



Diagnostics virologiques

hembaza

I-Pratique des prélèvements :

- ✓ Un résultat virologique fiable exige des échantillons prélevés à un moment adapté à la chronologie de l'infection et conservés dans des conditions favorables.
- ✓ Leur site dépend des symptômes cliniques et de mode de transmission des virus suspectés.

✓ Les échantillons sont étiquetés, placés dans des emballages étanches pour éviter toute contamination du personnel ou de l'environnement lors du transport.

✓ Les prélèvements sont accompagnés d'une fiche de renseignements qui est indispensable pour le choix des techniques et l'interprétation des résultats.

Les prélèvements en virologie

- « Phase pré-analytique »
 - Identification:
 - Du patient: identité, age, sexe,
 - Du prescripteur
 - Du prélèvement
 - Date, heure de prélèvement
 - Nature du prélèvement
 - Renseignements cliniques motivant la demande +++
 - Transport: dépend de la nature du prélèvement
 - Rapide ++
 - Milieu de transport pour virus (prélèvements sur écouvillon)
 - Récipient stérile (biopsie, LBA, LCR...)
 - Conservation avant analyse
 - 2-6°C
 - -80°C

Les prélèvements en virologie

- Sang pour sérologie
 - Tube « sec »
 - conservé au frigo 24-48h,
 - centrifugation, décantation
 - congélation et conservation du sérum à -20°C .
- Prélèvements respiratoires (culture)
 - Aspiration nasale (dispositif stérile)
 - Écouvillonnage nasal en milieu de transport
 - Lavage Broncho Alvéolaire (pot stérile)
- Urines (culture) - $2-6^{\circ}\text{C}$
- Selles (culture, PCR) - $2-6^{\circ}\text{C}$
- Liquide Céphalo Rachidien (culture, PCR) - $2-6^{\circ}\text{C}$

Les prélèvements en virologie

- Vésicules, ulcérations
 - culture - (transport rapide, <36h 2-6°C)
 - Récupérer des cellules ++: aspiration à la seringue du liquide vésiculaire; gratter le plancher des lésions avec écouvillon ⇒ milieu de transport pour virus / lame immunofluorescence (VZV++)/inoculation directe au lit du malade (VZV)
- Prélèvement endocol
 - Milieu de transport, conservation 2-6°C (HSV, papillomavirus)
- Fragments de tissus
 - Pot stérile, conservation 2-6°C
- Sang total pour culture - détection antigènes viraux
 - Tube avec anticoagulant (héparine), < 6h t° ambiante
- Sang total pour détection et quantification du génome viral
 - Tube avec anticoagulant type EDTA (héparine = inhibiteur de PCR), conservation 2-6°C

II-Acheminement au laboratoire :

Il doit se faire **au plus tôt**, les conditions de mise en attente dépendent de la **nature** du prélèvement, la **fragilité** des virus suspectés et des techniques qui seront mises en œuvre.

III-Techniques virologiques en pratique médicale courante :

La figure 1 montre les principales techniques utilisées.

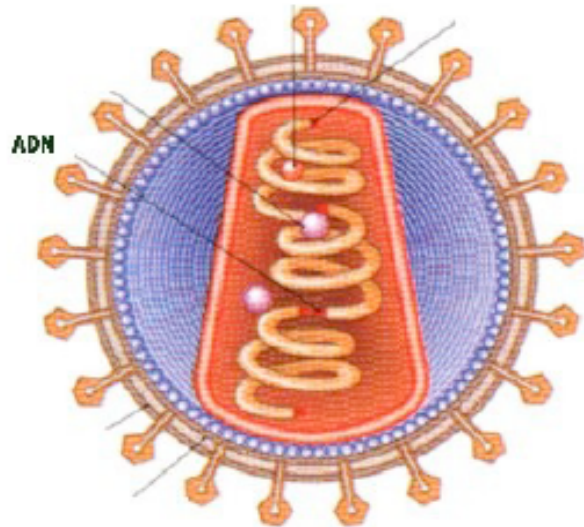
➤ Diagnostic direct

- = mise en évidence du virus ou de ses constituants

➤ Diagnostic indirect

- = détection des marqueurs immunologiques spécifiques (anticorps +++) produits par l'organisme en réponse à une infection virale

Diagnostic direct



- Isolement du virus (animaux vivants, œuf embryonné, **cultures cellulaires**)
- Visualisation du virus en **microscopie électronique**
- Mise en évidence du **génomme viral**
- Mise en en évidence des **antigènes viraux**

III-1- techniques utilisant les cultures cellulaires :

- ✓ Strictement dépendant des cellules pour leurs répliquions, les virus ne sont cultivables qu'en cellules vivantes.

Cours de Virologie
Ghembaza Boublenza

Il existe 3 sources :

- **A+ vivants,**
- **l'oeuf de poule embryonné (1931) utilisé uniquement dans les laboratoires de référence de la Grippe pour isolement, entretien des souches, la production d'antigènes et de vaccin**
- **les cellules en culture qui sont les plus utilisés en pratique.**

- ✓ Ces techniques restent la base du diagnostic virologique
- ✓ Chaque virus ayant un tropisme cellulaire propre, il n'existe pas de système de la culture cellulaire universelle, le laboratoire doit contenir un minimum de 2 ou 3 lignées cellulaires pour obtenir la réplication du plus grand nombre de virus pathogènes pour l'homme.

Isolement du virus

- Cultures cellulaires +++
 - Différents types de cellules en fonction du **tropisme cellulaire** du virus recherché
 - MRC-5 (fibroblastes embryonnaires) ex: HSV, CMV, adénovirus
 - Hep-2 (carcinome du larynx) ex: HSV,
 - Vero (cellules de rein de singe)
 - MDCK (cellules de rein de chien) ex: grippe
 - **Effet cytopathogène**: multiplication du virus dans les cellules - altération de la morphologie cellulaire.
 - Identification du virus
 - **Immunofluorescence** ou immunoperoxydase
 - Séroneutralisation
 - Inhibition de l'hémagglutination

✓ Quand un virus est inoculé en culture cellulaire, plusieurs éventualités sont possibles:

-absence de réplication (cellule non permissive).

-réplication peu cytolytique sans modifications morphologiques des cellules :

Divers artifices réservés à certaines familles virales sont utilisés pour montrer la présence du virus dans la nappe cellulaire. (tab1).

-réplication cytolytique altérant la morphologie de la nappe cellulaire : ECP:

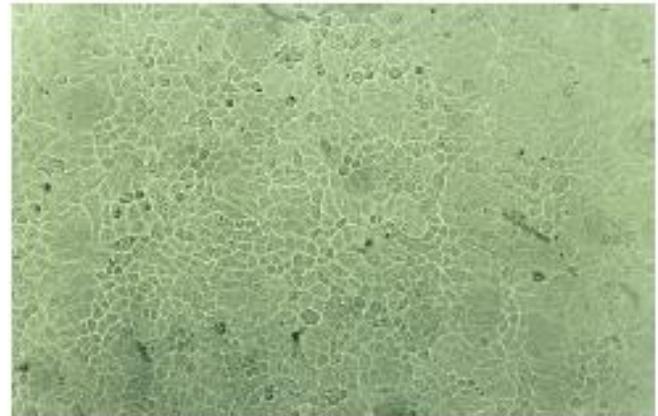
Son aspect est souvent évocateur de telle ou telle catégorie de virus.

NB : il arrive qu'un virus en faible quantité ou se répliquant mal dans le type de culture cellulaire utilisé ne soit détecté, un diagnostic probabiliste est souvent possible, du moins de la famille ou du genre en fonction du :

- ✓ **Type de cellules sur lesquelles il s'est multiplié**
- ✓ **Du délai d'apparition**
- ✓ **Des caractéristiques de l'ECP**
- ✓ **Et de l'origine du prélèvement.**

Cultures cellulaires

- Inoculation du prélèvement:
 - Sur plaque
 - Sur flasque
- Détection du virus
 - Après culture rapide: IF
 - HSV: 16h, CMV: 72h, virus respiratoires
 - Lecture des flasques de culture pendant 3 semaines après inoculation (microscope à contraste de phase) : apparition d'un ECP



Cellules Hep non infectées

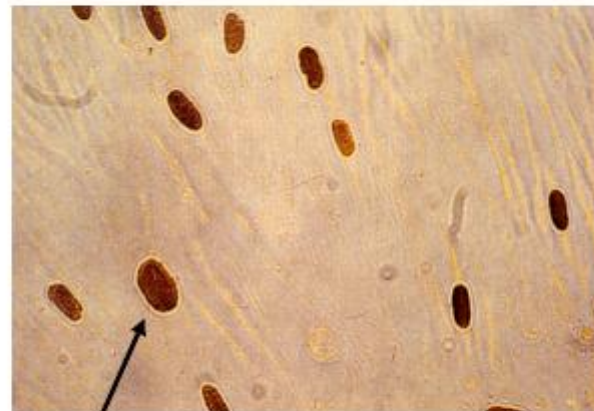


Aspect en « dentelle »: adénovirus

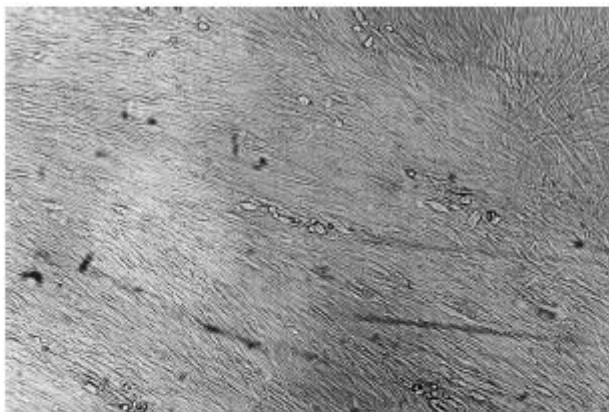
Cultures cellulaires



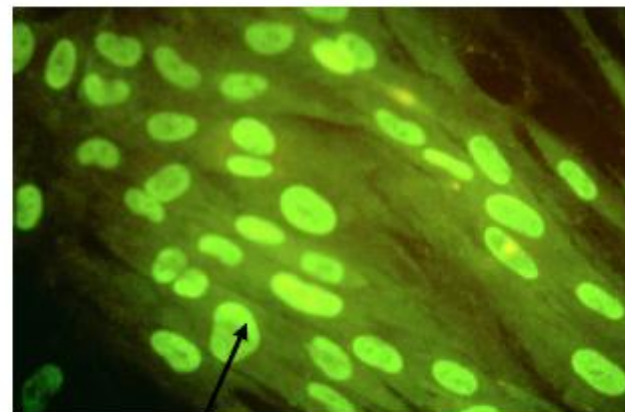
Fibroblastes MRC-5 non infectés



Noyaux positifs en immunoperoxydase



MRC-5: ECP cytomégaloovirus (banc de poisson)



Noyaux positifs en immunofluorescence

La culture cellulaire peut être accompagnée d'autres tests d'identification pour plus de certitude tel que :

- ✓ Immunofluorescence
- ✓ Seroneutralisation
- ✓ Inhibition de l'hémagglutination
- ✓ Hybridation avec des sondes spécifiques
- ✓ Techniques d'amplification.

Nb : pour réduire les délais de réponse les techniques dites de culture rapide ont connu un grand essor. Elles associent une centrifugation des prélèvements sur les cellules afin de favoriser les interactions virus-cellule et un marquage des cellules infectées en immunofluorescence.

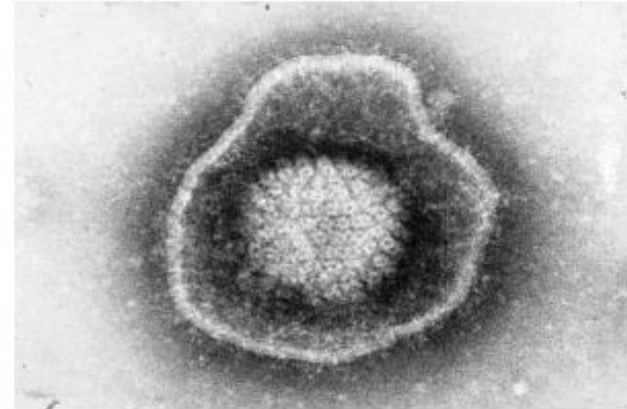
Cours de Virologie
Ghembaza Boublonza

III-2-détection de virus entier par microscopie électronique (ME)

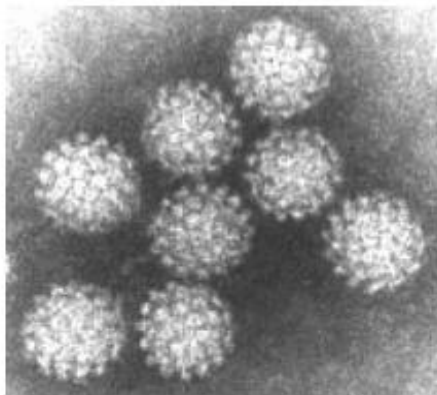
- utilisée quand le virus se trouve en grande quantité.
- utilisée pour détecter les agents non cultivables responsables de gastroentérites.
- on en augmente la sensibilité en mettant le prélèvement à examiner en contact avec un sérum dirigé contre le virus suspecté (virus sous forme d'agrégats)

Microscopie électronique

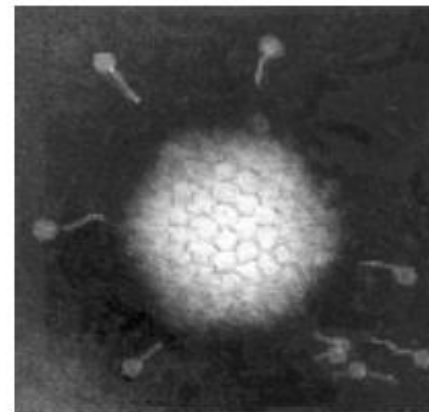
- Détection du virus entier
- Coloration négative



Herpes virus



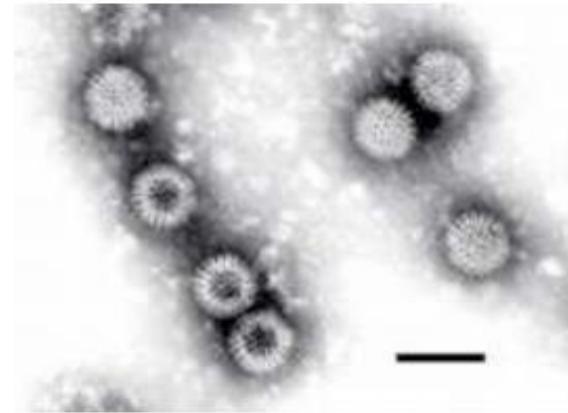
papillomavirus



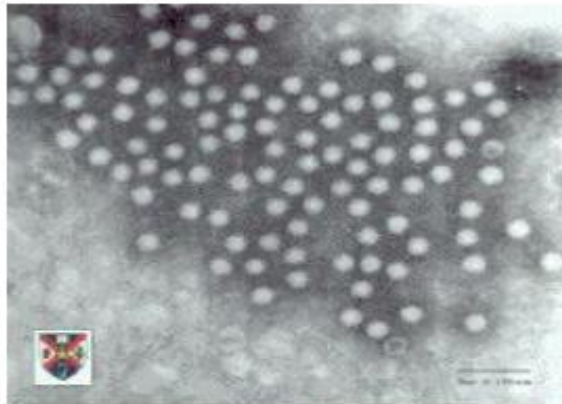
adénovirus

Microscopie électronique

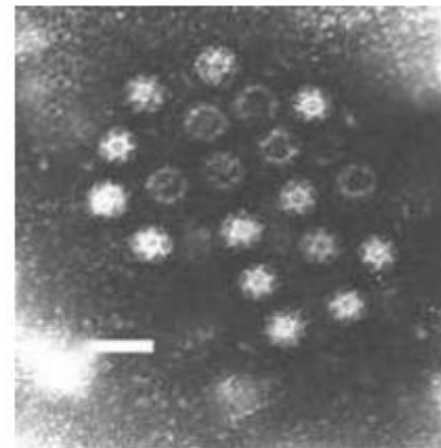
- Appliquée à la recherche de virus non cultivables:
 - +++ agents responsables de gastro-entérites



rotavirus



calicivirus



astrovirus

III-3-détection directe d'antigènes viraux :

Techniques rapides (quelques minutes à quelques heures) en utilisant la technologie des anticorps monoclonaux.

Les virus riches en constituants protéiques pouvant être la cible de réponse immune.

Le principe est d'incuber les prélèvements en présence d'anticorps dirigé spécifiquement contre antigène du virus recherché → révélation de la réaction antigène-anticorps

- principe = incubation du prélèvement avec anticorps dirigé spécifiquement contre antigène du virus recherché; révélation d'une réaction antigène/anticorps
 - Agglutination de particules de latex``
 - Ex: détection d'adénovirus ou rotavirus dans les selles
 - Immunofluorescence
 - Ex: recherche de virus respiratoire dans aspiration nasale, **LBA**(Lavage broncho-alvéolaire)
 - Enzymo immuno assay (EIA)
 - Ex: antigène p24 (HIV), antigène HBs et HBe (VHB)

III-4-détection des génomes viraux par hybridation sans amplification :

- elle nécessite au préalable l'extraction des ADN.

(Le rendement de cette étape est critique pour la suite de la technique).

- l'hybridation se fait spécifiquement entre le génome viral éventuellement présent dans l'échantillon à tester (après dénaturation thermique s'il s'agit d'un A.N double brin) et une sonde marquée (chaude ou froide).

NB : l'hybridation simple manque de sensibilité et ne s'applique qu'à des prélèvements riches en matériel viral.

Plusieurs techniques existent que nous allons décrire rapidement.

Dot blot : quand les AN sont déposés directement sur la membrane de NC ou nylon

Southern blot : quand les AN sont digérés puis séparés par électrophorèse

Northern blot: s'il s'agit d'ARN

Hybridation in situ: à partir de coupe de tissus. Elle renseigne sur le nombre et le type histologique des cellules infectées et à quel endroit (noyau, cytoplasme) se trouve l'AN recherché.

Hybridation en milieu liquide : permet d'apprécier la charge virale.

Les puces à ADN permettant l'hybridation de milliers de sondes seront capables par couplage avec les techniques d'amplification de faire franchir un nouveau bond aux technologies de détection et d'identification des agents infectieux.

III-5-détection de génomes viraux par PCR :

- ces techniques ont révolutionné le diagnostic virologique.
- elles sont applicables à tous les agents viraux.
- différentes variantes de PCR sont disponibles (tab2) ainsi que d'autres techniques d'amplification utilisées en virologie comme alternatives (tab3)

-ces techniques ont une grande sensibilité. Néanmoins deux écueils sont à éviter :

✓ Les faux (+) dus à des contaminations d'échantillons (-) par des traces d'ADN cibles

✓ Les faux (-) dus d'une part à la présence de substances inhibitrices dans les prélèvements (sang, selles, biopsie) et d'autre part la variabilité génétique de certains virus qui les fait échapper aux amorces et sondes.

III-6-séquençage :

Le séquençage des génomes viraux entre dans la pratique des laboratoires de virologie médicale.

Il sert en particulier à l'étude des déterminants de résistance génotypique aux antiviraux (HIV) et au typage moléculaire des virus comportant une grande diversité génétique (ex HPV, HIV, HCV)

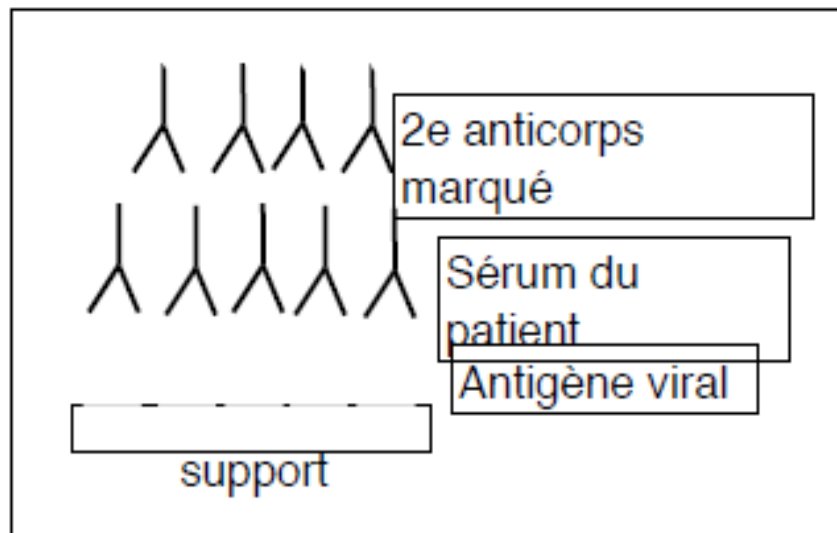
III-7- techniques de diagnostic indirect :

Caractérisation des anticorps viraux dans le sérum :

Mise en évidence d'Ac spécifiques d'un virus

Elles sont très diverse (tab 4)

Diagnostic indirect: détection des anticorps -



- Formation du complexe antigène-anticorps sur un support:
 - Lame de verre
 - Plastique
 - Puit d'une microplaque ou d'une bille (ELISA)
 - Membrane de cellulose ou nylon (immunoempreinte=western blot)
- Révélation par un deuxième anticorps marqué
 - Fluorochrome
 - Radioactivité
 - Réaction enzymatique (spectrophotométrie; lecture à l'œil nu)

Diagnostic indirect: détection des anticorps

➤ ELISA

- Spécificité du 2e anticorps permet de déterminer l'isotype IgG, IgM, IgA ou anticorps totaux

➤ Immuno-empreinte / western blot

- Permet une étude analytique des anticorps dirigés contre les différentes protéines virales
 - Ex: HIV, HTLV

➤ Autres techniques sérologiques

- Séroneutralisation
- Inhibition de l'hémagglutination
- Fixation du complément

Objectifs médicaux des examens en virologie

- Relation de causalité affection - virus
- Connaître le statut d'un individu vis à vis d'un virus
- Prendre en charge le suivi pronostique et/ou thérapeutique d'un sujet infecté
- Évaluer l'efficacité d'une vaccination
- Étudier une épidémie virale

Lien de causalité virus-affection

- Diagnostic étiologique d'une affection aiguë
 - Ex: éruption cutanée, méningite lymphocytaire, fièvre, sd mononucléosique
- Diagnostic étiologique d'une affection chronique
 - Ex: hépatite chronique, immunodéficience
- Rôle du diagnostic direct:
 - +++ détection d'un agent pathogène au site de l'infection (ex: HSV dans le LCR; virus respiratoire dans un LBA)
- Rôle du diagnostic indirect:
 - Présence d'IgM (primo infection / infections secondaires (réactivation) / faux positifs
 - augmentation « significative » du taux des anticorps entre 2 prélèvements: implique mesure quantitative de la réponse humorale
⇒ même technique, même labo +++

Statut d'un individu

➤ Statut sérologique

- Vis à vis d'une infection guérie
 - Ex: rubéole, rougeole, varicelle
- Vis à vis d'une infection chronique
 - Ex: hépatite C, hépatite B, HIV
- Dépistage systématique
 - donneurs de sang, de moelle, d'organes, de tissus, de gamètes, de lait
 - patient source en cas d'accident d'exposition au sang ou sexuelle
- Après vaccination: titrage des anticorps protecteurs
 - Ex: hépatite B

➤ Recherche de virus chez un fœtus ou un nouveau-né exposé pendant la grossesse

- Dans le cadre d'une infection aigue chez la mère: rubéole, cytomégalovirus
- Dans le cadre d'une infection chronique chez la mère: VIH, hépatite B, hépatite C

Suivi d'un sujet infecté

- Suivi de l'évolution des infections chroniques
 - Ex: bilan de réplication VHB
- Mesure du niveau de réplication d'un virus par la « charge virale »
 - Ex: HIV, hépatite C, hépatite B
- Surveillance des infections virales chez les sujets immunodéprimés
 - CMV, EBV...
- Recherche de résistance d'une souche virale à un traitement antiviral
 - Tests phénotypiques: cultures cellulaires en présence d'antiviral
 - Tests génotypiques: recherche de mutations dans le gène cible de la molécule antivirale -

Conclusions

- Savoir ce que l'on cherche
- Renseignements cliniques +++
- Interprétation des résultats en fonction de la clinique +++