

FACULTE DE MEDECINE

D'ALGER



Diagnostic Virologique

Pr H.ZIANE

Service de microbiologie médicale

CHU Mustapha, Alger

Enseignement 3^{ème} année de médecine,
Université de Laghouat, Mai 2020

Un laboratoire de virologie

- Assure :
 - le diagnostic de l'infection virale
 - le suivi de l'infection virale
 - une aide à la prise en charge thérapeutique
 - des actions de santé publique

Dans un laboratoire de virologie

- Le **diagnostic** d'une infection virale aiguë ou chronique se fait par :
 - isolement des virus
 - recherche de marqueurs viraux adéquats (antigènes, génome)
 - recherche de marqueurs immunologiques
- Le **suivi** des infections virales repose sur :
 - réponses au traitements antiviraux (évolution)
 - détection des marqueurs de guérison, de rechute, ou de chronicité
 - détection d'éventuelles résistances aux antiviraux
- Les **actions de santé publique** reposent sur :
 - surveillance épidémiologique (épidémies, résistance, virus émergents,..)
 - contrôle de tous les produits biologiques distribués (sécurité)
 - dépistage des infections nosocomiales virales

Diagnostic virologique : deux approches

Diagnostic direct

Détection directe du **VIRUS** (entier) ou de ses **COMPOSANTS** (antigènes ou génomes viraux) dans les liquides biologiques

Diagnostic indirect

Détection des **ANTICORPS** spécifiques du virus (réponse immunitaire de l'individu)

Diagnostic virologique : trois phases

- **Phase pré-analytique:** prélèvements***
- **Phase analytique:** techniques*, manipulation, validation des résultats
- **Phase post-analytique:** interprétation, rendu et saisie des résultats, et conservation des échantillons biologiques.

Les Prélèvements

« La qualité des prélèvements conditionne les résultats »

- **Réaliser les prélèvements**
 - en fonction des syndromes cliniques (pathogénie)
 - En fonction du virus en cause
 - au niveau du **site de multiplication virale** (organe cible, porte d'entrée et/ou site d'excrétion du virus)
 - **Le plus tôt**; au début des signes cliniques, voire avant (ex infection à CMV chez l'immunodéprimé); pendant la phase aiguë de la maladie quand l'excrétion virale est maximale.
- **Associer plusieurs prélèvements** (sang, urine, LCR, prélèvement de la porte d'entrée,..)

Les prélèvements

Plusieurs types

- Sang total(leucocytes) : la virémie précède l'apparition des signes cliniques
- Sérum, plasma
- Selles
- Urines
- LCR
- Liquide amniotique
- Prélèvements respiratoires : nasal, gorge, aspiration naso-pharyngée, écouvillonnage profond naso-pharyngé , lavage broncho-alvéolaire, PDP, expectoration,..

Les prélèvements

Plusieurs types

- Frottis cervico-vaginal, prélèvements génitaux
- Prélèvements oculaires: frottis conjonctivaux, prélèvements de cornée,..
- Prélèvements cutanés: lésions vésiculeuses, ulcérations
- Biopsies (sans fixateur: pas de liquide de BOUIN)
- Condylomes (HPV)

Recueil et transport du prélèvement

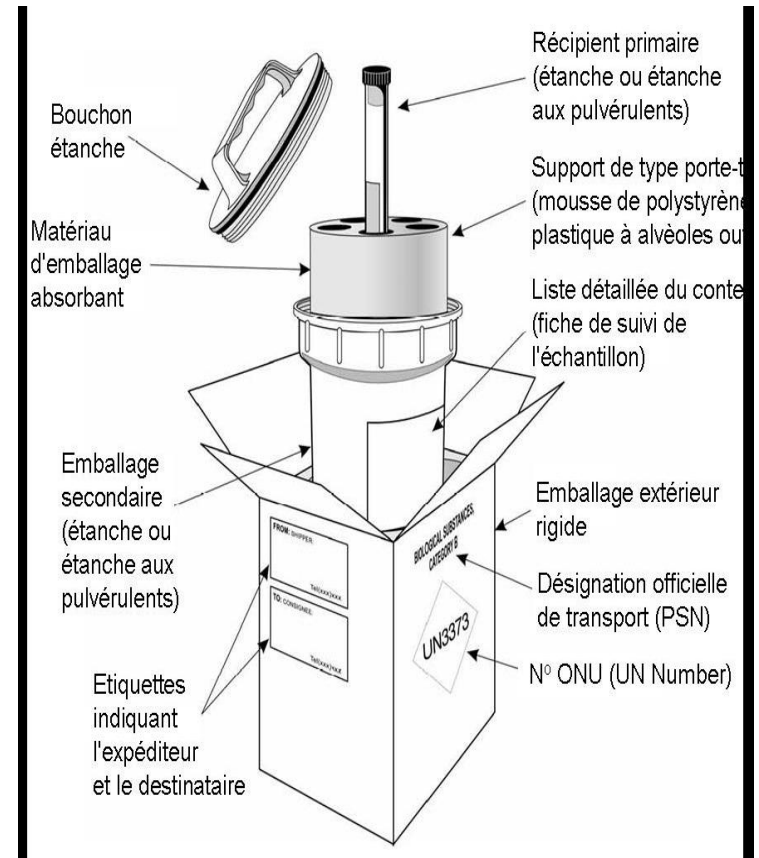
- Rédaction des **protocoles**: modalités/conditions de prélèvement, de transport et de conservation des échantillons biologiques
- Nécessité de connaître, d'appliquer et de respecter ces protocoles
- Toujours bien étiqueter les prélèvements: nom, prénom, date et type de prélèvement
- Importance de la fiche de renseignement: doit être dûment remplie
- Utilisation des milieux de transport des virus pour les prélèvements faits à l'écouvillon.
- Utilisation des containers stériles pour les liquides, matières biologiques et les biopsies
- Respect des conditions de transport et de conservation des échantillons (température et durée)
- Respect des règles de sécurité biologique pour le transport des échantillons (ex: triple emballage)

Recueil et transport du prélèvement



Modèle de containers stériles

Milieu de transport des virus (MTV)
composition: milieu de culture(ex albumine)+antibiotiques+antifongiques



Triple emballage pour échantillons infectieux (catégorie B)

OMS; cours pour expéditeurs 2015-2016. Emballage des matières infectieuses ; page 10 de 24

Recueil et transport du prélèvement

Les conditions de transport des échantillons diffèrent selon la technique de diagnostic virologique:

- **Diagnostic par isolement** (ex culture cellulaire) : la viabilité des virus doit être préservée**
 - acheminer le prélèvement le plus rapidement possible au laboratoire (au moins d'une heure),
 - sinon conservation à +4°C (quelques heures au réfrigérateur)
 - au delà de 36 heures, congeler à -80°C** ou utiliser l'azote liquide,
 - éviter la congélation à -20°C
 - conserver à l'abri de la dessiccation, de la chaleur, des variations de pH et d'une éventuelle pullulation bactérienne
- **Diagnostic par la détection des antigènes viraux** intracellulaires : le prélèvement doit contenir des cellules intactes et en grande quantité **
 - acheminer et/ou conserver le prélèvement à température ambiante ou à + 4 °C
 - ne pas congeler les prélèvements car la congélation altère les cellules

Diagnostic Direct

Permet la détection du virus ou de ses composants

Détection du virus		Détection des composants viraux	
Microscopie électronique	Isolement du virus	Détection des antigènes viraux	Détection du génome viral
	<ul style="list-style-type: none">- sur animaux- sur œuf embryonné- sur culture cellulaire• Effet Cyto-Pathogène (ECP)• Immuno-cyto-diagnostic	<p>-Immuno-cyto-diagnostic par:</p> <ul style="list-style-type: none">• Immunofluorescence (IF)• ELISA• Agglutination (Latex)• Immunochromatographie	<ul style="list-style-type: none">-Hybridation-PCR-RT-PCR-PCR temps réel-PCR-RFLP

1. Microscopie électronique (ME)

- Utilisation rare
- Utile pour caractériser un nouveau virus

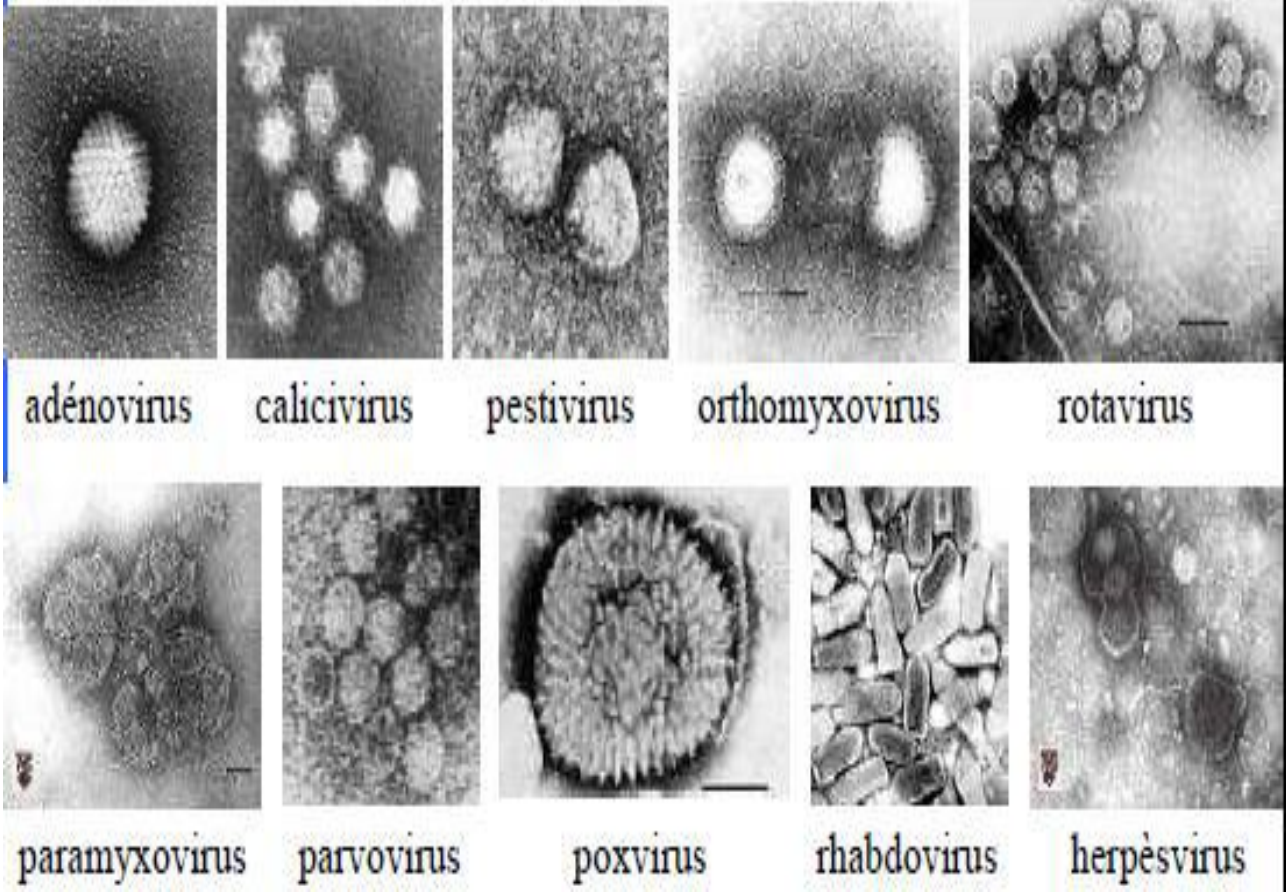
Ex: le nouveau Coronavirus (SARS-CoV 2) responsable de la pandémie COVID-19 en 2020, a été mis en évidence en ME (image en «couronne»)

- Permet un diagnostic de groupe (*Coronavirus, Herpesvirus,..*)
- L'immunomicroscopie électronique augmente le seuil de sensibilité de la ME

1. Microscopie électronique (ME)



Image en couronne en ME
Coronavirus (ex SARS-CoV-2)



2. Isolement du virus

Trois (3) systèmes cellulaires peuvent être utilisés, mais aucun système ne permet l'isolement de tous les virus

- **Culture cellulaire +++**
- Œuf de poule embryonné (virus de la grippe)
- Animal (*Coxsackievirus*)

Isolement du virus sur culture cellulaire in vitro

- Méthode de référence
- Elle met en évidence la présence de particules virales infectieuses (virus vivant)
- Le virus est un parasite intracellulaire strict. Il ne se réplique que dans des cellules vivantes, pouvant entraîner des lésions cellulaires appelées **effet cytopathogène(ECP)**
- Milieux de culture doivent satisfaire aux exigences des cellules : milieux synthétiques complexes (sels minéraux, a.aminés, vitamines, glucose etc...), tamponnés à pH 7,2, additionnés des facteurs de croissance apportés par du sérum animal (veau le plus souvent) + Antibiotiques + Antifongiques + tampon (Hepes, Tricine).

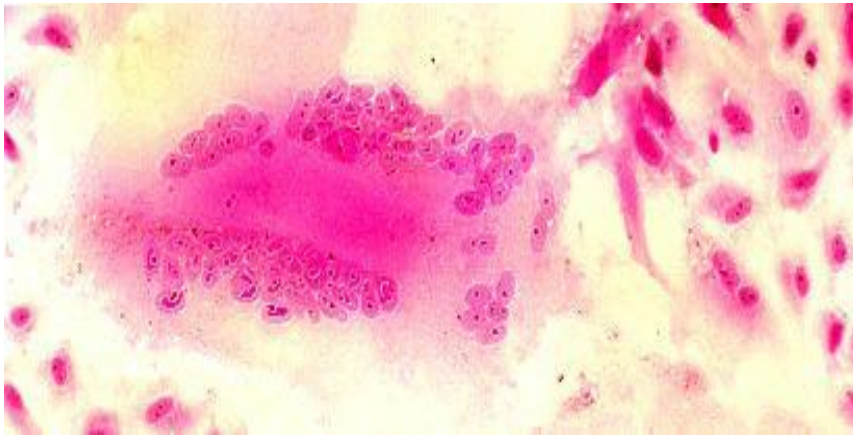
Culture cellulaire

- Cellules primaires (ex : rein de singe)
- Cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires humains(ex: MRC-5)
- Cellules en lignées continues (ex: Vero, MDCK,..)

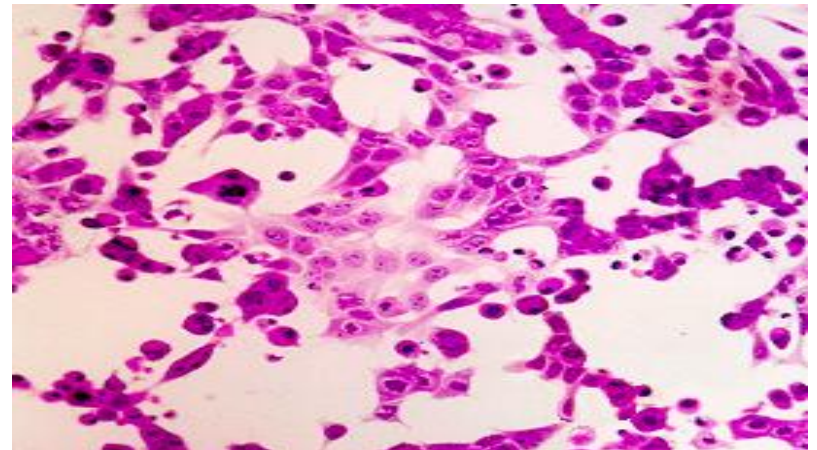


Culture cellulaire : Identification

L'orientation du diagnostic repose sur l'aspect et le délai d'apparition de l'ECP peuvent être caractéristiques d'un groupe de virus.



Formation de Syncytia par le virus de la rougeole (courtesy of Linda Stannard, University of CapeTown, S.A.)
Formation de Syncytia par le virus respiratoire syncytial (VRS)



Aspect en dentelles des Adénovirus

Culture cellulaire : Identification

L'identification précise fait appel à des techniques immunologiques:

- Séroneutralisation de l'ECP en présence d'anti-sérums spécifiques
- Inhibition de l'hémadsorption
- Inhibition de l'hémagglutination
- Caractérisation des antigènes par des méthodes sensibles et spécifiques
 - immunofluorescence
 - Elisa

Avantages et inconvénients de la Culture Cellulaire

- **Avantages**

- Mise en évidence du virus infectieux
- Possibilité d'étudier l'agent viral
- Très sensible : son seuil de sensibilité est de 1 à 10^2 virions
- Seule technique permettant une étude de la sensibilité aux antiviraux
- Mise en évidence de certains antigènes au cours de la réplication

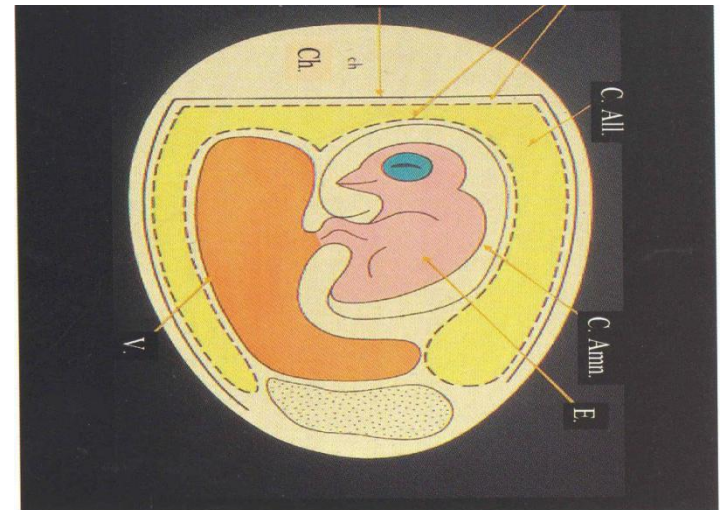
- **Inconvénients**

- Qualité des Prélèvements** (respect des bonnes conditions)
- Technique longue (apparition d'ECP tardive) et coûteuse (cellules, milieux etc...)
- Absence d'ECP pour certains virus non cytopathogènes
- Certains virus sont non cultivables (HAV, HBV, *Coxsackievirus A*, Rotavirus)

Isolement du virus sur œuf de poule embryonné (1931)

Utilisé uniquement dans les laboratoires de référence de la **Grippe** pour:

- pour isolement, et entretien des souches,
- la production d'antigènes
- la production de vaccins.

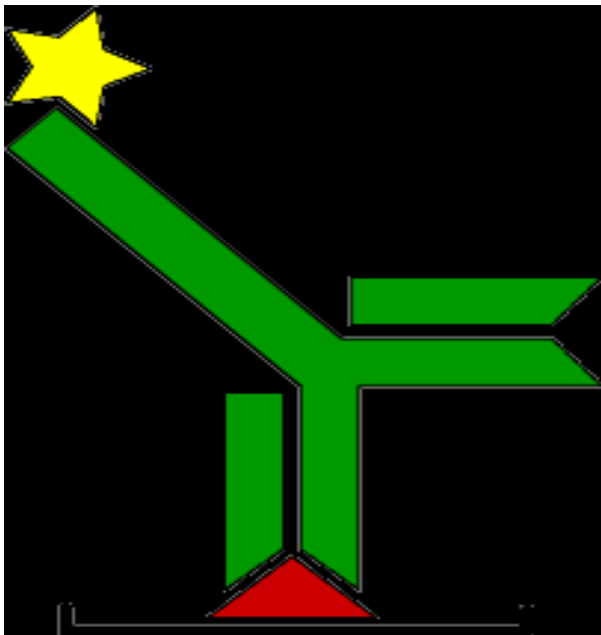


Isolement du virus chez l'animal après injection intracérébrale ou intra-péritonéale

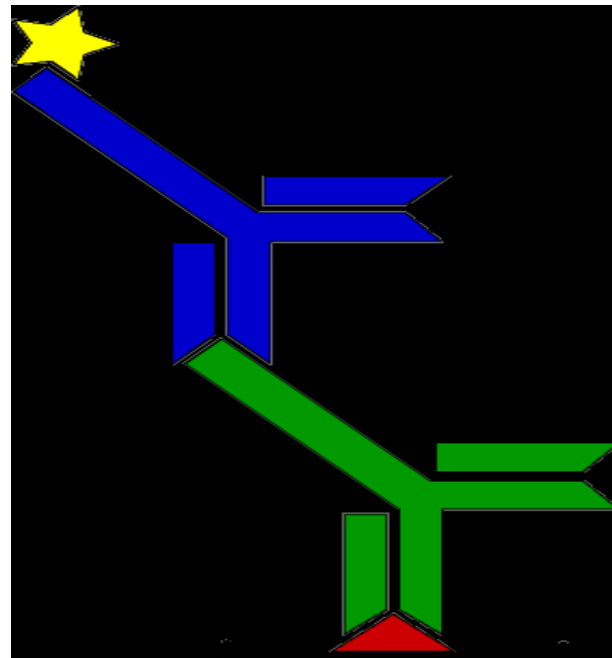
- Diagnostic des infections à *Coxsackievirus A* qui entraînent une paralysie flasque chez les souriceaux nouveau-nés
- Diagnostic de la rage qui entraîne une paralysie flasque puis mort des souriceaux nouveau-nés

3. Détection directe des Antigènes viraux

- Mise en évidence des antigènes viraux intracellulaires par **Immunofluorescence (IF)**



IF directe

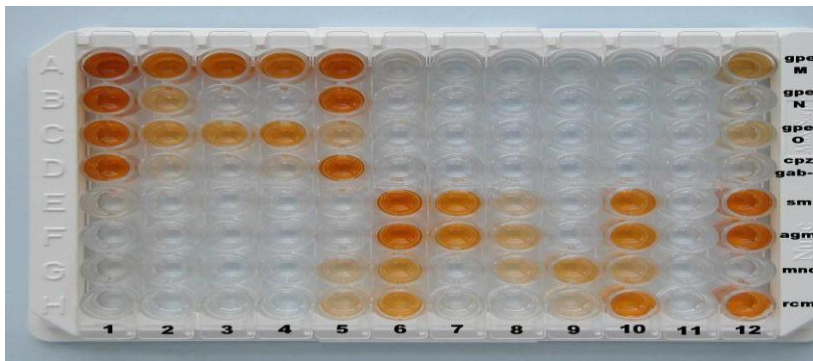


IF indirecte

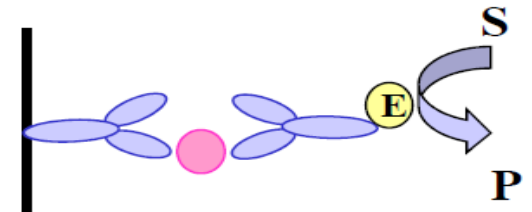
Détection des Antigènes viraux

- Mise en évidence des Ag viraux solubles ou intracellulaires après lyse des cellules, par méthode **ELISA** :

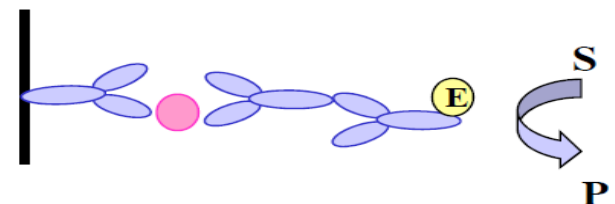
- rapide (2h30)
- sensible et spécifique
- sérotypage
- nombreuses trousse commercialisée
- non applicable à tous les virus



Sandwich direct



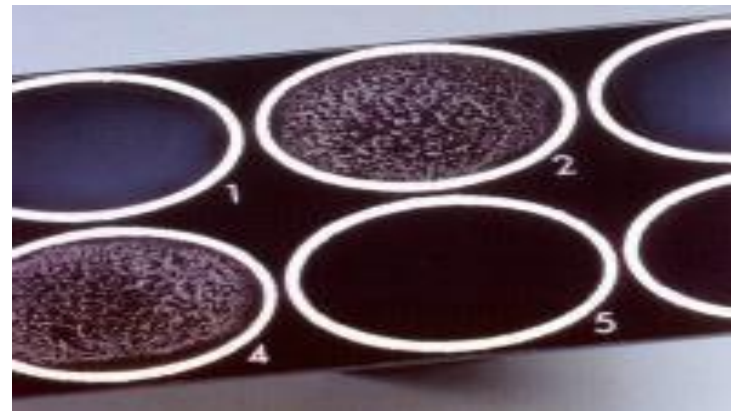
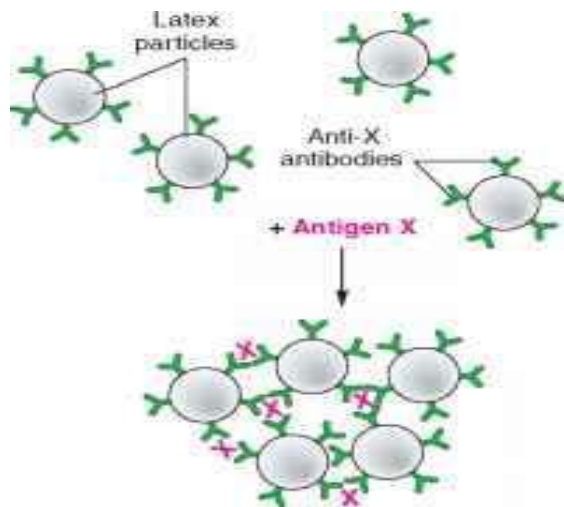
Sandwich indirect



Détection des Antigènes viraux

- **Agglutination** de particules de latex sensibilisées par des anticorps

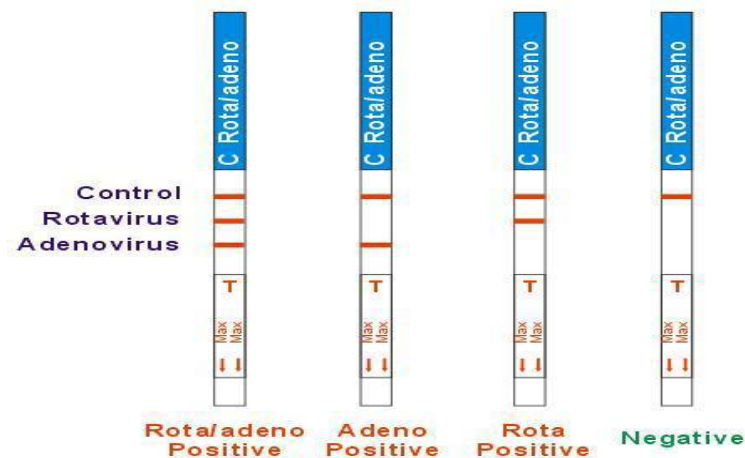
ex: à partir de selles au cours des gastro-entérites virales : Rotavirus, Adénovirus ou Astrovirus)



2 et 4 agglutination positive

Détection des Antigènes viraux

- Mise en évidence des antigènes viraux par **Immuno-chromatographie**
 - diagnostic rapide-simple -mais de sensibilité moindre
 - exemples :Virus respiratoires (Grippe, VRS...),Virus entériques (Rotavirus, Adénovirus...)



Détection des Antigènes viraux

- **Avantages**

- conservation et transport des prélèvements moins strictes
- facilité technique et rapidité d'exécution
- réponse rapide
- grande spécificité de ces techniques (utilisation des Acs monoclonaux)
- nombreux tests commercialisés

- **Inconvénients**

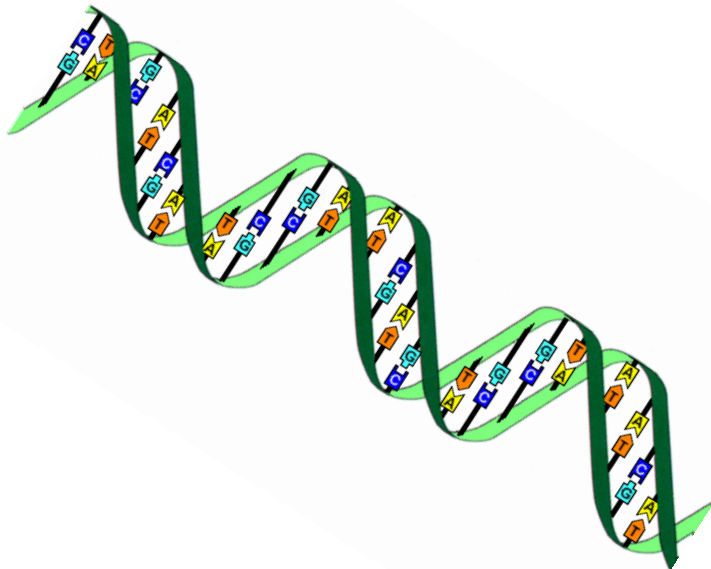
- sensibilité relativement faible
- coût relativement élevé

4. Détection du génome viral (ARN ou ADN) « Biologie Moléculaire »

- Poser le diagnostic d'infection par des virus difficilement ou non cultivables (parvovirus B19, HCV)
- Raccourcir le délai de diagnostic de certains virus cultivables (CMV, VZV)
- Quantification « charge virale » (quantification de l'ADN de l'HBV, de l'ARN du HIV ou de l'HCV ...)
- Conclure un Diagnostic face à des profils sérologiques d'interprétation douteuse ou à une phase pré-sérologique de la maladie.
- Comparer les souches virales entre elles : études épidémiologiques
- Elles sont applicables à tous les virus
- Amplification « multiplex » plusieurs couples d'amorces correspondant à différents virus

Hybridation moléculaire

- La complémentarité des bases est à la base de cette **technique**
- faible sensibilité de l'ordre 10^4 à 10^5 copies

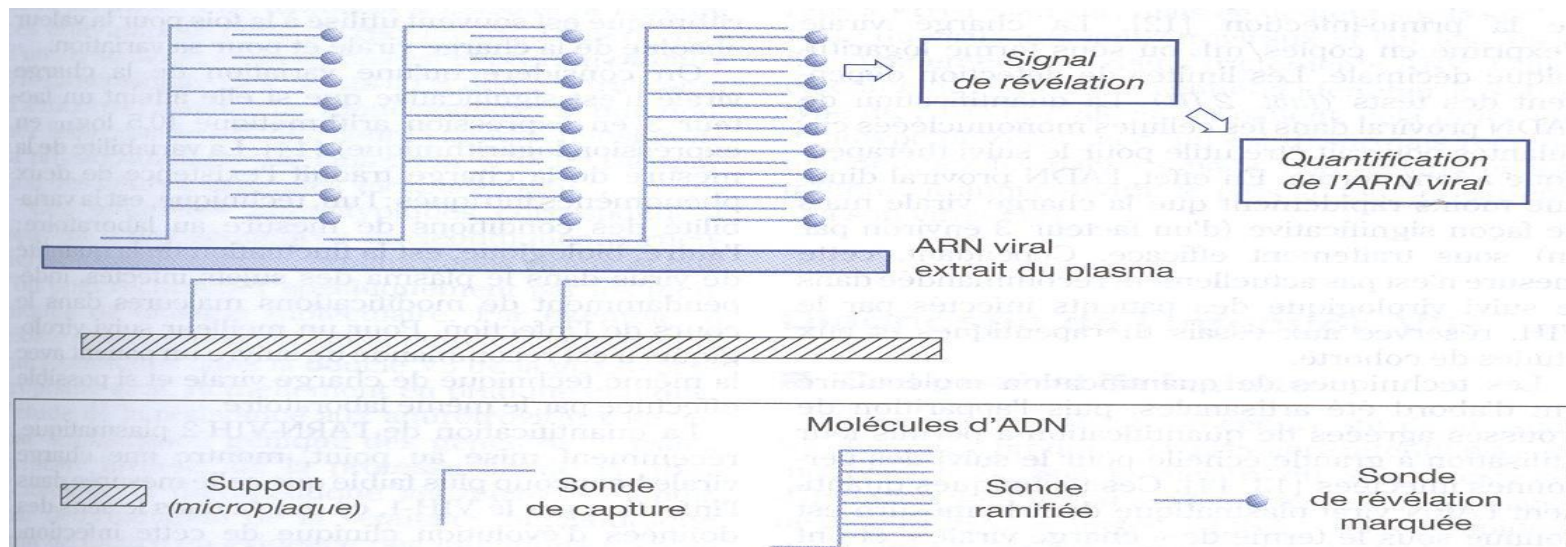


Exemples de techniques d'hybridation:

- Hybridation en Southern Blotting
- Hybridation en Northern Blotting
- Hybridation en dot blot
- Hybridation *in situ*
- Immunocapture sur phase solide

Amplification du signal

- Signal ADN branché (bDNA) : consiste à augmenter le signal post-hybridation, en utilisant des sondes ramifiées (ADN branché) ==> seuil de détection est alors de 500 copies /ml de plasma ==> application : charge virale HIV, HCV, HBV et détection de l'HPV,



Amplification génique (de la cible)

- **PCR** (Polymerase Chain Reaction ou amplification génique)
 - l'ADN est extrait des échantillons
- **RT-PCR** (avec une étape supplémentaire de transcriptase inverse)
 - transforme l'ARN du virus en ADN complémentaire

Pour ces deux techniques:

- **Prélèvements**
 - Selon site de répllication
 - Sang total sur tube sec /EDTA, **jamais l'héparine**
 - Conservation longue période à - 80°C (virus à ARN++)

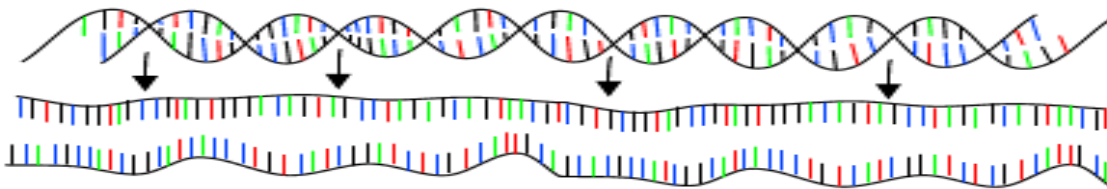
Principe de la PCR

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

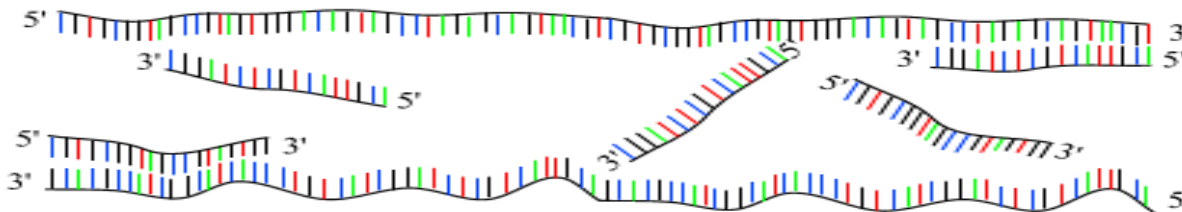
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

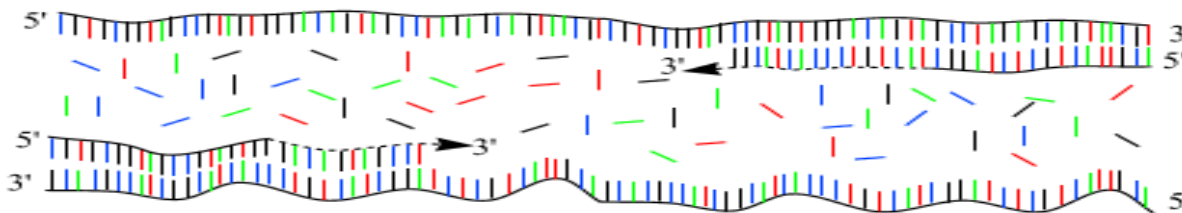
45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's



(Andy Vierstraete 1999)

PCR conventionnelle ou end point

- Quatre étapes successives :

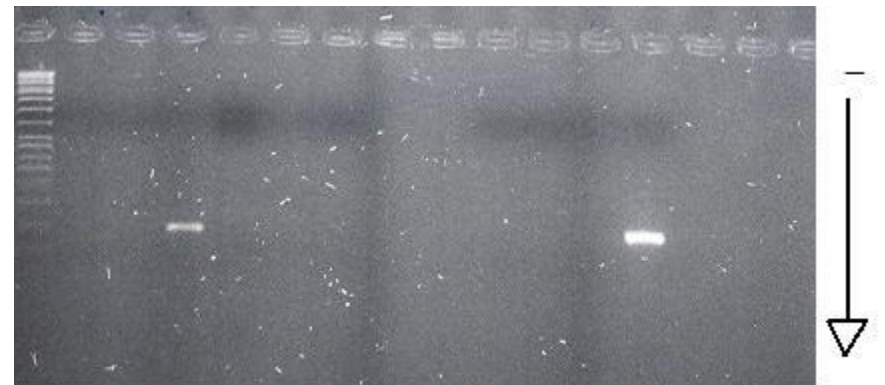
1. Extraction des acides nucléiques

2. Addition du mix(+ amorces + polymérase + dNTPs)

3. Amplification (thermocycleur)

4. Détection des produits amplifiés

- migration sur gel
- hybridation avec **sonde spécifique**



Migration sur gel d'agarose

PCR en temps réel

- **Trois étapes :**

1. Extraction des acides nucléiques

2. Addition du mix(+ **amorces + polymérase + dNTP+ sonde**)

3. Amplification et détection de la cible simultanément

PCR en temps réel

- **Avantages**
 - Réduction des risques de contamination par les produits de PCR (Pas d'ouverture de tubes)
 - Amélioration de la sensibilité
 - Plus large domaine de linéarité
 - Quantification plus précise
 - Réponse plus rapide

PCR Multiplex

- Recherche de plusieurs virus (agents infectieux) dans le même prélèvement par la même PCR
- amplifier une séquence suffisamment conservée commune aux différents virus recherchés (ex : Herpesviridae: HSV1-HSV2-VZV-HHV6 -CMV-EBV)
- systèmes d'amorces spécifiques d'agents pathogènes éloignés (ex : virus respiratoires).

Séquençage

- Utilisation de didésoxyribonucléosides triphosphates (**ddNTPs**)
- Réaction de séquence = synthèse in vitro d'ADN
- Recherche des mutations de résistance aux traitements antiviraux (HIV, HBV, CMV,..)
- Séquençage + analyse phylogénétique : permet le génotypage
- Intérêt : épidémiologique (généalogie des souches, variabilité) et thérapeutique.

Techniques du diagnostic indirect

« Sérologie »

- **Détection des anticorps antiviraux** par:

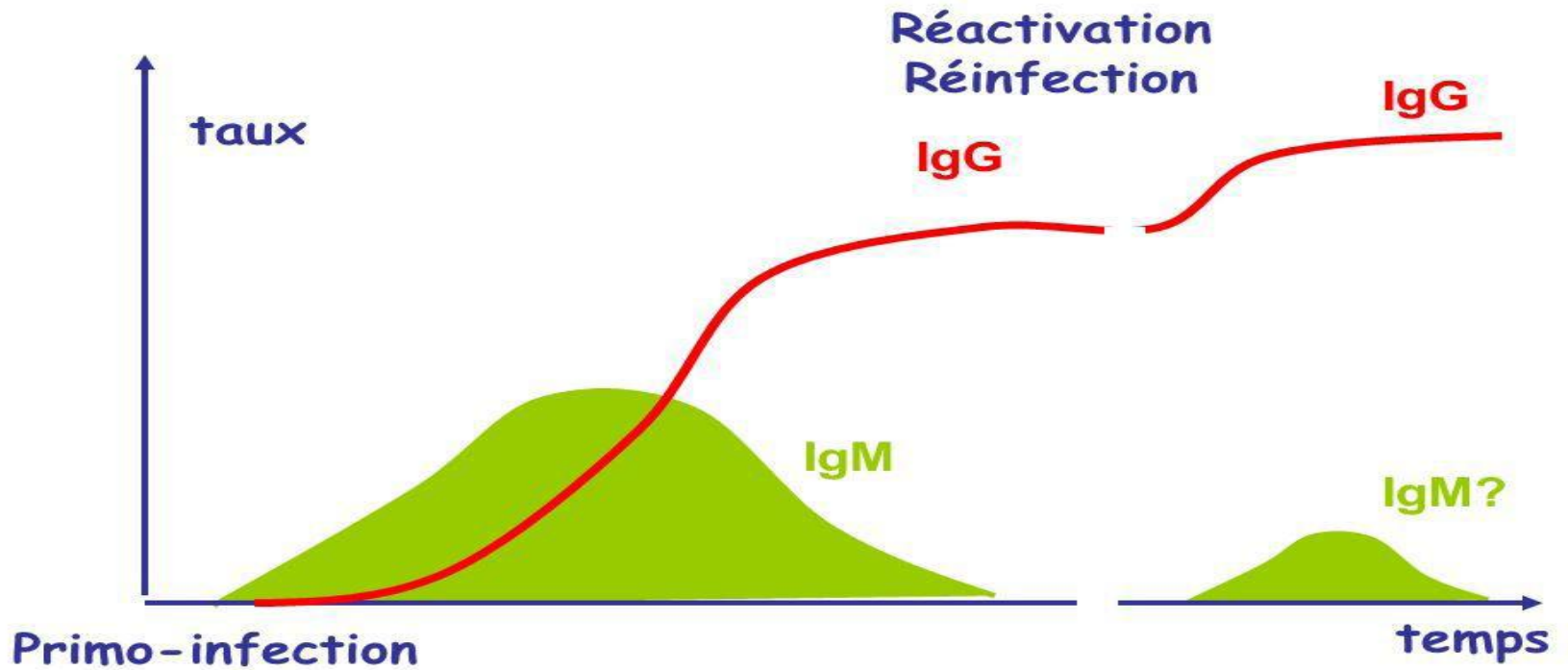
- Séroneutralisation
- Inhibition de l'hémagglutination
- EIA +++ (ELISA)
- Immunofluorescence
- Immunoblot
- Réaction de fixation du complément
- Hémagglutination passive
- Agglutination de particules de Latex

Indications de la sérologie

- **Outil biologique de première intention:** HIV, hépatites, CMV, rubéole, rougeole, parvoviroses...
- **Mise en évidence des anticorps :**
 - protecteurs témoins d'une infection ancienne (rougeole, rubéole, hépatite A ...)
 - vaccinaux à un titre protecteur (hépatite B, rubéole)
 - dont la présence prouve que le sujet est porteur du virus (HIV, HTLV) ou est susceptible de présenter des récurrences (CMV, EBV, HSV...)
- **Etablir un diagnostic d'une infection récente:** séroconversion(IgM) ou augmentation du titre des Acs(X 4)
- **Suivi d'une infection:** l'évolution d'une infection virale aiguë

La sérologie

Cinétique des Ac



La sérologie: Prélèvements

- Le prélèvement doit être réalisé avant toute thérapeutique susceptible de modifier l'interprétation du sérodiagnostic (sérothérapie, transfusion...)
- Sang (sérum, plasma), LCR, humeur aqueuse, liquide articulaire
- Un sérum précoce et un sérum tardif (15 jours plus tard)
- Les 2 sérums seront traités en même temps au laboratoire
- Le sang ou le sérum peut être conservé 24 à 48 heures à + 4 °C
- Le sérum aliquoté est conservé à -20 °C au moins 1 an
- Un stockage du sérum aliquoté à -80 °C est recommandé si conservation sur plusieurs années (sérothèques)

Séroneutralisation

- **Principe**

- Les ACs présents dans le sérum inhibent l'ECP (donc l'infectivité du virus)
- La réaction nécessite une culture de cellules pour la réplication du virus
- Ces ACs, dits neutralisants *in vitro*, ont souvent une activité protectrice *in vivo*.

- **Technique**

Technique laborieuse car elle nécessite un laboratoire de culture cellulaire

Cellules + virus sans sérum => ECP

Cellules + virus + sérum (ACs) => pas d'ECP

- **Applications**

- Elle ne s'applique **qu'aux virus induisant un ECP d'apparition rapide** :
entérovirus humains , virus herpes simplex
- technique de référence pour mesurer l'immunité anti-poliomyélitique

Inhibition de l'Hémagglutination (IHA)

- **Principe**

- Certains virus (ex: de la rubéole, de la grippe...) sont capables d'agglutiner spécifiquement les hématies (HA) de certaines espèces animales (cobayes, poussins...)
- Les Acs spécifiques se fixent sur le virus => le virus n'a plus accès à la surface des hématies => il y a donc IHA (inhibition de la formation d'un agglutinat visible à l'œil nu)

- **Caractères de la technique**

- IHA est souvent dépendante du pH, de la température et exige des globules rouges frais
- Eliminer les Achétérologues dirigés contre les GR tests et les inhibiteurs non spécifiques de l'HA (bêta-lipoprotéines par exemple)
- Les anticorps mis en évidence par IHA sont habituellement protecteurs *in vivo*
- La sensibilité de IHA est moindre que celle de l'ELISA

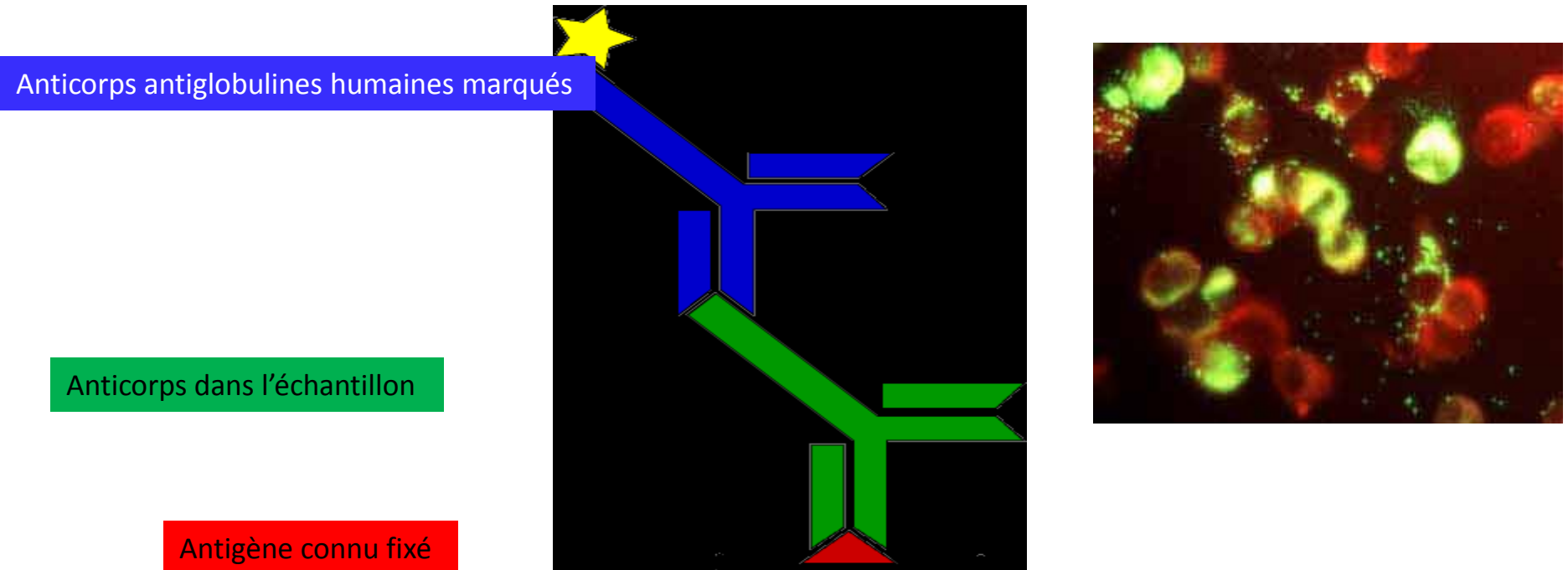
- **Applications**

- La rubéole
- La grippe pour le sous typage

Réaction de fixation du complément

- **Applications**
sérologie de la grippe et infections respiratoires
- Technique ancienne, de moins en moins utilisée
- Peu coûteuse

L'Immunofluorescence indirecte



Inconvénients

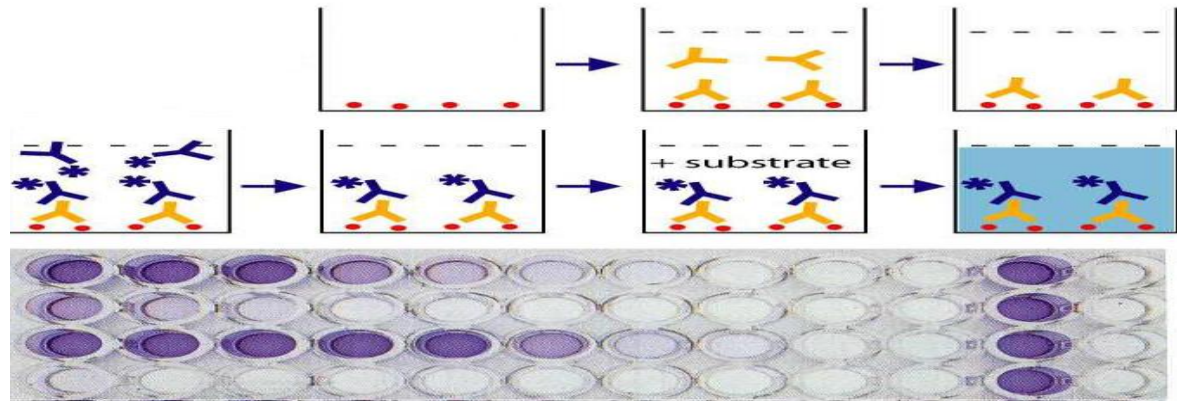
- Spécificité imparfaite (interprétation subjective)
- Absence d'automatisation, techniques réservées à de petites séries

Applications

- EBV, la recherche d'IgM du VRS, Paramyxovirus, Grippe

ELISA

- **Principe général** (recherche des Acs dans le sérum):
 - L'antigène viral est immobilisé sur un support solide (puits de microplaque);
 - Le sérum à tester est mis en contact avec l'Ag ;
 - Etape de lavage,
 - Un anticorps anti-immunoglobuline humaine est ajouté;
 - Cet Ac est couplé à une enzyme → réaction colorée (chromogène) → Densité Optique(spectrophotomètre)
- NB : le substrat de l'enzyme peut être fluorogénique, chimioluminescent ou chromogénique

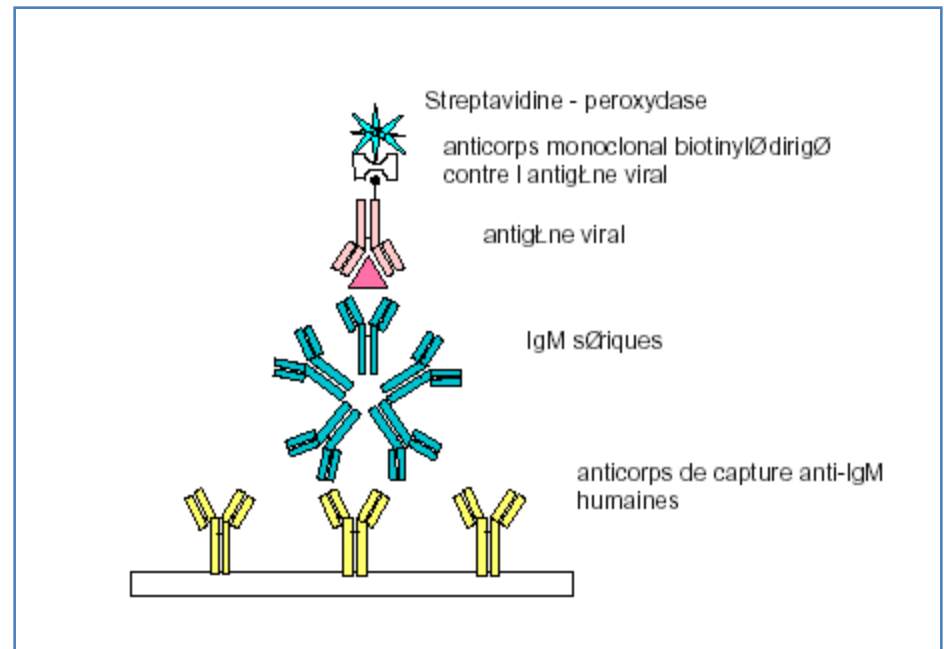


ELISA

- Rapide
- Sensible
- Spécifique
- Automatisation
- Permet de discriminer entre IgM et IgG
- Quantification des Ac(Rubéole)
- Avidité des IgG: distinguer primo-infection et infection ancienne

ELISA immunocapture(IgM)

- Eviter les faux positifs : facteur rhumatoïde (IgM anti-IgG humaines)
- Eviter les faux négatifs (compétition avec IgG)
- Dc de l'hépatite A, ..



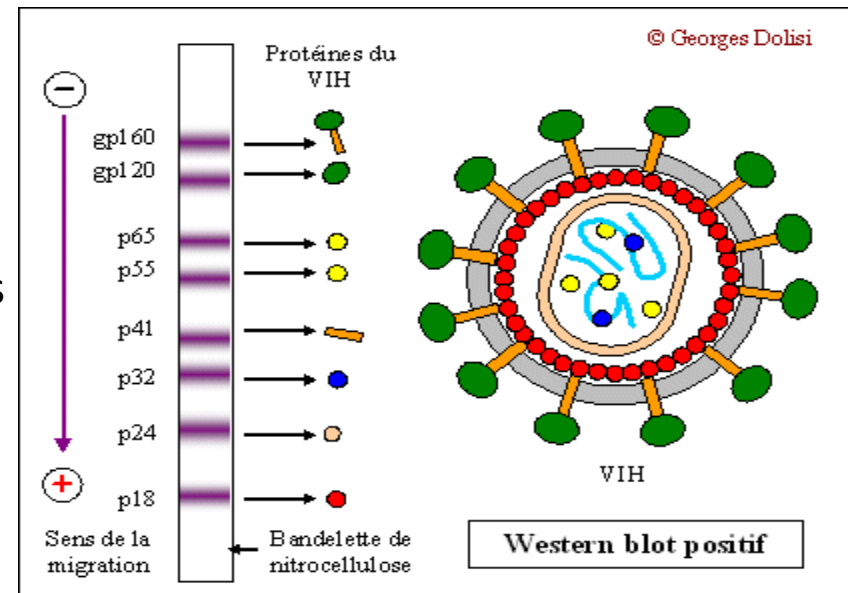
Western blot ou immunoblot

- **Principe**

- Les protéines virales natives sont séparées par électrophorèse puis transférées sur membrane de nylon.
- Les Acs spécifiques éventuellement présents dans le sérum se fixent sur ces protéines.
- La liaison Ag-Ac est révélée par une anti-Ig marquée à l'aide d'une enzyme. On ajoute le substrat => réaction colorée.

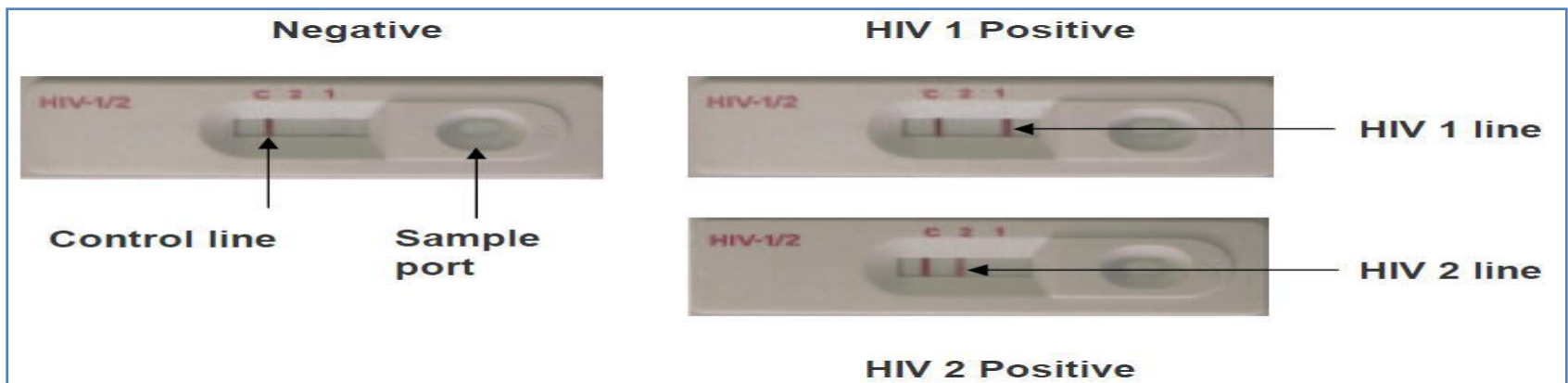
- **Avantages**

- Plus spécifique que l'ELISA
- Réponse en détail vis à vis des protéines virales



Test rapide sur bandelette par chromatographie

- Test Rapide de détection des anticorps anti HIV1/2 par immunochromatographie à partir du sérum, plasma ou sang entier
- Test pour la détection qualitative des anticorps



Merci
Pour votre attention