

ARTICLE ORIGINAL

Infection par le nouveau coronavirus : du dépistage et diagnostic antigéniques sérologiques à l'immunité et la réinfection**Infection with the new coronavirus : from antigenic and serological screening and diagnosis to immunity and reinfection.**

Hatem Masmoudi

Laboratoire d'Immunologie,
CHU Habib Bourguiba,
Sfax, Tunisie.Immunology Department,
Habib Bourguiba University

Hospital, Sfax, Tunisia.

Résumé

Le nouveau coronavirus ou SARS-Cov2 responsable de l'actuelle pandémie mondiale est un virus enveloppé à ARN simple bien de la famille des coronavirus qui partage plusieurs caractéristiques avec d'autres coronavirus connus et responsables d'infections respiratoires, notamment ceux à l'origine des épidémies de 2002–2003 en Chine et de 2012–2013 au Moyen Orient.

Le diagnostic biologique de l'infection par le SARS-Cov-2 repose essentiellement sur la réaction de polymérisation en chaîne quantitative avec transcription inverse ou RT-PCR qui permet de détecter l'ARN viral et d'identifier des séquences nucléotidiques spécifiques du virus. Cependant, les tests antigéniques et sérologiques qui permettent de détecter et/ou doser les antigènes et/ou les anticorps spécifiques du virus prennent une place de plus en plus importante aussi bien dans le diagnostic de la maladie que dans le dépistage des sujets ayant été infectés et l'identification des personnes immunisées et celles qui n'ont été en contact avec le virus.

Dans cet article nous présenterons les différentes méthodes et techniques utilisées dans ces tests antigéniques et sérologiques dont nous expliquerons l'intérêt et les limites. Nous aborderons aussi la notion de l'immunité acquise après infection par le virus, sa durée et la question souvent posée de la réinfection.

Mots clés : *Coronavirus, Covid 19, dépistage, diagnostic, immunité, réinfection, sensibilité, spécificité.*

Abstract

The new coronavirus or SARS-Cov2 responsible for the current global pandemic is an enveloped single RNA virus of the coronavirus family which shares several characteristics with other known coronaviruses responsible for respiratory infections, in particular those causing epidemics of 2002–2003 in China and 2012–2013 in the Middle East.

The biological diagnosis of SARS-Cov-2 infection is essentially based on the quantitative polymerase chain reaction with reverse transcription or RT-PCR which makes it possible to detect viral RNA and to identify virus-specific nucleotide sequences. However, antigenic and serological tests which allow to detect and/or measure the specific antigens of and/or antibodies for the virus are taking an increasingly important place both in the diagnosis of the disease and in the screening of subjects who have been infected and the identification of immunized individuals and those who have not been in contact with the virus.

In this article we will present the different methods and techniques used in these antigenic and serological tests of which we will explain the interest and the limits. We will also discuss the notion of acquired immunity after infection with the virus, its duration and the often asked question of reinfection.

Keywords : *Coronavirus, Covid 19, screening, diagnosis, immunity, reinfection, sensitivity, specificity.*

Introduction

Comme son nom l'indique, le virus SARS-Cov2 ("Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus" 2), responsable de la pandémie mondiale partie de la ville de Wuhan en Chine en Décembre 2019, est un virus enveloppé à ARN simple brin de la famille des coronavirus qui partage plusieurs caractéristiques avec d'autres coronavirus connus, responsables d'infections respiratoires notamment ceux à l'origine des épidémies de 2002–2003 en Chine ou SARS-Cov (corona virus du syndrome respiratoire aigu sévère) et de 2012–2013 au Moyen Orient ou MERS-Cov ("Middle East Respiratory Syndrome Corona Virus") (1).

Son long ARN de 30 kilobases code pour le complexe multimoléculaire de transcription-réplication virale comprenant l'ARN polymérase-ARN dépendante, 5 protéines de structure : S (spike), E (enveloppe), HE (hémagglutinine-estérase), M (membrane) et N (Nucléocapside), ainsi que plusieurs protéines accessoires de fonction inconnue.

L'enveloppe virale est formée d'une bicouche lipidique où sont incrustées les protéines E, M et S. A l'intérieur de cette particule sphérique pléomorphe de 100 à 160 nm de diamètre se trouvent plusieurs copies de la nucléocapside formée de la protéine N liée à l'ARN génomique simple brin du virus (2, 3).

De petite taille et non glycosylée, la protéine N est la protéine la plus abondante du virus. Elle joue un rôle important dans sa pathogénèse, sa réplication et le packaging de son ARN (4).

La glycoprotéine transmembranaire S est formée d'un homo-trimère saillant à la surface virale donnant à celle-ci l'aspect d'une couronne d'où son nom de protéine "spike" ou protubérance. Elle comprend 2 sous-unités fonctionnelles S1 et S2. La sous-unité S1 comprend un domaine de liaison au récepteur ou BRD ("Receptor Binding Domain") responsable de la liaison au récepteur membranaire de la cellule cible ; tandis que la sous-unité S2 contient les éléments nécessaires à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule cible (5).

Comme SARS-Cov, avec qui il partage 79 % d'homologies de séquences, SARS-Cov2 utilise l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE 2) comme récepteur membranaire pour pénétrer à l'intérieur des cellules humaines, les infecter et s'y répliquer. ACE 2 est exprimé principalement à la surface des cellules caliciformes des voies aériennes supérieures, des pneumocytes de Type II qui tapissent les alvéoles pulmonaires et des entérocytes de la muqueuse intestinale (5,6) ; mais d'autres cellules peuvent exprimer à leur surface cette métallo-carboxypeptidase transmembranaire (cellules endothéliales, myocardiques, rénales...) et le virus semble pouvoir utiliser d'autres protéines membranaires comme récepteur pour infecter d'autres types cellulaires.

C'est le cas du CD147 ou basigine exprimé à la surface des lymphocytes (L) T mais aussi de nombreuses autres cellules notamment les cellules endothéliales et épithéliales et les leucocytes d'une façon générale (6, 7).

SARS-Cov 2 semble être un virus très contagieux et doté d'un pouvoir pathogène assez puissant et étendu. Depuis les premiers cas d'infections respiratoires aiguës rapportés en Chine en Décembre 2019, l'épidémie n'a eu de cesse de se propager en Chine, surtout dans la province de Hubei, pour se disséminer ensuite progressivement aux 4 coins du monde, touchant plus de 200 pays et imposant le confinement strict à plus de la moitié de la population mondiale. L'OMS a donné le nom de Covid19 ("Corona virus disease 19") à la maladie liée à l'infection par le nouveau corona virus et qualifié de pandémie cette infection dès le 12 Mars.

Le diagnostic biologique de l'infection par le SARS-Cov-2 repose essentiellement sur la réaction de polymérisation en chaîne quantitative avec transcription inverse ou RT-PCR (RT pour "Reverse Transcriptase") qui permet de détecter l'ARN viral et d'identifier des séquences nucléotidiques spécifiques du virus (8). Cependant, les tests antigéniques et sérologiques qui permettent de détecter et/ou doser les antigènes (Ag) et/ou les anticorps (Ac) spécifiques du virus prennent une place de plus en plus importante aussi bien dans le diagnostic de la maladie que dans le dépistage des sujets ayant été infectés et l'identification des personnes immunisées (9).

Dans cet article nous présenterons les différentes méthodes et techniques utilisées dans ces tests antigéniques et sérologiques dont nous expliquerons l'intérêt et les limites. Nous aborderons aussi la notion de l'immunité acquise après infection par le virus, sa durée et la question souvent posée de la réinfection.

Apport et limites des techniques de biologie moléculaire pour diagnostic de l'infection par le SARS Cov-2 :

Le diagnostic biologique de l'infection par le SARS-Cov2 est d'abord et avant tout basé sur la mise en évidence chez le malade suspect de séquences nucléotidiques spécifiques de l'ARN génomique du virus. Même si cela peut être fait par des techniques de séquençage haut débit ou d'autres méthodes tout aussi sophistiquées que coûteuses (LAMP : "Loop-Mediated Isothermal Amplification" etc...) (8), la RT-PCR reste la technique la plus couramment utilisée. Il s'agit d'une technique très sensible (avec 30 cycles d'amplification, on obtient jusqu'à 1 milliard de copies d'ADN complémentaire à partir de 3 ou 4 copies d'ARN viral) et très spécifique aussi (l'utilisation d'amorces et de sondes spécifiques de 2 gènes au moins du virus permet d'assurer cet objectif).

Cependant et en dépit de sa grande fiabilité, la technique de RT-PCR souffre de beaucoup de limitations. C'est une technique coûteuse et assez laborieuse dont la mise en œuvre prend 2 à 3 heures et qui nécessite des équipements lourds et exige un personnel hautement qualifié et des conditions de sécurité assez strictes ; conditions qui ne peuvent pas être facilement réunies dans les laboratoires périphériques et les régions aux ressources limitées (5).

De plus le test PCR tel qu'il est couramment pratiqué sur un à écouvillon naso-pharyngé donne assez souvent lieu à des résultats faussement négatifs si le prélèvement n'a pas été correctement fait ou bien conservé ou surtout s'il a été effectué un peu tardivement (au-delà de 8 à 10 jours après le début de la maladie).

La RT-PCR appliquée au diagnostic de la maladie Covid19 met ainsi en exergue l'importance de la distinction entre sensibilité analytique, ici la capacité de la technique RT-PCR à détecter le virus lorsqu'il est présent dans le prélèvement analysé, et la sensibilité clinique, ici la capacité du test PCR à identifier les sujets infectés (4).

Toutes ces contraintes et limites ont poussé au développement rapide des méthodes immuno-chimiques qui sont beaucoup plus simples, rapides et moins coûteuses.

Tests et méthodes immuno-chimiques pour la détection et/ou le dosage des antigènes et/ou des anticorps spécifiques du nouveau corona virus :

On distingue ici 2 groupes de tests :

- Les tests dits antigéniques qui permettent de détecter la présence de protéines caractéristiques du virus dans un prélèvement naso-pharyngé, sanguin, urinaire ou autre.

- Les tests dits sérologiques qui permettent de déceler et/ou doser les Ac spécifiques du virus dans un prélèvement de sang.

Qu'il s'agisse de tests rapides ou non, manuels ou automatisés, tous ces tests sont basés sur la réaction Ag-Ac et l'utilisation d'un marqueur ou traceur (coloré, luminescent, fluorescent...) qui, la réaction Ag-Ac et le traceur, permettent d'en assurer respectivement la spécificité et la sensibilité.

Alors que la mise au point et la validation des tests RT-PCR devient assez facile et rapide du moment où l'ARN génomique du virus a été séquencé, celle des tests immuno-chimiques est beaucoup plus laborieuse et demande beaucoup plus de temps pour la purification de certaines protéines du virus ou leur production sous forme de protéines recombinantes (tests antigéniques et sérologiques) ou aussi pour l'obtention et la purification d'immun sérums ou la production d'Ac monoclonaux spécifiques d'épitopes (déterminants antigéniques) caractéristiques du virus (tests antigéniques).

Dans les 2 cas, tests antigéniques et tests sérologiques, la réaction Ag-Ac doit impliquer des épitopes propres au SARS-Cov2 et non partagés avec d'autres coronavirus,

ce qui constitue une difficulté supplémentaire pour ces tests immuno-chimiques.

Depuis la déclaration de l'épidémie en Chine et son expansion mondiale, de très nombreux tests d'immuno-analyse ("Immuno-Assay") ont été mis au point et commercialisés de par le monde. Cependant et dans l'urgence et la précipitation générale, très peu parmi eux ont eu le temps d'être évalués par des études larges et fiables et validés par les instances internationales de contrôle et d'accréditation. Beaucoup parmi les études publiées n'ont pas encore été "reviewées" et/ou ont concerné un faible effectif de patients chinois ou autres ; et doivent donc être prises avec beaucoup de précaution.

1- Tests antigéniques

Les tests antigéniques occupent une place de choix dans le dépistage et le diagnostic de nombreuses infections virales : Ag P24 dans l'infection par le VIH, Ag HBs et Hbe dans l'hépatite virale B... Ils permettent à moindre coût et de façon assez simple et rapide de détecter la présence du virus bien avant l'apparition des Ac spécifiques. Même si en cas de résultat positif, la confirmation du diagnostic et l'évaluation de la charge virale par PCR sont nécessaires, l'information donnée par ces tests antigéniques est capitale pour le dépistage et/ou le diagnostic précoce des sujets infectés ainsi que pour le screening des donneurs de sang contagieux dont les prélèvements doivent être retirés de la chaîne de transfusion.

Dans le cas du Covid19 et comme l'épidémie est relativement récente et pour les raisons déjà expliquées, peu de tests/kits commerciaux sont actuellement disponibles. Sur le site <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/> qui collecte et regroupe tous les tests commerciaux disponibles et/ou en développement pour le diagnostic du covid19, et parmi les 301 tests d'immuno-analyse enregistrés au 10 Mai, seuls 29 sont des tests antigéniques et 12 parmi eux sont encore en cours de mise au point/développement.

Les tests antigéniques sont généralement pratiqués sur un prélèvement naso-pharyngé, mais ils peuvent aussi être effectués sur des prélèvements de salive, d'urine ou de sang. La plupart des tests antigéniques sont des tests rapides basés sur la technique d'immuno-chromatographie et ciblent la protéine la plus abondante du virus, la protéine N de la nucléocapside (10).

La technique d'immuno-chromatographie ou LFIA ("Lateral Flow Immuno-Assay") est une technique d'immuno-analyse rapide ("Point of Care Testing") basée sur l'hydratation et le transport des réactifs lorsqu'ils interagissent avec l'échantillon à travers la bandelette via un flux latéral chromatographique.

L'architecture typique d'un dispositif d'immuno-chromatographie sur bandelette inclue la membrane poreuse active (généralement en nitrocellulose) et

d'autres membranes additionnelles pour les cases (ou blocs) échantillon, sonde (ou conjugué) et absorbant ainsi qu'une structure de support qui assure la stabilité et la consistance du dispositif (généralement une cuvette en plastique) (11).

Pour ce qui est de la sonde, des réactifs bio-sélectifs adaptés sont fixés sur des micro ou nanoparticules, ils délivrent ainsi le signal émis et permettent de détecter la réaction qui se produit sur la membrane active. Les traceurs le plus souvent utilisés sont des nano et microparticules dorées (or colloïdal) et les marqueurs colorés ou fluorescents. Ces derniers, nécessitant un dispositif d'excitation et de mesure de la fluorescence, sont moins utilisés.

Dans un article soumis au British Medical Journal, Bo Diao et al. décrivent un test antigénique pour la détection de la protéine N du virus qu'ils ont mis au point (12). Il s'agit d'un test de type immuno-chromatographique avec révélation par un marqueur fluorescent et lecture au bout de 10 minutes (min) à l'aide d'un analyseur d'immunofluorescence. Un Ac polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin est fixé sur la membrane de nitrocellulose au niveau de la ligne contrôle et un Ac monoclonal M1 de souris anti-protéine N du SARS-Cov-2 au niveau de la ligne test. Tandis que dans la case-conjugué, sont déposés à la fois, l'Ac monoclonal M4 de souris anti-protéine N du SARS-Cov-2 conjugué avec des microparticules chélatées marquées à l'Europium III (Trifluoro-methane-sulfonate) ainsi que des IgG de lapin marquées avec le même type de microparticules conjuguées. Avec l'aide de la capillarité du coussin d'absorption ("absorption pad"), l'échantillon dilué avec le tampon va s'écouler à travers la membrane de nitrocellulose, s'il contient des particules virales, les Ac M4 anti-protéine N marqués du conjugué vont les attraper en se fixant à leurs protéines N.

L'échantillon dilué poursuit sa diffusion le long de la membrane en emmenant avec lui les conjugués libres et liés et une fois arrivé à la ligne test, l'Ac monoclonal M1 de souris anti-protéine N va capturer les particules virales en se fixant à leurs protéines N, celles-ci se trouvent ainsi prises en sandwich entre l'Ac M1 fixé sur la nitrocellulose et l'Ac M4 marqué avec un conjugué fluorescent. S'il n'y a pas de particules virales, rien ne sera fixé sur la ligne test, il n'y aura pas de fluorescence et le résultat sera négatif. Qu'il y ait ou non des particules virales dans l'échantillon, la diffusion se poursuit sous l'effet de la capillarité et, arrivées à la ligne contrôle, les IgG de lapin conjuguées vont être captées par l'Ac de chèvre anti-IgG de lapin, ce qui va donner un signal de fluorescence (après excitation) au niveau de cette ligne contrôle indiquant la validité du test.

Les auteurs ont analysé avec cette technique les prélève-

ments naso-pharyngés de 239 patients suspects de covid19 provenant de 7 centres hospitaliers différents ainsi que 19 échantillons d'urines. Parmi les 208 patients RT-PCR positifs, 141 étaient positifs aussi avec cette technique (sensibilité : 68%), tandis que les 31 patients ARN-viral négatif étaient tous négatifs avec le test antigénique (spécificité : 100 %). D'autre part, le test antigénique effectué le même jour en parallèle avec la RT-PCR était positif chez 14 parmi les 19 malades covid19 avec RT-PCR positive (sensibilité : 73,6%). Les auteurs concluent ainsi à la fiabilité et la précision de leur test simple et rapide pour le diagnostic du covid-19 !

Même si l'OMS dans sa note du 8 Avril ne recommande pas l'utilisation des tests antigéniques en raison de leurs faibles performances notamment leur faible sensibilité en cas de charge virale basse, il est évident qu'avec le flux croissant de nouveaux tests mis sur le marché et les développements et améliorations qui y sont progressivement apportés ainsi que l'évaluation à pied d'œuvre de ces tests par les instances internationales de contrôle, les tests antigéniques, notamment les tests rapides basés sur l'immuno-chromatographie, sont amenés dans un futur très proche à prendre une place de choix dans le dépistage de l'infection par le nouveau coronavirus et le tri des malades qui viennent consulter et/ou qui se présentent aux urgences.

2- Tests sérologiques

Les tests sérologiques permettent de détecter et/ou doser les Ac spécifiques du SARS-Cov-2 dans un prélèvement de sang (sang total, sérum ou plasma).

Il peut s'agir de tests qui décèlent séparément les Ac de classe IgM et ceux de classe IgG ou de tests qui détectent les deux à la fois (13).

Les tests sérologiques recherchant les IgM permettent de détecter les infections en cours et représentent ainsi un outil diagnostique très utile en parallèle avec la RT-PCR ; tandis que les tests sérologiques ciblant les IgG permettent de détecter les infections antérieures.

Les tests sérologiques ne permettent pas de statuer sur la contagiosité ou non d'une personne. En mettant en évidence les Ac spécifiques du virus, les tests sérologiques permettent de savoir si une personne est ou a été infectée par le virus.

Outre leur apport diagnostique, les tests sérologiques permettent ainsi d'identifier dans la population générale les sujets immunisés qui ont fait une forme asymptomatique ou modérée et en sont guéris (jusqu'à 25 % des cas), ces sujets sont protégés et peuvent reprendre leur activité professionnelle et leur vie sociale en toute sécurité, ainsi que les sujets non encore infectés qui doivent rester vigilant et qu'il va falloir protéger (14).

Par ailleurs, les tests sérologiques constituent un outil

précieux pour estimer les variables épidémiologiques de la maladie (covid19) et aider à établir et mettre en place les stratégies adéquates pour rompre la chaîne de transmission du virus (9).

De très nombreux tests sérologiques ont été commercialisés ou sont en cours de développement par divers fabricants chinois et internationaux (plus de 270 enregistrés sur le site <https://www.finndx.org/covid-19/pipeline/> au 14 Mai). Il peut s'agir de tests qualitatifs rapides basés sur l'immuno-chromatographie (LFIA) ou de tests quantitatifs, manuels ou automatiques, de type ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"), CLIA (Chimi-Luminescence Immuno-Assay) ou autre (10).

Deux parmi les 4 ou 5 protéines de structure des virus de la famille des coronavirus, deux semblent être la cible de choix pour la réponse Ac contre ces virus : les protéines S (spike) et N (nucléocapside). C'est pourquoi la quasi-totalité des tests sérologiques du Covid-19 recherchent En raison de sa petite taille et de l'absence de sites de glycosylation, la protéine N peut être clonée facilement. Alors que la glycoprotéine S et en raison de sa grande taille, ne peut être exprimée en entier dans toute sa longueur et seuls de petits fragments produits par génie génétique sont utilisés dans les tests d'immuno-analyse. La grande difficulté réside alors dans la reproduction des sites de glycosylation et des déterminants antigéniques conformationnels au sein de ces fragments de synthèse (5).

L'utilisation combinée des protéines N et S comme Ag de détection des Ac spécifiques permet d'augmenter significativement la sensibilité du test sérologique. A défaut, l'utilisation de la protéine S permet de mettre en évidence les Ac neutralisants.

Comme les protéines S et N du SARS-Cov-2 ont beaucoup de similitude structurale et de séquences partagées avec les autres coronavirus (23 à 47 % d'identité) et en particulier le SARS-Cov (jusqu'à 75 % d'homologie), les réactions croisées pouvant être à l'origine de résultats faussement positifs doivent être gardées à l'esprit. En cas de doute, l'utilisation de plusieurs tests ciblant différents sites antigéniques peut être très utile (5, 15). Contrairement aux tests antigéniques, de très nombreuses études évaluant la fiabilité de tests sérologiques et/ou analysant la cinétique de la réponse Ac ont été publiées. Cependant, bon nombre de ces articles ne précisent pas correctement les critères de sélection des malades et/ou leurs données cliniques et épidémiologiques, notamment le délai exact entre le début des symptômes et la date du prélèvement.

Comme dans la plupart des autres infections, qu'elles soient virales ou non, les Ac spécifiques du SARS-Cov-2 de classe IgM apparaissent généralement en premier, dès la 1ère ou 2ème semaine, suivis, au cours de la 2ème ou 3ème semaine, par ceux de classe IgG. Cependant, certaines études rapportent une apparition plus précoce

des Ac de classe IgG dès la première semaine. Aussi, le test le plus sensible pour le diagnostic sérologique est-il le dosage des Ac totaux (IgM et IgG, ou IgM, IgG et IgA) (16). Les tests sérologiques de type immuno-chromatographique offrent l'avantage d'être simples, rapides et peu coûteux. Tandis que, les tests de dosage quantitatif de type ELISA, CLIA ou autre, mesurent la concentration d'Ac spécifiques dans le sérum et permettent ainsi d'identifier les éventuels donneurs de plasma avec titre élevé d'Ac parmi les malades guéris, surtout que le titre d'Ac mesuré dans le sérum ou le plasma semble être en corrélation avec le taux d'Ac neutralisant (14). De plus, les tests sérologiques quantitatifs permettent de suivre la cinétique de la réponse Ac spécifique contre le virus et d'avoir une idée sur les seuils et la durée de l'immunité (9).

Zhengtu et al. ont développé un test rapide de type LFIA pour la détection des Ac spécifiques de type IgM et IgG. L'Ag utilisé pour la détection des Ac spécifiques correspond au domaine de fixation au récepteur ou RBD ("Receptor Binding Domain") de la protéine S. L'Ag purifié et marqué avec l'or colloïdal (nanoparticules de 40 nm de diamètre) est déposé dans la case conjugué avec des IgG de lapin marquées de la même façon. Tandis que l'Ac monoclonal de souris anti-IgM humaines est fixé sur la membrane de nitrocellulose au niveau de la ligne M (IgM) et un autre, anti-IgG humaine, au niveau de la ligne G (IgG). Enfin, un Ac anti-IgG de lapin est fixé au niveau de la ligne C (contrôle) (17). L'échantillon (20 µl de sang total ou 10 à 15 µl de sérum ou plasma) déposé dans la case correspondante avec le diluant (70 à 100 µl de tampon PBS) migre en direction du coussin d'absorption. En passant par la case conjuguée, les Ac spécifiques du SARS-Cov2, si présents, se fixent sur l'Ag viral marqué. L'échantillon dilué poursuit sa migration emmenant dans son mouvement les IgG de lapin marquées et l'Ag viral marqué libre ou lié. En passant par la ligne M, tous les Ac de classe IgM vont être capturés par l'Ac monoclonal de souris anti-IgM humaines. Si l'échantillon contient des Ac spécifiques du SARS-Cov-2 de type IgM, ils vont être révélés grâce à l'Ag viral marqué qu'ils auront fixé en passant par la case-conjugué, la ligne M vire alors au bout de 15 min à une couleur rouge/rose. Les Ac spécifiques de classe IgG sont révélés par le même mécanisme d'immunocapture lors du passage du mélange échantillon dilué-conjugué par la ligne G. L'excès de réactifs non fixés poursuit sa diffusion vers le coussin d'absorption et, arrivés à la ligne C, les IgG de lapin marquées à l'or colloïdal vont être captées par l'Ac anti-IgG de lapin préalablement fixé à ce niveau, ce qui va donner une couleur rouge-rose à cette ligne indiquant la validité du test (Figure 1). Les auteurs ont analysé les prélèvements sanguins de 525 malades de 8 hôpitaux chinois, dont 397 étaient covid+ (confirmés cliniquement et avec la PCR) et 128

covid -. Les IgM et les IgG étaient positives respectivement chez 328 et 280 des 397 malades covid + ; ce qui confère une sensibilité de 82,6% pour les IgM et de 70,5% pour les IgG. Soixante-douze cas étaient positifs pour les IgM seules et 24 pour les IgG seules, ce qui donne une sensibilité globale du test de 88,66%. Chez le groupe de 128 patients covid -, le test était positif chez 12 malades, 1 cas positif pour l'IgM et l'IgG, 10 cas pour l'IgM seule et 1 cas pour l'IgG seule, ce qui confère au test une spécificité globale de 90,63 %.

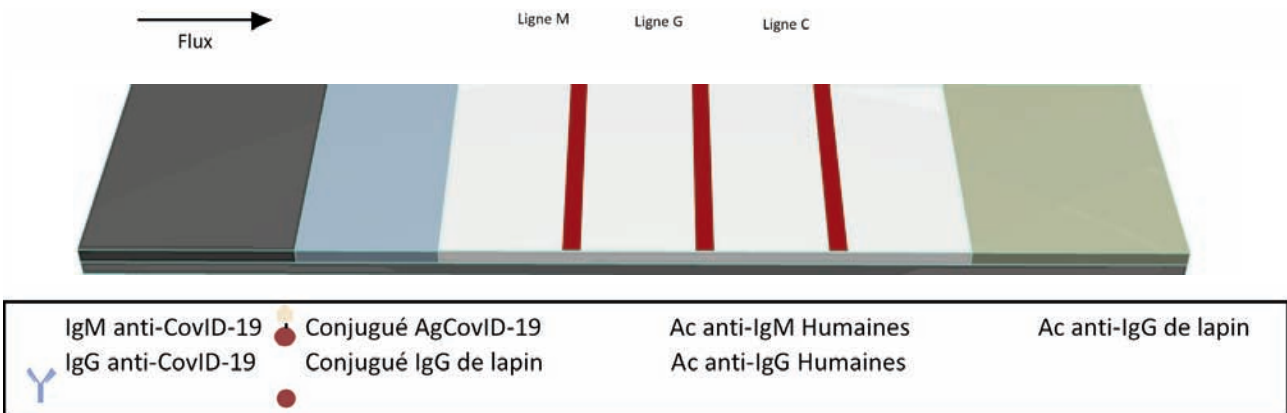
La plupart des tests sérologiques quantitatifs sont des tests de dosage immuno-enzymatique en phase solide (ou hétérogène) de type ELISA (ou équivalent), avec fixation indirecte ou par immunocapture.

Dans les tests ELISA indirects et non compétitifs, l'Ag viral recombinant purifié est adsorbé sur la surface des micropuits de la plaque ELISA qui, après incubation et lavage, est saturée par une solution de sérum albumine bovine (ou de sérum de veau fœtal) pour éviter la fixation d'Ac non spécifiques sur le plastique. Les échantillons de sérums des patients (ainsi que les contrôles

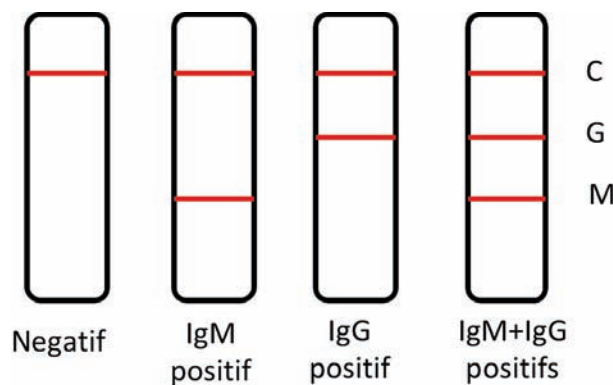
positifs titrés et les contrôles négatifs) dilués sont incubés, les Ac spécifiques présents dans l'échantillon se fixent alors sur l'Ag viral adsorbé sur la surface de plastique. Après un cycle de 3 lavages pour éliminer tout ce qui n'est pas fixé, les Ac spécifiques de classe IgG sont révélés par un Ac anti-IgG humaines marqué avec une enzyme et l'addition de son substrat après un cycle de 3 lavages. Le dosage des IgM spécifiques avec le même procédé comporte 2 sources d'erreur. D'une part et lorsqu'ils sont présents en abondance dans l'échantillon, les Ac spécifiques de classe IgG peuvent occuper tous les sites antigéniques ne laissant quasiment plus d'Ag libres pour la fixation des IgM spécifiques. Cette compétition entre les IgM et les IgG spécifiques peut ainsi aboutir à des résultats faussement négatifs. D'autre part et lorsque le sérum du malade contient des facteurs rhumatoïdes (RF : "Rhumatoïd Factor") de classe IgM, ceux-ci vont se fixer sur les Ac spécifiques de classe IgG et être révélés par l'Ac anti-IgM humaines marqués, ce qui aboutit à un résultat faussement positif alors que le malade n'avait que des Ac spécifiques de classe IgG et pas de classe IgM,.

A/

Figure 1 : Test immuno-chromatographique pour la détection des anticorps IgM et IgG spécifiques du Covid 19, A/schéma illustrant le dispositif du test, B/ illustration des différents résultats.



B/



C'est pourquoi, il est impératif lors du dosage des Ac spécifiques de classe IgM de pré-diluer les échantillons de sérum dans une solution tampon contenant un immun-sérum animal (chèvre ou autre) anti-IgG humaines appelé RF absorbant (ou neutralisant IgG). La fixation des Ac de l'immun-sérum sur les IgG contenues dans l'échantillon permet d'empêcher la fixation des IgG spécifiques sur l'Ag viral adsorbé et celle des RF de classe IgM sur les Ac IgG spécifiques fixés sur cet Ag. Les 2 sources d'erreur (faux négatifs et faux positifs) sont ainsi éliminées d'un seul coup (18).

Un autre procédé pour éviter ces sources d'erreur est l'immunocapture ou c ELISA (capture ELISA) qui consiste à fixer sur la surface plastique un Ac (généralement un immun-sérum animal) anti-IgM humaines qui va fixer tous les Ac de classe IgM contenus dans l'échantillon. Les Ac spécifiques de classe IgM sont alors révélés par l'addition de l'Ag viral (protéine N et S recombinantes) marqué (19).

Guo et al. ont suivi à l'aide d'un test ELISA la cinétique d'apparition des Ac spécifiques anti-protéine N de classe IgM et IgG sur 208 prélèvements de sang d'une cohorte de 89 patients covid + (PCR positive) et 58 cas suspects (PCR négative mais signes cliniques et radiologiques typique de la maladie). Ils ont observé que les IgM et les IgG apparaissent respectivement 5 jours (3 à 6 jours) et 14 jours (10 à 18 jours) après le début des symptômes. Les IgM avaient une sensibilité de 85,4 %, pour les IgG c'était 77,9%. Les auteurs ont montré que les IgM sont plus efficaces pour déceler la maladie que la PCR à partir du 6ème jour suivant le début des symptômes et que la combinaison des 2 marqueurs (IgM et PCR) permet d'augmenter significativement la sensibilité qui passe ainsi de 51,9 % avec la PCR seule à 98,6% avec la PCR couplée au dosage des IgM spécifiques (20).

Yong et al. ont abouti à la même conclusion en utilisant un test rapide de type LFIA permettant de déceler sur la même bande les Ac spécifiques de type IgM et IgG à la fois (21). De très nombreux études ont décrit de nouveaux tests sérologiques et évalué leur performances analytiques (sensibilité et spécificité analytiques, reproductibilité, linéarité...) et diagnostiques (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative...) (22-31). Tout en contribuant à l'évaluation et à l'analyse critique de la fiabilité et de la validité des nouveaux tests et kits commerciaux mis sur le marché, ces études sont très utiles pour comprendre la cinétique de réponse Ac contre le virus et la durée de l'immunité.

Immunité et réinfection

Comme la pandémie du Covid 19 est toute récente, il est encore trop tôt pour avoir une idée exacte sur la durée et l'efficacité de l'immunité et de la mémoire immunitaire acquises après infection. Les annonces itératives de plu-

sieurs cas de réinfection observés chez des malades déclarés guéris et parues dans les rapports de certains CDC ("Center of Disease Control"), notamment celui de la Corée du Sud, et/ou relayées dans les médias internationaux, ont exacerbé la peur de ce nouveau virus parmi les gens, puisque même une fois guéri, après avoir été infecté et malade, on n'était pas sûr d'être immunisé et on risquerait de retomber malade du covid 19 ! Les notes et recommandations de l'OMS, ajoutées aux déclarations de certains responsables politiques internationaux de très haut rang, n'ont fait qu'attiser cette angoisse générale.

Il serait peut-être utile de rappeler tout d'abord que lors d'une primo-infection virale, les Ac et en raison du délai nécessaire à leur production et de leur mécanisme d'action, ne jouent qu'un rôle très secondaire dans la lutte contre le virus. Ce sont d'autres effecteurs moléculaires et cellulaires de l'immunité innée (encore appelée naturelle ou non spécifique) et adaptative (encore appelée acquise ou spécifique) qui vont joindre leurs efforts et se relayer pour essayer de venir à bout du virus :

- Les interférons (INF) α et β : il s'agit de cytokines dotées d'un puissant pouvoir antiviral. Lorsqu'une cellule est infectée par un virus, elle produit de l'interféron qui, se fixant sur son récepteur membranaire sur la cellule voisine, la rend résistante au virus en y induisant la production d'enzymes qui dégradent l'ARN viral et/ou bloquent la synthèse des protéines virales.

- Les cellules NK ("Natural Killer") : ces cellules tueuses naturelles représentent 5 à 15% des lymphocytes (L) circulants. Elles sont dotées de récepteurs activateurs, reconnaissant les protéines étrangères (notamment les protéines virales), et d'autres inhibiteurs, reconnaissant certaines protéines ubiquitaires du soi (notamment les molécules HLA classe I exprimées sur la quasi-totalité des cellules nucléées normales du soi). Lorsqu'elles rencontrent des cellules qui expriment à leur surface des Ag étrangers (d'origine virale ou du soi modifié par un processus cancéreux par exemple) sans les Ag HLA classe I (ou autres Ag ubiquitaires), ces cellules reconnaissent qu'il s'agit de cellules infectées par un virus ou transformées et les tuent.

Les cellules NK n'ont pas de récepteurs spécifiques pour l'Ag et, mise à part une sous-population minoritaire exprimant la chaîne α du récepteur de l'interleukine 2 (IL2R- α ou CD25) qui est très peu cytotoxique et beaucoup plus sécrétrices de cytokines, les cellules NK sont toutes quasiment identiques et chacune d'elles est capable de tuer les cellules infectées par un très large éventail de virus.

- Les lymphocytes T cytotoxiques (Tc) : ces cellules qui sont généralement de phénotype CD8+ représentent 30 à 40% du total des LT CD3+ circulants. Comme les

autres lymphocytes T et B, ces cellules expriment un récepteur spécifique pour l'Ag polymorphe, hautement diversifié et clonalement distribué et sont capables de prolifération en périphérie. Chaque LT (qu'il soit cytotoxique, helper ou régulateur) exprime à sa surface des milliers de copies du seul et même récepteur spécifique pour l'Ag ou TCR (hétérodimère α/β ou γ/δ) associé au complexe de transmission de signal CD3. Chaque LT exprime son propre TCR, différent d'une cellule T à l'autre. On a ainsi des milliers de milliards de LT différents exprimant chacun un TCR particulier. La très grande diversité du répertoire TCR des LT (comme celui des LB) permet ainsi de couvrir le très large polymorphisme de l'univers antigénique. Cependant, pour chaque Ag (viral ou autre), le nombre de LT exprimant un TCR spécifique leur permettant de reconnaître cet Ag est extrêmement limité (de quelques cellules à quelques centaines de cellules seulement).

Les lymphocytes Tc circulent en fait sous forme de pré-curseurs naïfs incapables de tuer. Lorsqu'un lymphocyte Tc reconnaît avec son TCR l'Ag spécifique (viral ou autre) exprimé à la surface d'une cellule (infectée par un virus ou devenue cancéreuse) en association avec une molécule HLA classe I, il est activé, exprime CD25 et rentre en cycle cellulaire pour se diviser plusieurs fois de suite (prolifération en périphérie) tout en poursuivant sa différenciation terminale pour donner des centaines et milliers de lymphocytes Tc matures tous spécifiques du même Ag (viral ou autre) et capables de tuer les cellules exprimant cet Ag avec une molécule HLA classe I. Le taux de lymphocytes Tc spécifiques d'un virus peut ainsi atteindre jusqu'à 25 à 30% des LT circulants au cours d'une infection virale. C'est toute la puissance des réponses immunitaires spécifiques qui permettent ainsi, à partir d'un tout petit nombre de lymphocytes T ou B naïfs spécifiques d'un Ag, d'obtenir grâce à ces mécanismes d'activation, de prolifération et de maturation, un très grand nombre de cellules effectrices matures pouvant exercer pleinement leurs fonctions.

Comme pour les LB et la réponse Ac, ces mécanismes d'activation et d'amplification de la réponse T cytotoxique mettent 5 à 6 jours au moins pour se mettre en place et nécessitent l'aide des LT helper CD4+ qui doivent être eux-aussi activés par la reconnaissance des mêmes Ag (viraux ou autres) pour produire les cytokines (IL2, INF γ ...) dont ces lymphocytes Tc ont besoin pour leur prolifération et leur maturation. C'est ce qui explique que les lymphocytes Tc interviennent et entrent en jeu en dernier lieu, bien après les cellules NK.

Il serait utile ici de rappeler que, en règle générale, une cellule infectée par un virus est une cellule perdue et vouée à la mort. L'objectif pour le système immunitaire, une fois une telle cellule reconnue, est de la tuer avant qu'elle ne réussisse à parachever la synthèse de tous les

éléments nécessaires à la formation de particules virales pathogènes (il suffit qu'il manque un seul composant pour que la particule virale ne soit pas viable, virulente). C'est ce que font justement les cellules NK et les lymphocytes Tc.

Les Ac quant à eux agissent par un tout autre mécanisme. En effet, en se fixant sur leurs cibles antigéniques sur les glycoprotéines de l'enveloppe et/ou de la capsid virale et plus particulièrement sur les domaines d'interaction avec la protéine membranaire utilisée comme récepteur pour adhérer aux cellules cibles et les infecter, ces Ac bloquent cette interaction et empêchent ainsi le virus de pouvoir se fixer à la cellule cible et s'y multiplier, c'est la neutralisation (le virus n'est pas tué mais neutralisé). Ce mécanisme d'action des Ac n'est pas très utile lors des primo-infections virales puisque le temps que les Ac spécifiques neutralisants sont produits, le virus a déjà infecté un très grand nombre de cellules et s'est disséminé un peu partout dans l'organisme. Par contre, lors des infections virales secondaires (ou réinfections par le même virus), les Ac spécifiques du virus, déjà présents et ceux rapidement (en quelques heures) produits par les LB mémoires à longue durée de vie spécifiques du virus et générés lors de la primo-infection, vont immédiatement se fixer sur les particules virales nouvellement venues et les neutraliser bloquant ainsi à la source le processus de réplication et d'infection virales. Une fois fixés sur les particules virales, les Ac neutralisants peuvent interagir par leurs fragments Fc avec des effecteurs cytotoxiques et/ou phagocytaires (complément, cellules NK, macrophages) et contribuer ainsi à la clairance du virus (32).

Les Ac neutralisants sont ceux qui se fixent sur les portions des glycoprotéines de l'enveloppe virale impliquées dans le phénomène d'adhésion et de fusion avec la membrane cellulaire (ex : sous unités S1 et S2 de la protéine Spike dans le cas du SARS-Cov2). Ce sont généralement des Ac de classe IgG de forte affinité obtenus à la faveur des phénomènes de commutation isotypique (ou "switch" IgM vers IgG, IgA...) et de maturation d'affinité des Ac (les mutations somatiques sur les régions variables VH et VL permettent d'avoir et de sélectionner les Ac qui se fixent sur les épitopes correspondants avec la plus forte affinité) qui ont lieu habituellement à la fin de la réponse Ac primaire (33).

Cependant, les Ac produits lors d'une infection virale ne sont pas tous des Ac neutralisants et certains même peuvent avoir un rôle néfaste. En effet et bien que les Ac soient en règle générale protecteurs, il arrive dans certaines conditions qu'ils jouent un rôle favorisant l'infection virale. Ce phénomène connu sous le nom de renforcement dépendant des Ac ou "Antibody Dependent Enhancement" (ADE) est bien documenté dans le cas du SARS-Cov, mais aussi du virus de la dengue et beau-

coup d'autres virus (33). Il est médié par l'engagement des récepteurs pour le fragment Fc des IgG (Fcγ-R) exprimés à la surface de nombreuses cellules immunes (monocytes-macrophages, LB, PNN, PNE...) ; les Ac spécifiques fixés sur les particules virales peuvent ainsi faciliter l'entrée de ces dernières par endocytose à l'intérieur de ces cellules. L'entrée du virus à l'intérieur de ces cellules n'aboutit pas forcément à la réplication du virus. L'internalisation des complexes Ac-virus par ces cellules, et notamment les macrophages, se traduit très souvent par le développement d'une intense réaction inflammatoire et des lésions tissulaires via la reconnaissance du RNA viral par les TLR ("Toll Like Receptors") intracellulaires (TLR3, TLR7 et TLR8) et l'induction d'une cascade de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL6...) (32, 33). D'ailleurs, il a déjà été rapporté dans le cas du SARS, que la production rapide d'un titre élevé d'Ac pouvait être en relation avec la sévérité de la maladie (34). Il n'en reste pas moins que les Ac de classe IgG de forte affinité, dirigés contre les domaines de la protéine S impliqués dans l'adhésion au récepteur membranaire et la fusion avec la membrane cellulaire et produits au cours de l'infection par le SARS-Cov2 sont des Ac neutralisants et protecteurs. La question qui se pose alors est de savoir combien dure la protection assurée par ces Ac et par les LB mémoire à longue durée de vie qui les produisent. Cette question se pose avec d'autant plus d'insistance que de nombreux cas de soi-disant réinfection par le SARS-Cov2 ont été rapportés ici et là.

En fait et comme bien expliqué par Pr Anna Petherick dans son "World Report" du Lancet du 4 Avril 2020, les virologues s'accordent pour dire que les cas de réinfection rapportés par les médias sont le plus vraisemblablement dus à des résultats de RCR erronés (35). Dans ce même article, A. Petherick rappelle que certains auteurs pensent même que les personnes qui produisent des Ac contre un coronavirus donné sont probablement protégées et immunisées à vie ! Elle cite aussi l'équipe de Wang qui, en étudiant la durée de l'immunité acquise après infection par les virus SARS et MERS ont observé qu'un malade survivant du SARS avait des Ac 17 ans après, plus encore ces Ac avaient encore un pouvoir neutralisant in vitro.

Markus et al. ont montré que les Ac neutralisant anti-SARS-Cov d'un malade convalescent du SARS pouvaient bloquer in vitro l'entrée du SARS-Cov-2 à l'intérieur des cellules cibles, ce qui illustre une potentielle immunité protectrice croisée entre les 2 virus (36).

D'ailleurs et dans une récente étude soumise pour publication dans Cell, Grifoni et al. ont remarqué que les LT CD4+ spécifiques du SARS-Cov2 étaient présents chez 40 à 60% des sujets contrôles, des personnes qui n'ont pas été infectées par le SARS-Cov2, ce qui suggère fortement l'existence d'une immunité croisée entre le

SARS-Cov-2 et les coronavirus communs responsables du rhume hivernal (37). Dans une étude similaire, Braun et al. ont montré que les LT CD4+ spécifiques de la protéine S du SARS-Cov2 étaient présentes dans le sang circulant de 83% des patients Covid 19 mais aussi chez 34% des sujets sains qui n'ont jamais été infectés par le virus (38).

Liu et al. ont suivi pendant 24 mois les Ac anti-SARS-Cov chez 56 malades convalescents du SARS. Les Ac IgG spécifiques et les Ac neutralisant étaient hautement corrélés. Leurs taux atteignaient leur pic vers le 4ème mois suivant le début des symptômes puis commençaient à décroître à partir du 18ème mois. Au 24ème mois, les Ac IgG et les Ac neutralisant étaient toujours détectables chez 88,2% des sujets suivis (39).

En prolongeant la période d'étude jusqu'à 3 ans, Cao et al. ont observé que les Ac IgG et les Ac neutralisants étaient présents respectivement dans 74,2% et 83,9% des cas au bout de 36 mois (40). En suivant 176 malades convalescents du SARS pendant 3 ans, Wu et al. ont montré que les Ac IgG spécifiques restaient présents chez 93,9% des anciens malades après 1 an, 89,6% après 2 ans et 50% après 3 ans (41).

Compte tenu des nombreuses similitudes entre le nouveau coronavirus et le virus SARS-Cov, il est permis de penser que l'immunité acquise après infection avec le SARS-Cov-2 doit être protectrice pendant au moins 2 à 3 ans chez la plupart des patients guéris (42).

A ce titre, il est important de noter que les 2 seuls articles ayant à ce jour rapporté des cas de réinfection ont bien pris soin de noter le très faible cas de malades rapportés (4 seulement) et l'éventualité de résultats faussement négatifs de la PCR et de suggérer de prendre un peu plus de recul avant de déclarer un malade définitivement guéri et non contagieux (43, 44).

Dans chacune de ces 2 publications, les 4 patients et après avoir été déclarés guéris sur la base de la disparition de la fièvre et des autres signes cliniques et radiologiques et de 2 PCR négatives sur prélèvement naso-pharyngé à 24 h à 48 h d'intervalle, ont vu leur PCR de contrôle, pratiquée au cours de leur mise en quarantaine pour la période de convalescence, se positiver à nouveau. Les patients continuaient tous à être asymptomatiques (cliniquement et radiologiquement). Ils n'avaient eu aucun contact avec une personne présentant des symptômes respiratoires et aucun membre de leur famille n'était infecté. Le suivi de ces malades convalescents a montré qu'aucune transmission à d'autres personnes contact n'a eu lieu.

Les auteurs expliquent qu'il peut s'agir d'un résultat faussement négatif de la PCR ayant justifié la sortie de l'hôpital surtout que le prélèvement naso-pharyngé est connu pour se négativer beaucoup plus rapidement que le liquide de lavage broncho-alvéolaire. Pour eux, le virus serait encore présent dans les poumons de ces

malades à leur sortie de l'hôpital et, à la faveur d'un petit déclin transitoire de la réponse immunitaire, il serait réapparu au niveau du nasopharynx. Les auteurs recommandent donc d'associer un prélèvement de salive pour la PCR de sortie de l'hôpital et d'imposer aux malades guéris à leur sortie de l'hôpital, un confinement de 14 jours chez eux à la maison (43, 44).

D'ailleurs et dans une lettre à l'éditeur récemment parue dans JMFA, Javard Alizargar, rappelle qu'en Corée du Sud, la règle appliquée pour déclarer un malade guéri est 2 PCR négatives à 24 heures d'intervalle et insiste sur le fait qu'il faudrait être plus prudent avant de déclarer un malade réellement guéri du Covid-19 (45).

Enfin et dans un récent éditorial de la revue *Nat Immunol Rev*, Miyo Ota (46) a présenté l'étude de Ba et al. (47) qui ont infecté 4 singes macaques avec le virus SARS-Cov2. Les 4 singes étaient tombés malades avec une pneumonie, des lésions histo-pathologiques et les auteurs ont vérifié par RT-PCR que la réplication virale avait bien eu lieu dans le nasopharynx, les poumons et les intestins. Après la guérison confirmée par la PCR négative et la présence d'Ac neutralisant, 2 des 4 singes ont reçu la même dose de virus qu'initialement, aucun d'eux n'a montré de signes de rechute de la maladie et leurs PCR naso-pharyngée et anale sont restées négatives. Et à Miyo Ota de conclure que l'immunité acquise après une primo-infection par le SARS-Cov-2 devrait protéger contre les expositions ultérieures au virus.

Au vu de toutes ces observations, on peut dire que l'immunité acquise après une primo-infection avec le nou-

veau coronavirus, non seulement qu'elle assure une protection durable chez les personnes ainsi immunisées, mais chaque nouvelle exposition au coronavirus devrait renforcer et prolonger encore plus leur mémoire immunitaire comme le ferait un rappel de vaccin !

Conclusion

Même si la technique RT-PCR reste la technique de référence pour le diagnostic de l'infection par le SARS-Cov2, les tests antigéniques, en cours de développement et/ou d'évaluation, devront apporter une aide précieuse pour le dépistage rapide des personnes infectées et le premier tri des malades. Les tests sérologiques peuvent être très utiles pour le diagnostic positif de l'infection en association avec la RT-PCR (IgM spécifiques). Ils sont aussi et surtout utiles pour identifier dans les populations à risque (personnel soignant...) et/ou la population générale les sujets déjà infectés et immunisés et ceux qui ne l'ont pas été et qui doivent donc rester vigilants (IgG spécifiques). Les tests sérologiques apportent aussi une aide précieuse pour estimer les variables épidémiologiques de la maladie. Enfin et contrairement à ce qui a pu être diffusé dans certains médias internationaux, l'immunité acquise après infection par le SARS-Cov2 devrait rester protectrice durant plusieurs années et chaque nouveau contact avec le virus, après la guérison, devrait renforcer et prolonger la mémoire immunitaire acquise lors de la primo-infection comme le ferait un rappel de vaccin.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Jasper Fu –Woo Chan, Kin-Hang Kok, Zheng Zhu, Hin Chu, Kelvin Kai-Wang To, Shuefeng Yuan, and Kwok-Yung Yuen. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes and infections*, 2020, vol.9.
2. Dae-Gyun Ahn, Hye-Jin Shin, Mi-Hwa Kim, Sunhee Lee, Hae-Soo Kim, Jinjong Myoung, Bum-Tae Kim, and Seong-Jun Kim. Current Status of Epidemiology, Diagnosis, Therapeutics, and Vaccines for Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *J.Microbiol.Biotechnol.*(2020),30(3),313–324. <https://doi.org/10.4014/jmb.2003.03011>.
3. Xiaowei Li, Manman Geng, Yizhao Peng, Liesu Meng, Shemin Lu. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>.
4. Yi-Wei Tang, Jonathan E. Schmitz, David H. Persing, and Charles W. Stratton. The Laboratory Diagnosis of COVID-19 Infection: Current Issues and Challenges. *J.Clin. Microbiol.* Doi :10.1128/JCM.00512-20.
5. Maria Infantino, Arianna Damiani, Francesca, Li Gobbi, Valentina Grossi, Barbara Lari, Donatella Macchia et al. Serological Assays for SARS-CoV-2 Infectious Disease: Benefits, Limitations and Perspectives. *IMAJ* : Vol 22, April 2020.
6. Hong Peng Jia, Dwight C. Look, Lei Shi, Melissa Hickey, Lecia Pewe, Jason Netland, Michael Farzan et al. ACE2 Receptor Expression and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Depend on Differentiation of Human Airway Epithelia. *Journal of Virology*. 2005 Dec;79(23):14614–14621. doi: 10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005

7. Ulrich H, Pillat M. M. CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Aithromycin and Stem Cell Engagement. *Stem Cell Rev Rep.*2020 Jun;16(3):434–440. Doi : 10.1007/s12015-020-09976-7.
8. Minzhe Shen, Ying Zhou, JiaweiYe, Abdu Ahmed Abdullah Al-maskri, Yu Kang, Su Zeng, Sheng Cai. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010 (in press)
9. Amy K Winter, Sonia T Hegde. The important role of serology for COVID-19 control. *The Lancet*, April 21, 2020. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30322-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30322-4).
10. Michael J. Loeffelholz & Yi-Wei Tang. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections—the state of the art. *Emerging Microbes & Infections*,9:1,747–756, doi:10.1080/22221751.2020.1745095.
11. Laura Anfossi, Fabio Di Nardo, Simone Cavalera, Critina Giovannoli and Claudio Baggiani. Multiplex Lateral Flow Immunoassay: An Overview of Strategies towards High-throughput Point-of-Need Testing. *Biosensors* 2019, 9, 2 ; doi : 10.3390/bios9010002.
12. Bo Diao, Kun Wen, Jian Chen, Yueping Liu, Zilin Yuan, Chao Han et al. Diagnosis of Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection by Detection of Nucleocapsid Protein.B.M.J. (submitted), medRxiv preprint, doi:<https://doi.org/10.1101/2020.03.07.20032524>.
13. Sandeep Kumar Vashist. In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. *Diagnostics* 2020,10,202; doi:10.3390/diagnostics10040202.
14. Jennifer Abbasi. The Promise and Peril of Antibody Testing for COVID-19. *JAMA*. 2020;323(19):1881-1883. doi:10.1001/jama.2020.6170.
15. Ying Yan, Le Chang, Lunan Wang. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and counter measures. *Rev Med Virol*. 2020; e2106, doi.org/10.1002/rmv.2106.
16. Nandini Sethuraman, Sundararaj Stanleyraj Jeremiah, Akihide Ryo. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2.*JAMA*,published online May6, 2020. Doi :10.1001/jama.2020.8259.
17. Zhengtu Li, Yongxiang Yi, Xiaomei Luo, NianXiong, Yang Liu, Shaoqiang Li et al. Development and clinical application of a rapid IgM□IgG combined antibody test for SARS□CoV□2 infection diagnosis.*Journal of Medical Virology* 2020;1–7.DOI: 10.1002/jmv.25727.
18. Champsaur H, Fattal-German M. Sensitivity and specificity of viral immunoglobulin M determination by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988 Feb;26(2):328–32.
19. Petra Emmerich, Angela Mika , Ronald von Possel, Anne Rackow, Yang Liu, Herbert Schmitz et al. Sensitive and specific detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV)-Specific IgM and IgG antibodies in human sera using recombinant CCHFV nucleoprotein as antigen in μ -capture and IgG immune complex (IC) ELISA tests. *PLoS Negl Trop Dis.*2018Mar;12(3):e0006366. Doi : 10.1371/ journal.pntd.0006366.
20. Li Guo, Lili Ren, Siyuan Yang, Meng Xiao, De Chang, Fan Yang et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases*, doi.org/10.1093/cid/ciaa310, 2020 Mar.21.
21. Gao Yong, Yuan Yi, Li Tuantuan, Wang Xiaowu, Li Xiuyong, Li Ang, Han Mingfeng. Evaluation of the auxiliary diagnostic value of antibody assays for the detection of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Journal of Medical Virology* (in press), doi: 10.1002/jmv.25919.
22. Rodolfo Castro, Paula M. Luz, Mayumi D. Wakimoto, Valdilea G. Veloso, Beatriz Grinsztejn, Hugo Perazzo. COVID-19: a meta-analysis of diagnostic test accuracy of commercial assays registered in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2020 (in press).
23. Fei Xiang, Xiaorong Wang, Xinliang He, Zhenghong Peng, Bohan Yang, Jianchu Zhang et al. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020 Apr 19. doi: 10.1093/cid/ciaa461.
24. Lucia Spicuzza, Arturo Montineri, Rosa Manuele, Claudia Crimi, Maria P Pistorio, Raffaele Campisi, Carlo Vancheri, Nunzio Crimi. Reliability and usefulness of a rapid IgM-IgG antibody test for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection: A preliminary report. *Journal of Infection*, April28, 2020;23;8.
25. Yujiao Jin, MiaoChan Wang, ZhongbaoZuo, Chaoming Fan, Fei Ye, Zhaobin Cai et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *International Journal of Infectious Diseases*. 94 (2020) 49 – 52.
26. Nisreen M.A Okba, Marcel A. Müller, Wentao Li, Chynyan Wang, Corine H. Geurtsvan Kessel, Vicor M. Corman et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. *Emerging Infectious Diseases*, Volume 26, Number7–July 2020.
27. Juanjuan Zhao, Quan Yuan, Haiyan Wang, Wei Liu, Xuejiao Liao, Yingying Su et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Mar 28. DOI: 10.1093/cid/ciaa344.
28. Andrea Padoan, Chiara Cosma, Laura Sciacovelli, Diego Faggian and Mario Plebani. Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS- CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics. *Clin chem lab med*, 2020, aop. doi.org/10.1515/cclm-2020-0443.
29. Daniel Stadlbauer, Fatima Amanat, Veronika Chromikova, Kaijun Jiang, Shirin Strohmeier, Guha Asthagiri

- Arunkumar et al. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup. *Current Protocols in Microbiology*, e100, Volume 57.
30. Jiuxin Qu, Chi Wu, Xiaoyong Li, Guobin Zhang, Zhaofang Jiang, Xiaohe Li et al. Profile of IgG and IgM antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clinical Infectious Diseases*, 27 April 2020. doi.org/10.1093/cid/ciaa489.
 31. Ria Lassaunière, Anders Frische, Zitta B. Harboe, Alex C.Y Nielsen, Anders Fomsgaard, Karen A Krogfelt, Charlotte S. Jorgensen. Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 Immunoassays. *B.M.J* (submitted), medRxiv preprint. doi.org/10.1101/2020.04.09.20056325.
 32. Santosha A. Vardhana, Jedd D. Wolchok. The many faces of the anti-COVID immune response. *Journal of Experimental Medicine*, 2020, Vol.217 N° 6. e20200678.
 33. Akiko Iwasaki and Yexin Yang. The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nature reviews. Immunology*, 20, pages339–341(2020).
 34. Nelson Lee, P.K.S. Chan, Margaret Ip, Eric Wong, Jenny Ho, Catherine Ho, C.S. Cockram. Anti-SARS-CoV IgG response in relation to disease severity of severe acute respiratory syndrome. *J. Clin. Virol.* 35, 179 – 184 (2006).
 35. Anna Petherick. Developing antibody tests for SARS-CoV-2. *The Lancet*, Vol395, April 4, 2020, P:1101-1102.
 36. Markus Hoffmann, Hannah Kleine-Weber, Nadine Krüger, Marcel Müller, Christian Drosten, Stefan Pöhlmann. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. *BioRxiv*, doi.org/10.1101/2020.01.31.929042.
 37. Alba Grifoni, Daniela Weiskopf, Sydney I. Ramirez, Jose Mateus, Jennifer M. Dan, Carolyn Rydyznski et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* (2020), doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015.
 38. Julian Braun, Lucie Loyal, Marco Frentsch, Daniel Wendisch, Philipp Georg, Florian Kurth et al. Presence of SARS-CoV-2-reactive T cells in COVID-19 patients and healthy donors. *medRxiv*, doi.org/10.1101/2020.04.17.20061440.
 39. Wei Liu, Arnaud Fontanet, Pan-He Zhang, Lin Zhan, Zhong-Tao Xin, Laurence Baril et al. Two-year Prospective Study of the Humoral Immune Response of Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*. 2006 Mar 15; 193(6): 792-5. doi:10.1086/500469.
 40. Wu-Chun Cao, Wei Liu, Pan-He Zhang, Fang Zhang, Jan H Richardus. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. *N Engl J Med*. 2007; 357: 1162– 1163.
 41. Wu L.P., Wang N.C., Chang Y.H., Tian X.Y., Na D.Y., Zhang L.Y. Duration of antibody responses after severe acute respiratory syndrome. *Emerging Infectious Diseases*. 2007; 13 (10):1562–1564. doi: 0.3201/eid1310.070576.
 42. Qingqing Lin, Li Zhu, Zuwei Ni, Haitao Meng, Liangshun You. Duration of serum neutralizing antibodies for SARS-CoV-2 : Lessons from SARS-CoV infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, doi.org/10.1016/j.jmii;2020.03.015.
 43. Lan Lan, Dan Xu, Guangming Ye, Chen Xia, Shaokang Wang, Yirong Li, Haibo Xu. Positive RT-PCR Test Results in Patients Recovered From COVID-19. *JAMA*, April 21, 2020 Volume 323, Number 15.
 44. Yan Chen, Weizhi Bai, Bin Liu, Jian Huang, Irakoze Laurent, Wuquan Deng, Xiaoqiu Xiao. Re-evaluation of Nucleic Acid Retested Positive Cases in the Recovered COVID-19 Patients: Report from a Designated Transfer Hospital in Chongqing, China. DOI: 10.21203/rs.3.rs-17321/v1 *Research Square*: Preprint.
 45. Javad Alizargar. Risk of reactivation or reinfection of novel coronavirus (COVID-19). *Journal of the Formosan Medical Association*, doi.org/10.1016/j.jfua.2020.04.013.
 46. Miyo Ota. Will we see a protection or reinfection in COVID-19? *Nat Rev Immunol.* 2020 Apr 17:1. Doi:10.1038/s41577-020-0316-3.
 47. Linlin Bao, Wei Deng, Hong Gao, Chong Xia, Jialyi Liu, Jing Xue et al. Reinfection could not occur in SARS-CoV-2 infected rhesus macaques. *BioRxiv*. doi.org/10.1101/2020.03.13.990226.