

Les méthodes de diagnostic en virologie



Pourquoi faire du diagnostic en virologie ?

- ★ ⇒ Dons de sang, d'organes et de tissus (dépistage obligatoire)
- ★ ⇒ Suivi biologique des infections (VIH, VHB, VHC)
- ★ ⇒ Mesures prophylactiques et contrôle des épidémies
rota et VRS en pédiatrie - grippe
- ★ ⇒ Etudes épidémiologiques (prévalence, réservoir, mode de transmission)
 - ⇒ Preuve de l'origine virale d'une infection
 - +++ chez immunodéprimés
 - ⇒ Décision thérapeutique
 - développement des antiviraux



Plusieurs approches

- Recherche des anticorps = **Sérologie**
- Recherche du virus ou de ses constituants = **Diagnostic Direct**

= approches complémentaires
(fonction du virus recherché et de la clinique)

L'analyse comprends plusieurs phases :

- Prélèvement = phase pré-analytique
- Choix de techniques et réalisation = phase analytique
- Validation et interprétation

Phase pré-analytique : *le prélèvement*

1. **Choix** des prélèvements à effectuer

Selon la **clinique** (toute lésion accessible doit être prélevée)

Porte d'entrée, **sites de multiplication** et/ou d'**excrétion** des virus recherchés

2. **Réalisation** des prélèvements

Importance +++ de la qualité du prélèvement

Doit être réalisé **le plus tôt possible** après le début des signes cliniques

(multiplication +++ pendant phase d'incubation)

3. **Acheminement** des prélèvements au laboratoire

Milieu de transport pour virologie (+++ pour culture de virus)

Transport **rapide**

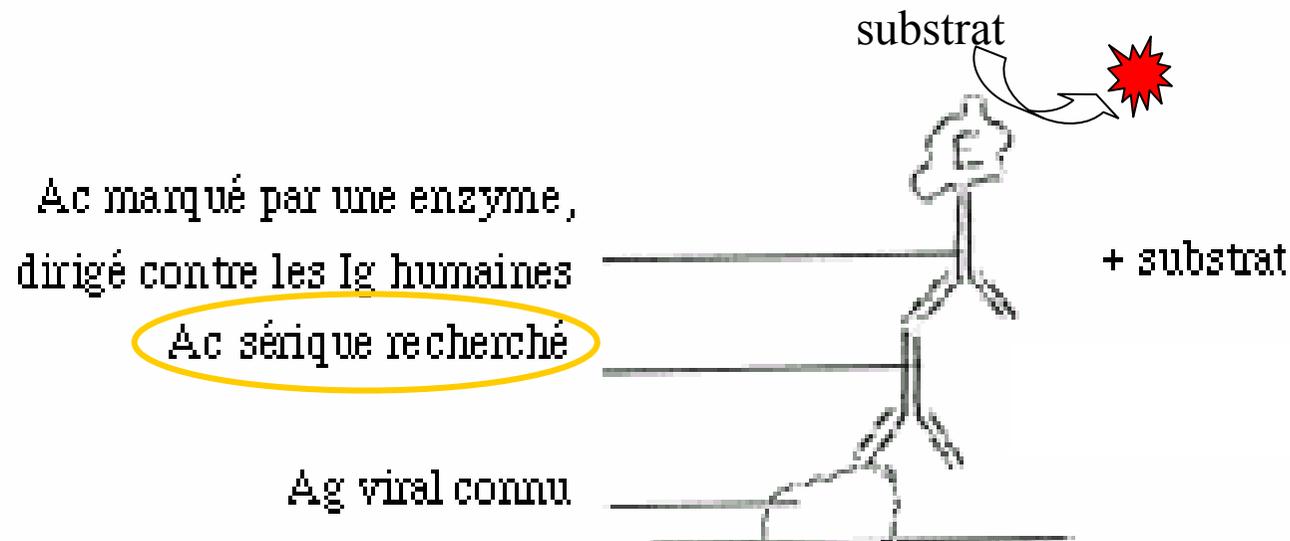
Sécurité

Importance des **renseignements cliniques** transmis au virologue avec le prélèvement

Diagnostic indirect = sérologie

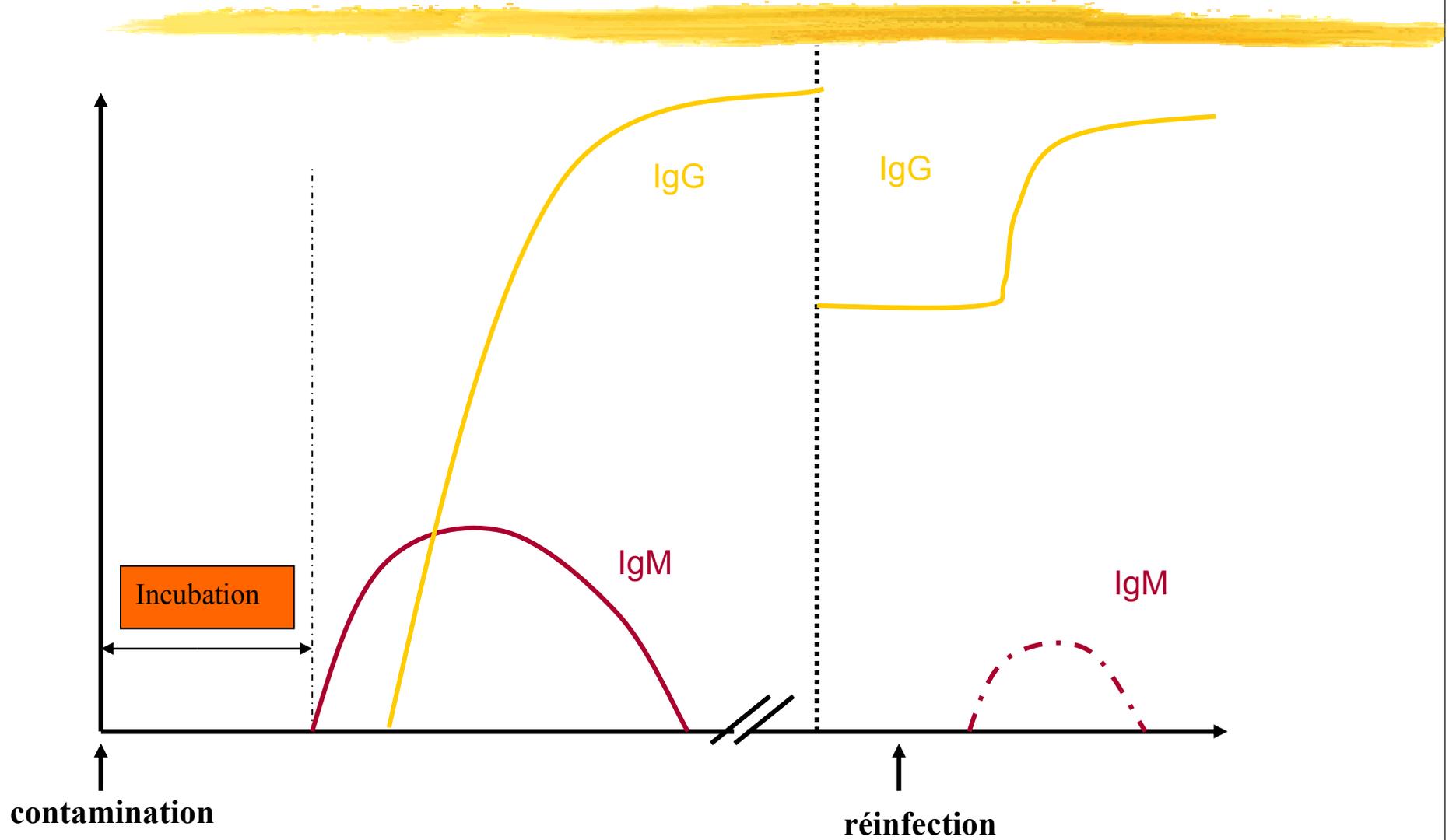
Recherche des anticorps

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) :

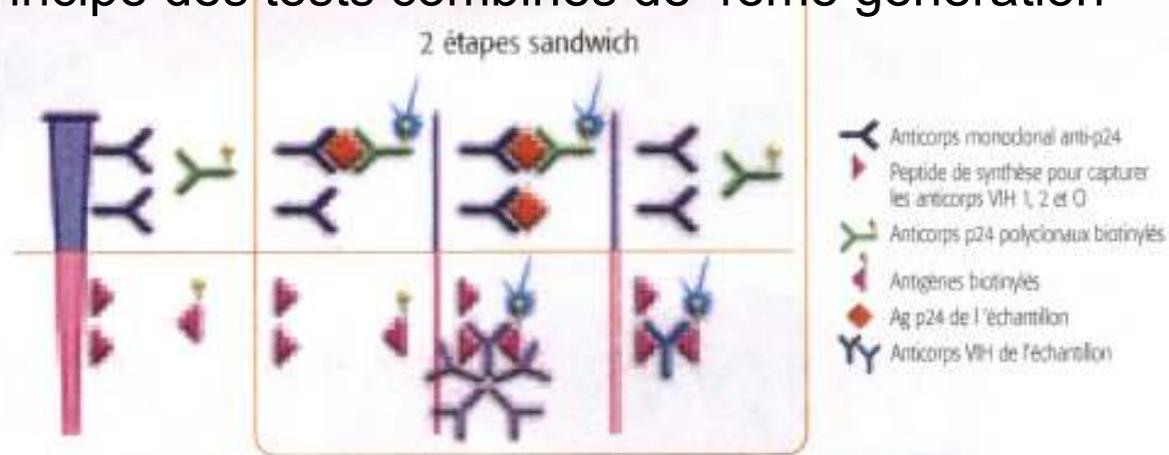


développé pour tous types de virus, automatisable, adapté à de grandes séries
différencie IgG et IgM

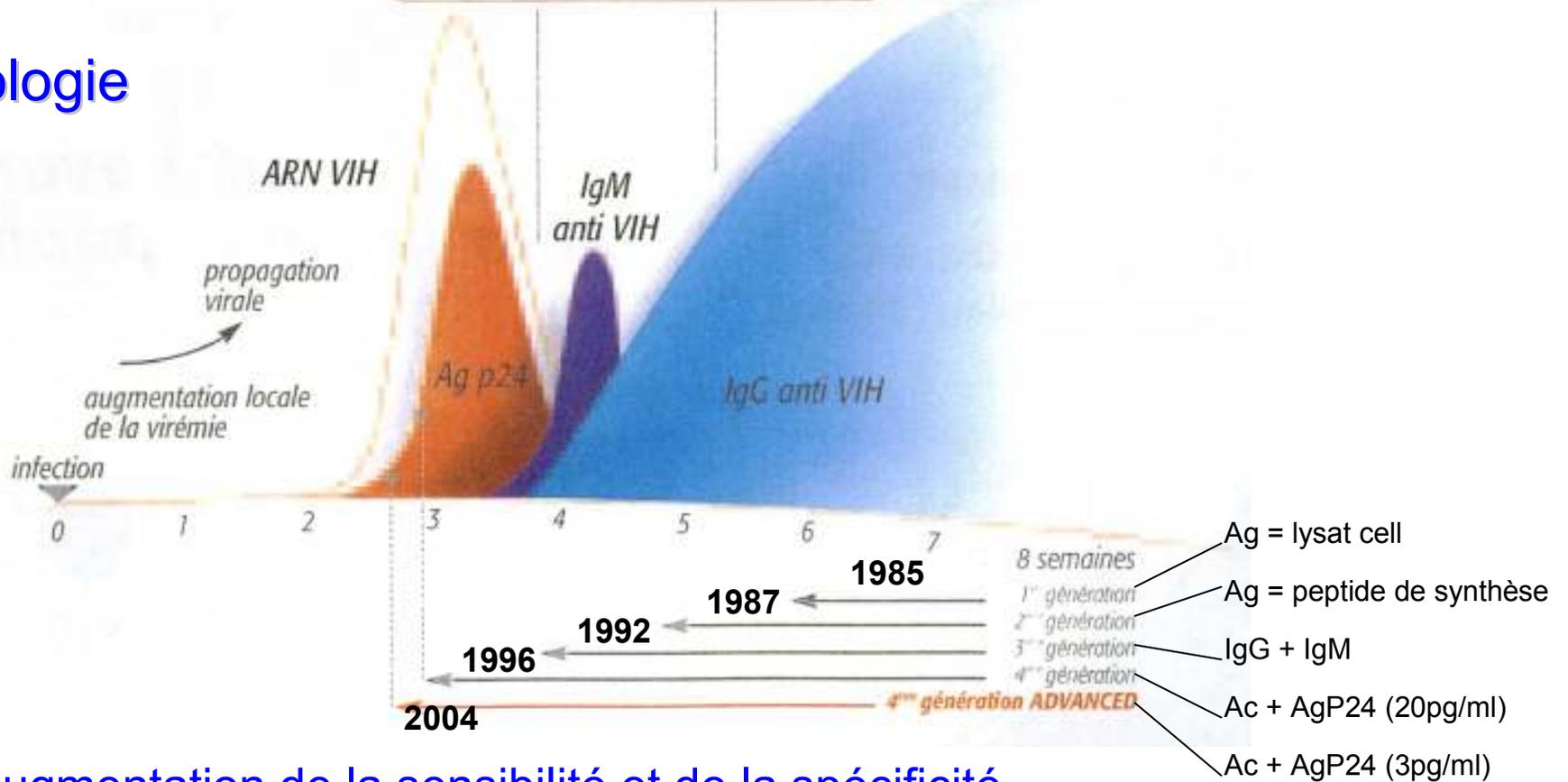
Cinétique d'apparition des anticorps



Principe des tests combinés de 4ème génération



Sérologie VIH

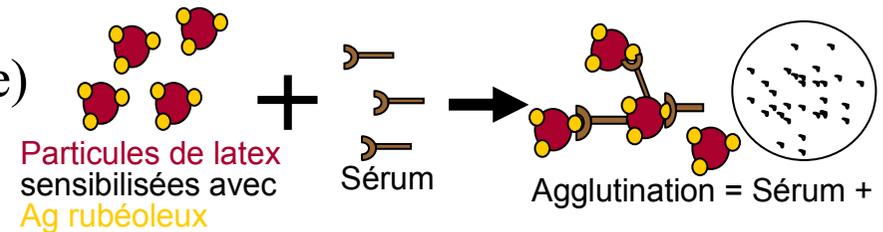


= Augmentation de la sensibilité et de la spécificité

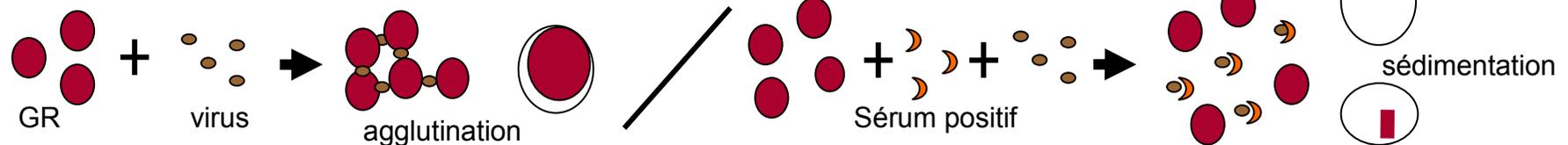
Autres techniques de sérologie

- ❖ Fixation du complément (virus respiratoires) :
détection des Ac d'infection

- ❖ Agglutination (sérologie rubéole)



- ❖ Inhibition de l'hémagglutination



- ❖ Neutralisation de l'ECP (sérologie des virus polio)

- ❖ Western Blot (confirmation de dépistage pour VIH, HTLV)

- ❖ RIBA : recombinant immunoblot assay
(confirmation de dépistage pour VHC)

Sérologie



+++ Pour diagnostic des **primo-infections**

= apparition des Ac entre deux sérums d'un patient

2 sérums : sérum précoce (neg) – sérum tardif (pos)

Pour définir le **statut immunitaire** vis-à-vis d'un virus

= savoir si un patient a déjà rencontré un virus précis

(Ac pos) ou non (Ac neg)

1 seul sérum

Diagnostic direct



Recherche du virus ou de ses constituants :

- Détection d'antigènes – techniques immunologiques
- Détection de génome (ADN ou ARN) – biologie moléculaire
- Détection du virus entier – culture virale
- *Observation des particules virales (microscopie électronique)*

Si résultat positif avec clinique concordante

= preuve de l'implication d'un virus dans une infection

Diagnostic direct : détection d'antigènes

Techniques immunologiques

Techniques simples et rapides à mettre en œuvre mais **manque de sensibilité**

Mise au point des **anticorps monoclonaux** en 1975-1980

Détection :

- **Ag dans des cellules (immunofluorescence)**

centrifugation du prélèvement => culot cellulaire => déposé sur lame

- **Ag libre ou libéré (ELISA ; agglutination ; immunochromatographie)**

étape d'extraction des Ag (pvt + détergent)

contrôle de la spécificité de la réaction +++ : ex. du HSV

Détection des **antigènes** du virus

		Ag dans cellules	Ag extrait		
		IF	ELISA	IC	Agglut
Selles	rotavirus	-	+++	++	+
	adénovirus	-	+++	++	+
Respiratoires	VRS	+++	-	+	-
	Grippe	+	+++	+	-
	parainfluenza	+	+++	-	-
Cutané	HSV	+++	+++	-	-
	VZV	+++	-	-	-

Immunofluorescence

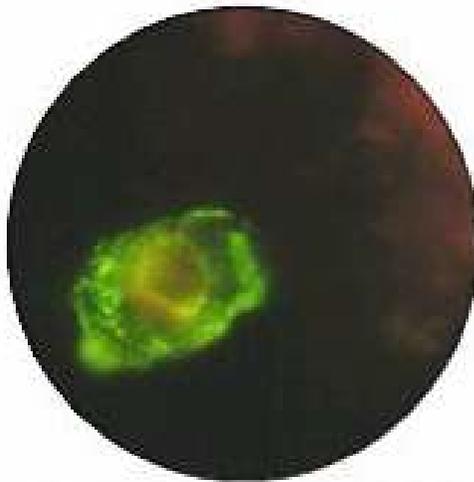
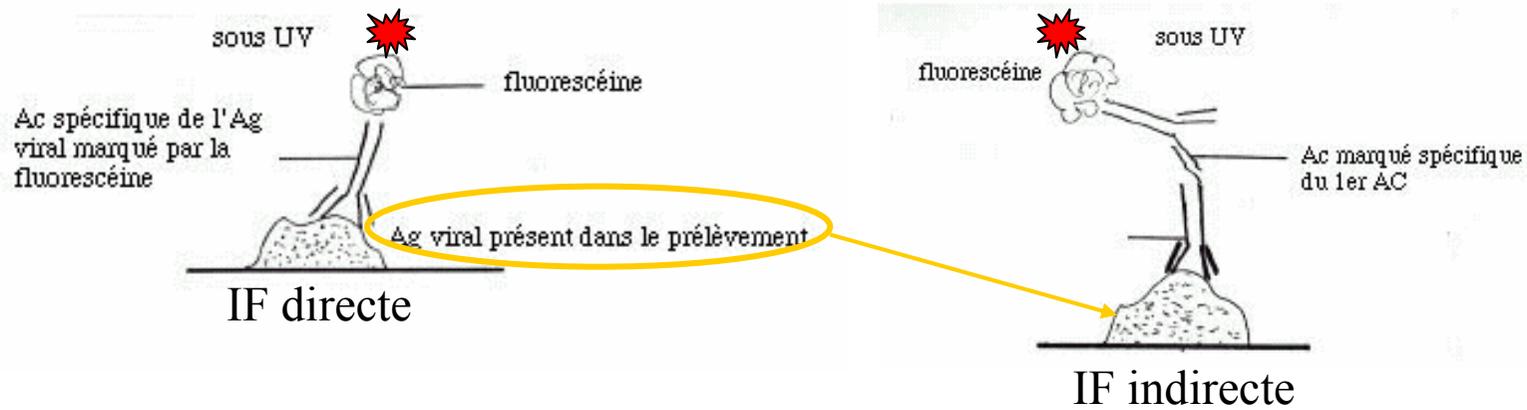
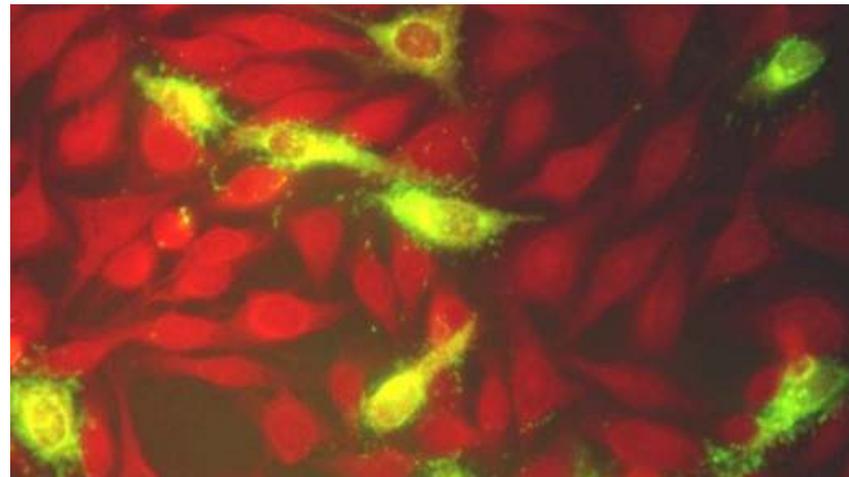
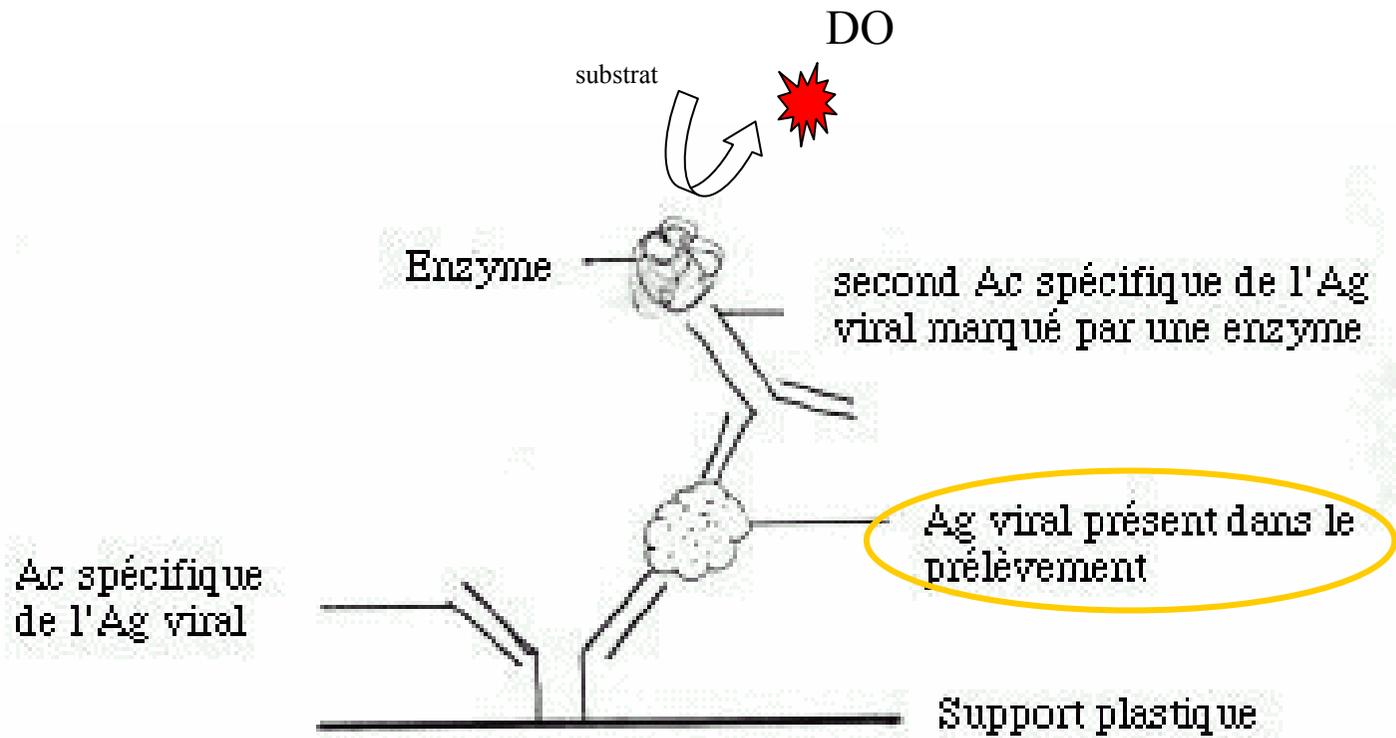


Fig. 3. HSV-infected epithelial cell from skin lesion (DFA)



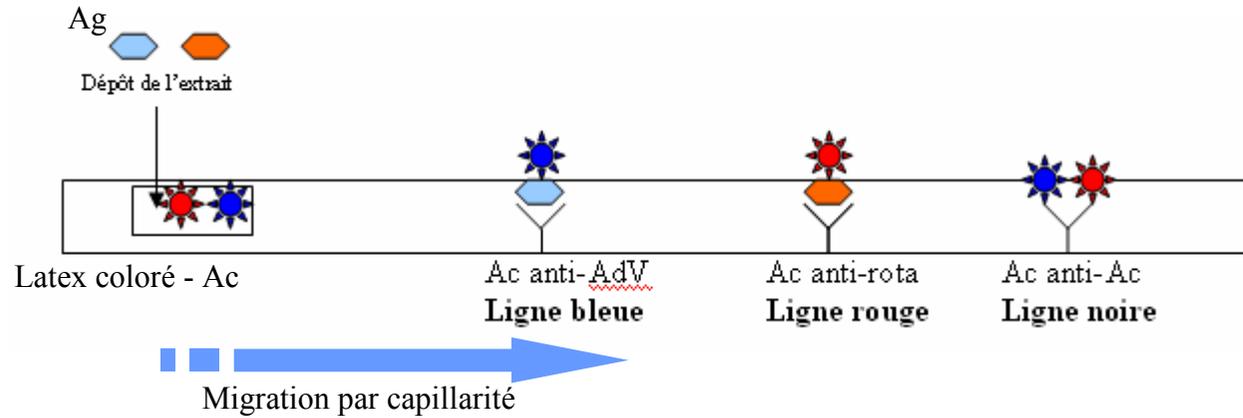
RSV-infected cells

ELISA



Immuno-chromatographie - Agglutination

Immuno-chromatographie rota-adv



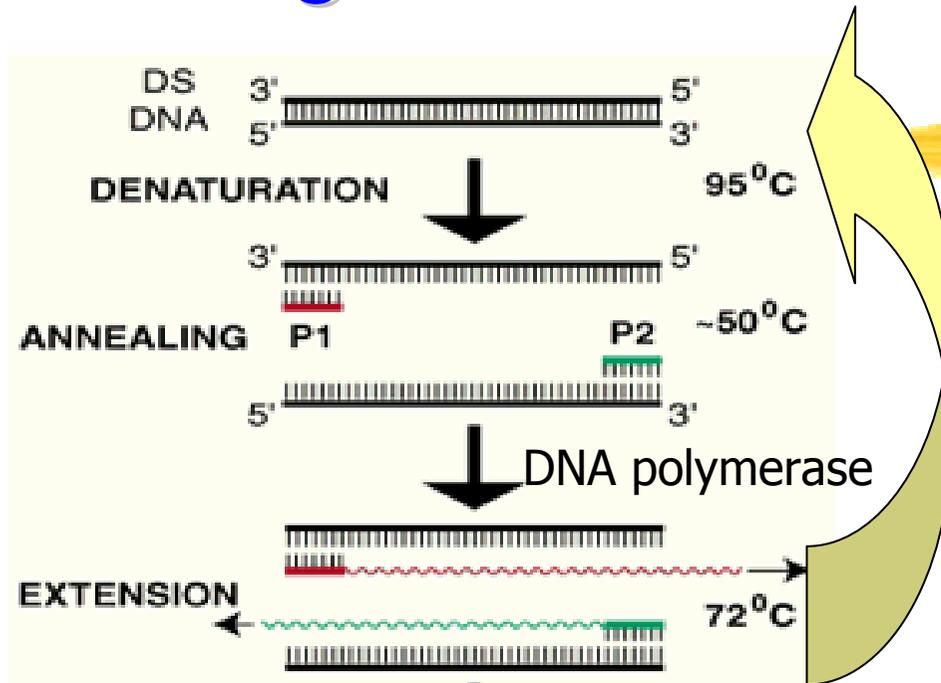
Diagnostic direct : détection du génome



Extraction des acides nucléiques

- Lyse cellulaire (ARN)
- Extraction sur colonne (ADN)

Diagnostic direct : détection du génome



Très nombreuses copies de l'ADN



PCR 1989
= polymerase chain reaction

30 x



PCR (ADN) / RT-PCR (ARN)

Diagnostic direct : détection du génome



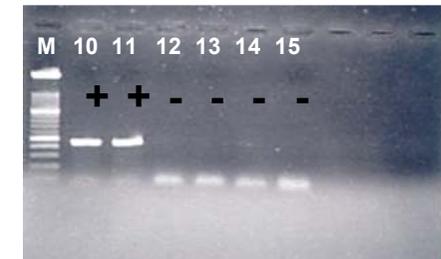
Visualisation sur gel d'électrophorèse

30 min / courant électrique

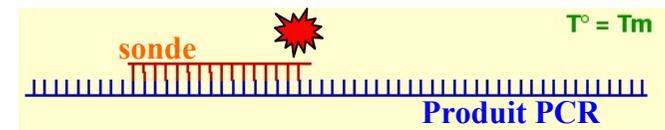


UV

Gel en bromure d'éthidium



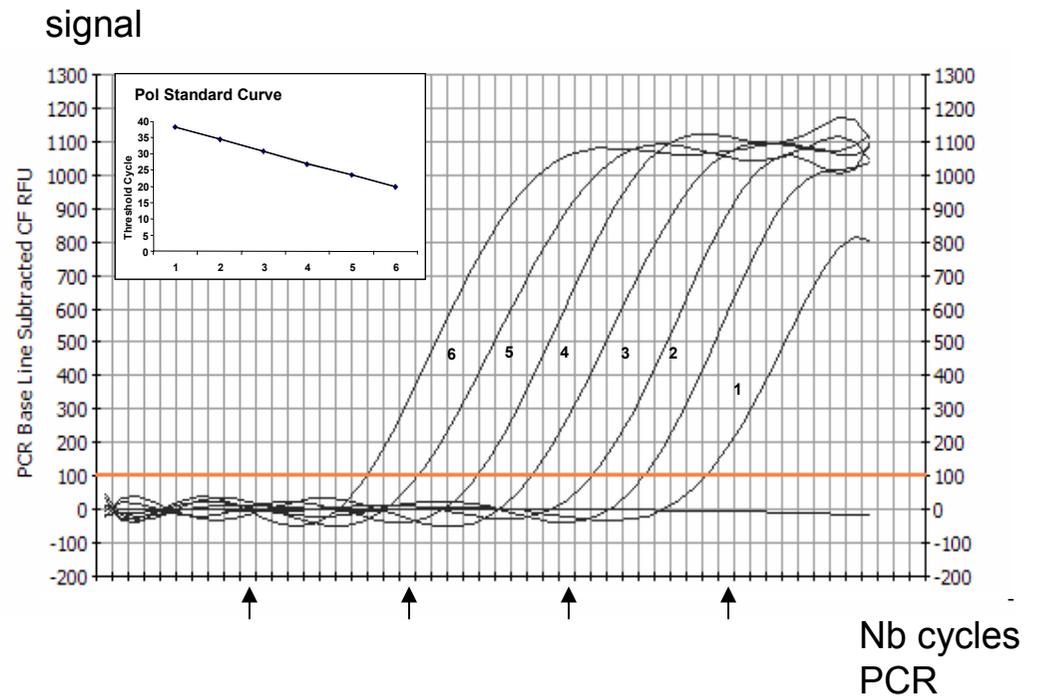
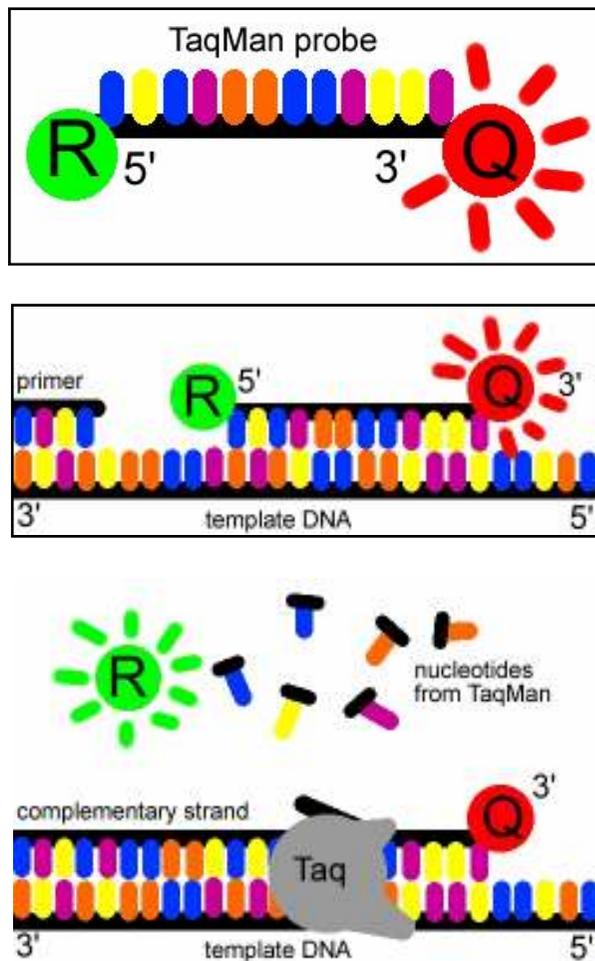
et/ou hybridation en plaque



= **PCR qualitative (+/-)**

Diagnostic direct : détection du génome

PCR quantitative : charge virale (nb de copies de génome viral par ml de plasma)



PCR en temps réel – système Taqman

Diagnostic direct : détection du génome

Principales applications

HSV dans LCR pour méningo-encéphalite (urgence)

CMV : PCR quantitative (greffés de rein)

VIH : PCR qualitative (dépistage chez nouveau-né)
et PCR quantitative (charge virale pour suivi
thérapeutique)

VHC : sérologie + PCR

Diagnostic direct : culture de virus

Technique de référence

Virus = **parasites intracellulaires obligatoires**

Ne peuvent se multiplier que dans des cellules vivantes

- **animal** (Coxsackievirus A types 1 à 6)
- **œuf de poule embryonné** (virus de la grippe, poxvirus)
- **cellules en culture *in vitro***

Importance d'un **transport rapide** jusqu'au laboratoire pour conserver le **pouvoir infectieux du virus**

Dans **milieu de transport** = MEM + protéines (SVF) + tampon + ATB

Diagnostic direct : culture de virus

Equipement +++

- hotte à flux laminaire

car manipulations
en environnement stérile

- Microscope
- Incubateur
à CO₂
- ...



Diagnostic direct : culture de virus

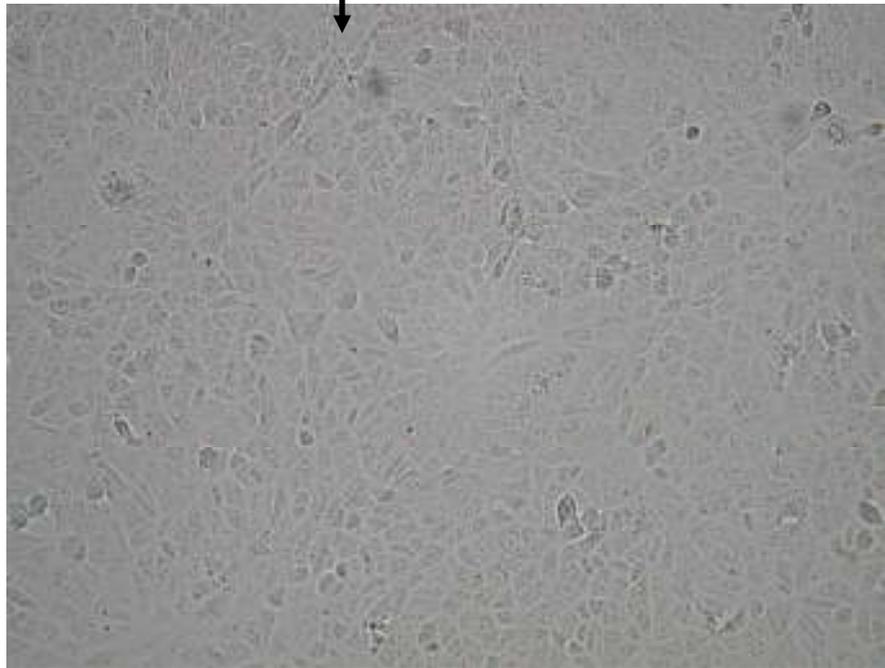
Lignées cellulaires

Origine : **humaine** ou **animale** (singe, chien...)

Nature : Lignées **diploïdes** (durée de vie limitée)

Lignées continues hétéroploïdes

Cellules **épithéliales** ou **fibroblastiques**



Diagnostic direct : culture de virus

Choix des cellules à inoculer

1 virus ~~→~~ toutes cellules

1 lignée cellulaire ~~→~~ tous virus

Au moins 2 ou 3 types de cellules différentes

Dépend du **type de prélèvement** (respiratoire, selles, sang, etc.)

respiratoire : grippe, VRS, parainfluenza

selles : rotavirus, adénovirus, entérovirus (polio)

sang : cytomégalovirus

Traitement des prélèvements avec des **antibiotiques** avant inoculation sur cellules

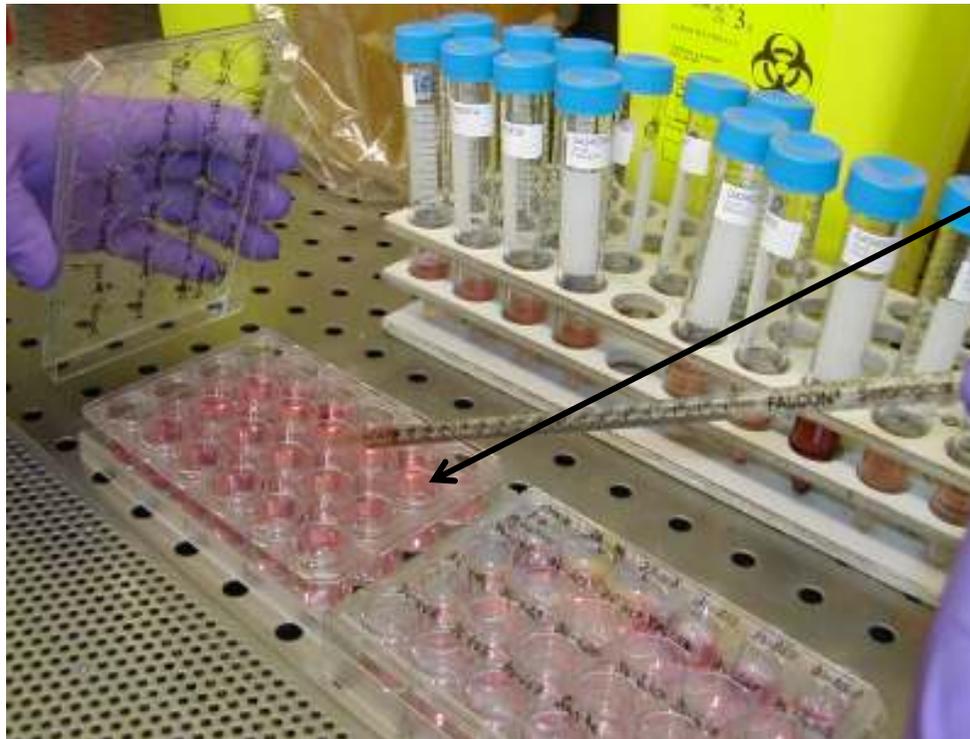
Diagnostic direct : culture de virus



Traitement des prélèvements

- Prélèvements périphériques (respiratoire, cutané) :
contact 30 min avec des **antibiotiques** (mélange pénicilline-streptomycine)
avant inoculation sur cellules
- Sang : inoculation du sang total (recherche d'AdV)
ou séparation des cellules (recherche du CMV) sur gradient de Ficoll

Inoculation sur cellules



0,2 ml par puits



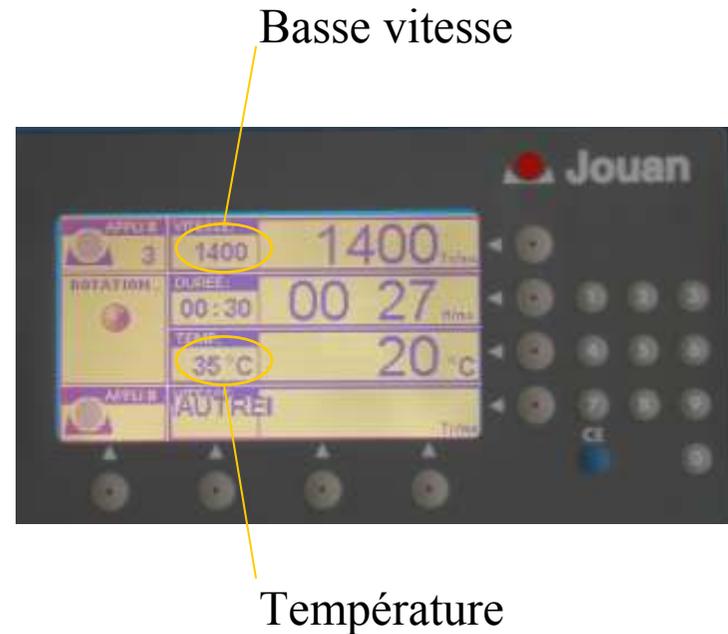
Cellules MRC-5
poumon embryonnaire humain

Et/ou



Cellules épithéliales
Vero, HEp-2, MDCK...

Après inoculation des prélèvements sur cellules : Centrifugation des plaques



et incubation à 34°C (respiratoires) ou 36°C (CMV)
sous 5% de CO₂

Diagnostic direct : culture de virus

Détection

- Examen des cellules au microscope pour détection d'un effet cytopathique (ECP)

caractéristique d'un virus et d'une lignée cellulaire

Temps d'apparition :
24h pour un EV
2-3j pour un HSV
4-5j pour un VZV
10-15j pour un CMV

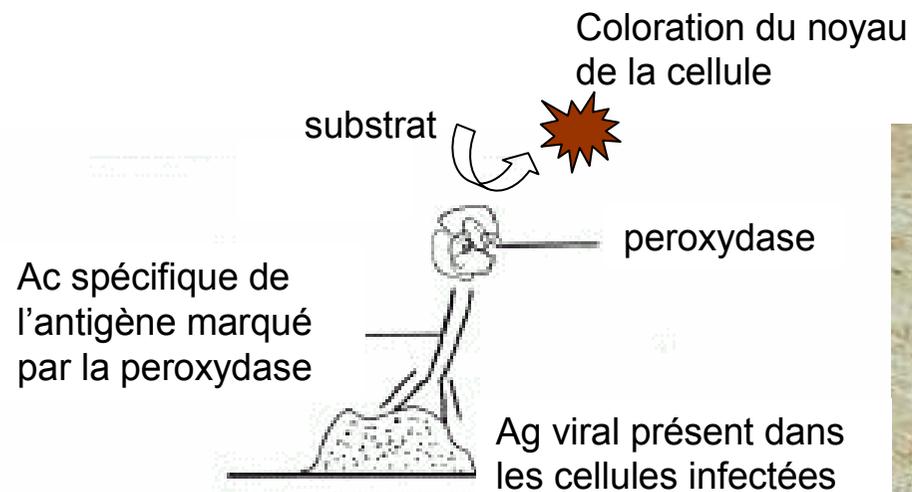
- Détection **précoce** du virus par des anticorps monoclonaux à 24-48 h de culture
 - * réactions enzymatiques : immunoperoxydase (IP) ; ELISA
 - * fluorescence : immunofluorescence (IF)

intérêt +++ pour **CMV** : détection à 48h par IP

CMV : inoculation en double $\left\{ \begin{array}{l} \text{1 plaque : détection à 48h (IP)} \\ \text{1 plaque : culture longue (ECP)} \end{array} \right.$

CMV : détection rapide

réaction d'immunoperoxydase à 48h de culture



Diagnostic direct : culture de virus

Identification d'un virus détecté par son ECP :

par les anticorps monoclonaux : **IF**, ELISA

Ou neutralisation de l'ECP

cellules + virus = ECP

cellules + virus + Ac spécifique = inhibition de l'ECP

Ou inhibition de l'hémagglutination

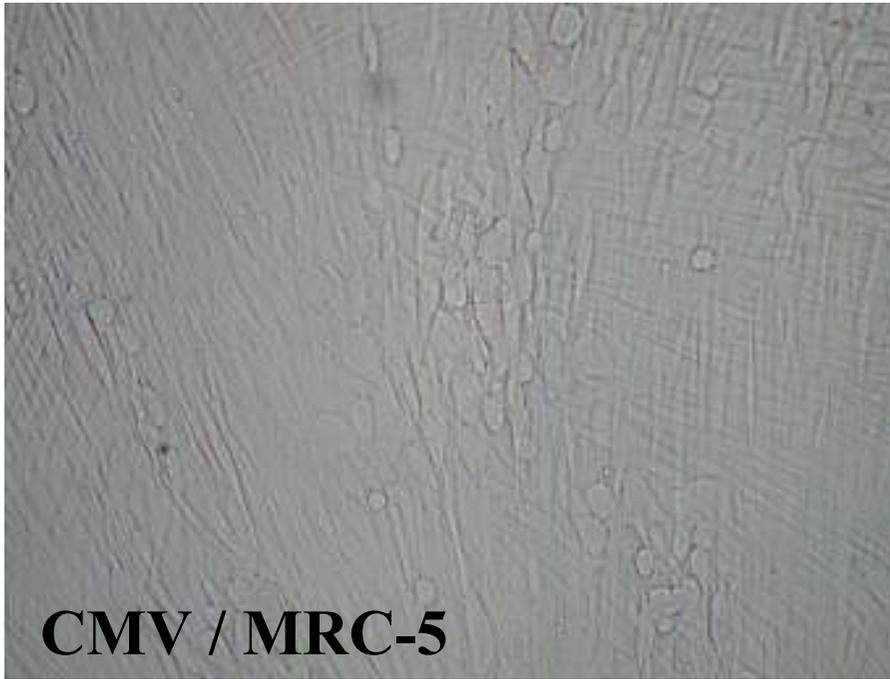
influenza + GR = hémagglutination

influenza + GR + Ac spécifique = inhibition de l'hémagglutination

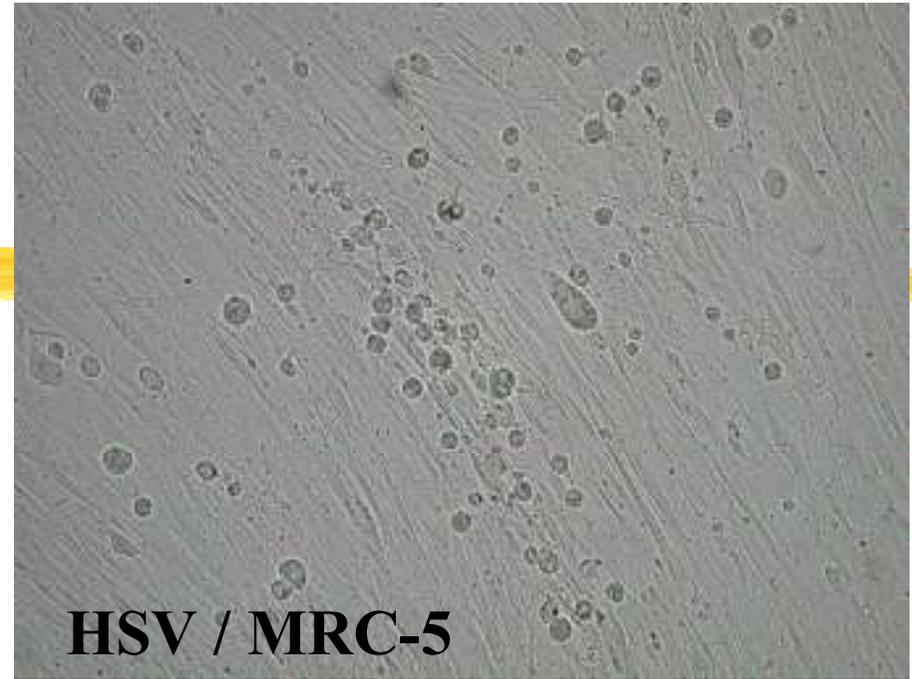
Caractérisation du virus :

différenciation des souches vaccinales et sauvages (polio / rougeole)

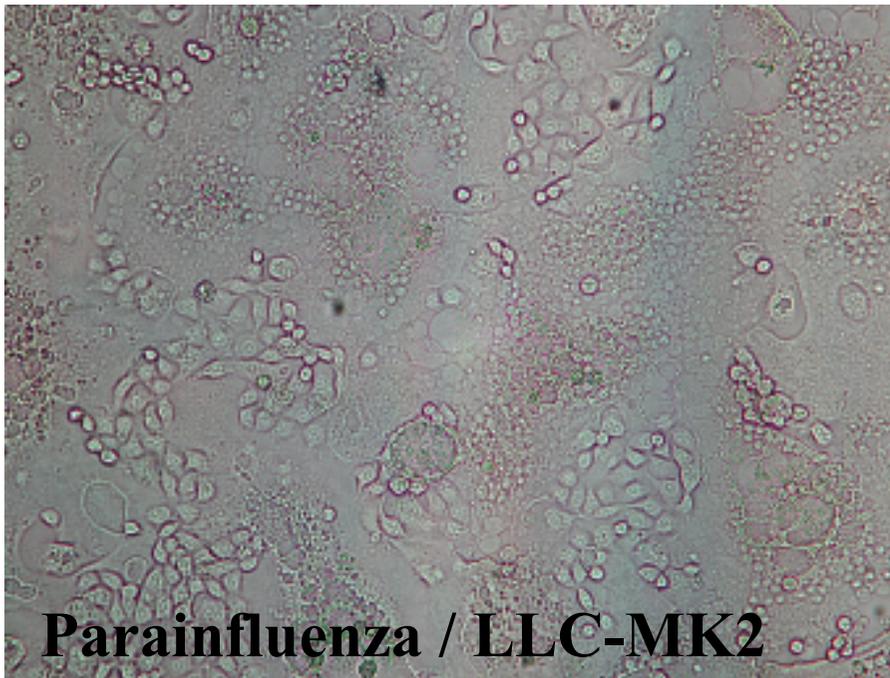
étude de la sensibilité aux antiviraux



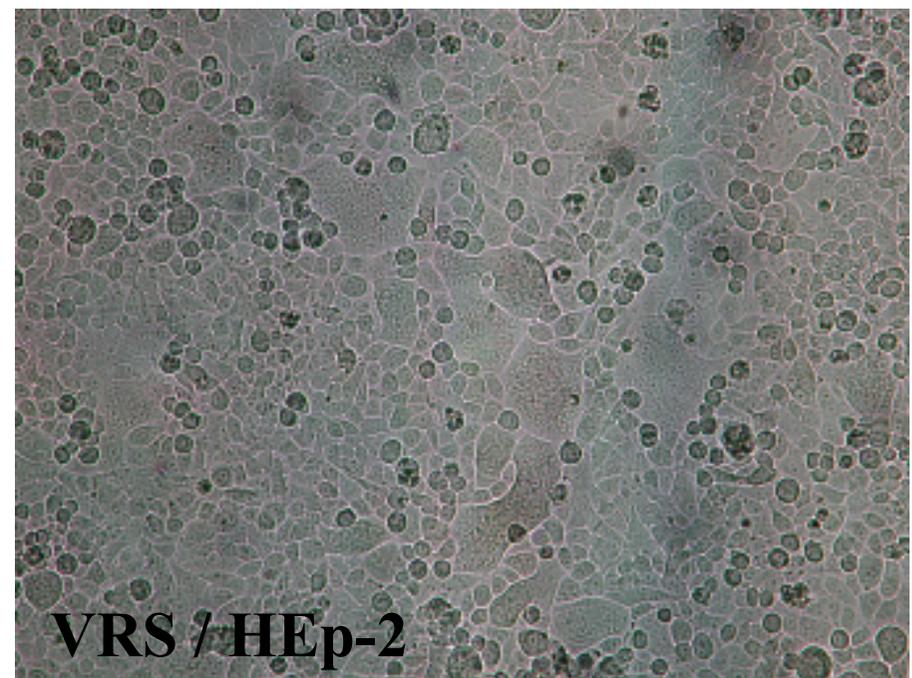
CMV / MRC-5



HSV / MRC-5



Parainfluenza / LLC-MK2



VRS / HEp-2



Microscope
électronique

