



Disponible en ligne sur

ASJP
 Algerian Scientific Journal Platform

<https://www.asjp.cerist.dz/en/PresentationRevue/588>


REVUE GENERALE

COVID-19 : Outils diagnostiques au laboratoire.

COVID-19 : Laboratory tools for diagnosis.

Lilya Meriem BERKANI*, Brahim BELAID*, Réda DJIDJIK.

Service d'immunologie médicale, CHU Issad Hassani, Béni Messous

Article reçu le 27-05-2020 ; accepté le 27-05-2020

MOTS CLÉS

COVID-19 ;
 SARS-CoV-2 ;
 Diagnostic moléculaire ;
 Type d'échantillon ;
 Diagnostic sérologique ;
 Interprétation des
 résultats ;
 Cinétique d'évolution de
 la maladie

Résumé

L'épidémie du COVID-19 causée par le coronavirus SARS CoV 2 a eu un impact majeur mondial au cours des derniers mois. Le diagnostic repose sur des arguments épidémiologiques, cliniques, radiologiques et biologiques. Au laboratoire, différents outils peuvent être utilisés permettant le dépistage des personnes infectées, soit directement en détectant le matériel génétique du virus (ARN viral), par des techniques moléculaires représentées principalement par la RT-PCR en temps réel, ou les protéines virales, ou indirectement, en détectant l'immunisation anti-virale faisant suite à l'infection, et ce en recherchant les anticorps d'isotype IgM et IgG anti SARS CoV 2 par différentes techniques. Ces différents outils sont complémentaires et leurs performances diagnostiques dépendent directement de la cinétique de l'évolution de la maladie, permettant, lorsqu'ils sont utilisés à bon escient, d'augmenter la sensibilité diagnostique du COVID-19 au laboratoire.

© 2020 Revue Algérienne d'allergologie. Tous droits réservés.

KEYWORDS

COVID-19, SARS-CoV-2;
 Molecular diagnosis;
 Type of specimen;
 Serological diagnosis;
 Interpretation of results;
 Kinetics of the disease
 course

Abstract

The COVID-19 epidemic caused by the coronavirus SARS CoV 2 has had a worldwide major impact in the recent months. The diagnosis is based on epidemiological, clinical, radiological and biological arguments. In the laboratory, different tools can be used for screening infected persons, either directly by detecting the genetic material of the virus (viral RNA), by molecular assays represented mainly by the real time RT-PCR, or viral proteins, or indirectly, by detecting the anti-viral immunization following the infection, and this by looking for anti SARS CoV2 IgM and IgG antibodies by several methods. These different tools are complementary and their diagnostic performance depends directly on the kinetics of the disease course allowing, when they are used wisely, to increase the diagnostic sensitivity of COVID-19 in the laboratory.

© 2020 Revue Algérienne d'allergologie. All rights reserved.

* Auteur correspondant :

Adresse e-mail : berkani.lm.immuno@gmail.com (L M. Berkani), brahimld@gmail.com (B. Belaid).

Introduction

L'utilisation des tests diagnostiques pour l'identification des personnes présentant une infection causée par le virus SARS CoV 2 (Severe Acute Respiratory Syndrom coronavirus -2) nommée : Coronavirus disease 2019 ou COVID-19, a été primordiale pour le contrôle de l'épidémie mondiale qui a débuté à la fin de l'année 2019. Cette dernière continue à toucher une bonne partie du globe. Dans quelques pays, l'utilisation de ces tests à grande échelle a été la pierre angulaire du succès des stratégies de confinement. Dans d'autres, où la capacité de tests est limitée, une stratégie de priorisation de l'utilisation de ces tests pour un groupe de personnes a été adoptée. Les tests diagnostiques ne cessent d'évoluer et la compréhension de la nature de ces tests, de l'indication de leur utilisation et de l'interprétation des résultats obtenus, est d'une importance capitale (1).

Vu la non spécificité des symptômes cliniques liés au COVID-19, le diagnostic de ce dernier repose sur des outils radiologiques (Tomodensitométrie) et biologiques. Ces derniers peuvent être directs basés sur l'identification du virus en détectant l'ARN viral (Diagnostic moléculaire) ou les protéines virales (Tests antigéniques), ou indirects basés sur la détection des anticorps anti SARS CoV2 développés après l'infection (Tests sérologiques) (2).

Indications des outils biologiques du COVID-19

Théoriquement, les outils biologiques du COVID-19 auraient pour indications (1) :

- Dépistage des patients asymptomatiques.
- Dépistage des patients durant la phase d'incubation.
- Dépistage des patients symptomatiques (Diagnostic).
- Prise de décision d'instaurer un traitement.
- Prise de décision d'arrêt de l'isolement.
- Suivi de l'élimination du virus.

Si d'excellents outils diagnostiques existent pour le dépistage des patients symptomatiques, des lacunes importantes subsistent pour le dépistage des patients asymptomatiques durant la phase d'incubation ainsi que pour la détermination précise de l'élimination du virus vivant durant la phase de convalescence, afin de décider de l'arrêt de l'isolement du patient (1).

Définition du virus

Le virus SARS CoV 2 est un virus enveloppé, à ARN simple brin (~30,000 nucléotides), appartenant à la famille des Coronaviridae, le genre Betacoronavirus et le sous genre Sarbecovirus.

Le génome viral code pour 27 protéines dont l'ARN polymérase ARN dépendante (RNA polymerase RNA dependant ou RpRd), l'hémagglutinine estérase (HE), les cadres de lecture ouverts « ORF, Open Reading Frames » ORF1a et ORF1b, et quatre protéines structurales : Glycoprotéine de surface « Spike ou S », protéine de l'enveloppe « E », protéine de la matrice « M » et protéine de

la nucléocapside « N » (Figure 1). Le SARS CoV2 présente une grande similitude génétique avec le SARS-CoV, notamment pour les protéines S (76,0%), E (94,7%), M (90,1%) et N (90,6%) (2).

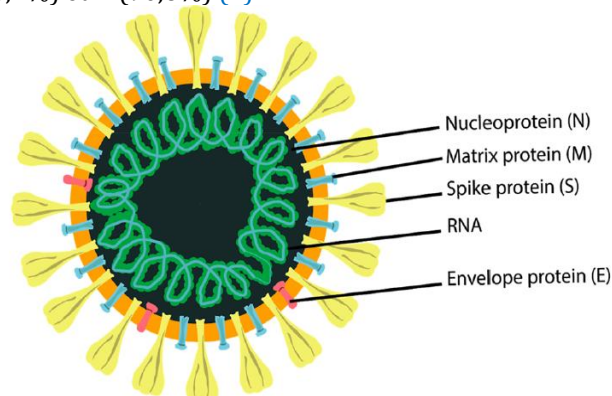


Figure 1: Structure du virus SARS CoV 2 (2).

1. Diagnostic biologique direct du COVID-19

1.1. Diagnostic moléculaire du COVID-19

Le diagnostic moléculaire du COVID-19 repose sur des tests d'amplification des acides nucléiques (Nucleic Acid Amplification Tests ou NAAT), dont la technique de RT-PCR (Retrotranscription - Polymerase Chain Reaction) en temps réel ou RT-qPCR est recommandée (gold standard) (3-6). En dépit de sa grande sensibilité et spécificité, cette technique n'est pas épargnée des résultats faussement négatifs. Les principaux facteurs à l'origine de ces faux négatifs au diagnostic sont (7):

- Le délai entre le début des symptômes et la réalisation du test.
- Le type de prélèvement.
- La technique de réalisation du prélèvement.
- Les conditions de transport du prélèvement.
- La limite de détection des tests (LOD).

Les techniques de séquençage du génome du virus comme le NGS (Next Generation Sequencing) ont été essentielles à l'identification initiale du SARS CoV2 et seront utiles dans le futur pour l'identification des différentes mutations virales (8). Cependant, ces techniques ne peuvent être utilisées en pratique quotidienne pour le diagnostic moléculaire du COVID-19 (9).

1.1.1. Cinétique de la détection de l'ARN viral

Dans l'étude de Xiao et al. portant sur 56 patients présentant un COVID-19 confirmé léger ou modéré, la majorité des résultats de RT PCR étaient positifs dans les trois premières semaines après le début de symptômes. A partir de la 3^{ème} semaine, le nombre de résultats négatifs augmentait. Enfin, tous les résultats étaient négatifs à la 6^{ème} semaine après le début des symptômes. Le taux de positivité était le plus élevé à la première semaine (100%) suivi respectivement par des taux de positivité de 89.3%, 66.1%, 32.1%, 5.4% et 0% aux semaines 2, 3, 4, 5 et 6 (Figure 2)(10).

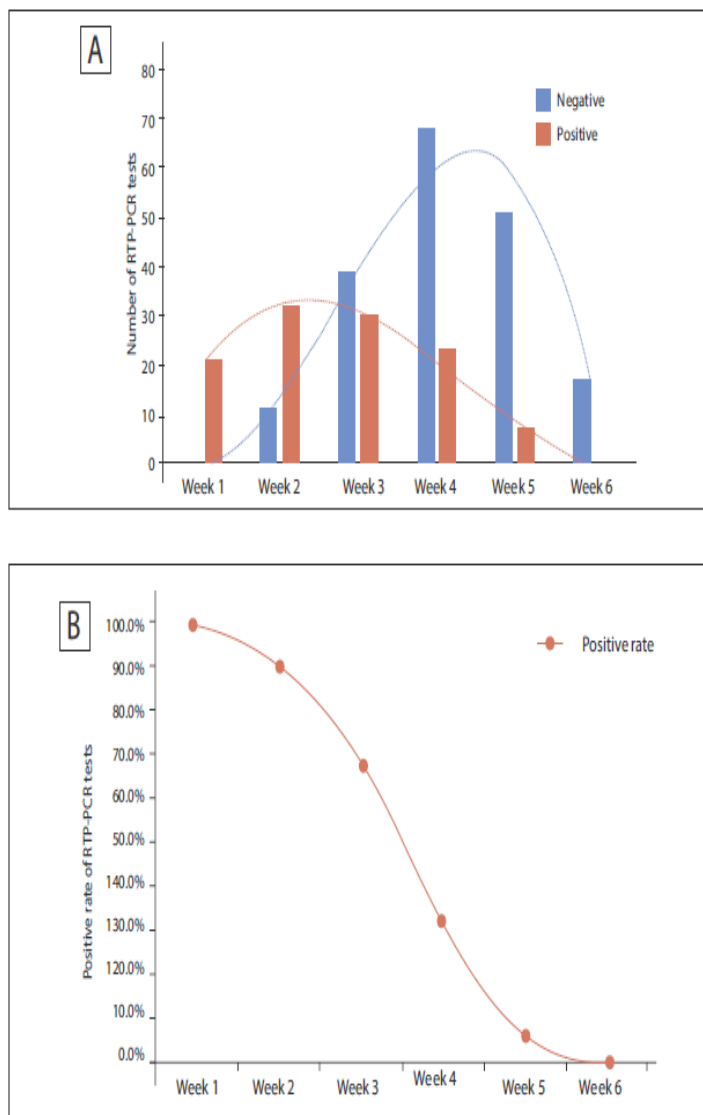


Figure 2 : Profil dynamique de la RT-PCR pour le virus SARS CoV2 (10).

Dans une autre étude chinoise, *Zhao et al.* ont rapporté une sensibilité de la détection moléculaire du SARS CoV 2 de 66,7% dans la première semaine suivant le début des symptômes, 54% durant la deuxième semaine et enfin 45,5% entre 15 et 39 jours après le début des symptômes, et ce dans différents échantillons issus des voies respiratoires (11).

La charge virale du SARS CoV2 varie en fonction du stade du COVID19. En effet, des charges virales plus importantes ainsi qu'une élimination virale prolongée ont été rapportées pour les formes sévères, en comparaison avec les formes modérées et asymptomatiques (12).

Plusieurs facteurs ont été rapportés comme étant associés à une élimination prolongée du virus : le sexe masculin, l'âge avancé, une hypertension artérielle (HTA) concomitante, une hospitalisation tardive, un stade sévère de la maladie à l'admission, une ventilation mécanique invasive ainsi qu'un

traitement par les corticoïdes (13).

1.1.2. Etapes pré-analytiques

1.1.2.1. Collecte et transport des prélèvements

En se basant sur la biologie du virus SARS CoV2 chez l'Homme, les principaux prélèvements effectués à visée diagnostique sont issus des voies respiratoires supérieures : Ecouvillons nasopharyngés (NP), oropharyngés (OP), aspiration nasale,... ou inférieures comme les crachats, le liquide bronchoalvéolaire (LBA), l'aspiration endotrachéale et la biopsie bronchique (9). Le recours à d'autres types de prélèvements comme les selles est envisageable (9).

Le choix du type de prélèvement dépend de sa sensibilité à détecter le virus, et du délai par rapport au début des symptômes cliniques (9). *Wang et al.* ont rapporté les résultats de la détection du virus dans différents types de prélèvements (Tableau 1). Par ailleurs, ces données ont pour limite de ne pas avoir été corrélées aux symptômes cliniques et à la durée d'évolution de la maladie (14).

Tableau 1 : Résultats de la détection du virus par RT-PCR dans les différents types de prélèvements (14).

Echantillon	Résultat positif (%)
LBA (n=15)	14 (93)
Biopsie bronchique (n=13)	6 (46)
Crachats (n= 104)	75 (72)
Ec NP (n= 8)	5 (63)
Ec OP (n= 398)	126 (32)
Selles (n=153)	44 (29)
Sang (n=307)	3 (1)
Urines (n=72)	0

Les écouvillons NP et/ou OP sont le plus souvent recommandés pour le screening ou le diagnostic d'une infection récente (15). Etant donné sa meilleure tolérance par le patient et sa plus grande innocuité pour le préleveur, le prélèvement NP est préférable. De plus, ce type de prélèvement atteint préférentiellement la zone correcte à tester ce qui explique sa meilleure sensibilité (63%) en comparaison avec les prélèvements OP (32%) (14).

La technique de réalisation du prélèvement NP est d'une importance capitale (Figure 3). L'écouvillon doit être introduit en profondeur dans la cavité nasale et doit susciter un larmoiement. Le fléchissement des patients indiquera que l'écouvillon a atteint la cible. Les prélèvements OP doivent susciter un réflexe nauséux, mais une grande variabilité de réponse existe entre les patients. Les écouvillons doivent être maintenus en place pendant 10 secondes en les faisant pivoter trois fois. Les écouvillons doivent être constitués de fibres synthétiques floquées non

toxiques comme le polyester, favorisant la collecte et le déchargement du matériel cellulaire, et d'une tige en plastique ou en aluminium (1). Les écouvillons contenant de l'alginate de calcium, du bois ou du coton doivent être évités car ils peuvent contenir des substances inhibant la réaction de PCR (1).

La collecte des écouvillons NP/OP comporte un risque théorique de transmission du virus (17). Le port d'un équipement de protection individuelle (EPI) par le préleveur est indispensable (3). Une option alternative à la collecte des écouvillons NP/OP est la collecte de la salive par le patient et l'aspiration nasale (9).

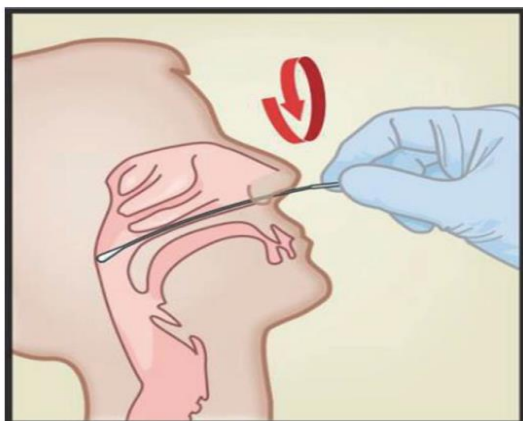


Figure 3: Réalisation d'un écouvillonnage naso-pharyngé (16).

Idéalement, les crachats ou le LBA devraient être utilisés pour la collecte des prélèvements à partir des voies respiratoires, essentiellement dans les phases tardives de l'évolution de la maladie, étant donné qu'ils renferment les charges virales les plus élevées du SARS CoV2 (18). Si intubation du patient, la réalisation de ces prélèvements durant cette procédure est souhaitable (9).

Cependant, des charges virales élevées du virus SARS CoV2 ont également été détectées dans les selles des patients présentant un COVID-19 (19) ainsi qu'une clearance retardée à partir des voies respiratoires lors des stades avancés de l'évolution clinique de la maladie (17). Ainsi, en plus des prélèvements directs à partir des voies respiratoires, un écouvillonnage rectal suivi d'une détection par une RT-PCR en temps réel est préférable dans les cas avancés de la maladie (9).

Après leur collecte, les écouvillons doivent être placés dans un milieu de transport universel pour les virus, et transportés rapidement au laboratoire, idéalement dans des conditions réfrigérées (3,20). Certains milieux contiennent des sels de guanidinium permettant l'inactivation du virus vivant durant le transport de l'échantillon (9). Le tableau 2 regroupe les conditions de transport et de conservation des différents types d'échantillons (3).

Tableau 2: Collecte, transport et conservation des échantillons (3).

Specimen type	Collection materials	Storage temperature until testing in-country laboratory	Recommended temperature for shipment according to expected shipment time
Nasopharyngeal and oropharyngeal swab	Dacron or polyester flocked swabs*	2-8 °C	2-8 °C if ≤5 days -70 °C (dry ice) if >5 days
Bronchoalveolar lavage	Sterile container *	2-8 °C	2-8 °C if ≤2 days -70 °C (dry ice) if >2 days
(Endo)tracheal aspirate, nasopharyngeal or nasal wash/aspirate	Sterile container *	2-8 °C	2-8 °C if ≤2 days -70 °C (dry ice) if >2 days
Sputum	Sterile container	2-8 °C	2-8 °C if ≤2 days -70 °C (dry ice) if >2 days
Tissue from biopsy or autopsy including from lung.	Sterile container with saline or VTM.	2-8 °C	2-8 °C if ≤24 hours -70 °C (dry ice) if >24 hours
Serum	Serum separator tubes (adults: collect 3-5 ml whole blood).	2-8 °C	2-8 °C if ≤5 days -70 °C (dry ice) if >5 days
Whole blood	Collection tube	2-8 °C	2-8 °C if ≤5 days -70 °C (dry ice) if >5 days
Stool	Stool container	2-8 °C	2-8 °C if ≤5 days -70 °C (dry ice) if >5 days
Urine	Urine collection container	2-8 °C	2-8 °C if ≤5 days -70 °C (dry ice) if >5 days

Cependant, il est à noter qu'il est possible de passer à côté d'une infection récente en prélevant les échantillons NP et OP. Dans ce cas, une répétition du test ou l'obtention de prélèvements des voies respiratoires inférieures pourront être requis. De plus, d'autres virus respiratoires pathogènes comme l'influenza et le virus respiratoire syncytial doivent être exclus (9).

De différentes façons, le COVID-19 a souligné la différence clé entre la sensibilité « analytique » qui est la capacité d'un test à détecter un pathogène s'il est présent dans un échantillon, et la sensibilité « clinique » qui est la capacité d'un test à identifier le statut infectieux global chez un patient. La répétition du test est indispensable si le patient présente des signes cliniques et/ou radiologiques avec un historique d'exposition potentielle. Un résultat négatif unique pourrait impacter les décisions en rapport avec la mise en quarantaine du patient et la distanciation sociale, particulièrement s'il s'agit du personnel de santé.

1.1.2.2. Mesures de biosécurité pour la manipulation des échantillons en vue d'une réalisation d'une RT-PCR

La manipulation des échantillons respiratoires doit se faire dans un poste de sécurité microbiologique (PSM) de classe II. La culture du virus requière l'utilisation d'un PSM de classe III au minimum (3).

1.1.3. Etapes analytiques

La détection de l'ARN viral par RT-PCR en temps réel se fait en plusieurs étapes : une étape d'extraction du matériel génétique du virus (ARN viral) manuelle ou automatisée, une étape de rétro transcription de cet ARN en ADN complémentaire (RT-PCR) en utilisant une rétrotranscriptase comme la MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus), et enfin une amplification en temps réel de cet ADNc en plusieurs copies permettant sa détection (PCR en temps réel ou PCR quantitative = qPCR). Les étapes de RT-PCR et PCR en temps réel se font le plus souvent en une seule étape (One step).

La détection utilise le plus souvent la technologie des sondes d'hydrolyse (TaqMan®) basée sur l'utilisation d'une sonde spécifique de la cible recherchée, marquée à un fluorochrome. Ainsi, on aura autant de fluorochromes que de cibles recherchées si les cibles sont détectées simultanément dans le même puits (Multiplexage). Cette technique est qualitative, elle ne pourra que renseigner sur la présence ou l'absence de l'ARN viral dans l'échantillon analysé.

1.1.3.1. Extraction de l'ARN viral du SARS CoV2

Afin d'extraire l'ARN du virus, une étape de lyse chimique doit être réalisée sous PSM2 en utilisant un tampon de lyse, contenant des agents inactivateurs à base de sels de guanidinium (Dénaturant aussi les RNAses et DNAses) ainsi que des détergents non dénaturants. Cette étape permettra une désorganisation de l'architecture virale (Enveloppe, membrane et nucléocapside) permettant ainsi la libération de l'ARN viral. Un RNA carrier est ajouté dans la plupart des

kits commerciaux afin d'optimiser le rendement, surtout lorsque les charges virales sont faibles dans l'échantillon de départ. L'ARN viral libéré sera retenu grâce à sa fixation sur des particules de silice, tapissant une colonne chromatographique ou des billes magnétiques selon le kit fourni. Cette étape de lyse sera suivie par plusieurs étapes de lavage et enfin d'éluion qui permettra la récupération de l'ARN viral.

Cette étape d'extraction a été rendue automatique par plusieurs fournisseurs limitant ainsi le risque de contamination entre les différents échantillons. Une inactivation thermique des échantillons peut être réalisée au préalable (56°C pendant 30 minutes ou 72°C pendant 5 minutes) afin d'inactiver le virus vivant et diminuer son infectivité (9). Par ailleurs, le non-respect de la durée de cette inactivation peut être à l'origine de la dégradation de l'ARN viral (9).

1.1.3.2. Tests permettant la détection de l'ARN viral du SARS CoV2

La plupart des tests développés à ce jour se sont basés sur le principe d'une RT-PCR en temps réel, comme ceux des centres américains de contrôle et de prévention des maladies (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) (21), de l'institut Charité de virologie à Berlin (Allemagne) (5), ainsi que ceux de l'université chinoise de Hong Kong (22).

En dehors de la RT PCR en temps réel, d'autres méthodes moléculaires ont été développées et évaluées dans le monde pour la détection du SARS CoV2, incluant la technique RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-mediated isothermal Amplification), NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), amplification recombinase polymérase, caractérisées par une amplification isotherme des acides nucléiques, ainsi que la technique CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) (2).

En outre, plusieurs systèmes fermés assurant l'extraction des acides nucléiques, l'amplification (RT PCR en temps réel ou autre) et la détection ont été développés et commercialisés afin de permettre une détection rapide de l'ARN viral à partir des différents échantillons (Résultats en une heure de temps au maximum). Les échantillons sont transférés sous PSM 2 dans une cartouche qui sera par la suite scellée et introduite dans l'instrument correspondant rendant leur utilisation très simple (9).

Parmi ces tests basés sur l'utilisation des cartouches, les tests : Abbott ID NOW® (Abbott Laboratories), BioFire FilmArray® (bioMérieux), cobas Liat® (Roche Diagnostics), et GeneXpert® (Cepheid) ont été autorisés à être utilisés au lit du malade, en dehors du laboratoire (*Point-of-care molecular diagnostics*) (23).

1.1.3.3. Sélection des cibles virales à détecter par RT PCR en temps réel

L'avantage majeur de la technique de RT PCR en temps réel est que l'amplification et l'analyse se font simultanément dans un système fermé afin de minimiser les résultats faussement positifs liés à une contamination par des produits d'amplification. Plusieurs instruments de PCR en temps réel peuvent être utilisés (Applied Biosystems®, Light Cycler®, Rotorgene®,...). Plusieurs cibles moléculaires du virus peuvent être utilisées dans les tests RT-PCR. Elles incluent les protéines structurales : Glycoprotéines de l'enveloppe S (Spike), l'enveloppe (E), la matrice (M), l'hémagglutinine estérase (HE) et la nucléocapside (N), ainsi que les gènes nécessaires à la réplication virale : l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp), l'hélicase (Hel), ainsi que les cadres de lecture ouverts « ORF, Open Reading Frames » ORF1a et ORF1b (24–26). Aux Etats Unis, le CDC recommande deux cibles : les protéines de la nucléocapside N1 et N2 (21) alors que l'OMS recommande de faire un premier dépistage avec le gène E suivi par une confirmation avec le gène RdRp (5). *Chan et al.* ont développé et comparé les performances de 3 essais RT PCR en temps réel ciblant les gènes RdRp/Hel, S et N du SARS CoV2. Parmi eux, le test ciblant la RpRd/Hel présente la limite de détection la plus basse in vitro et une sensibilité et spécificité les plus élevées (26). Cependant, les performances d'un test sont généralement dictées par le design du réactif et non par la cible elle-même, car les gènes viraux sont présents en nombre égal de copies.

Afin d'éviter les réactions croisées avec d'autres coronavirus endémiques ainsi que les dérives génétiques potentielles du virus, au moins deux cibles moléculaires doivent être incluses dans l'essai. Aux Etats Unis, le CDC a sélectionné deux loci dans le gène de la nucléocapside, qui semblent donner de bons résultats (21). Une autre étude a utilisé deux séquences codant pour l'ORF1b et la nucléocapside qui sont hautement conservées parmi les Sarbecovirus (4). Une étude chinoise a opté pour deux cibles : la nucléocapside pour le dépistage initial suivi par une confirmation par l'ORF1b (22). En Allemagne, deux cibles : l'enveloppe et la RdRp ont été sélectionnées (5). À ce jour, rien n'indique que l'une de ces séquences utilisées offre un avantage pour le diagnostic clinique. Cependant, la conception idéale comprendrait au moins une région conservée et une région spécifique pour atténuer les effets de la dérive génétique, d'autant plus que le virus évolue au sein de nouvelles populations (9).

À côté des cibles virales, un contrôle interne visant à valider les étapes de RT PCR et PCR en temps réel et même parfois l'étape d'extraction de l'ARN pour chaque échantillon, est introduit. Ce dernier a pour cible en général de l'ARN humain (exemple : RNase P).

1.1.4 Etapes post analytiques: Interprétation des résultats

À la fin de l'amplification, l'analyse se fera manuellement en ajustant le seuil (Threshold) au niveau de la phase logarithmique ou exponentielle de la courbe d'amplification (Représentation en Log). La valeur « Ct » ou Cycle threshold est le nombre de cycles à partir duquel l'amplification est significative (Fluorescence au-dessus du bruit de fond). Il s'agit du point d'intersection entre la ligne seuil et la courbe d'amplification (Figure 4). Il existe une relation inversement proportionnelle entre la valeur du Ct et la charge virale : Plus la charge virale est importante dans l'échantillon initial, plus le Ct est faible et inversement.

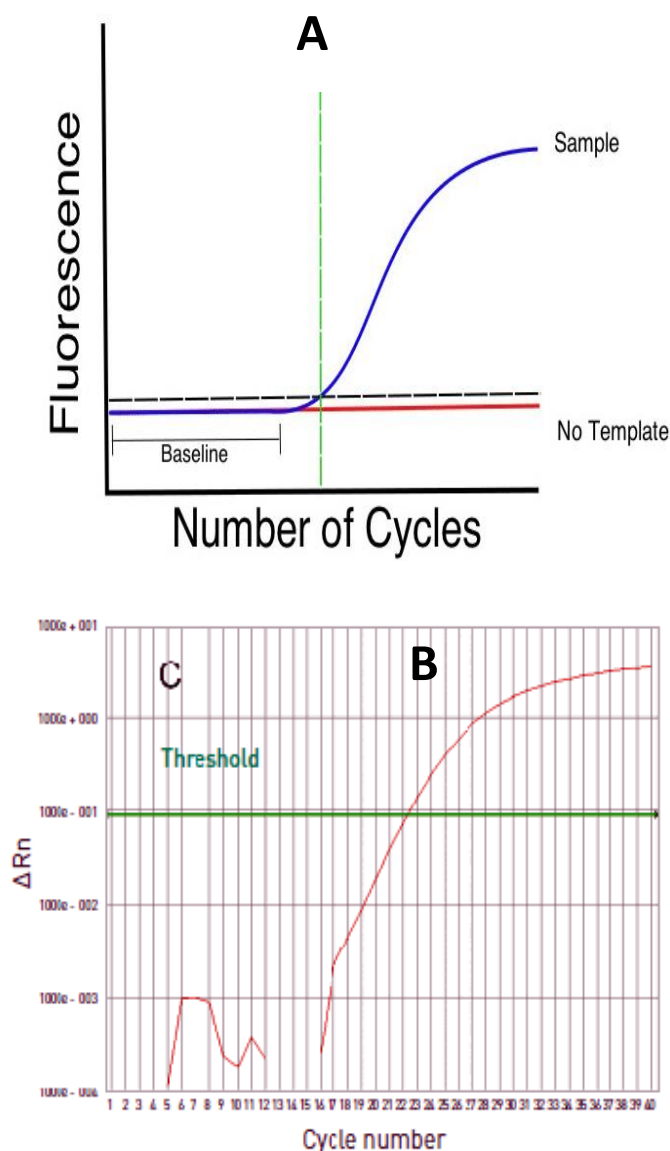


Figure 4 : Représentation schématique d'une courbe d'amplification.

A : Représentation linéaire. B : Représentation en Log.

La validation des contrôles positifs, négatifs et du contrôle interne pour chaque échantillon est indispensable avant de procéder à l'analyse de la présence ou l'absence de l'ARN viral pour chaque échantillon. Il est à noter que le contrôle interne peut ne pas être amplifié dans les échantillons positifs.

Aux Etats Unis, initialement si les deux cibles (N1 et N2) sont positives, un cas est considéré confirmé par le laboratoire (21). Une valeur de Ct inférieure à 40 définit un résultat positif, alors qu'une valeur supérieure ou égale à 40 définit un résultat négatif. Une valeur de Ct inférieure à 40 pour une seule cible définit un résultat indéterminé et nécessitera une confirmation en retestant l'échantillon (21). Actuellement en Chine, pour les essais comportant trois cibles, un résultat positif pour au moins deux cibles est considéré positif (9).

Les charges virales déterminées par RT-PCR en temps réel ne devraient pas être utilisées pour indiquer la sévérité de la maladie ou le suivi de la réponse au traitement, même si une corrélation entre ces paramètres a été rapportée (15,27,28). Cependant, des Ct faibles indiquant des charges virales élevées pourraient être utilisés comme une indication de transmissibilité du virus (17).

En outre, les valeurs de Ct obtenus chez les patients hospitalisés à un stade sévère sont plus bas que celles des formes modérées, et la positivité de la RT PCR peut persister 3 semaines après le début des symptômes, alors que la RT PCR se négative pour la plupart des formes modérées (29).

Enfin, une RT PCR positive reflète seulement la détection de l'ARN viral et n'indique pas forcément la présence du virus vivant (30).

1.1.5. La RT qPCR pour tester la guérison et l'infectivité

Un suivi des patients après résolution de la pneumonie du COVID-19 est important afin de définir la fin de l'isolement ou l'hospitalisation. A la fin de cette dernière, les patients continuent à porter le virus vivant et peuvent contaminer d'autres personnes (31).

Plusieurs critères d'arrêt de l'isolement et/ou d'hospitalisation des patients COVID-19 ont été établis par les différents pays pour les patients symptomatiques. En plus de la résolution des paramètres cliniques, une négativation de la RT PCR sur deux prélèvements NP ou OP consécutifs (Deux au minimum pour les critères du CDC américain), à un intervalle de 24h au minimum, pour la majorité des critères (32).

Chez certains cas, une RT PCR positive a été rapportée après 2 RT PCR consécutives négatives à 24h d'intervalle. Il n'est pas encore clair s'il s'agit d'une erreur d'interprétation, d'une réinfection ou d'une réactivation. Dans une étude portant sur 9 patients, l'isolement du virus en culture n'a pas été possible au-delà de 8 jours après le début des symptômes, ce qui corrèle avec le déclin de l'infectivité au-delà de la première semaine de l'évolution de la maladie (30).

1.2. Tests antigéniques pour le diagnostic biologique du COVID-19

Des tests immunologiques ont été développés afin de permettre une détection rapide des antigènes du SARS CoV2 qui sont le plus souvent des tests immunochromatographiques. Théoriquement, ces tests ont pour avantage de fournir un résultat rapide avec un plus faible coût mais manquent de sensibilité, comme c'était le cas avec les virus influenza (33,34).

Des anticorps monoclonaux spécifiques du SARS CoV2 (Glycoprotéine spike « S » ou protéine de la nucléocapside « N ») ont été produits et différents tests rapides antigéniques ont été développés (2,9,35). Vu la variabilité de la charge virale d'un patient à l'autre, de faux négatifs peuvent être obtenus avec ces tests en fonction de la charge virale du patient et de l'échantillon prélevé (2,9).

2. Diagnostic biologique indirect ou sérologique du COVID-19

2.1. Dynamique sérologique du COVID-19

La Haute Autorité de la Santé (HAS) résume les connaissances actuelles sur la dynamique sérologique de COVID-19 : "La production d'IgM débute à partir du 5^{ème} jour suivant l'apparition des symptômes, deviendrait détectable chez certains patients à partir du 7^{ème} jour et chez la totalité des patients au cours de la 2^{ème} semaine après l'apparition des symptômes. La production des IgG survient légèrement en décalé par rapport celle des IgM, mais peut également être fréquemment quasi concomitante de cette dernière. La production d'IgM et/ou d'IgG est donc détectable chez les patients symptomatiques à partir de la 2^{ème} semaine suivant l'apparition des symptômes. Les taux d'anticorps semblent plus élevés pour les cas les plus sévères (Figure 5) (12,36). Il a également été rapporté des cas avec des productions d'anticorps plus tardives, au-delà du 15^{ème} jour après l'apparition des symptômes, et jusqu'à 30 jours après l'infection, notamment chez des patients asymptomatiques ou paucisymptomatiques (36). La cinétique de production d'IgM et/ou d'IgG est encore aujourd'hui principalement mal caractérisée chez les patients asymptomatiques ou paucisymptomatiques.

D'après l'analyse de l'épitope antigénique du SARS-CoV et du SARS-CoV-2 (37), les protéines N et S devraient être des cibles potentielles d'antigène avec un grand nombre d'épitopes pour l'induction de la réponse des lymphocytes T et de la réponse des lymphocytes B, ce qui pourrait montrer des perspectives prometteuses pour le développement de vaccins et l'induction de réponses immunitaires à long terme. De plus, plusieurs lambeaux structuraux de preuves montrent que la protéine S est cruciale pour l'entrée du SARS-CoV-2 dans les cellules hôtes (38,39) et l'administration d'anticorps contre la protéine S bloque l'entrée dans les cellules, ce qui pourrait donner un plan pour le développement de vaccin pour le COVID-19 ciblant les épitopes de la protéine S (40).

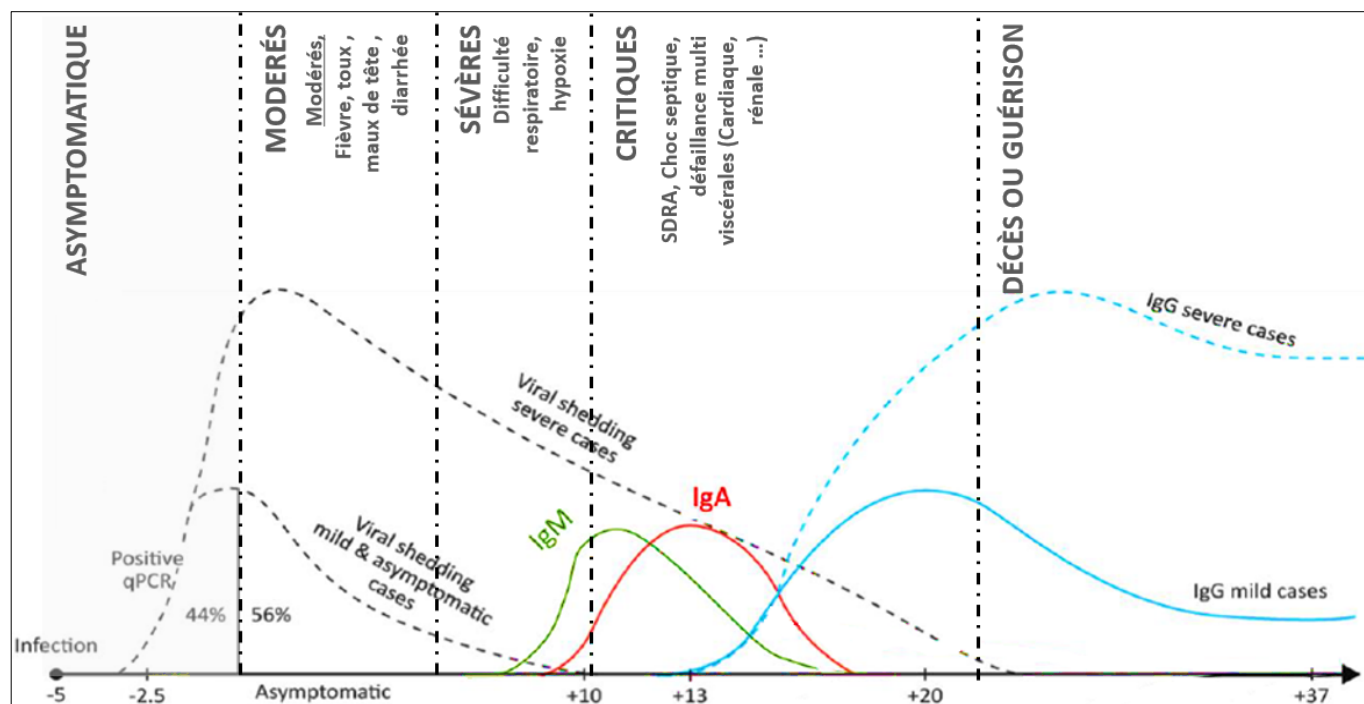


Figure 5 : Différentes évolutions cliniques, cinétique de la réponse immunitaire adaptative et l'élimination virale dans le COVID-19 (12).

En revanche, la plupart des données sérologiques actuellement disponibles dans la littérature concernent des patients examinés principalement dans la phase aiguë de la maladie.

Par conséquent, elles sont insuffisantes pour établir exactement la durabilité des titres d'anticorps de chaque pic d'isotype lorsqu'ils finissent par disparaître. Les taux d'IgG sériques semblent cependant proportionnels à l'intensité de la charge virale et à la sévérité des symptômes (11,41).

2.2. Tests sérologiques et immunologiques

Les tests sérologiques sont définis comme une analyse du sérum ou du plasma sanguin et ont été étendus sur d'autres fluides biologiques pour la détection de la présence d'anticorps IgM, IgA et IgG. Ils offrent certains avantages par rapport à la RT-PCR (42) :

- Les tests sérologiques détectent les anticorps qui sont connus pour être beaucoup plus stables que l'ARN viral. En conséquence, les échantillons sérologiques IgM/IgG sont moins sensibles à la détérioration pendant le prélèvement, le transport, le stockage que les échantillons destinés à la RT-PCR.

- Les anticorps sont généralement uniformément distribués dans le sang, les échantillons sérologiques ont des variations beaucoup moins importantes que les échantillons d'ARN viral issus des prélèvements nasopharyngés et peuvent être facilement collectés avec une gène mineure liée au prélèvement pour le patient.

- Contrairement à la RT-PCR, les tests sérologiques peuvent détecter une infection ancienne car les anticorps spécifiques du virus (contrairement à l'ARN viral) peuvent persister dans le sang pendant plusieurs semaines / mois après le début des symptômes.

Ces tests ont un énorme potentiel pour l'épidémiologie du COVID-19 mais les résultats des tests peuvent être affectés par au moins trois situations (43) :

- Un sous-groupe de sujets avec un résultat positif des tests moléculaires (RT-PCR) pour le SARS-CoV-2 sont séronégatives en raison du retard dans la production d'anticorps après l'infection,
- Les sujets peuvent être séropositifs mais négatifs pour les tests moléculaires reflétant la clairance d'une infection plus précoce et plus bénigne,
- Sensibilité et spécificité limitées des dosages. Le dernier problème est particulièrement important car même un petit pourcentage de résultats faussement positifs en raison d'une faible spécificité (réaction croisée) peut conduire à une prévalence prédictive trompeuse des anticorps dans une population donnée, ce qui peut avoir un impact indésirable sur les décisions socio-économiques et la confiance générale du public dans les résultats.

2.2.1. Test immunochromatographique en flux latéral (test rapide)

Une fois entré dans les cellules hôtes, le SRAS-CoV-2 provoque le système immunitaire adaptatif dans le corps de l'hôte. 3 à 6 jours après l'infection, les anticorps IgM seront produits, tandis que les anticorps IgG seront générés 8 jours après l'infection. Ainsi, ces anticorps contre le SRAS-CoV-2 peuvent être détectés dans le sang du patient. De plus, les IgM tendent à être des indicateurs de l'exposition récente au virus, tandis que les IgG indiquent une infection virale plus précoce.

Les IgM et les IgG peuvent être déterminées sur la base d'interactions anticorps-antigène très spécifiques. En bref, ajoutez 10 à 15 µl de sang, de sérum ou de plasma et 70 µl de

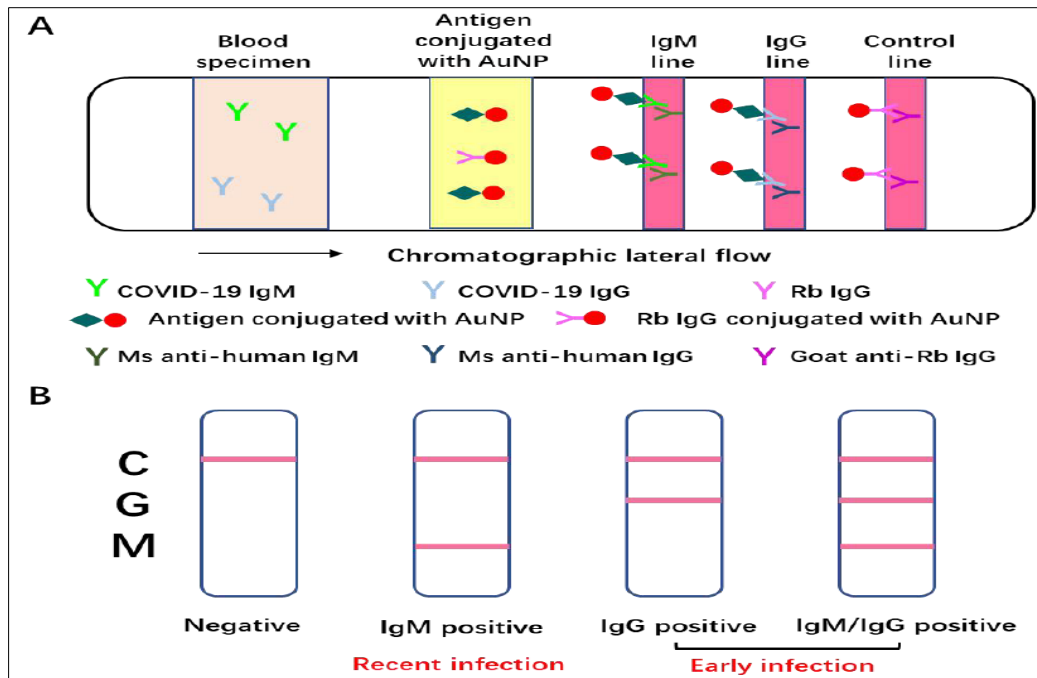


Figure 6: Illustration schématique de l'immunochromatographie en flux latéral (44).

A : Diagramme schématique du dispositif rapide de détection d'anticorps combinés IgM-IgG SARS-CoV-2;

B : Une illustration des différents résultats des tests. C : ligne de détection d'anticorps combinés IgM-IgG SARS-CoV-2 ;

tampon de dilution d'échantillon. Lorsque l'échantillon de sang s'écoule à travers l'antigène recombinant SARS-CoV-2 (domaine de liaison aux récepteurs de la protéine spike) marqué par des colloïdes de nanoparticules d'or (AuNP) à 40 nm via un flux latéral chromatographique, un complexe d'antigène IgM-AuNP/IgG-antigène-AuNP se formera. Ensuite, ce complexe continue de se déplacer et passe à travers l'anticorps anti-IgM/G humain enduit de souris à la ligne de revêtement M/G, ils formeront un complexe d'or colloïdal sandwich à double anticorps, montrant une bande de couleur à la ligne de revêtement (rouge/violet). Le liquide en excès continue de circuler à travers la ligne de contrôle, l'AuP conjugué IgG de lapin interagira avec l'IgG anti-lapin de chèvre, présentant une bande de couleur au niveau de la ligne de contrôle (44). Ce test d'écoulement latéral au point d'intervention utilise un or colloïdal comme indicateur pour déterminer les IgM / G contre le SRAS-CoV-2, qui est un indice fiable et visuel pour le dépistage rapide des porteurs du SRAS-CoV-2 (Figure 6).

Avantages et inconvénients

-Avantages

- Facile à utiliser et à utiliser à grande échelle.
- Aucune exigence d'équipement supplémentaire.
- Bonne sensibilité (88,66%) et spécificité (90,63%).
- Coût faible et rapide (moins de 15 minutes).

-Inconvénients

Longue période de fenêtre. Il est difficile de détecter les infections précoces, car les anticorps IgM ne peuvent être détectés que dans le sang du patient 3 à 6 jours après l'infection, tandis que les IgG peuvent être détectés 8 jours après l'infection.

2.2.2. Dosage immunoenzymatique (ELISA)

L'ELISA est une technique de micropuits sur plaque conçue pour détecter et quantifier des substances telles que des peptides, des protéines, des anticorps et des hormones. Le test peut être qualitatif ou quantitatif, et le délai d'obtention des résultats est généralement de 1 à 5 heures. Dans le cas du SRAS-CoV-2 comme le montre la figure 7, les puits de plaque sont généralement recouverts d'une protéine virale. S'ils sont présents, les anticorps antiviraux dans les échantillons de patients se lieront spécifiquement, et le complexe anticorps-antigène lié peut être détecté avec un anticorps conjugué supplémentaire pour produire une lecture colorimétrique. Le test ELISA est rapide et a la capacité de tester plusieurs échantillons et est adaptable à l'automatisation pour un débit accru, mais peut être variable en sensibilité.

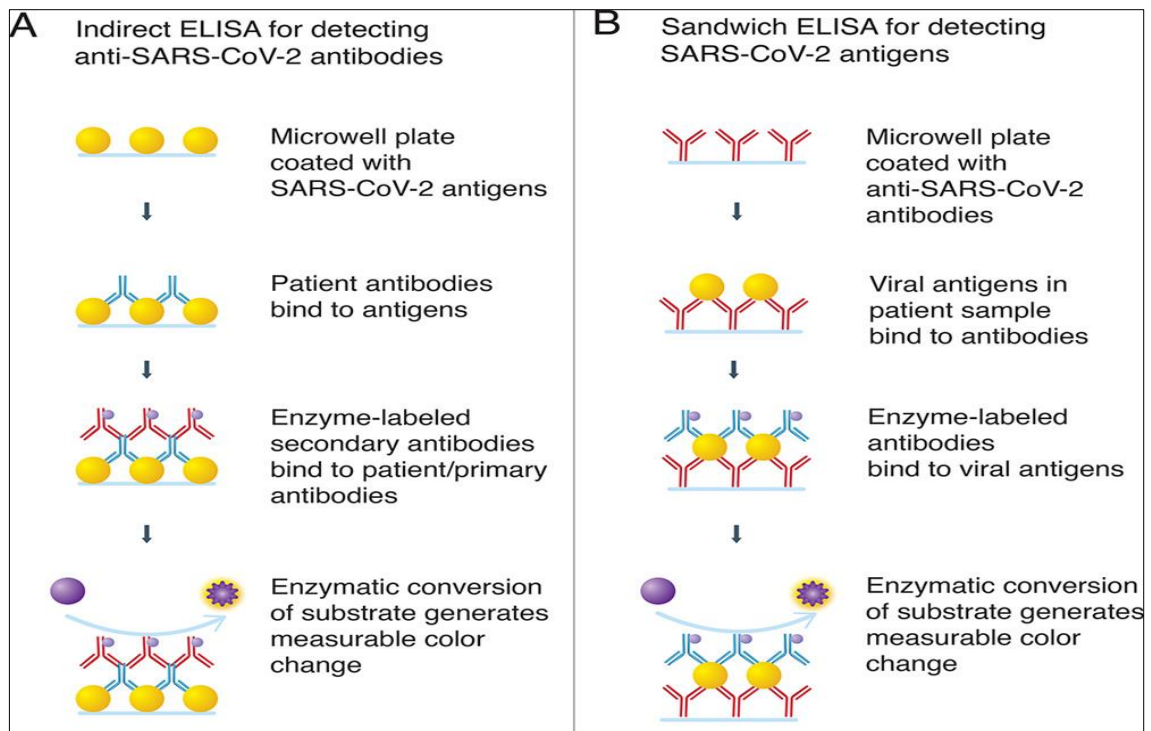


Figure 7: Dosages ELISA détectant les anticorps (A) ou les antigènes (B) (42).

Dosages luminescents

Les immunodosages luminescents comprennent des méthodes qui améliorent les limites de détection des réactifs à base d'anticorps. Généralement, ils impliquent une chimiluminescence et une fluorescence. *Cai et al.* ont développé un immunodosage par enzyme de chimioluminescence magnétique à base de peptides pour le diagnostic de COVID-19, et Diazyme Laboratories, Inc. (San Diego, Californie) a annoncé la disponibilité de deux nouveaux tests sérologiques entièrement automatisés pour le SRAS-CoV-2 qui sont exécutés sur le système entièrement automatisé Analyseur de chimioluminescence (45).

Test de neutralisation :

Les tests de neutralisation déterminent la capacité d'un anticorps à inhiber l'infection virale des cellules en culture et les effets cytopathogènes résultants de la réplication virale.

Pour ce test, des échantillons de sang total, de sérum ou de plasma de patients sont dilués et ajoutés à des concentrations décroissantes aux cultures cellulaires. Si des

anticorps neutralisants sont présents, leurs niveaux peuvent être mesurés en déterminant le seuil auquel ils sont capables d'empêcher la réplication virale dans les cultures de cellules infectées. Le délai d'obtention des résultats pour les tests de neutralisation est généralement de 3 à 5 jours, mais les progrès récents l'ont réduit à quelques heures (46). Ce type de test nécessite des installations de culture cellulaire et, dans le cas du coronavirus du SRAS, les laboratoires de biosécurité de niveau 3. Malgré ces limites, la détermination des anticorps neutralisants est importante à court terme pour l'application thérapeutique du plasma convalescent et, à long terme, pour le développement de vaccins.

2.3. Comment interpréter les résultats des tests sérologiques IgM/IgG?

Les tests sérologiques IgM/IgG sont conçus pour compléter RT-PCR dans le diagnostic des infections par le SRAS-CoV-2. Le tableau 3 montre l'interprétation clinique de toutes les situations possibles qui peuvent être rencontrées lors du test d'un patient avec à la fois RT-qPCR et un test sérologique IgM / IgG.

Tableau 3: Signification clinique d'un résultat de test sérologique IgM / IgG.

Résultat du test			Signification clinique
RT-qPCR	IgM	IgG	
+	-	-	Patient peut être dans la fenêtre de l'infection
+	+	-	Patient peut être dans le stade précoce de l'infection
+	+	+	Patient dans la phase active de l'infection
+	-	+	Patient peut être au stade tardif ou récurrent de l'infection
-	+	-	Patient peut être dans le stade précoce de l'infection. Résultat faux négatif de la RT-PCR
-	-	+	Patient peut avoir eu l'infection dans le passé, et s'est rétabli
-	+	+	Patient peut être au stade de rétablissement de l'infection. Résultat faux négatif de la RT-PCR

Ce tableau est basé sur les connaissances actuelles sur l'augmentation et la diminution de l'ARN viral et des antigènes du SRAS-CoV-2, des anticorps IgM et IgG (Figure 5) et la corrélation de ces variations avec le moment initial de l'infection, l'apparition des symptômes et phase de récupération (28,47).

La conclusion clé est que les résultats des tests sérologiques IgM/IgG et la RT-qPCR ne doivent pas être nécessairement en accord. Un désaccord entre les deux tests, peut souvent être attribué aux points de temps après l'infection auxquels les tests ont été effectués. Dans l'ensemble, bien que le test RT-qPCR puisse être approprié pour la détection du SRAS-CoV-2 pendant la phase aiguë, l'IgM / IgG est le test approprié pendant la phase chronique. Étant donné que le moment exact de l'infection est souvent inconnu, la combinaison des tests RT-qPCR et IgM / IgG peut améliorer la précision du diagnostic COVID-19.

Indications et non-indications des tests sérologiques :

Indications :

Dans le tableau 4 ci-dessous sont présentées différentes indications en fonction de la présentation clinique (patient asymptomatique, symptomatique sans signes de gravité ou avec des signes de gravité) pour lesquelles sont définis(36) :

- La population cible du test et les raisons pour lesquelles un diagnostic ou un dépistage systématique sérologique serait pertinent ;
- La finalité du test (diagnostic initial, diagnostic de rattrapage, diagnostic étiologique à distance, santé publique) ;
- La séquence des tests, ainsi que la temporalité de réalisation ;
- Les isotypes d'immunoglobulines à rechercher.

Non-indications :

Sur la base de la littérature analysée et de la position des experts, les non-indications des tests sérologiques sont :

- Diagnostic initial d'un patient symptomatique présentant ou non des signes de gravité pour lequel l'examen clinique et la RT-PCR ont été réalisés lors de la première semaine après apparition des symptômes et sont concordants ;
- Test des personnes-contacts d'un patient confirmé ou suspecté ;
- Suivi de l'infection COVID-19 ;
- Sortie hospitalière ;
- Test de dépistage systématique chez les résidents d'hébergements collectifs non symptomatiques, notamment sociaux et médicosociaux. Il est rappelé qu'en cas de nécessité de diagnostic de rattrapage, notamment en cas de RT-PCR non réalisée, le recours aux tests sérologiques sur prescription médicale peut être envisagé, conformément à l'indication précédemment définie ;
- Test de dépistage chez les patients à risque de forme grave de COVID-19 ;
- Test de dépistage chez les groupes socio-professionnels confinés ou non confinés ;
- Test de dépistage chez les patients en vue d'une hospitalisation. Il est rappelé qu'en cas de nécessité de diagnostic de rattrapage, notamment en cas de RT-PCR non réalisée, le recours aux tests sérologiques sur prescription médicale peut être envisagé, conformément à l'indication précédemment définie.

Ces non-indications seront revues à mesure que les connaissances sur la protection conférée par les anticorps s'étofferont et seront à adapter en fonction de l'évolution de la spécificité des tests. Elles pourront également être adaptées en fonction de la prévalence localement observée.

Tableau 4: Indications des tests sérologiques détectant les anticorps anti-SARS-CoV-2 (36).

Présentation clinique	Population cible	Finalité du test	Séquences des tests et temporalité de réalisation détaillée à partir du jour de l'exposition (JE) si asymptomatique ou du jour de l'apparition de symptômes (JAS) si symptomatique	Isotype Ig à rechercher
Patients symptomatiques avec signes de gravités	Patients hospitalisés	Diagnostic initial	Si tableau clinique ou scanographique évocateur et RT-PCR négative, recours à la sérologie à partir de JAS 7.	Recherche d'IgG et d'IgM ou d'Ig totales
		Diagnostic de rattrapage	Si tableau clinique ou scanographique évocateur et absence de RT-PCR avant JAS 7, sérologie à partir JAS 7.	Recherche d'IgG et d'IgM ou d'Ig totales
Patients symptomatiques sans signe de gravité	Patients suivis en ville ou en structure d'hébergement	Diagnostic initial	Si tableau clinique évocateur et RT-PCR négative entre JAS 1 et 6, recours à la sérologie à partir de JAS 14.	Recherche d'IgG et d'IgM ou d'Ig totales
		Diagnostic de rattrapage	Si tableau clinique évocateur et absence de RT-PCR avant JAS 7, sérologie à partir JAS 14.	Recherche d'IgG et d'IgM ou d'Ig totales
	Patients suivis en ville ou en structure d'hébergement avec diagnostic syndromique	Diagnostic étiologique à distance	Si patient uniquement diagnostiqué cliniquement (depuis l'entrée en vigueur de la phase 2 en semaine 10 2020), sérologie possible pour confirmation à distance de l'infection COVID-19.	Recherche d'IgG et d'IgM ou d'Ig totales
Personnel asymptomatique	Professionnels soignants	Santé publique	Dépistage et détection personnes-contacts par RT-PCR selon les recommandations en vigueur. Possibilité de sérologie complémentaire en cas de RT-PCR négative mais uniquement à l'échelon individuel (autour d'un cas) sur prescription médicale.	Recherche d'IgG et d'IgM ou d'Ig totales
	Personnel d'hébergements collectifs	Santé publique	Dépistage et détection personnes-contacts par RT-PCR selon les recommandations en vigueur. Possibilité de sérologie complémentaire en cas de RT-PCR négative mais uniquement à l'échelon individuel (autour d'un cas) sur prescription médicale.	Recherche d'IgG et d'IgM ou d'Ig totales

Conclusion:

Les tests directs et indirects constituent des outils indispensables dans le diagnostic biologique du COVID-19. Ces tests sont complémentaires et chacun d'eux garde sa place dans l'algorithme diagnostique de cette infection, suivant la cinétique d'évolution de la maladie. La combinaison des

tests moléculaires et sérologiques permettrait d'atteindre une sensibilité de 78 % durant la première semaine, 97% à la deuxième semaine et de 100% au-delà. Le tableau 5 regroupe les performances des tests diagnostiques moléculaires et sérologiques à différents temps de l'évolution de la maladie, extrait de l'étude réalisée par *Zhao et al* (11).

Tableau 5 : Performances des différents tests diagnostiques à différents temps de l'évolution de la maladie (11).

Days after onset	n	RNA		Ab		IgM		IgG		RNA+Ab	
		n(+)	Sensitivity (% , 95%CI)	n(+)	Sensitivity (% , 95%CI)	n(+)	Sensitivity (% , 95%CI)	n(+)	Sensitivity (% , 95%CI)	n(+)	Sensitivity (% , 95%CI)
Total	173	112 ^s	67.1 (59.4, 74.1)	161	93.1 (88.2, 96.4)	143	82.7 (76.2, 88)	112	64.7 (57.1, 71.8)	172	99.4 (96.8, 100.0)
1-7	94	58 ^s	66.7 (55.7, 76.4)	36	38.3 (28.5, 48.9)	27	28.7 (19.9, 39.0)	18	19.1 (11.8, 28.6)	74	78.7 (69.1, 86.5)
8-14	135	67 ^s	54.0 (44.8, 63.0)	121	89.6 (83.2, 94.2)	99	73.3 (65.0, 80.6)	73	54.1 (45.3, 62.7)	131	97.0 (92.6, 99.2)
15-39	90	25 ^s	45.5 (32.0, 59.5)	90	100.0 (96.0, 100.0)	83*	94.3 (87.2, 98.1)	71 [#]	79.8 (69.9, 87.6)	90	100.0 (96.0, 100.0)

L'utilisation combinée de ces deux tests diagnostiques 3. constituerait un outil essentiel dans l'élaboration de stratégies permettant d'assouplir les mesures actuelles de santé publique.

Enfin, plusieurs questions demeurent sans réponses, comme celles sur la durée de l'immunisation potentielle chez les 4. individus infectés par le SARS CoV2, qu'ils soient asymptomatiques ou symptomatiques.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêt.

Références bibliographiques :

1. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus-2: A Narrative Review. *Ann Intern Med* [Internet]. 13 avr 2020 [cité 10 mai 2020]; Disponible sur: <https://annals.org/aim/fullarticle/2764737/diagnostic-testing-severe-acute-respiratory-syndrome-related-coronavirus-2-narrative>

2. Udagama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano*. 28 avr 2020;14(4):3822-35.

3. Organization WH. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. 2020 [cité 10 mai 2020]; Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>

4. Chu D, Pan Y, Cheng S, Hui K, Krishnan P, Liu Y, et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem*. 31 janv 2020;66.

5. 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*. 23 janv 2020;25(3):2000045.

6. Emery SL, Erdman DD, Bowen MD, Newton BR, Winchell JM, Meyer RF, et al. Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay for SARS-associated Coronavirus. *Emerg Infect Dis*. févr 2004;10(2):311-6.

7. False Negatives and Reinfections: the Challenges of SARS-CoV-2 RT-PCR Testing [Internet]. *ASM.org*. [cité 10 mai 2020]. Disponible sur: <https://asm.org/Articles/2020/April/False-Negatives-and-Reinfections-the-Challenges-of-SARS-CoV-2-RT-PCR-Testing>.

8. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. mars 2020;579(7798):270-3. 20
9. The Laboratory Diagnosis of COVID-19 Infection: Current Issues and Challenges | *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. [cité 10 mai 2020]. Disponible sur: <https://jcm.asm.org/content/early/2020/04/03/JCM.00512-20> 21
10. Xiao AT, Tong YX, Zhang S. Profile of RT-PCR for SARS-CoV-2: a preliminary study from 56 COVID-19 patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. [cité 10 mai 2020]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa460/5822175>
11. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 28 mars 2020; 23
12. Matricardi PM, Negro RWD, Nisini R. The first, holistic immunological model of COVID-19: implications for 24 prevention, diagnosis, and public health measures. *Pediatr Allergy Immunol* [Internet]. [cité 13 mai 2020];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pai.13271> 25
13. Xu K, Chen Y, Yuan J, Yi P, Ding C, Wu W, et al. Factors associated with prolonged viral RNA shedding in patients 26 with COVID-19. *Clin Infect Dis* [Internet]. [cité 10 mai 2020]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa351/5818308>
14. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 11 mars 2020; 27
15. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*. 19 2020;382(12):1177-9. 28
16. GeneXpert Xpert Xpress SARS CoV2 Instructions for use [Internet]. [cité 10 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/media/136314/download>
17. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 26 mars 2020;382(13):1199-207.
18. Yu F, Yan L, Wang N, Yang S, Wang L, Tang Y, et al. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 28 mars 2020;
19. Zhang W, Du R-H, Li B, Zheng X-S, Yang X-L, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):386-9.
20. Druce J, Garcia K, Tran T, Papadakis G, Birch C. Evaluation of swabs, transport media, and specimen transport conditions for optimal detection of viruses by PCR. *J Clin Microbiol*. mars 2012;50(3):1064-5.
21. Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, et al. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N Engl J Med*. 5 mars 2020;382(10):929-36.
22. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, To KK-W, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet Lond Engl*. 15 2020;395(10223):514-23.
23. A Hogan C, Caya C, Papenburg J. Rapid and simple molecular tests for the detection of respiratory syncytial virus: a review. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(7):617-29.
24. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(3):181-92.
25. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 22 févr 2020;395(10224):565-74.
26. Chan JF-W, Yip CC-Y, To KK-W, Tang TH-C, Wong SC-Y, Leung K-H, et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hex Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*. 23 2020;58(5).
27. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(4):411-2.
28. To KK-W, Tsang OT-Y, Leung W-S, Tam AR, Wu T-C, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 1 mai 2020;20(5):565-74.
29. Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* [Internet]. 21 avr 2020 [cité 10 mai 2020];369. Disponible sur: <https://www.bmj.com/content/369/bmj.m1443>
30. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 1 avr 2020;1-5.

31. Isakbaeva ET, Khetsuriani N, Beard RS, Peck A, Erdman D, Monroe SS, et al. SARS-associated Coronavirus Transmission, United States. *Emerg Infect Dis.* févr 2004;10(2):225-31.
32. Novel coronavirus (SARS-CoV-2) - Discharge criteria for confirmed COVID-19 cases [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2020 [cité 10 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/novel-coronavirus-sars-cov-2-discharge-criteria-confirmed-covid-19-cases>
33. Chen Y, Chan K-H, Hong C, Kang Y, Ge S, Chen H, et al. A highly specific rapid antigen detection assay for on-site diagnosis of MERS. *J Infect.* 2016;73(1):82-4.
34. Lau SKP, Woo PCY, Wong BHL, Tsoi H-W, Woo GKS, Poon RWS, et al. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein in SARS Patients by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microbiol.* juill 2004;42(7):2884-9.
35. Diao B, Wen K, Chen J, Liu Y, Yuan Z, Han C, et al. Diagnosis of Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection by Detection of Nucleocapsid Protein. *medRxiv.* 13 mars 2020;2020.03.07.20032524.
36. Dalour S. Place des tests sérologiques dans la prise en charge de la maladie COVID-19. 2020;9.
37. Ahmed SF, Quadeer AA, McKay MR. Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. *Viruses.* mars 2020;12(3):254.
38. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 16 2020;181(2):271-280.e8.
39. Xiaolong C. An Insight of comparison between COVID-19 (2019-nCoV disease) and SARS in pathology and pathogenesis. 2020.
40. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 16 avr 2020;181(2):281-292.e6.
41. Woo PCY, Lau SKP, Wong BHL, Chan K, Chu C, Tsoi H, et al. Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol.* juill 2004;11(4):665-8.
42. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci.* 30 avr 2020;591-605.
43. Serology testing of COVID19 John Hopkins center for health security.pdf [Internet]. [cité 13 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-fact-sheets/200228-Serology-testing-COVID.pdf>
44. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol.* 27 févr 2020;
45. Cai X, Chen J, Hu J, Long Q, Deng H, Fan K, et al. A Peptide-based Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Serological Diagnosis of Corona Virus Disease 2019 (COVID-19). *medRxiv.* 25 févr 2020;2020.02.22.20026617.
46. En P, J P, Cj VR, Mr H, L B, S Y, et al. Scalable, Semi-Automated Fluorescence Reduction Neutralization Assay for Qualitative Assessment of Ebola Virus-Neutralizing Antibodies in Human Clinical Samples [Internet]. Vol. 14, *PLoS one.* PLoS One; 2019 [cité 13 mai 2020]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31454374/>
47. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med* [Internet]. 2020 [cité 13 mai 2020]; Disponible sur: <https://dx.doi.org/10.7326/M20-0504>