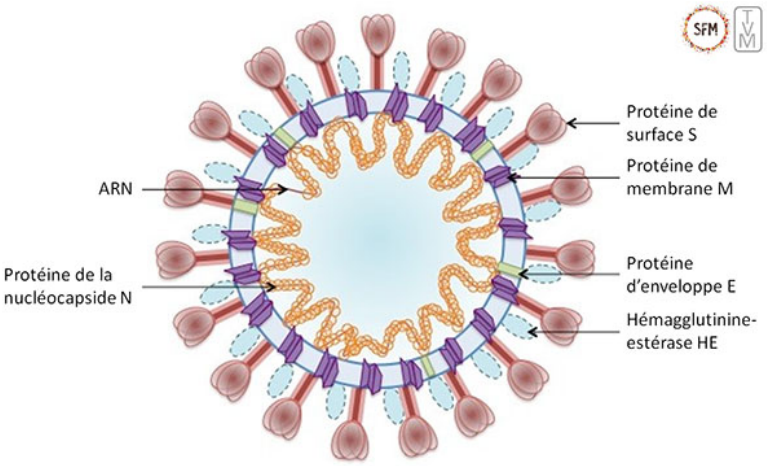
AT 24 - Les différents tests de diagnostic d'infection au SARS-CoV-2
(*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*)

DOCUMENT 1 : Structure des Coronavirus



source : Société française de microbiologie

https://www.sfm-microbiologie.org/2020/04/03/covid-19/

DOCUMENT 2 : Synthèse de la Haute Autorité de Santé (HAS) sur les tests diagnostiques du 2019-nCoV

Le 31 décembre 2019, l'OMS a été alertée de l'apparition de plusieurs cas de pneumonie d'origine inconnue dans la ville de Wuhan (Chine). Le pathogène à l'origine de ces pneumonies a été identifié : il s'agit d'un nouveau coronavirus baptisé SARS-CoV-2, la maladie associée étant désignée par le terme COVID-19.

Plusieurs options de tests diagnostiques du COVID-19 sont disponibles, il s'agit :

- De **tests antigéniques** qui permettent la détection de protéines spécifiques du SARS-CoV-2. Ces tests peuvent être réalisés sur des prélèvements nasopharyngés, des prélèvements des voies respiratoires basses. Comme les tests de RT-PCR, ces tests permettent le diagnostic précoce de la maladie dès la phase aiguë. **Toutefois, compte de tenu de leurs faibles performances notamment en cas de charge virale basse, ces tests antigéniques ne sont à ce jour pas recommandés en usage clinique dans le cadre du COVID-19**, comme l'a souligné l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans sa position du 08 avril 2020 ;
- De **tests sérologiques** qui permettent la détection des anticorps (Ac) spécifiques (immunoglobulines : Ig) produits par l'organisme et dirigés contre le SARS-CoV-2. Ces tests sont réalisés sur des prélèvements sanguins et pourraient avoir une utilité pour identifier les patients ayant développé une immunité vis-à-vis du SARS-CoV-2 qu'ils aient été symptomatiques ou pas. Par corolaire, les tests sérologiques pourraient identifier dans certaines circonstances les patients étant ou ayant été infectés par le SARS-CoV-2, connaître le statut sérologique de personnes exposées (professionnels de santé par exemple). Enfin, ces tests pourraient également avoir une utilité dans le recueil des données épidémiologiques liées au COVID-19 (patients réellement infectés, taux de mortalité…). Toutefois, la pertinence du recours à ces tests en pratique clinique dépend de la disponibilité préalable de connaissances physiopathologiques, techniques et cliniques permettant leur évaluation et leur validation ;
- Du **test moléculaire de détection du génome du coronavirus SARS-CoV-2 par RT-PCR qui est** à ce jour **la seule technique de diagnostic biologique du COVID-19 recommandée.** Cette technique de RT-PCR permet un diagnostic **lors de la phase aiguë** du COVID-19. Elle est réalisée sur des prélèvements nasopharyngés profonds par écouvillonnage ou des prélèvements des voies respiratoires basses. **Cet acte est remboursé depuis le 07 mars 2020** en fonction de critères définis par la HAS dans son avis du 06 mars 2020 et dans les indications définies et actualisées par les autorités sanitaires. Des tests RT-PCR sur prélèvements salivaires ont également été décrits mais leurs performances n'ont pas été suffisamment évaluées à ce jour pour être recommandés.

Source : HAS • Cahier des charges définissant les modalités d'évaluation des performances des tests sérologiques détectant les anticorps dirigés contre le SARS-CoV-2 • avril 2020

→ 1. Identifier les trois types de tests réalisables pour le diagnostic du COVID-19. Rappeler la nature des molécules recherchées ou dosées dans chaque type de test.

→ 2. Expliquer pourquoi, au 16 avril 2020, la Haute Autorité de Santé ne recommande qu'un seul type de test. Préciser la condition à respecter pour que les résultats de ce test soient exploitables.

DOCUMENT 3 : test sérologique rapide de détection des IgG ou IgM

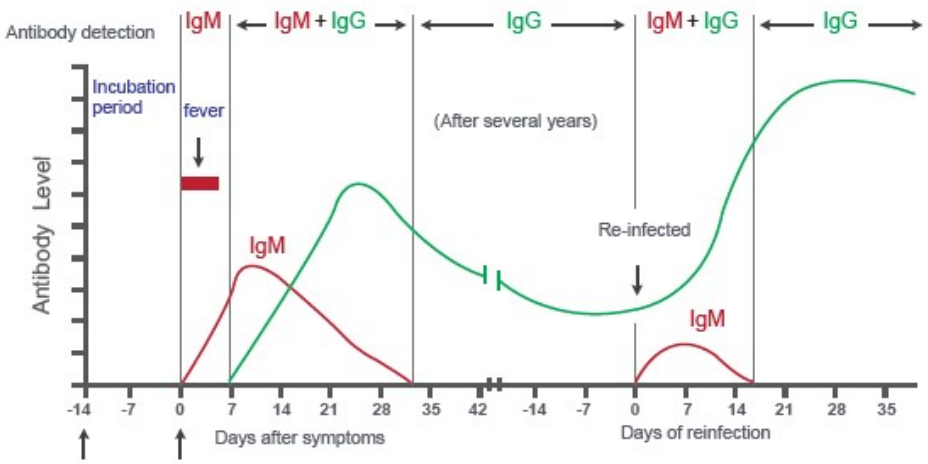
COVID-19 (Corona Virus Disease) est une maladie infectieuse causée par le coronavirus le plus récemment découvert, le SRAS-CoV-2 (2019-nCoV).

Le test rapide, basé sur le principe de l'immunochromatographie à flux latéral (lateral flow assay) et disponible sous forme de cassette, permet une détection qualitative des IgG et des IgM dans le sérum, le sang total ou le plasma humains en 15 min. Les composants du mélange sont séparés lors de leur migration grâce à la force capillaire et la liaison spécifique anticorps-antigène.

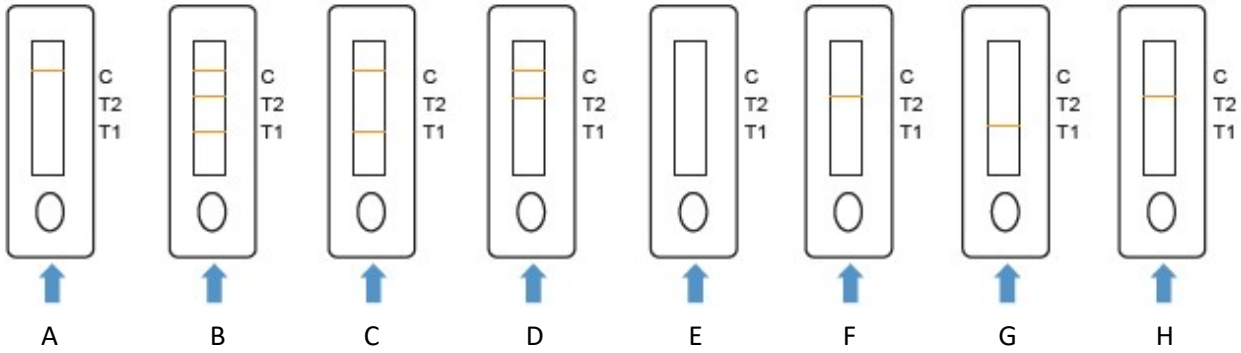
Les IgM et IgG sont des immunoglobulines produites par le système immunitaire pour assurer une protection contre le SRAS-CoV-2. Les deux isotypes d'anticorps IgM et IgG anti-SARS-CoV-2 peuvent donc être détectés dans les échantillons des patients affectés.

La méthode consiste à fixer des anticorps anti-IgG et IgM humaines sur la surface de la cassette et de coupler un antigène du virus avec des particules d'or colloïdal. Si l'échantillon du patient contient des anticorps anti-SARS-CoV-2, alors ces anticorps se fixent à l'antigène présent dans la zone de conjugaison et le complexe formé migre jusqu'aux anti-IgG et/ou IgM humaines fixés sur la membrane. On voit alors apparaître une bande colorée.

Le niveau d'IgM commence à augmenter environ une semaine après l'infection initiale, tandis que les IgG apparaissent plus tard (généralement dans les 14 jours suivant l'infection) et durent 6 mois, voire plusieurs années, ce qui signifie que les IgG servent d'indicateur d'une infection antérieure.

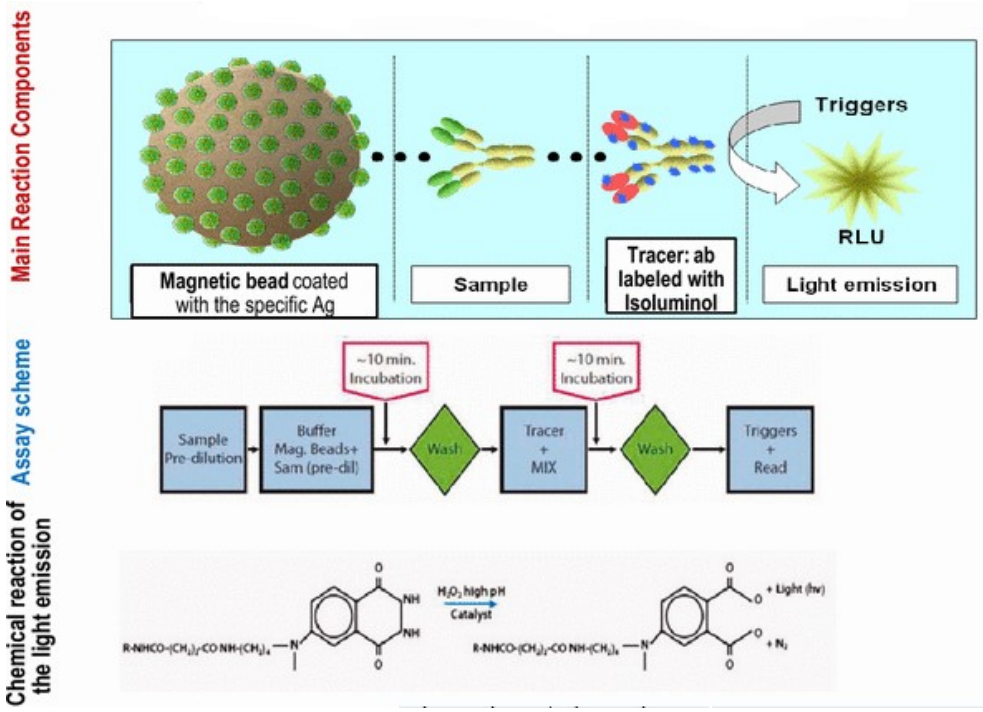


Interprétation des résultats :



→ 3. Analyser les résultats obtenus après réalisation du test sérologique rapide. Expliquer à quoi est due l'apparition d'une ligne colorée sur la bandelette de nitrocellulose.

DOCUMENT 4 : fonctionnement de l'automate YHLO (technologie CLIA) pour le dosage des IgG et IgM. → voir vidéo : https://www.youtube.com/watch?v=kiZuwHcQ0bg



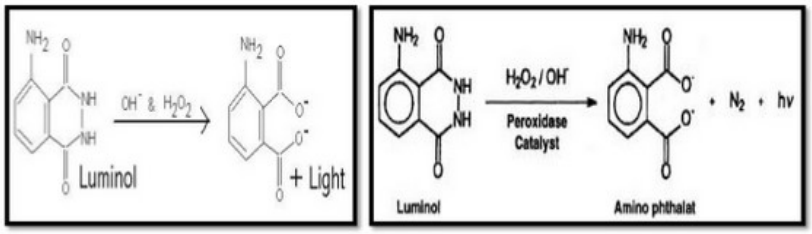
◘ Most common chemiluminescent compounds are :-

♦ A. Luminol :

• It is the first chemiluminescent label used in immunoassays; it emits light energy under alkaline conditions in the presence of peroxide and peroxidase .

• Because peroxidase can serve as the catalyst, assays may use this enzyme as the label; the chemiluminogenic substrate, luminol, will produce light that is directly proportional to the amount of peroxidase present .

$$\text{Luminol} + 2H_2O_2 + OH^- \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{3-aminophthalate} + \text{light (425 nm)}$$



♦ B. Acridinium esters :

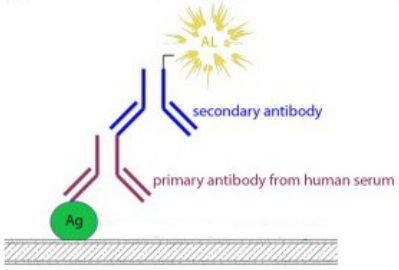
• They are popular chemiluminescent labels composed from triple-ringed organic molecules linked by an ester bond to an organic chain.

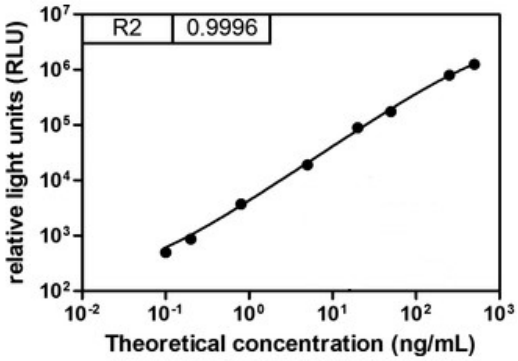
• In the presence of hydrogen peroxide and under alkaline conditions, the ester bond is broken and an unstable molecule (N-methylacridon) remains .

• Light is emitted as the unstable molecule reverts to its more stable ground state .

$$\text{Acridinium ester} + 2H_2O_2 + OH^- \rightarrow \text{N-methylacridron} + Co_2 + H_2O + \text{Light (430nm)}$$

CLIA test utilizing Abs labelled with original acridinium label (AL)





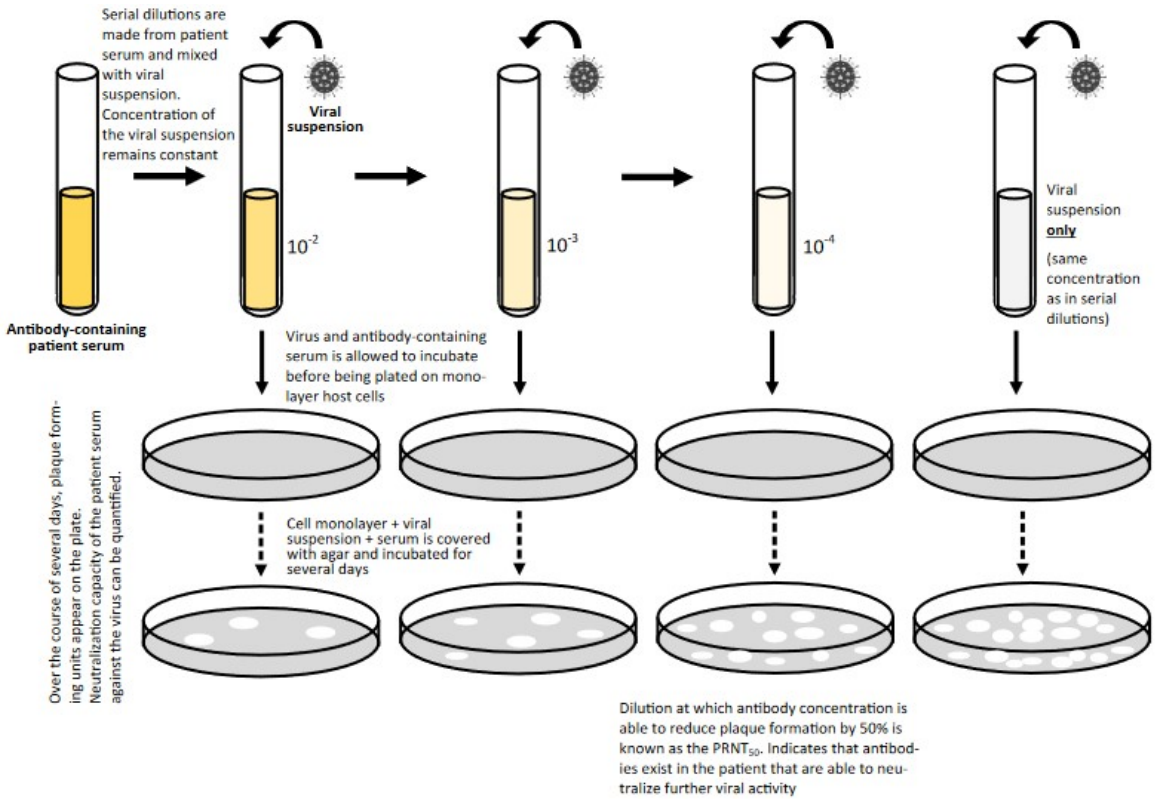
source : https://www.slideshare.net/SciAmany/chemiluminescence-immunoassay-and-immunofluorescence-assay

→ Q4. Donner la signification de l'acronyme "CLIA". Expliquer comment les anticorps dirigés contre le 2019- nCoV sont piégés et expliquer comment se fait l'apparition de la luminescence dans l'automate YHLO.

DOCUMENT 5 : Sérology-based tests for COVID-19

Type of test	Time	What it tells us	What it cannot tell us	Figure
Rapid diagnostic test (RDT) : lateral flow assay	10-30 minutes	The presence or absence (qualitative) of antibodies against the virus present in patient serum.	The quantifiable amount of antibodies in the patient serum, or if these antibodies are able to protect against future infection	Doc 3
Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	1-5 hours	The presence or absence (quantitative) of antibodies against the virus present in patient serum.	If the antibodies are able to protect against future infection.	
Neutralization assay	3-5 days	The presence of active antibodies in patient serum that are able to inhibit virus growth ex vivo, in a cell culture system. Indicates if the patient is protected against future infection.	It may miss antibodies to viral proteins that are not involved in replication.	PRNT figure

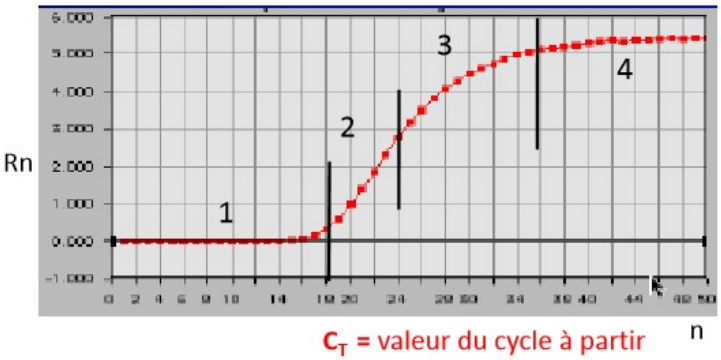
PRNT Figure



source : https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/serology/Serology-based-tests-for-COVID-19.html (last updated on April 15, 2020)

→ Q5. Citer deux tests sérologiques autres que les tests CLIA et immuno-chromatographique. Préciser leurs avantages et inconvénients.

DOCUMENT 6 : principe de la PCR en temps réel (real time), qPCR ou PCR quantitative



Equation de la PCR:

$X_n = X_0 AE^n$

AE: efficacité d'amplification 0<AE<2;
n: nombre de cycles

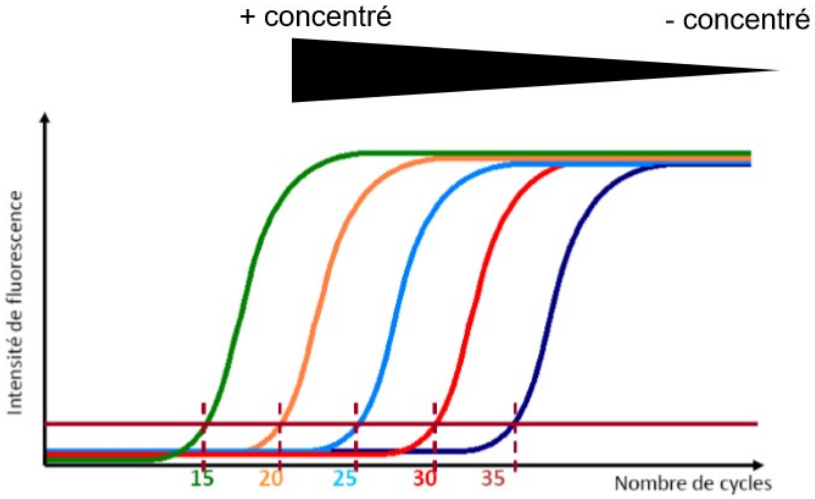
Si AE=2, $X_n = X_0 2^n$

C_T = valeur du cycle à partir duquel le produit devient détectable

✓Phase 1: amplification exponentielle mais produit non détectable
✓Phase 2: amplification exponentielle
✓Phase 3: amplification, phase « log-linéaire »
✓Phase 4: phase de plateau, plus d'amplification (saturation)

➢**PCR classique (en point final):** on regarde les produits au plateau (non quantitatif)

➢**PCR quantitative:** on quantifie les produits pendant tout le déroulement de la PCR (quantitatif dans la phase exponentielle)



▪ **Plus la quantité d'ADN initiale est élevée, plus la valeur de C_T est faible**

Deux procédés permettent d'obtenir la fluorescence mesurable :
- l'incorporation d'un agent intercalant : Sybrgreen…
- l'utilisation de sondes : Taqman, Quantiprobe …

source : Emmanuèle Mouchel-Vielh, atelier épigénétique juin 2012

→ **Voir aussi capsule MOOVLY sur le principe de la PCR en temps réel :**
https://www.youtube.com/watch?v=AZWLysiG3Rg

→ Q6. Le test moléculaire réalisé pour le diagnostic de l'infection en phase aiguë est une q③RT①-PCR②. Expliquer succinctement chacun des éléments constituant ce test moléculaire en expliquant leur rôle.

DOCUMENT 7 : PCR en temps réel QuantiVirus ™ (SARS-CoV-2) Diacarta™

Résumé du test

Trois gènes du SARS-CoV-2, N, Orf1ab et E sont ciblés dans le test qRT-PCR. Les amorces et les sondes Taqman sont conçues dans la région conservée du virus SARS-CoV-2, dans une région génomique spécifique pour permettre une amplification et une détection sensibles et spécifiques de l'ARN viral (figure 1). Le gène humain de la Rnase P est utilisé comme contrôle interne et d'extraction pour surveiller l'efficacité d'extraction de l'ARN viral et évaluer l'ARN / ADN ampifiable dans les échantillons à tester.

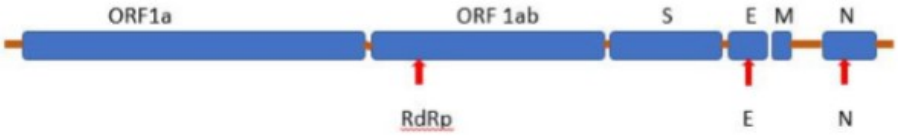
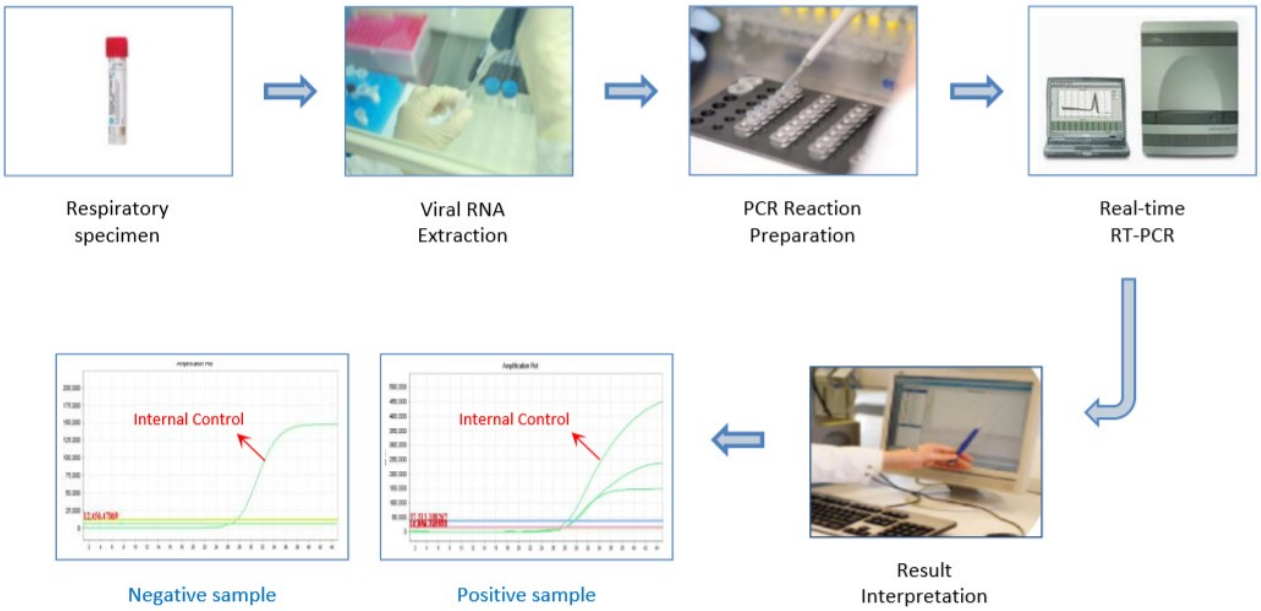


Figure 1. Cible de l'amplicon du génome du SARS-Cov-2 E: gène de la protéine d'enveloppe; M: gène de la protéine membranaire
N: gène de la protéine nucléocapside; ORF: cadre de lecture ouvert; RdRp: gène d'ARN polymérase dépendant de l'ARN; S: gène de la protéine de pointe. La flèche rouge indique la cible du kit de détection DiaCarta sur le génome du SRAS –CoV-2.



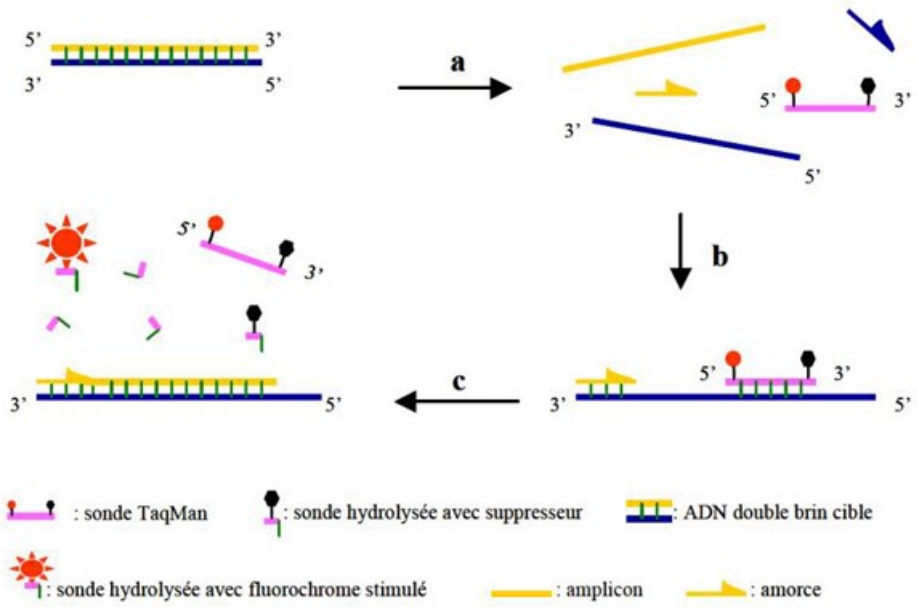
The oligonucleotide primers and probes for detection of 2019-nCoV were selected from regions of the virus nucleocapsid (N) gene. The panel is designed for specific detection of the 2019-nCoV (two primer/probe sets). An additional primer/probe set to detect the human RNase P gene (RP) in control samples and clinical specimens is also included in the panel.

RNA isolated and purified from upper and lower respiratory specimens is reverse transcribed to cDNA and subsequently amplified in the Applied Biosystems 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument with SDS version 1.4 software. In the process, the probe anneals to a specific target sequence located between the forward and reverse primers. During the extension phase of the PCR cycle, the 5' nuclease activity of Taq polymerase degrades the probe, causing the reporter dye to separate from the quencher dye, generating a fluorescent signal. With each cycle, additional reporter dye molecules are cleaved from their respective probes, increasing the fluorescence intensity.

source : https://www.fda.gov/media/134922/download

→ Q7. Repérer et justifier l'étape préalable indispensable à réaliser avant la qRT-PCR. Nommer les gènes du 2019-nCoV amplifiés par le kit Diacarta™.

Apparition de la fluorescence :



Contrôle de qualité de la méthode :

SARS-CoV-2 - Gène N (Mix A)				Référence RP (Mix D)		
Echantillon concentration (copies / µL)	Moyenne Cq	% répliquer Détection	Coefficient variation (%)	Moyenne Cq	% Réplicat Détection	Coefficient de Variation (%)
50	30.987	100	0.894	31.079	100	1.338
25	31.931	100	1.019	31.775	100	1.060
10	34.377	100	2.171	33.173	100	2.886

SARS-CoV-2 - Gène Orf1ab (Mix B)				Référence RP (Mix D)		
Echantillon concentration (copies / µL)	Moyenne Cq	% répliquer Détection	Coefficient variation (%)	Moyenne Cq	% Réplicat Détection	Coefficient de Variation (%)
50	31.336	100	0.762	31.079	100	1.338
25	32.471	100	0.802	31.775	100	1.060
10	34.558	100	2.012	33.173	100	2.886

SARS-CoV-2 - Gène E (Mix C)				Référence RP (Mix D)		
Echantillon concentration (copies / µL)	Moyenne Cq	% répliquer Détection	Coefficient variation (%)	Moyenne Cq	% Réplicat Détection	Coefficient de Variation (%)
50	32.242	100	2.535	31.079	100	1.338
25	33.101	100	1.071	31.775	100	1.060
10	35.529	100	1.527	33.173	100	2.886

donnée : limite d' acceptabilité du test: CV = 3%

→ Q8. Donner la composition moléculaire du contrôle interne de la qRT-PCR et préciser son rôle. Expliquer le mécanisme selon lequel la fluorescence apparaît dans le kit Diacarta™.

→ Q9. Déterminer le nombre moyen de cycles nécessaires pour détecter les gènes du Coronavirus. Identifier le gène le plus rapidement détecté par ce kit de qRT-PCR. Analyser les résultats du contrôle de qualité et conclure.