(Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). Guo L ET AL; Clin Infect Dis. 2020 Mar)

- IgM (85,4%) et IgA (92,7%) → 5j
- IgG (77,9%) → 14j



- Corrélations significatives

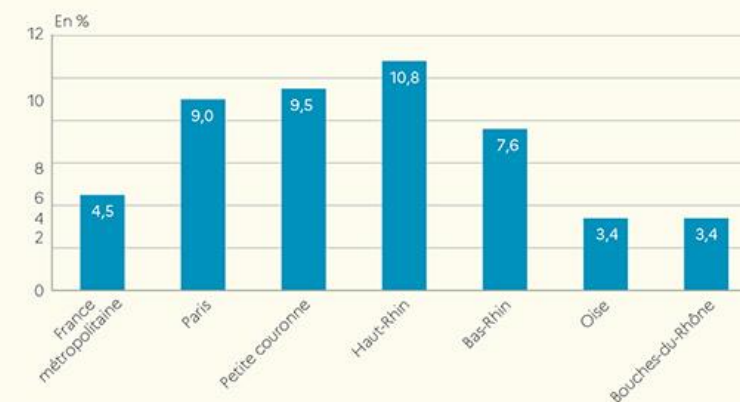
- Taux IgG anti-SRAS-CoV-2 avec l'âge
- Taux IgG anti-SRAS-CoV-2 avec la gravité des symptômes

Diagnostic INDIRECT – sérologie

- Utilité des tests sérologiques ?
 - Pour les tests performants (Cibles S et RBD)
 - peu de réaction croisée avec les coronavirus saisonniers et donc la positivité signifie un contact avec SARS-CoV2
 - Inutiles pour le diagnostic de l'infection aiguë
 - Intérêt essentiel : épidémiologique (Qui a été infecté?)
 - Utile pour sélectionner des sérums de convalescents hyper-immuns pour des traitements par transfusion de plasma
 - Détecter les personnes potentiellement « protégées » contre l'infection (anticorps neutralisants, définition de seuil de protection?, durée d'immunisation?)
 - Pas de corrélat de protection!
 - Etudes de séroprévalence (soignants, donneurs de sang, populations précaires, universités...)
- En mai 2020: 4,5 % de la population vivant en France métropolitaine a développé des anticorps contre le SARS-CoV-2

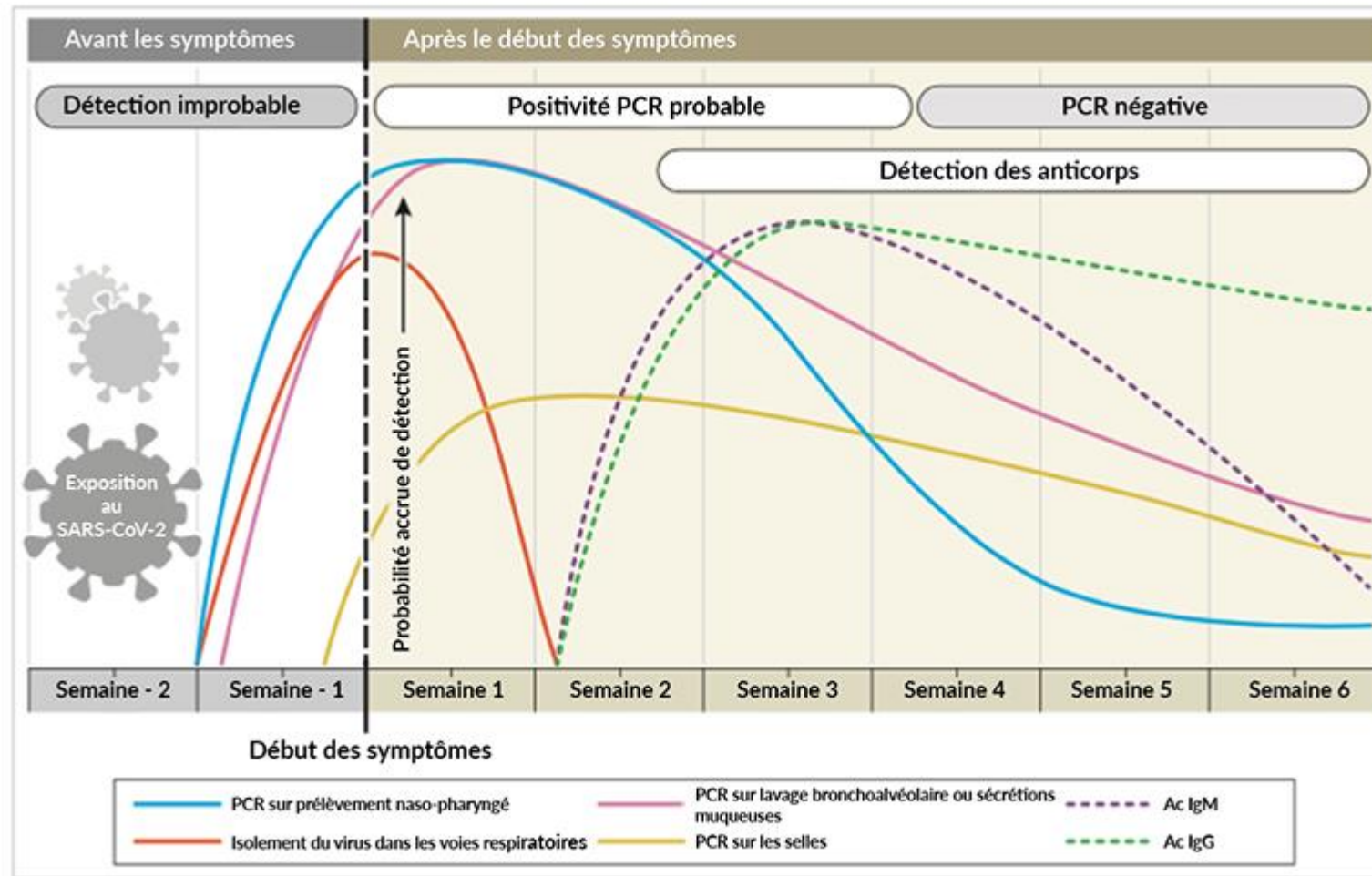
GRAPHIQUE

Séroprévalence contre le SARS-CoV-2 en France métropolitaine et dans certains départements, en mai 2020



Champ • Personnes âgées de 15 ans ou plus, résidant en France métropolitaine hors Ehpad, maisons de retraite et prisons.
Source • EpiCov (Inserm-DREES), vague 1.

Diagnostic - conclusion





Merci pour votre attention