

information
formation
recherche
coopération internationale

SRAS : méthodes et critères diagnostiques; précautions en laboratoire

Michel Couillard, Ph.D., Hugues Charest, Ph.D.,
Christiane Claessens, M.Sc., Jean Joly, MD
Laboratoire de santé publique du Québec

1^{er} décembre 2003

Institut national
de santé publique
Québec

Événements marquants mondiaux

- Mi-novembre 2002 : premiers cas de pneumonie atypique en Chine
- 21 février 2003 : hôtel Metropole
- 12 mars : alerte de pneumonie atypique par l'OMS
- 14 mars : premiers cas en Ontario
- 8 avril [*The Lancet* en ligne] : un coronavirus est la cause possible du SRAS
- 1^{er} mai [*Science* en ligne] : séquence complète du coronavirus humain associé au SRAS (SRAS CoV)
- 15 mai [*Nature*] : transmission de l'infection chez le macaque

2 formation

Institut national
de santé publique
Québec

Tests pour le SRAS au Québec

- 3 avril 2003 : premiers échantillons envoyés à Winnipeg pour analyses SRAS
- 4 avril : premiers RT-PCR hMPV au LSPQ
- 28 avril : le LSPQ reçoit des sécrétions nasopharyngées SRAS CoV+ envoyées de Toronto par le CPHL
- 29 avril : premiers RT-PCR diagnostiques pour le SRAS CoV au LSPQ



3



Institut national
de santé publique
Québec



Plan de la présentation

- Méthodes de diagnostic
- Type d'échantillons
- Critères diagnostiques
- Biosécurité en laboratoire

4



Institut national
de santé publique
Québec



Diagnostic virologique en laboratoire

5 approches

- visualisation
- isolement viral
- détection d'antigènes
- détection d'acides nucléiques
- détection d'anticorps (sérodiagnostic)

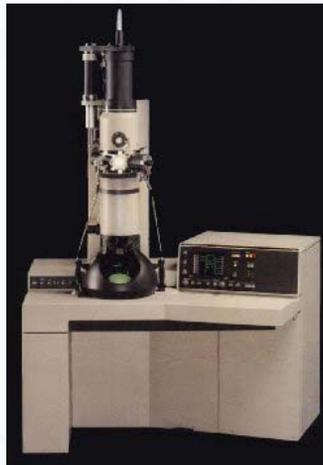
5



Institut national
de santé publique
Québec



Visualisation en microscopie électronique



6



Institut national
de santé publique
Québec



Isolement viral

- Épreuve de référence
- Nécessite un niveau de confinement 3
- Virus fastidieux
- Multiplication sur Vero E6
 - Infection par foyers
 - Cellules infectées arrondies et réfringentes
- Identification par RT-PCR

7



Institut national
de santé publique
Québec



Détection d'antigènes

- Concentration insuffisante de virus dans les échantillons cliniques ?
- Détection à l'aide d'anticorps spécifiques
- Pas de trousse disponibles

8

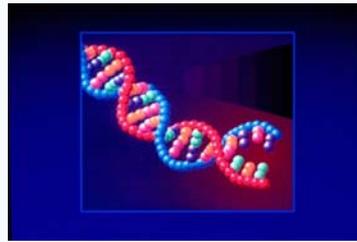


Institut national
de santé publique
Québec



Détection d'acides nucléiques – RT-PCR

- Différentes approches
- Épreuves très sensibles
- Choix des amorces



Amorces spécifiques développées pour la détection du SRAS CoV

Urbani
 Toronto
 Frankfurt
 G250
 OC43
 229E

GACAGAGCCATGCCTAACATGCTTAGGATAAATGGCCCTCTCTTGTCTTCTGCTCGCAAAACATAACACTTGGCTGTAACCTTATCACACCGTTTC

Urbani
 Toronto
 Frankfurt
 G250
 OC43
 229E

TACAGGTTAGCTAACGAGTGTGCCAAGTATTAAGTGAGATGGTCATGTGTGGCGGCTCACATATATGTTAAACAGGTGGAAATCATCC

Urbani
 Toronto
 Frankfurt
 G250
 OC43
 229E

GGTGATGCTACAACCTGCTTATGCTAATAGTGTCTTTAACATTTGTCAAGCTGTACAGCCAATGT-AAATGCACCTTCTTCAACTGATGG

Urbani
 Toronto
 Frankfurt
 G250
 OC43
 229E

TAATAAGTAGTGCACAGTATGTCGGCAATCTACACACAGGCTCTATGAGTGTCTCTATAGAAATAGGGATGTTGATCATGAATTCGT

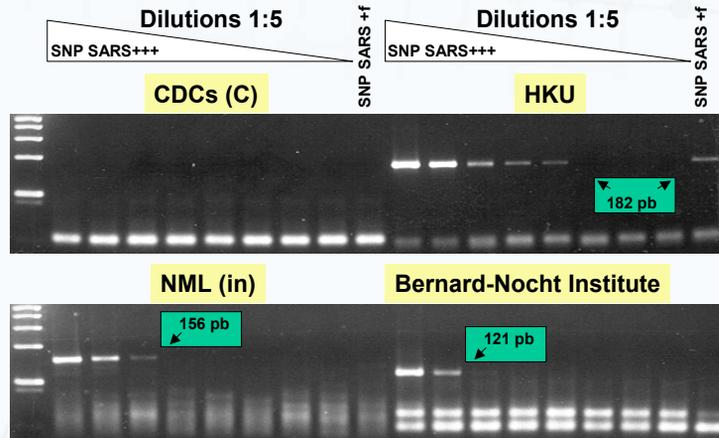
Urbani
 Toronto
 Frankfurt
 G250
 OC43
 229E

GGATGAGTTTACGCTTACCTGCCTAACATTTC

: NML/Winnipeg
 : CDCs
 : Hong Kong PH
 : BNI/Germany

Institut national de santé publique Québec
 Laboratoire de santé publique du Québec

Sensibilité des amorces (avril 2003)



11



Institut national
de santé publique
Québec

RT-PCR – Interprétation des résultats

- Possibilité de résultats faussement positifs
 - Contamination par de l'ADN issu d'une amplification antérieure
 - Contamination croisée entre les échantillons
- Possibilité de résultats faussement négatifs
 - Titre viral faible dans les sécrétions respiratoires dans les jours suivant le début de la maladie

12



Institut national
de santé publique
Québec

RT-PCR – Interprétation des résultats

- Un résultat négatif n'infirmes pas un SRAS
- Un résultat positif doit être considéré provisoire jusqu'à ce qu'une autre analyse indépendante soit effectuée

13



Institut national
de santé publique
Québec



Sérodiagnostic

- Trousses commerciales disponibles évaluées avec un nombre limité d'échantillons
- Épreuves « maison » développées par des laboratoires de référence

14



Institut national
de santé publique
Québec



Sérodiagnostic – Épreuve immunoenzymatique (EIA)

- Semblerait être spécifique
 - Pas de réaction avec d'autres infections à coronavirus (OC43 et 229E)
 - Pas de réaction avec des donneurs de sang « normaux » (réf. CDC)
- Détection d'anticorps 8 à 10 jours après le début des symptômes
- Une sérologie est considérée négative s'il n'y a pas d'anticorps >28 jours après le début des symptômes

15



formation

Institut national
de santé publique
Québec



Sérodiagnostic – Épreuve immunoenzymatique (EIA)

- Trousse commerciale disponible (Adaltis)
- Peptides SRAS CoV
- Sensibilité (24 cas positifs) = 91,7%
- Spécificité (23 contrôles) = 95,7%
- Possibilité de résultats faussement réactifs (faible prévalence)
- Reprendre l'analyse si négatif (21 j. post-Sx)

16



formation

Institut national
de santé publique
Québec



Sérodiagnostic – Épreuve d'immuno-fluorescence indirecte

- Source d'antigène : cellules infectées par le SRAS CoV
- Possibilité de faire une détection des IgM et des IgG
- Détection d'anticorps 10 jours après le début des symptômes

17



Institut national
de santé publique
Québec



Sérodiagnostic – Épreuve d'immuno-fluorescence indirecte

- Sensibilité (147 patients)
 - Euroimmun AG : 98% IgG; 79% IgM
- Spécificité (285 contacts + 45 VIH, VHC ou VHB)
 - Euroimmun AG : 100%
 - Réalité : réactions croisées possibles

18

Institut national
de santé publique
Québec



Sérodiagnostic – Développements

- Antigènes recombinants
 - Phosphoprotéine de la nucléocapside
 - Glycoprotéine des spicules
 - Glycoprotéine membranaire
- Élimination des réactions croisées
- Détection précoce : épreuves IgM
- Neutralisation virale (réduction des plages de lyse)
 - Épreuve de confirmation
 - Culture du virus = travail en NC 3

19



formation

Institut national
de santé publique
Québec



Type d'échantillons

- Pour RT-PCR et culture
 - Écouvillon ou aspiration nasopharyngée dans un milieu de transport pour la virologie (MTV)
 - Selle ou écouvillon rectal dans un MTV
 - **Répéter après 7 à 10 jours si négatif**
 - Si possible :
 - Échantillons des voies respiratoires inférieures (LBA ou aspiration trachéale dans un contenant stérile)
 - Tissu congelé et non fixé provenant de biopsie ou d'autopsie (poumon, intestin, rate, ganglions lymphatiques)



20



formation

Institut national
de santé publique
Québec



Type d'échantillons

- Pour le sérodiagnostic
 - Sérum précoce et tardif
 - 2 à 3 ml chacun
 - Délai de 2 semaines entre les prélèvements
 - Prélever un troisième sérum à 28 jours s'il y a absence de séroconversion

21



formation

Institut national
de santé publique
Québec

Critères de diagnostic

- La recherche pour le SRAS CoV ne devrait être entreprise que si les critères de la définition d'un cas de maladie respiratoire sévère potentiellement associée au SRAS sont rencontrés

22



formation

Institut national
de santé publique
Québec

Critères de diagnostic

- Détection d'acide nucléique (RT-PCR) positive
 - Sur au moins 2 échantillons cliniques distincts
 - Résultat obtenu avec 2 paires d'amorces
 - Analyse reprise dans un autre laboratoire
- Culture virale positive
 - Fournit une excellente preuve de l'infection

23



formation

Institut national
de santé publique
Québec

Critères de diagnostic

- Séroconversion mesurée par
 - Épreuve d'immunofluorescence ou
 - Épreuve immunoenzymatique
- Et
- Confirmée par
 - Épreuve de neutralisation

24



formation

Institut national
de santé publique
Québec

Diagnostic de laboratoire

- Standardisation des réactifs
- Échantillons contrôles (sérum de patients)
- Programmes d'assurance qualité

25



Institut national
de santé publique
Québec



Précautions en laboratoire

- Équipement de protection en NC 2
 - Enceintes de sécurité biologique (ESB) type I ou II.
 - Centrifugeuses munies de godets de sécurité.



26



Institut national
de santé publique
Québec



Précautions en laboratoire

- Équipement de protection en NC 3



27



Institut national
de santé publique
Québec



Conclusions

- Les épreuves diagnostiques pour le SRAS CoV sont sensibles et spécifiques, mais plusieurs ne peuvent fournir un diagnostic définitif tôt dans la maladie.
- La quantité, le type et le moment choisis pour le prélèvement améliorent les chances de détection.
- L'interprétation des résultats doit tenir compte de la possibilité de faux positifs et de faux négatifs.
- Le diagnostic rapide et précis d'autres pathogènes respiratoires pour éliminer l'infection au SRAS CoV est important.

28



Institut national
de santé publique
Québec

