Diagnostic virologique

Pr. Samir Gourari
Virologie – CHU Mustapha

Indications

Dc individuel :

hépatites virales

infection à VIH,..

Dc épidémiologique / Dc des formes atypiques :

infections respiratoires aigues

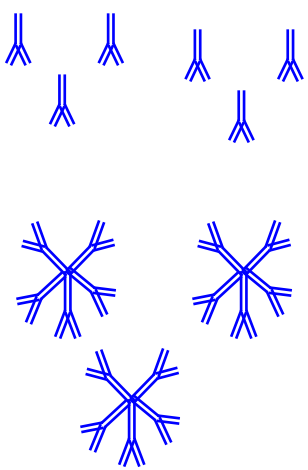
infections cutanées,..

Deux approches:

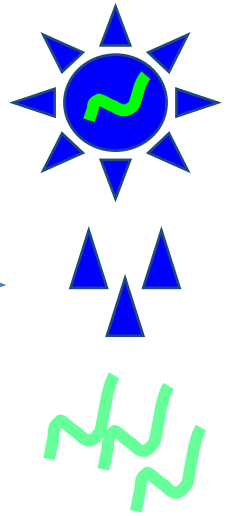
- **Diagnostic indirect**

IgG

IgM



- **Diagnostic direct**



Virus entier

Antigènes

Acides nucléiques

Détection d'**ANTICORPS** spécifiques du virus: réponse immunitaire de l'individu

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

Dc direct versus Dc indirect

- Dans certaines infections virales, le diagnostic ne peut être que direct, comme les IRA et les infections à papillomavirus, mais
- la sérologie représente toujours l'outil de première intention du diagnostic de nombreuses autres infections (rubéole, hépatites, VIH…).
- le statut immunitaire d'un individu ou d'une population ne peut être déterminé que par les tests sérologiques.

Dc direct versus Dc indirect

Dc direct	Dc indirect
diversité des prélèvements et des techniques utilisés : LCS, sang, liquide pleural, aspiration nasopharyngée,..	le prélèvement est simple, il s'agit de sang
l'interprétation des résultats est relativement facile	l'interprétation des résultats est plus compliquée : - état immunitaire de l'hôte -fenêtre sérologique -réactions croisées -réactions non spécifiques (FR, stimulation polyclonale) -persistance des IgM -infection active/trace sérologique?

Diagnostic Direct

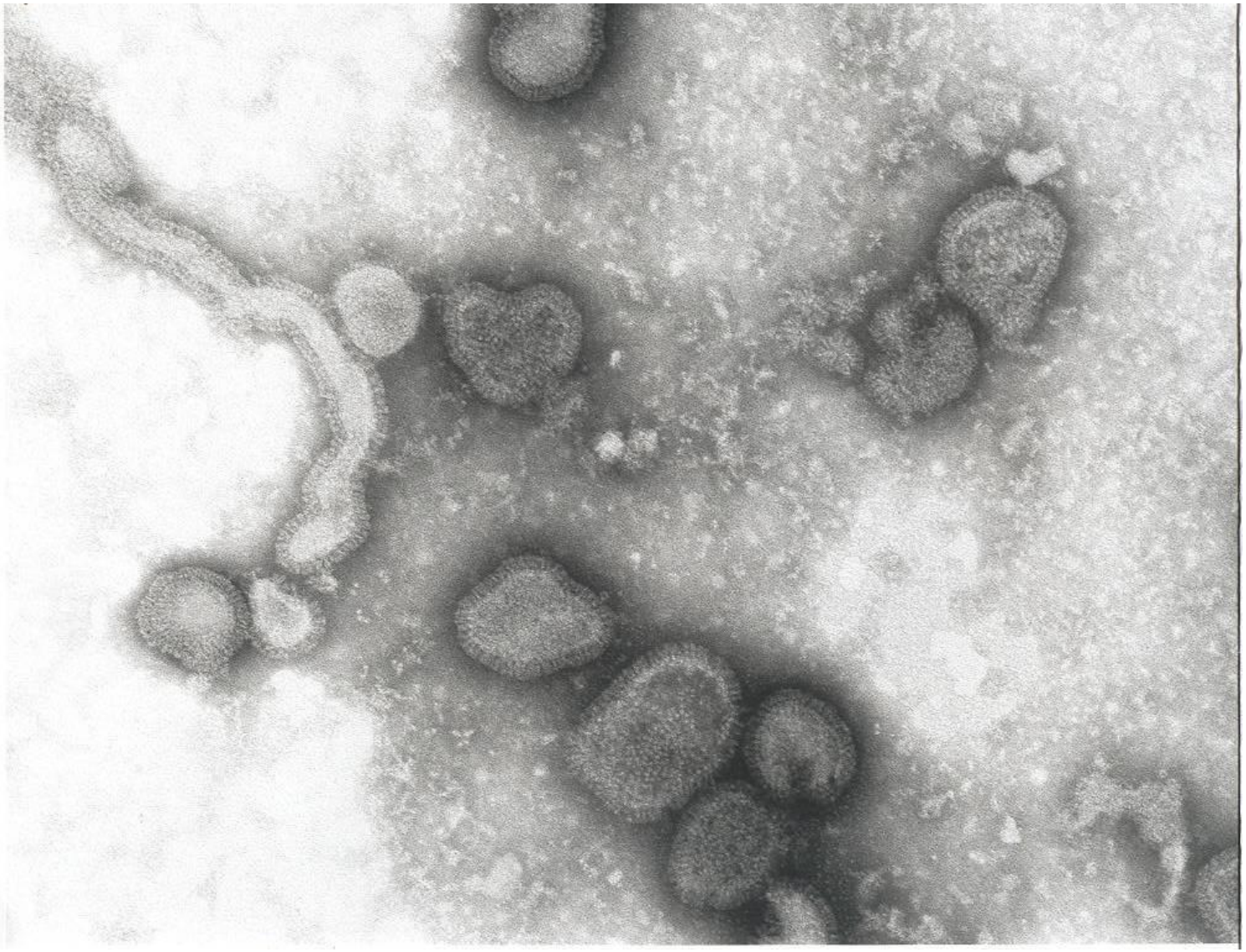
Microscopie électronique

- **Indications Dc rares**

- **Outil précieux pour caractériser un nouveau virus:**

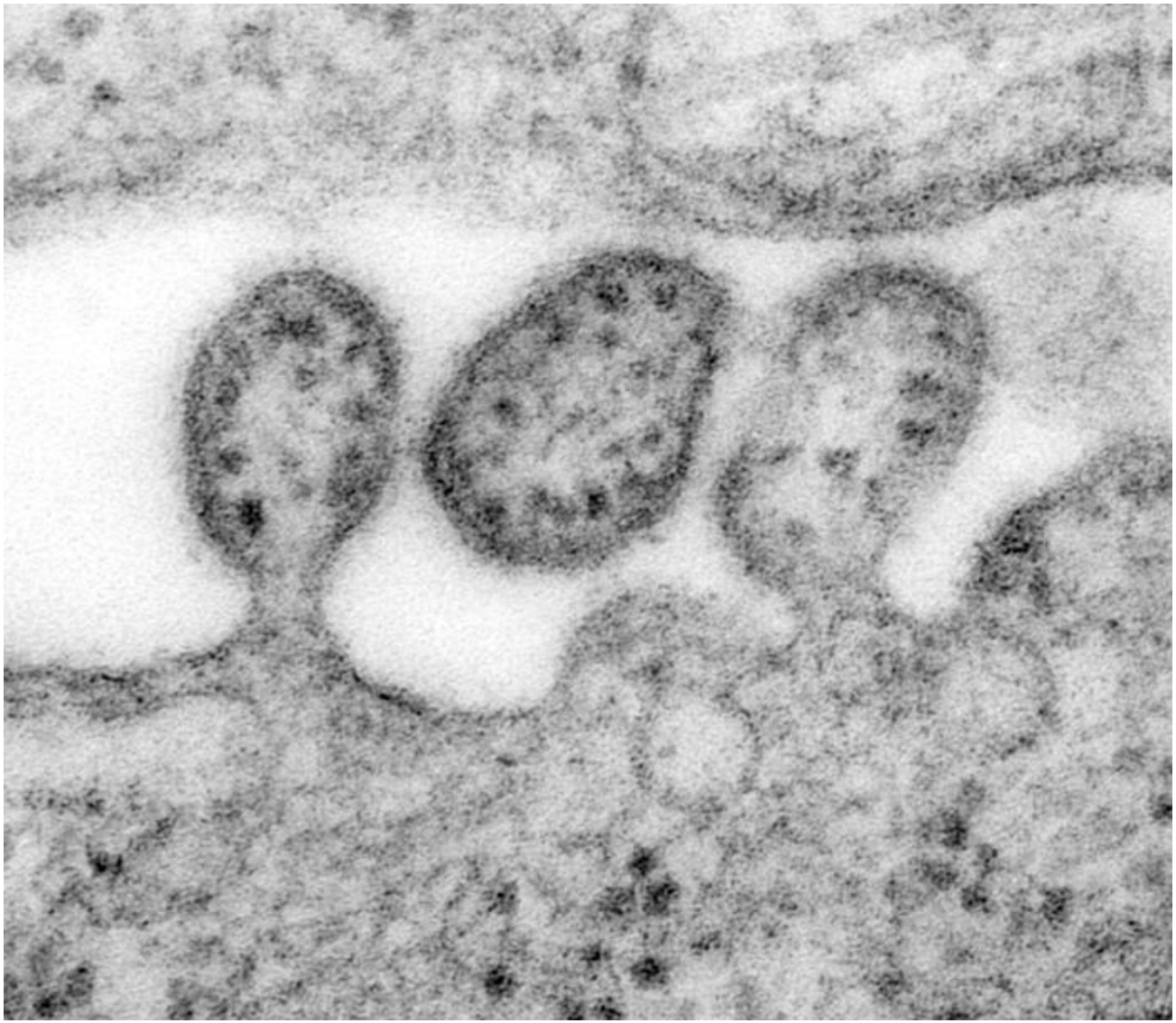
  orientation vers un nouveau coronavirus sur une image en «couronne» en ME (épidémie de SARS en 2003)

Microscopie électronique : virus grippal

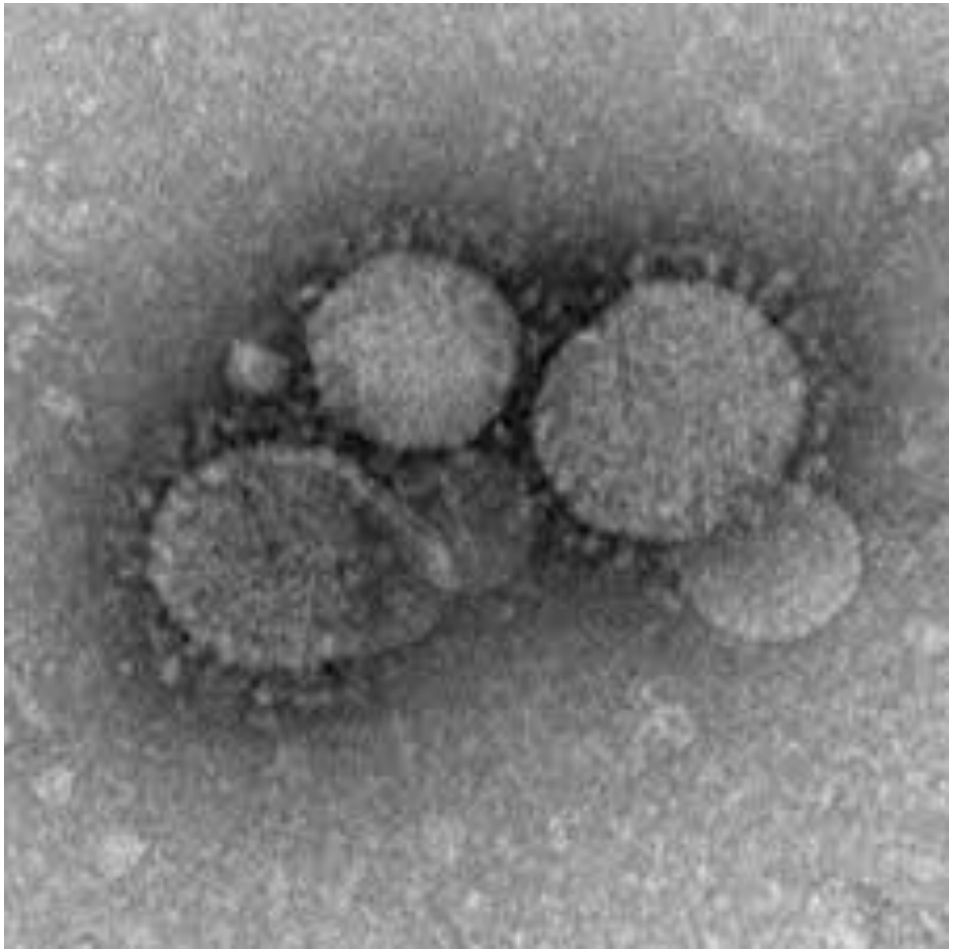


x 100 000

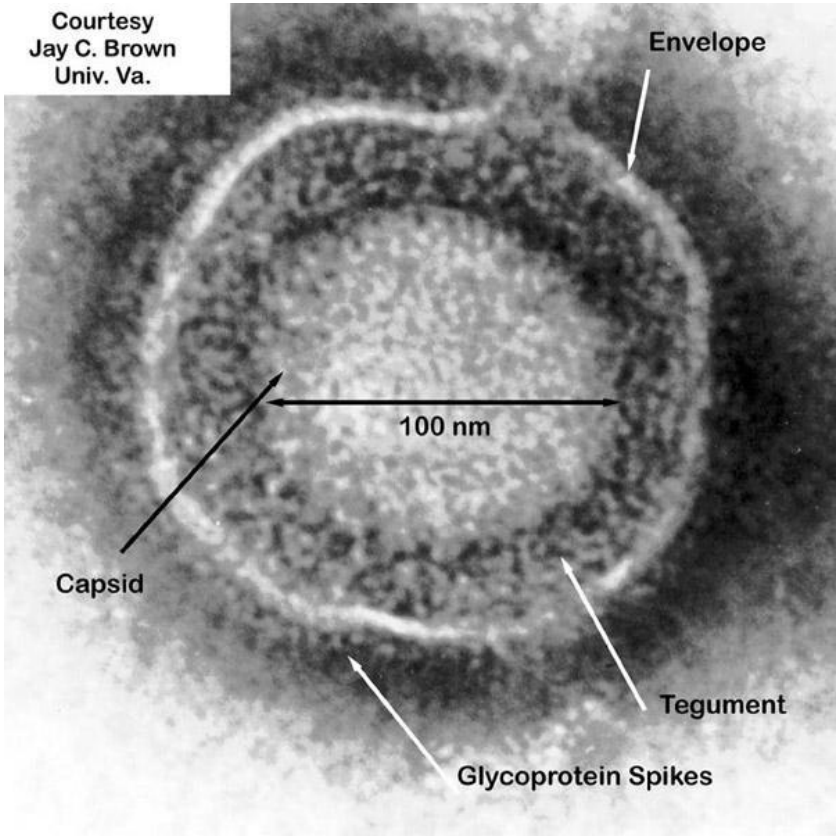
Arenaviridae



Coronaviridae



Herpesviridae



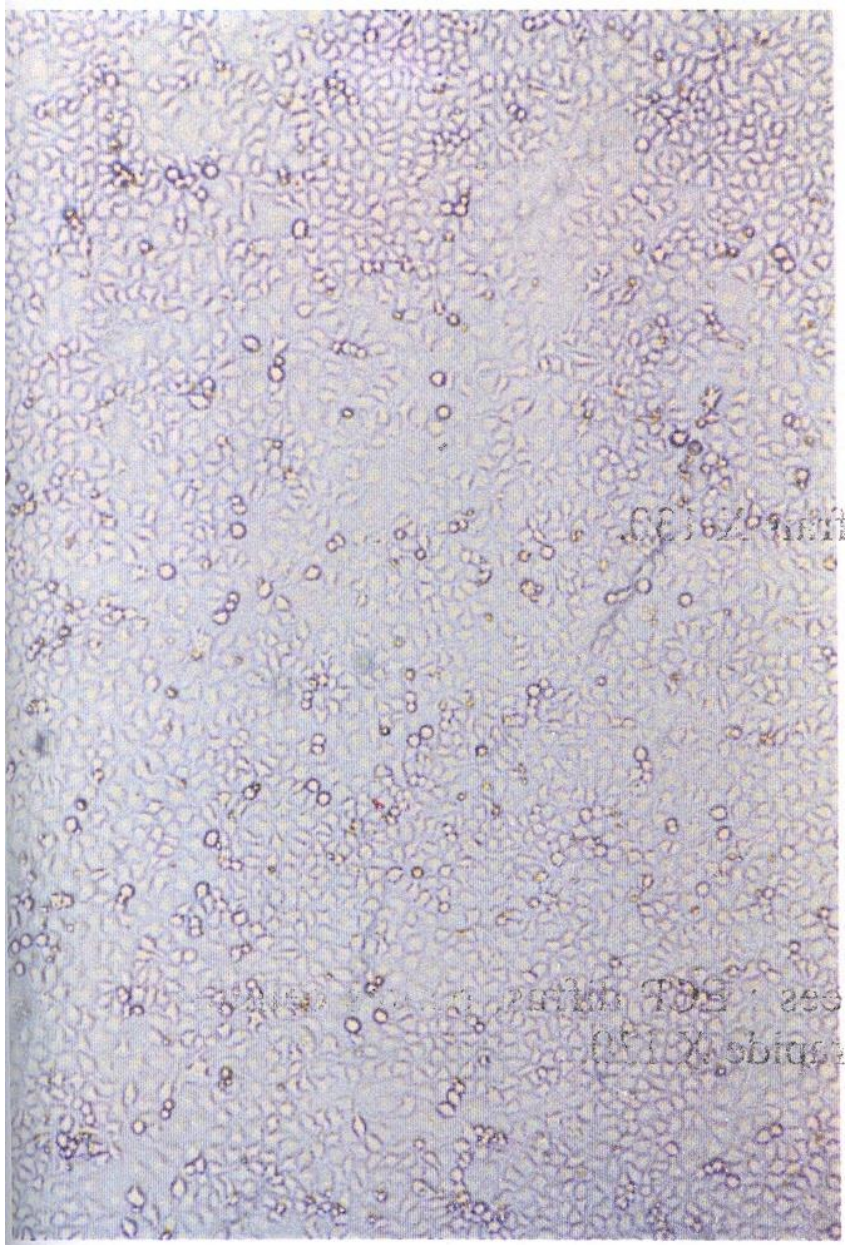
Isolement virale

3 systèmes cellulaires:

- **Culture cellulaire +++**
- Œuf de poule embryonné (v. grippe)
- Animal (coxackies virus)

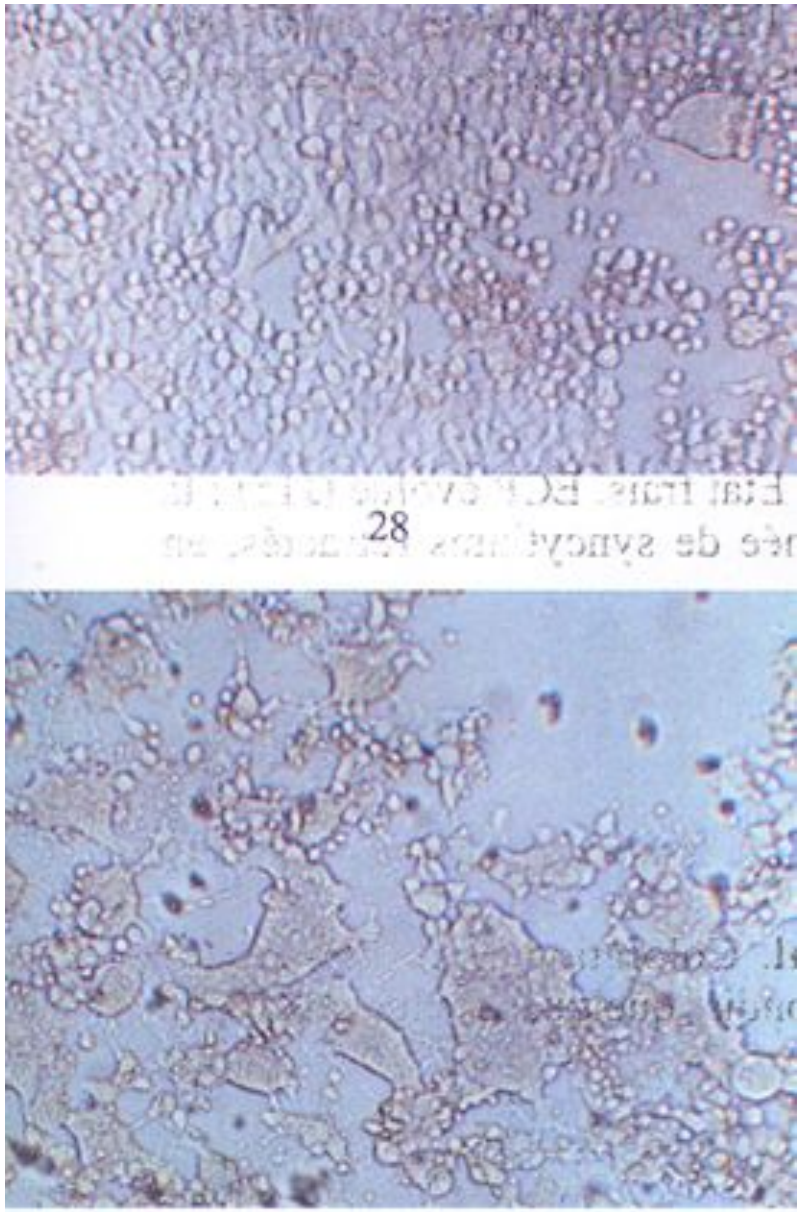
Culture cellulaire

Nappe cellulaire normale



MO x 10

Effet Cytopathique (ex: VRS)



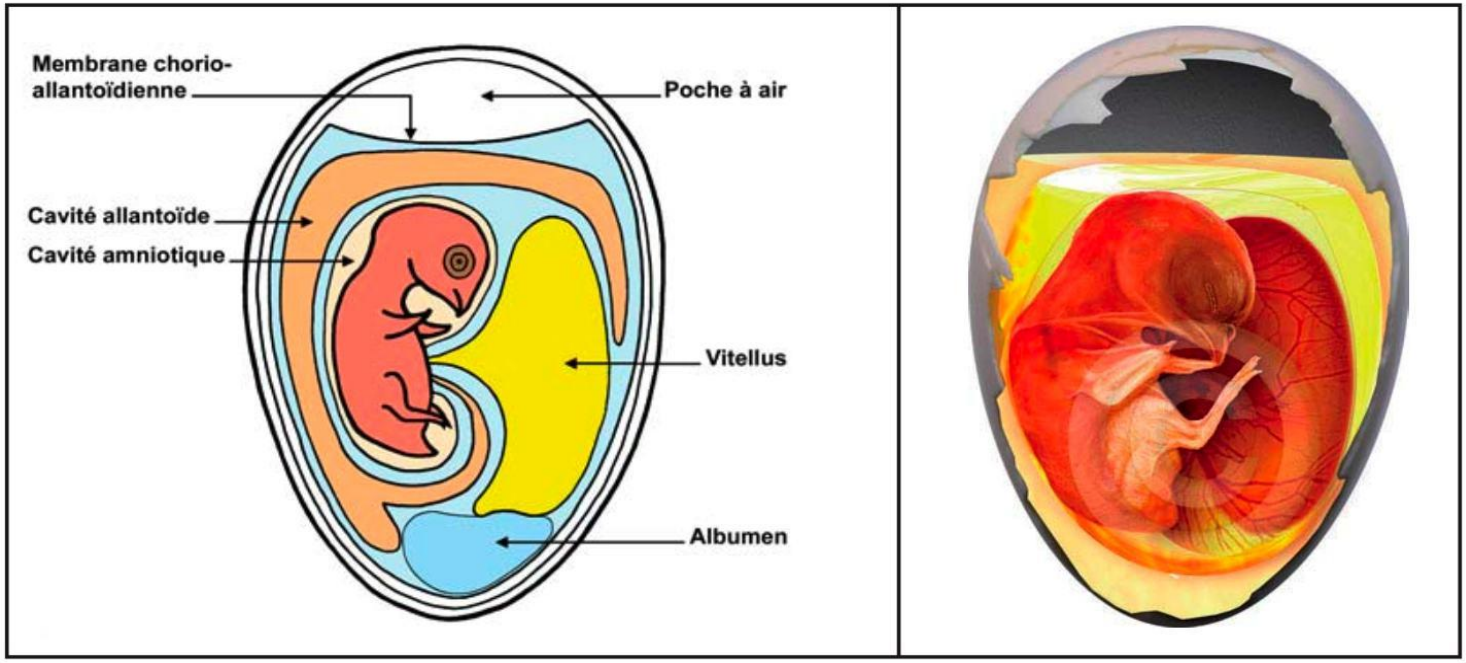


FIGURE 5 - ŒUF DE POULE EMBRYONNÉ DE 10 JOURS
A. Représentation schématique. B. Image de Science-Art (© W.G.ROTH)

Culture cellulaire: inconvénients

- Dépend de la qualité du prélèvement → garder la viabilité du virus :

  milieu de transport

  acheminement rapide au labo (chaine de froid)

  conservation à – 80°C si analyse différée
- Technique lourde et coûteuse
- Certains virus sont non cultivables

Culture cellulaire: avantages

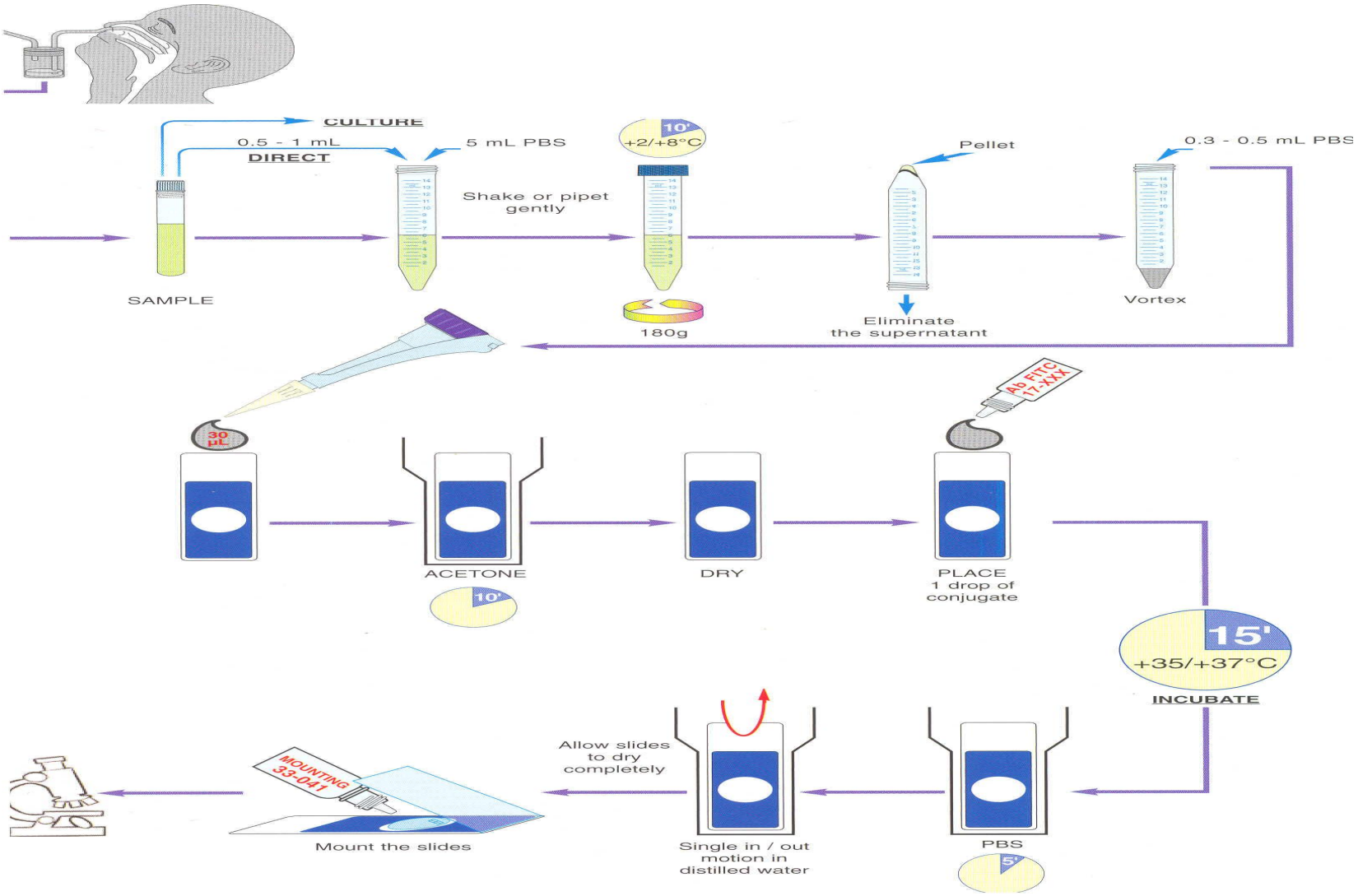
- Mise en évidence du virus infectieux
- Système ouvert
- Très sensible
- Permet l'étude de la sensibilité aux ATVs,..

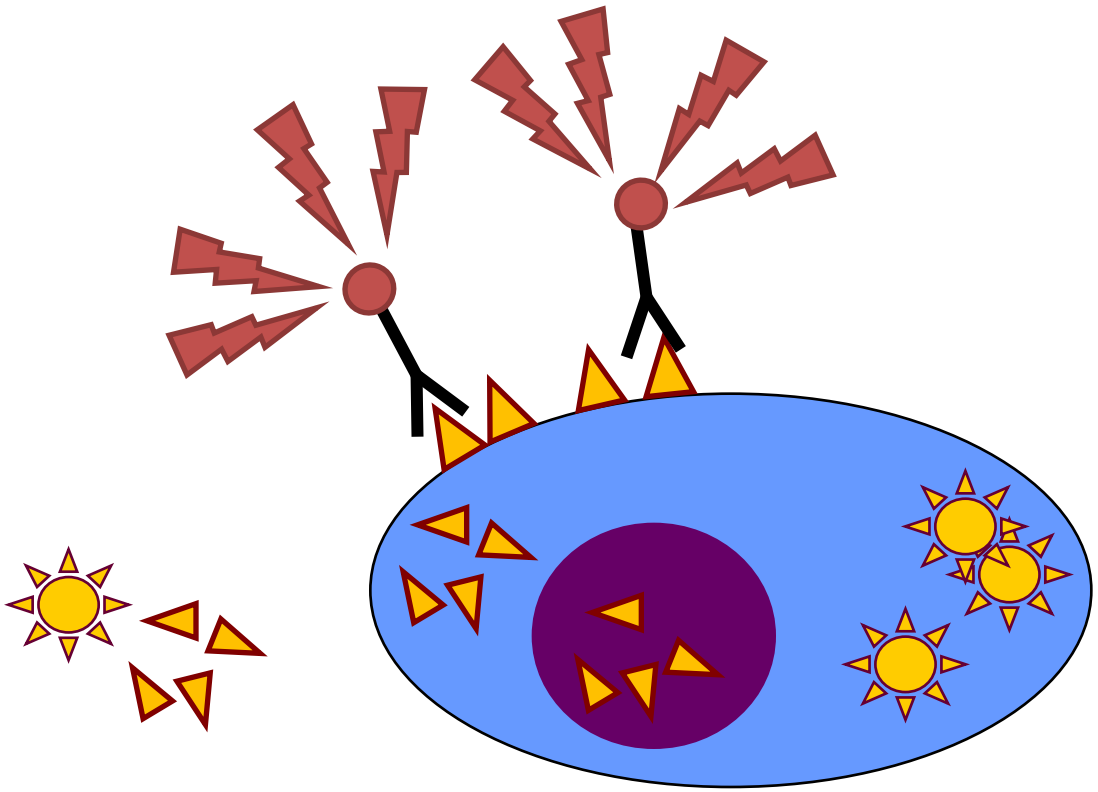
Détection directe des Ags viraux

- Immunofluorescence /Réaction immunoenzymatique
- Immunochromatographie (tests rapides)

Technique d'Immunofluorescence:

Pvts nasopharyngés / Virus respiratoires





Cellules infectées

↓

Ag viraux

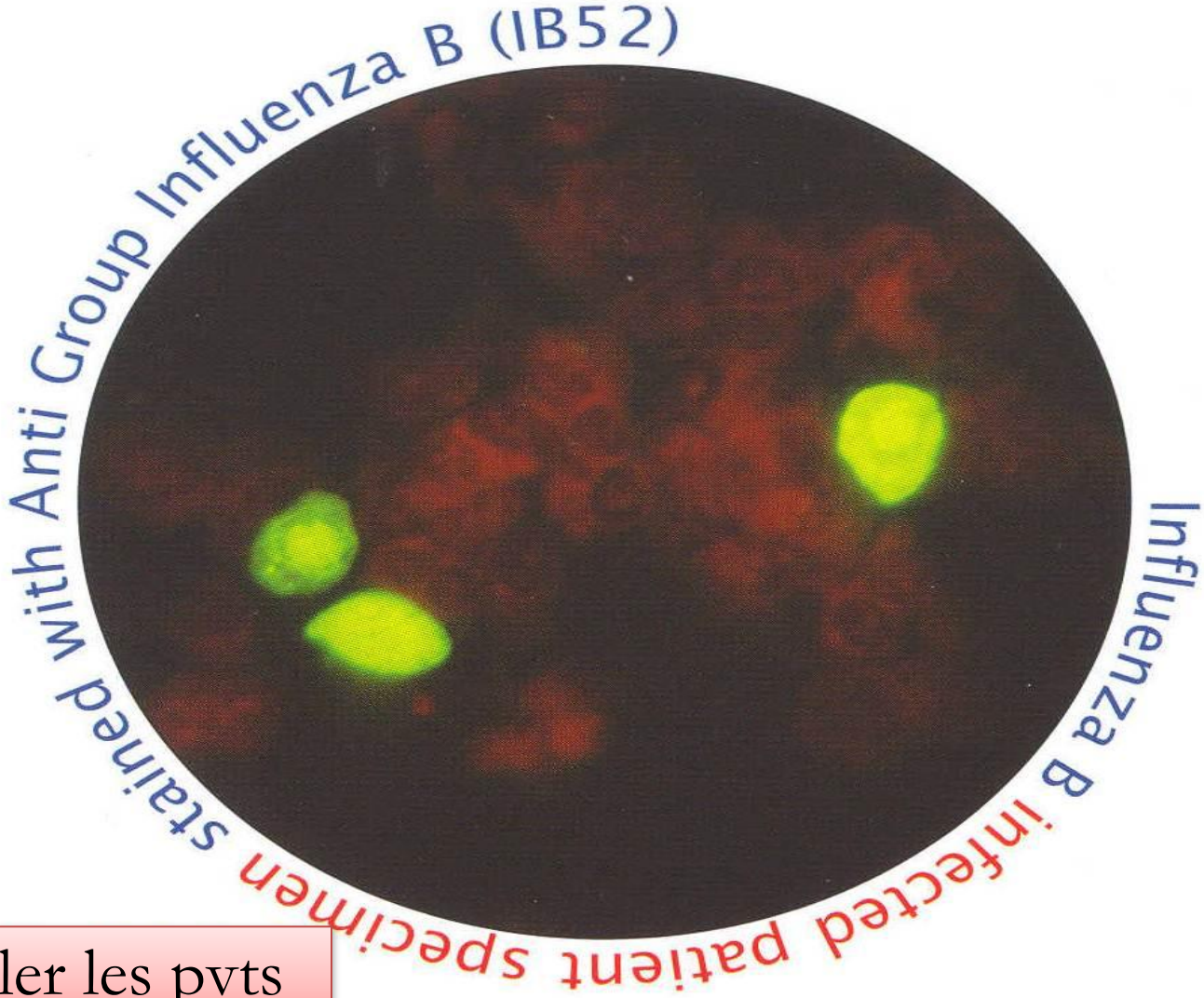
↓

Anticorps monoclonaux marqués

↓

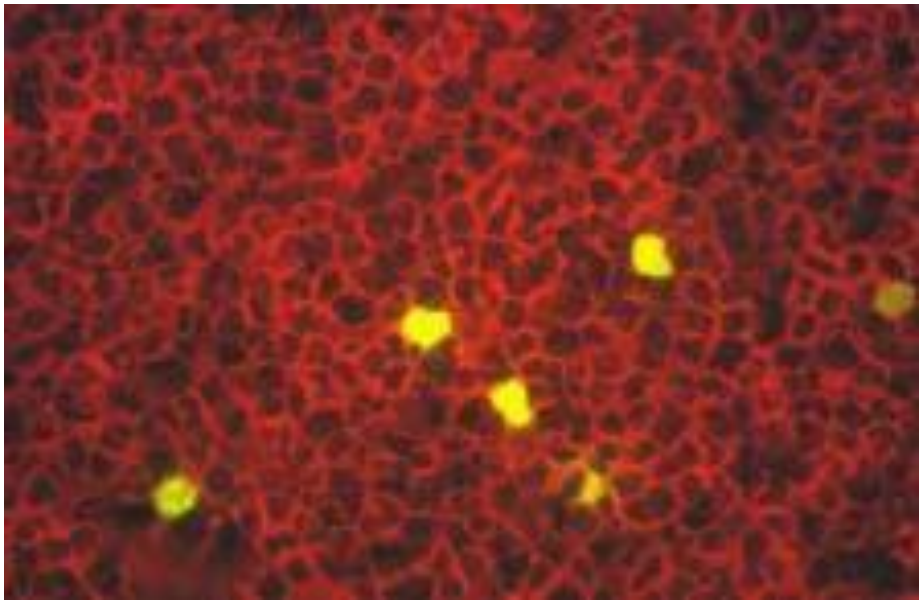
Signal

Immunofluorescence : Lecture au microscope à UV



Ne pas congeler les pvts

Antigènémie pp65 du CMV positive (Pvt = leucocytes circulants)



Ne pas congeler les pvts

Test rapide/Immunochromatographie

Diagnostic rapide, quelques exemples :

- Virus respiratoires (v. grippe, SARS-CoV-2,..)
- Virus entériques (Rotavirus, Adénovirus…)

Simple, Rapide, Faible coût, **Sensibilité imparfaite**

Test rapide / Immunochromatographie (Recherche d'Antigène)

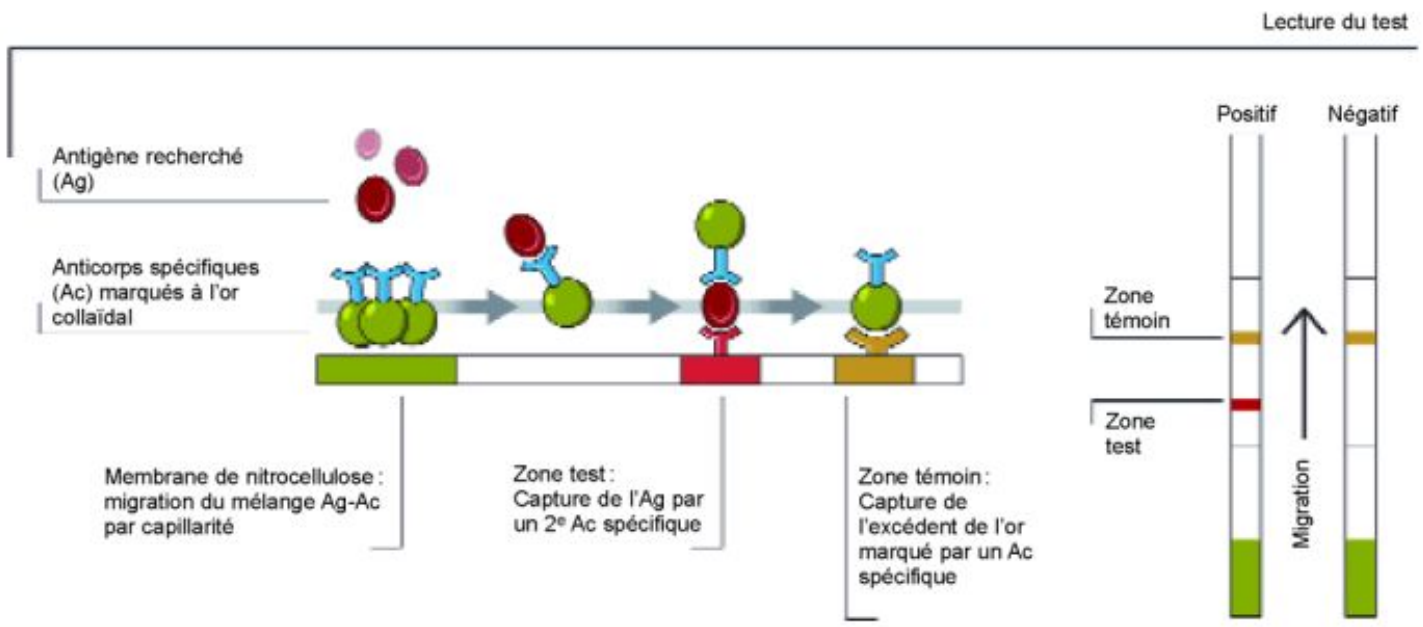
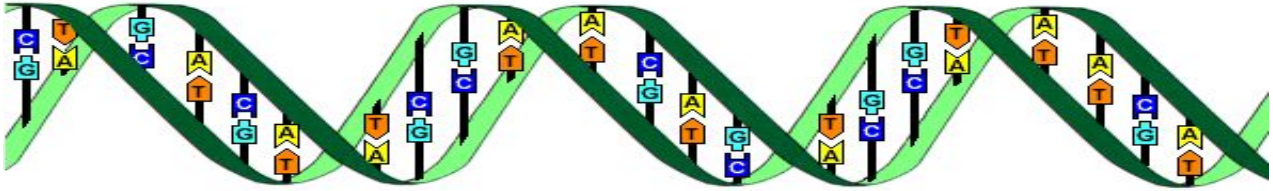


Figure 1. Schéma d'un test d'immunoch

BIOLOGIE MOLECULAIRE

Techniques d'hybridation

La complémentarité des bases est à la base de cette **technique**



Techniques d'hybridation (cas Pos)

Prélèvement

5′ A T C A G T A C C T T A T A C G C T T C G T T A T 3′
3′ T A G T C A T G G A A T A T G C G A A G C A A T A 5′

Dénaturation

5′ A T C A G T A C C T T A T A C G C T T C G T T A T 3′

3′ T A G T C A T G G A A T A T G C G A A G C A A T A 5′

Hybridation

5′ A T C A G T A C C T T A T A C 3′

Sonde marquée

5′ A T C A G T A C C T T A T A C 3′
3′ T A G T C A T G G A A T A T G C G A A G C A A T A 5′

Lavage

Signal +

5′ A T C A G T A C C T T A T A C 3′
3′ T A G T C A T G G A A T A T G C G A A G C A A T A 5′

→ **Pvt POSITIF**

Techniques d'hybridation (cas Neg)

Prélèvement

5' C T A A G T A C C G G A T A C G C T T C G T T A T 3'
3' G A T T C A T G G C C T A T G C G A A G C A A T A 5'

Dénaturation

5' C T A A G T A C C G G A T A C G C T T C G T T A T 3'

3' G A T T C A T G G C C T A T G C G A A G C A A T A 5'

5' A A C A G T A C C T T A T A C 3'

Sonde marquée

5' A A C A G T A C C T T A T A C 3'

Pas d'Hybridation

3' G A T T C A T G G C C T A T G C G A A G C A A T A 5'

Lavage

Pas de signal

3' G A T T C A T G G C C T A T G C G A A G C A A T A 5'

→ **Pvt négatif**

faible sensibilité, de l'ordre de 10^4 à 10^5 copies

Amplification de la cible avant détection pour améliorer la sensibilité

→ **PCR :** Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction

Prélèvements:

Selon site de réplication

Sang total sur tube sec /EDTA, **jamais l'héparine**

Conservation longue période à – 80°C (virus à ARN++)

PCR conventionnelle ou end point

Quatre étapes successives :

1. Extraction des acides nucléiques
2. Addition du mix **(+ amorces + polymérase + dNTP)**
3. Amplification (thermocycleur)
4. Détection des produits amplifiés par hybridation avec **sonde** spécifique

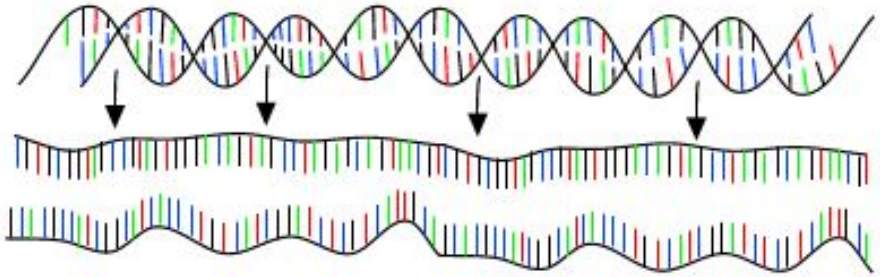
PCR conventionnelle ou end point

Quatre étapes successives :

1. Extraction des acides nucléiques
2. Addition du mix (+ **amorces** + **polymérase** + **dNTP**)
3. Amplification (thermocycleur)
4. Détection des produits amplifiés
   - migration sur gel
   - hybridation avec **sonde** spécifique

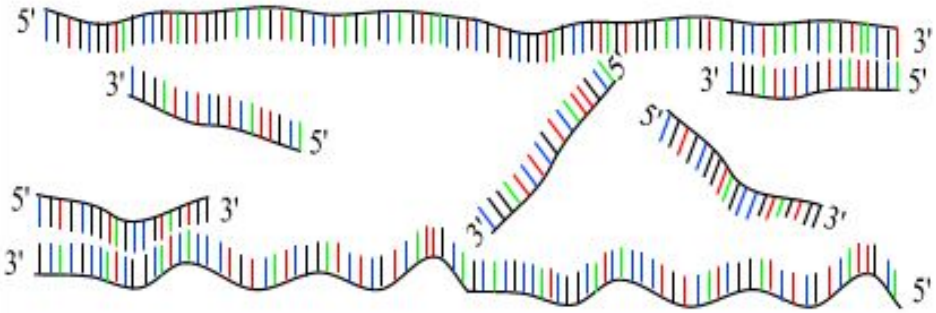
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

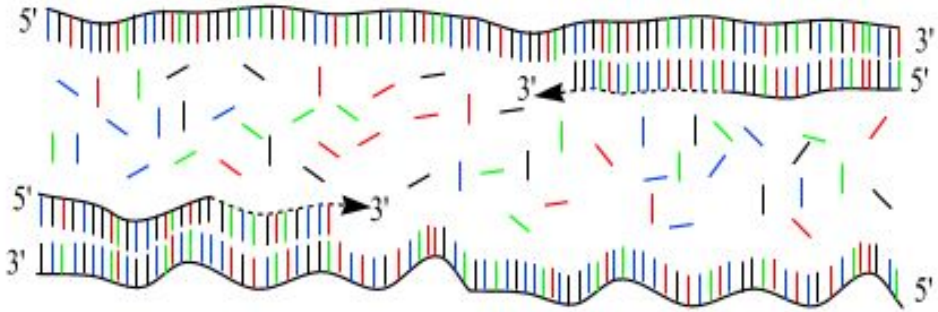
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



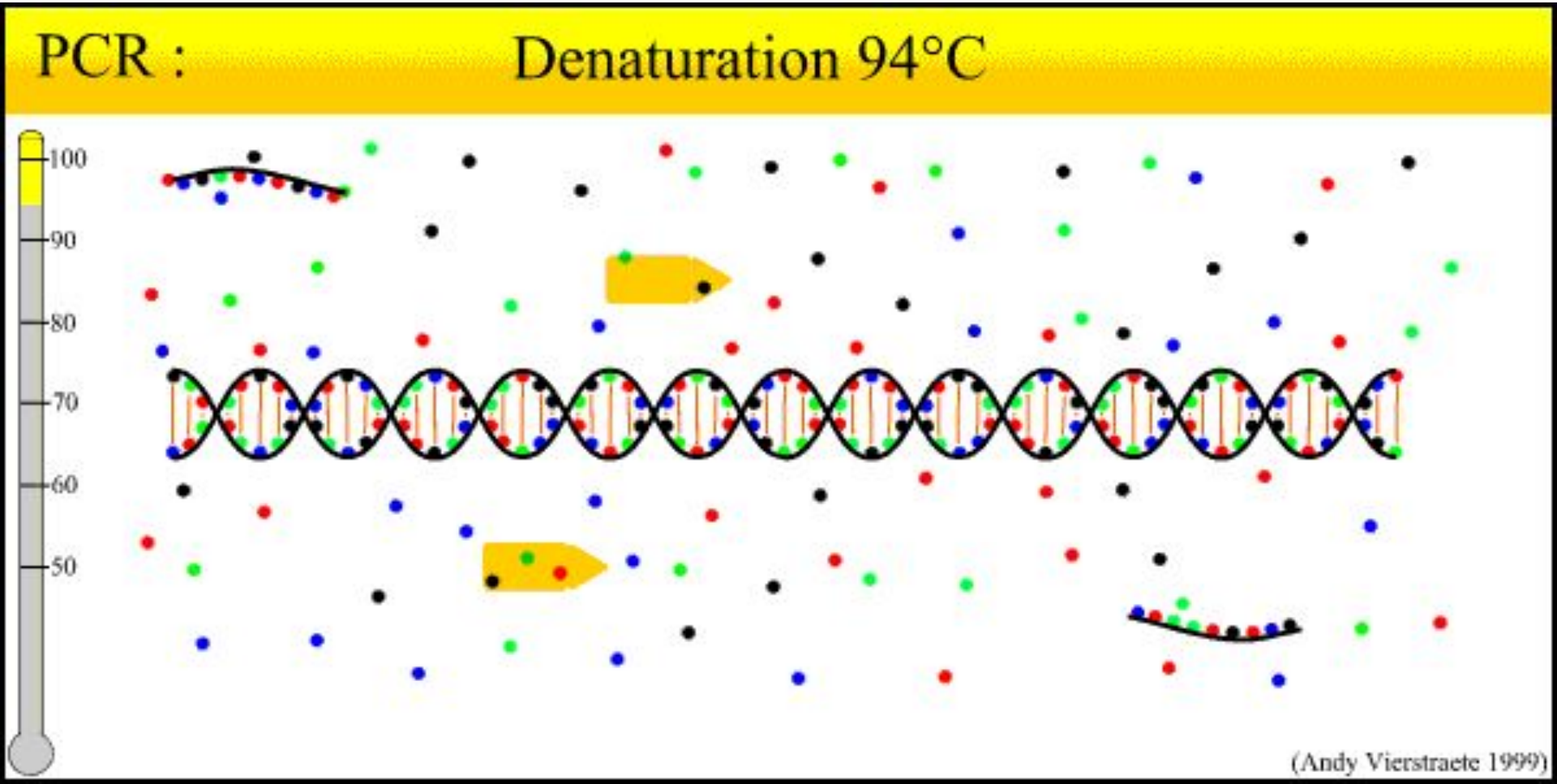
Step 3 : extension

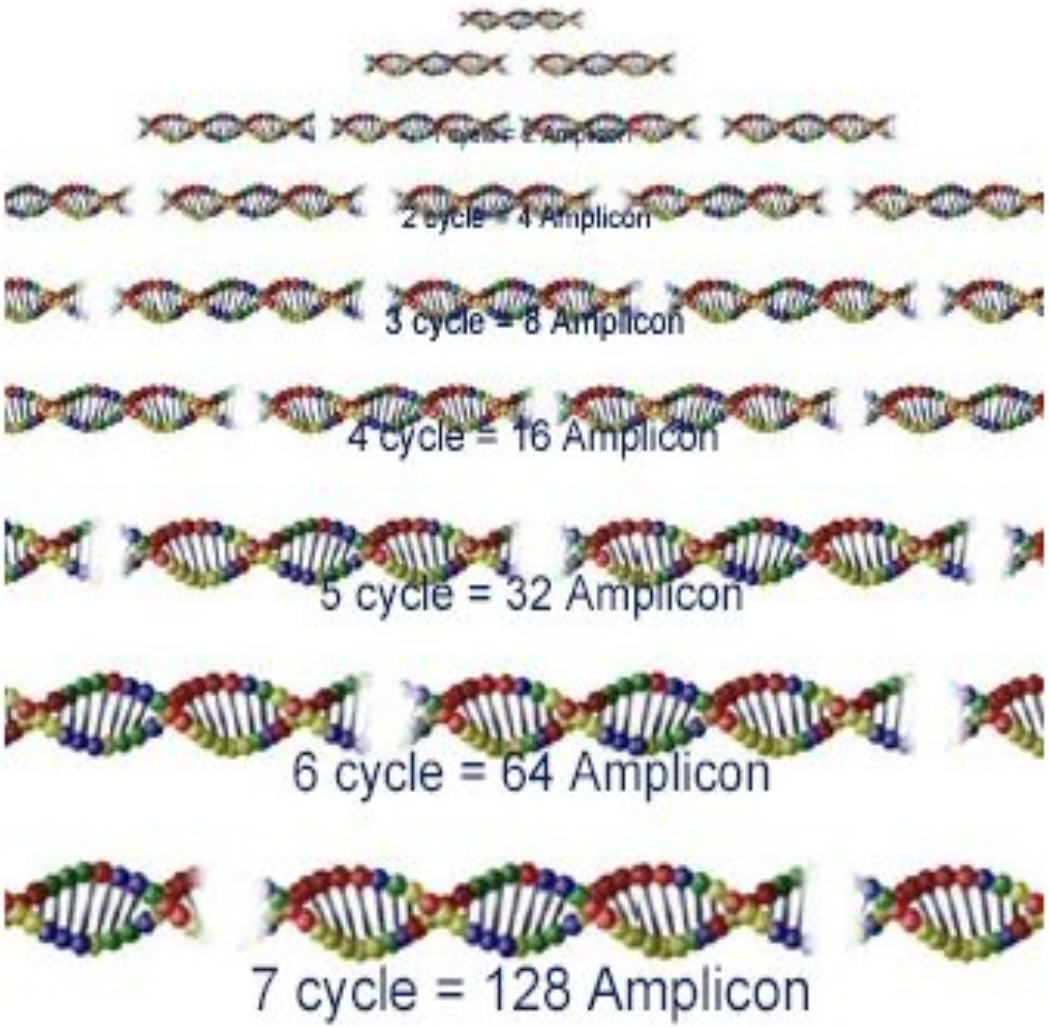
2 minutes 72 °C

only dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)

Principe de la PCR





No. of Cycles	No. Amplicon Copies of Target
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

les cycles de la PCR

PCR : Détection par hybridation avec sonde spécifique

Produits de PCR

5′ A T C A G T A C C T T A T A C G C T T C G T T A T 3′
3′ T A G T C A T G G A A T A T G C G A A G C A A T A 5′

Dénaturation

5′ A T C A G T A C C T T A T A C G C T T C G T T A T 3′

3′ T A G T C A T G G A A T A T G C G A A G C A A T A 5′

Hybridation

5′ A T C A G T A C C T T A T A C 3′

Sonde marquée

5′ A T C A G T A C C T T A T A C 3′
3′ T A G T C A T G G A A T A T G C G A A G C A A T A 5′

Sensibilité améliorée

PCR en temps reel

Trois étapes :

1. Extraction des acides nucléiques
2. Addition du mix **(+ amorces + polymérase + dNTP + sonde)**
3. Amplification et détection de la cible simultanément

PCR conventionnelle ou end point

Quatre étapes successives :

1. Extraction des acides nucléiques
2. Addition du mix **(+ amorces + polymérase + dNTP)**
3. Amplification (thermocycleur)
4. Détection des produits amplifiés par hybridation avec **sonde** spécifique

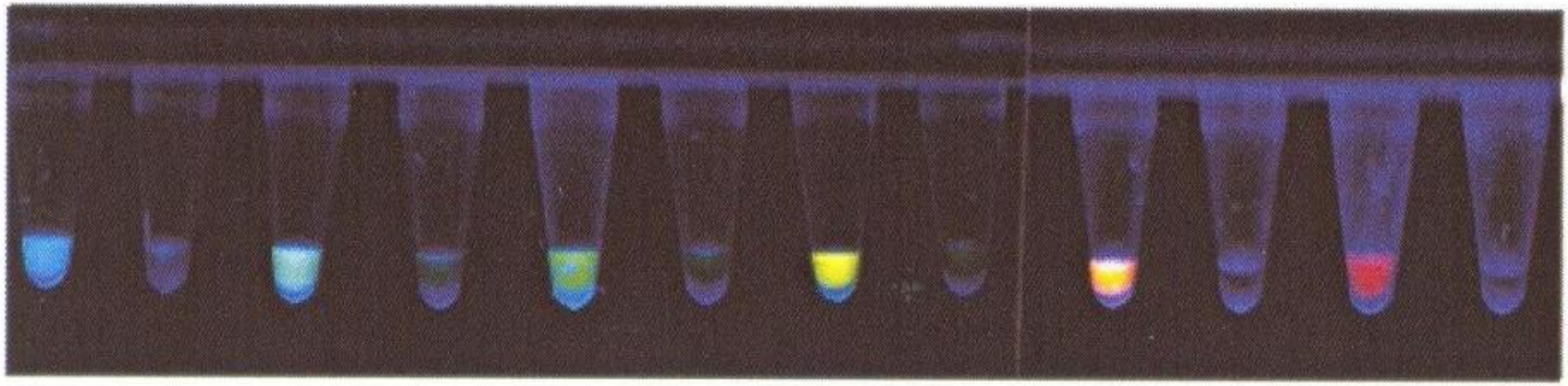
In Real-Time PCR the detection of PCR products is dependent on fluorescent light.

Fluorescence

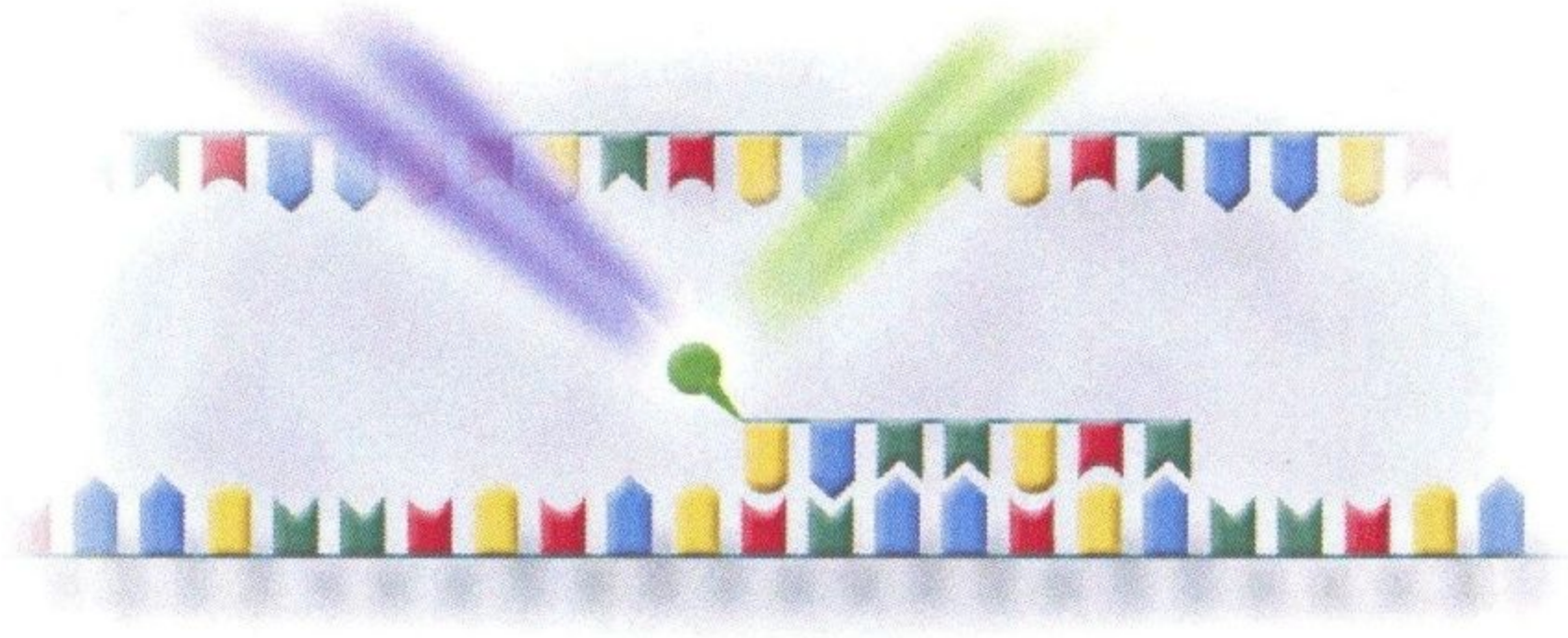
≡

absorption of short-wave light,

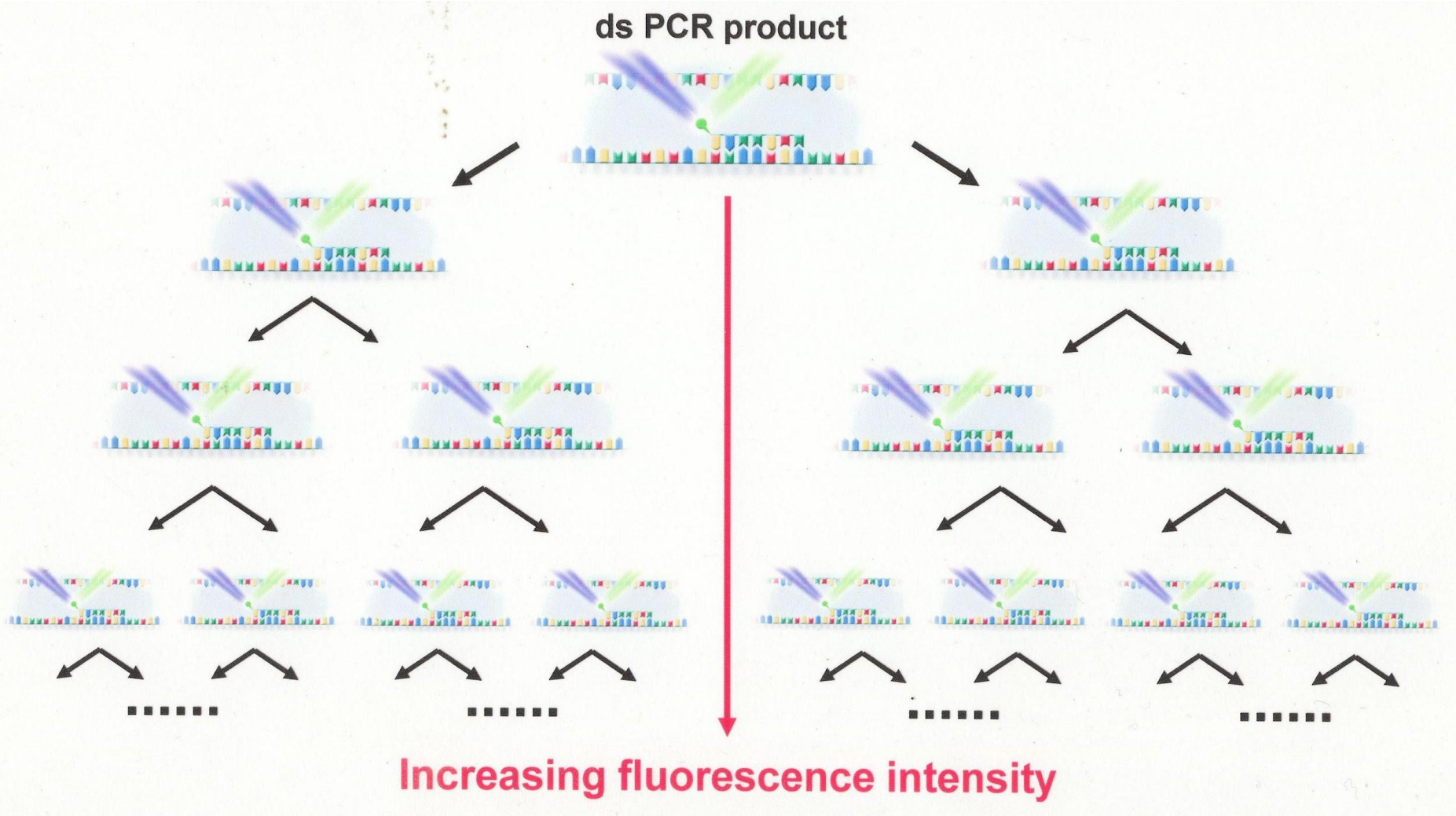
emission of long-wave light

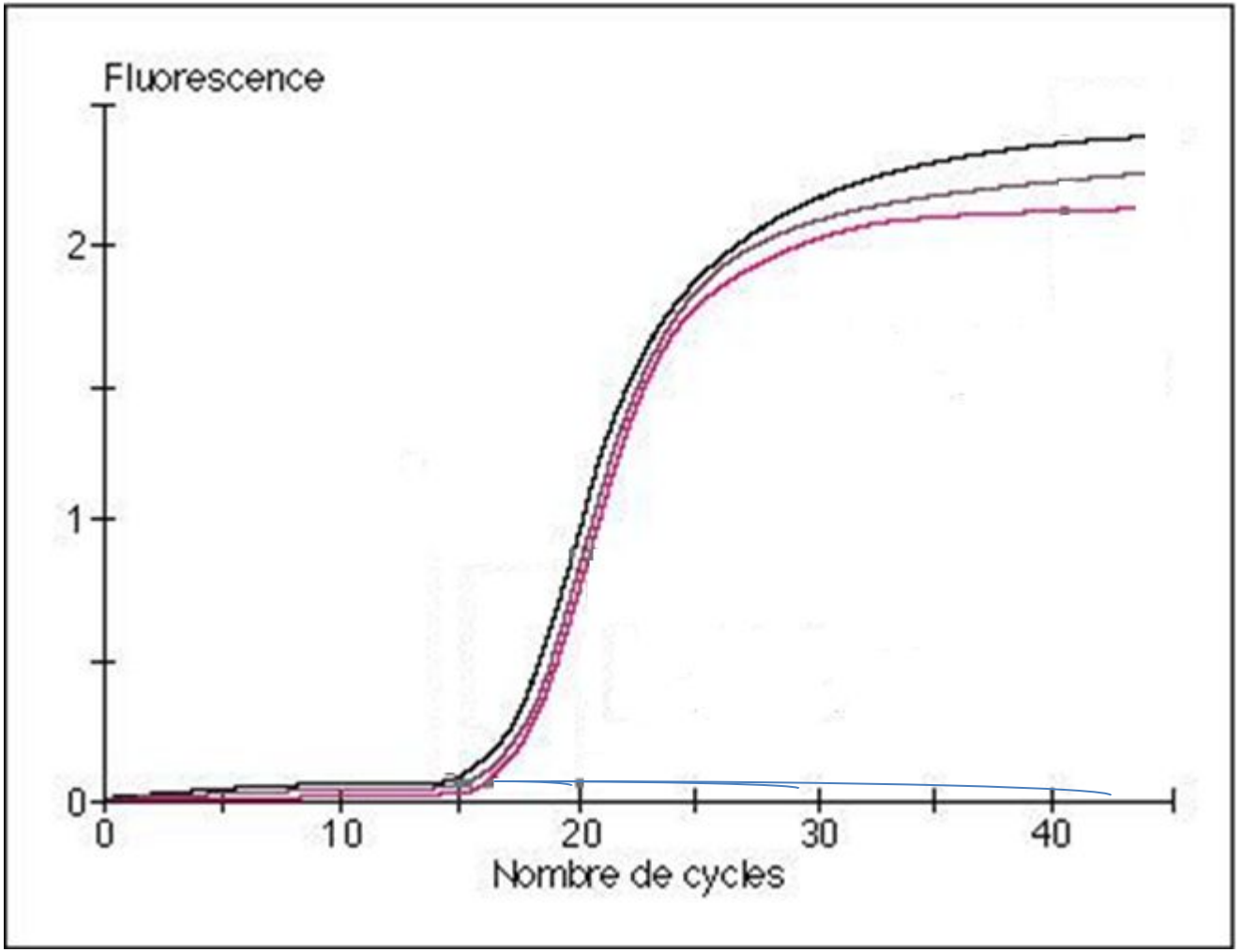


DNA detection by fluorescent oligonucleotides



DNA detection by fluorescent oligonucleotides

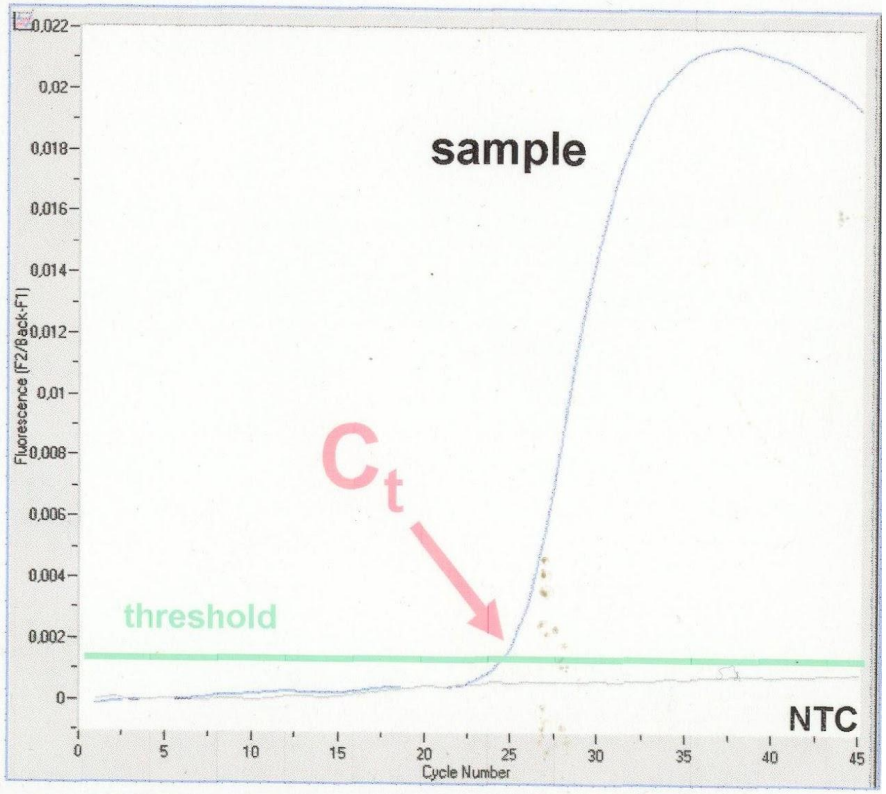



Fluorescence
2
1
0
0
10
20
30
40
Nombre de cycles

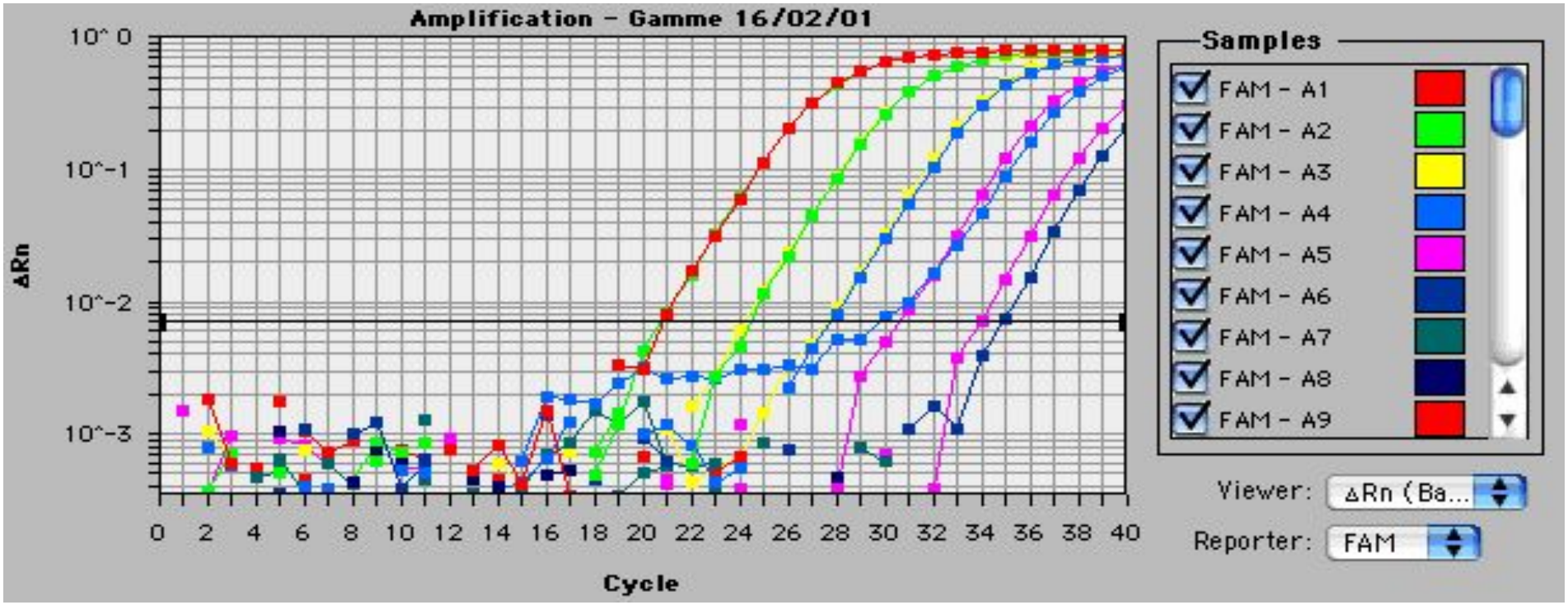
Determine the TIME POINT of signal generation rather than signal strength!

The measure of this TIME POINT is achieved in Real-Time PCR by determination of the

C_t



C_t = threshold cycle: The calculated cycle number at which the PCR product crosses a threshold of detection (= C_p: crossing point)


Amplification - Gamme 16/02/01
10^0
10^-1
10^-2
10^-3
ΔRn
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40
Cycle
Samples
FAM - A1
FAM - A2
FAM - A3
FAM - A4
FAM - A5
FAM - A6
FAM - A7
FAM - A8
FAM - A9
Viewer: ΔRn (Ba...
Reporter: FAM

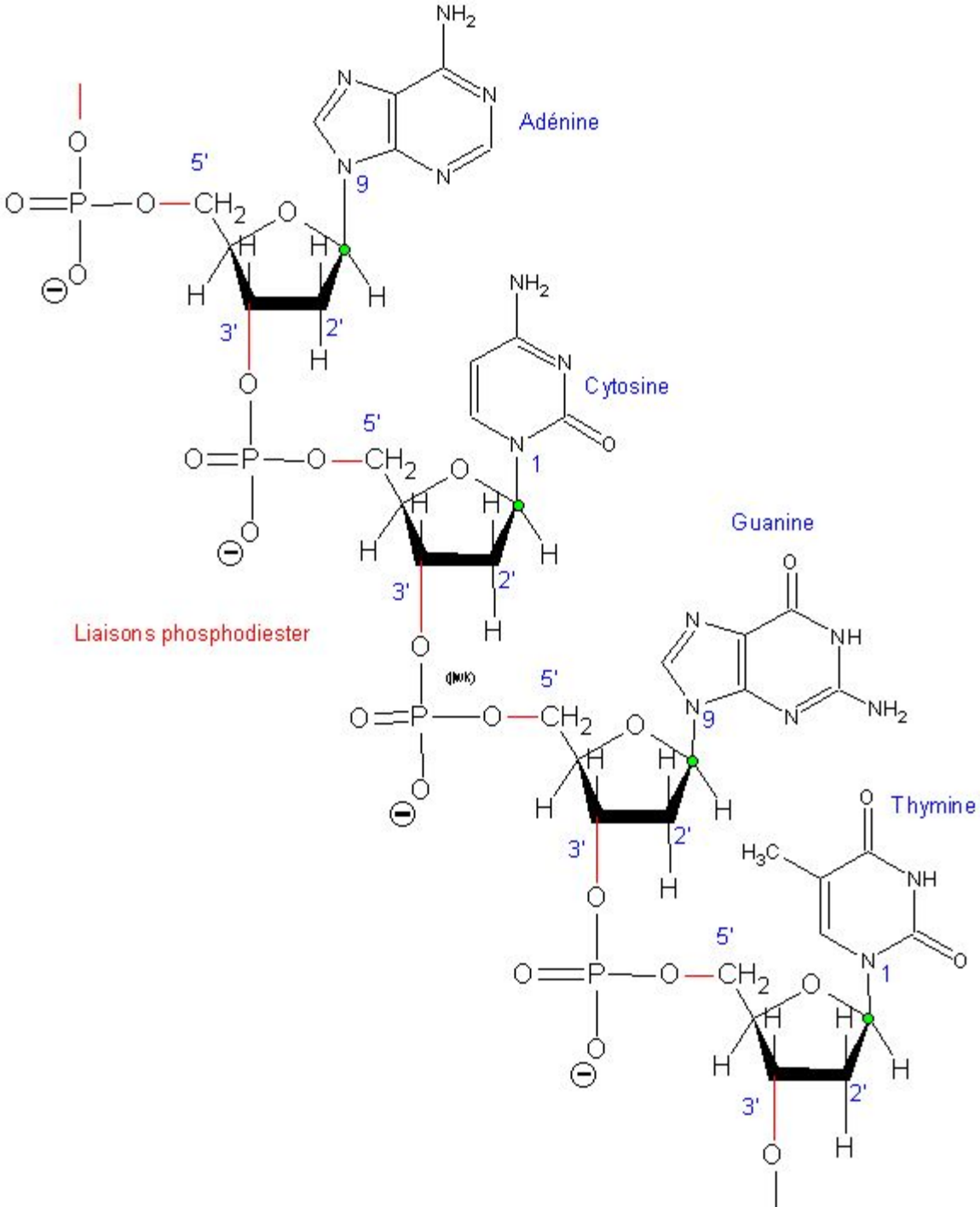
PCR en temps reel

Avantages

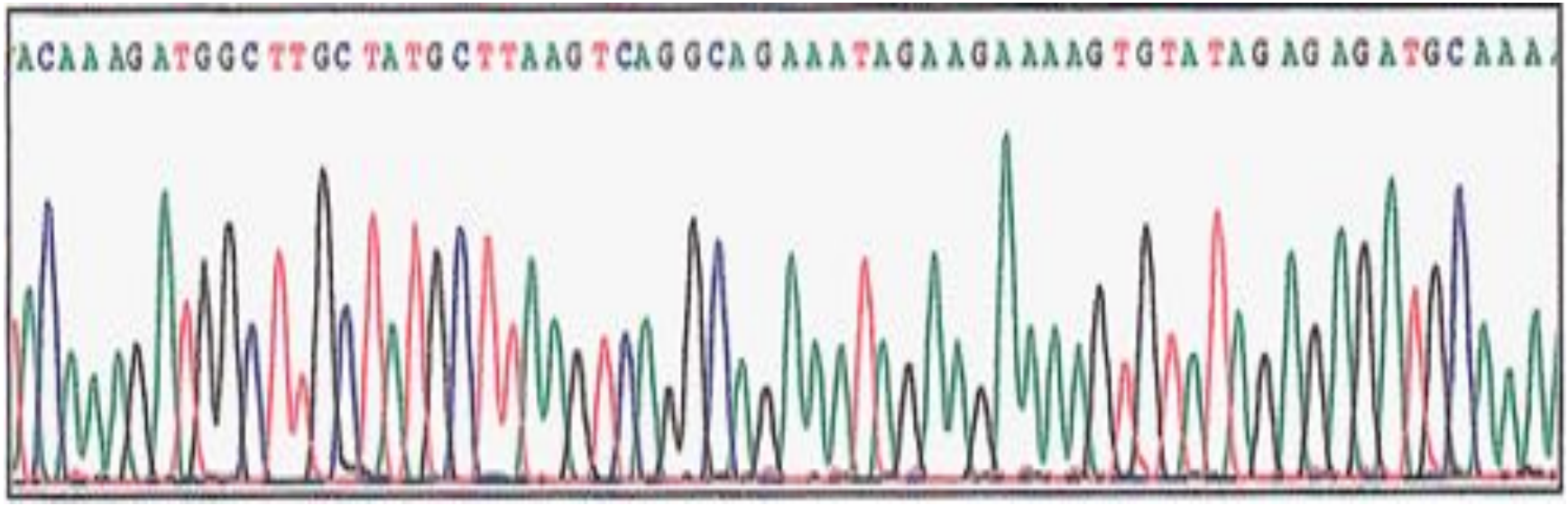
- Réduction des risques de contamination par les produits de PCR (Pas d'ouverture de tubes en post PCR)
- Amélioration de la sensibilité
- Plus large domaine de linéarité
- Quantification plus précise
- Plus rapide

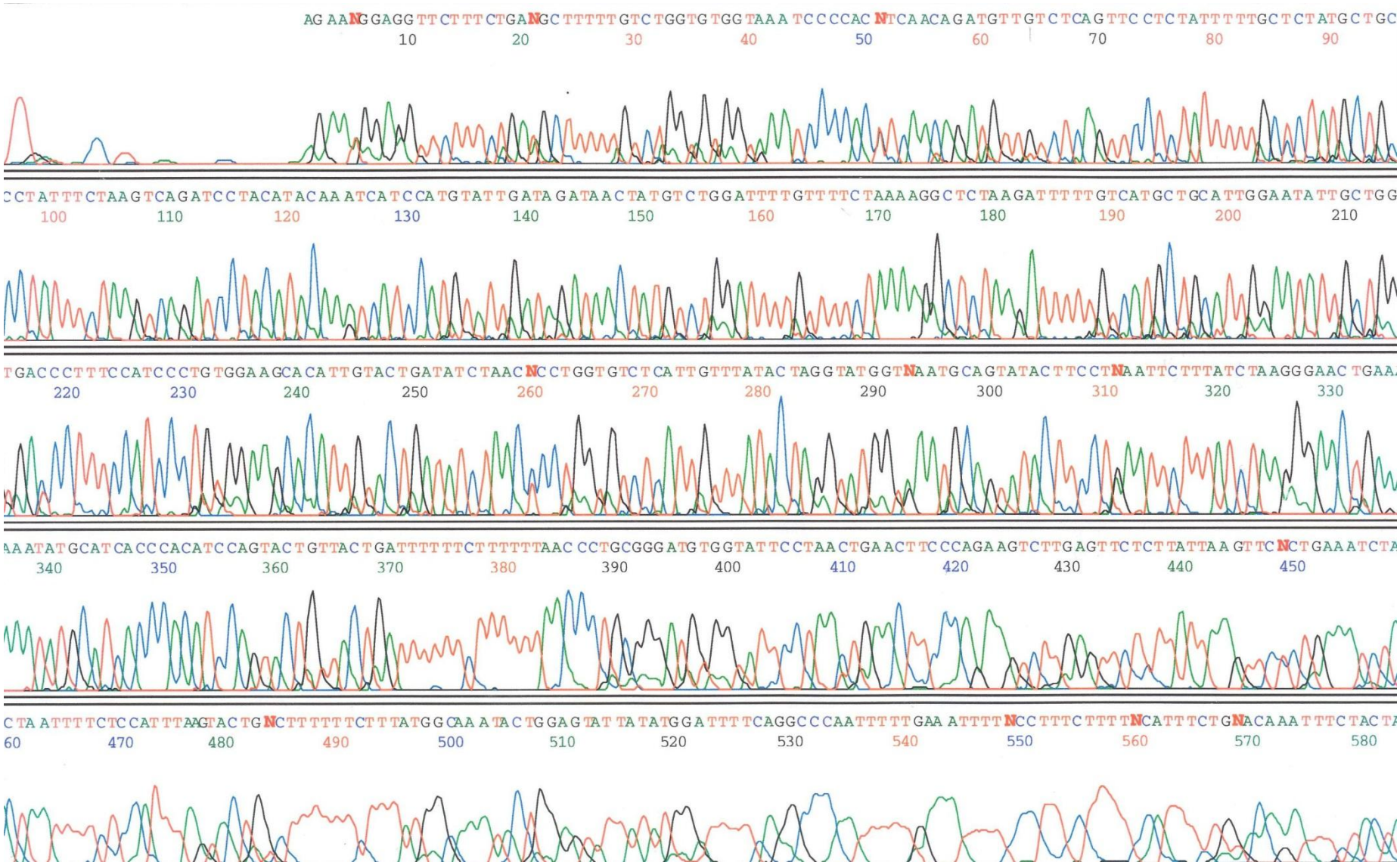
Séquençage de l'ADN (méthode enzymatique de Sanger)

Détermination de la séquence des nucléotides (**Adénine, Guanine, Cytosine et Thymine**) composant une portion ou la totalité du génome viral


Adénine
Cytosine
Guanine
Thymine
Liaisons phosphodiester

Séquençage de l’ADN (méthode enzymatique)

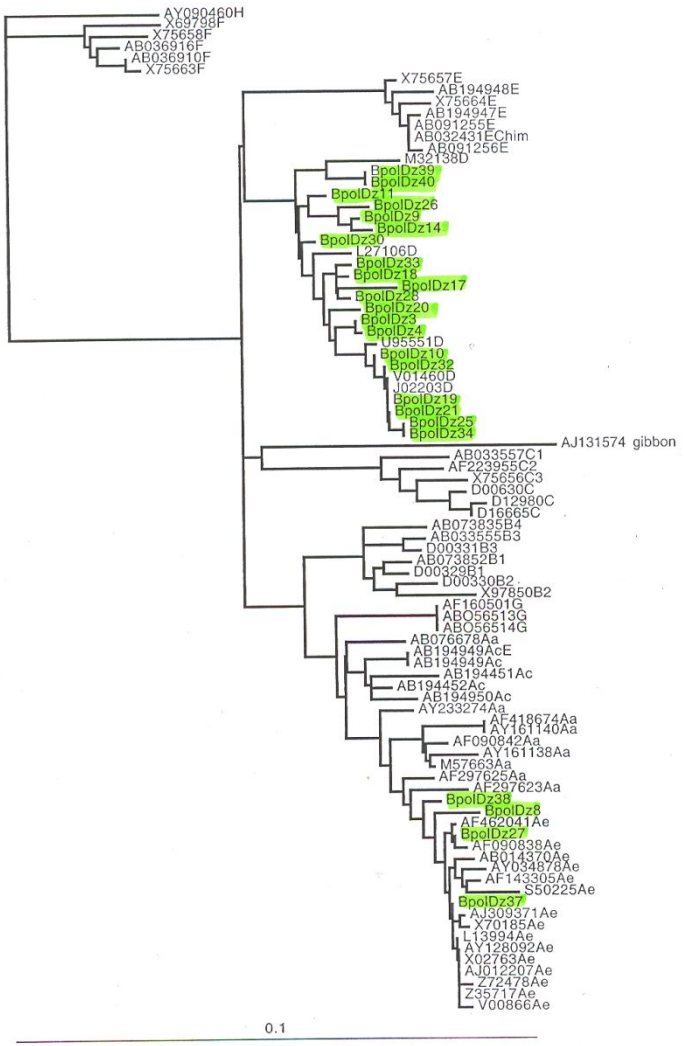



AGAANGGAGGTTCTTTCTGANGCTTTTTGTCTGGTGTGGTAAATCCCCACNTCAACAGATGTTGTCTCAGTTCCTCTATTTTTGCTCTATGCTGC
10 20 30 40 50 60 70 80 90
CCTATTTCTAAGTCAGATCCTACATACAAATCATCCATGTATTGATAGATAACTATGTCTGGATTTTGTTTTCTAAAAGGCTCTAAGATTTTTGTCATGCTGCATTGGAATATTGCTGG
100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210
TGACCCTTTCCATCCCTGTGGAAGCACATTGTACTGATATCTAACNCCTGGTGTCTCATTGTTTATACTAGGTATGGTNAATGCAGTATACTTCCTNAATTCTTTATCTAAGGGAACTGAA
220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330
AAATATGCATCACCCACATCCAGTACTGTTACTGATTTTTTCTTTTTTAACCCTGCGGGATGTGGTATTCCTAACTGAACTTCCCAGAAGTCTTGAGTTCTCTTATTAAGTTCNCTGAAATCTA
340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450
CTAATTTTCTCCATTTAAGTACTGNCTTTTTTCTTTATGGCAAATACTGGAGTATTATATGGATTTTCAGGCCCAATTTTTGAAATTTTNCCTTTCTTTTNCATTTCTGNACAAATTTCTACTA
60 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580

Séquençage de l'ADN

Recherche des mutations de résistance aux traitements antiviraux (HIV, HBV, CMV,..)

Séquençage + Analyse phylogénétique



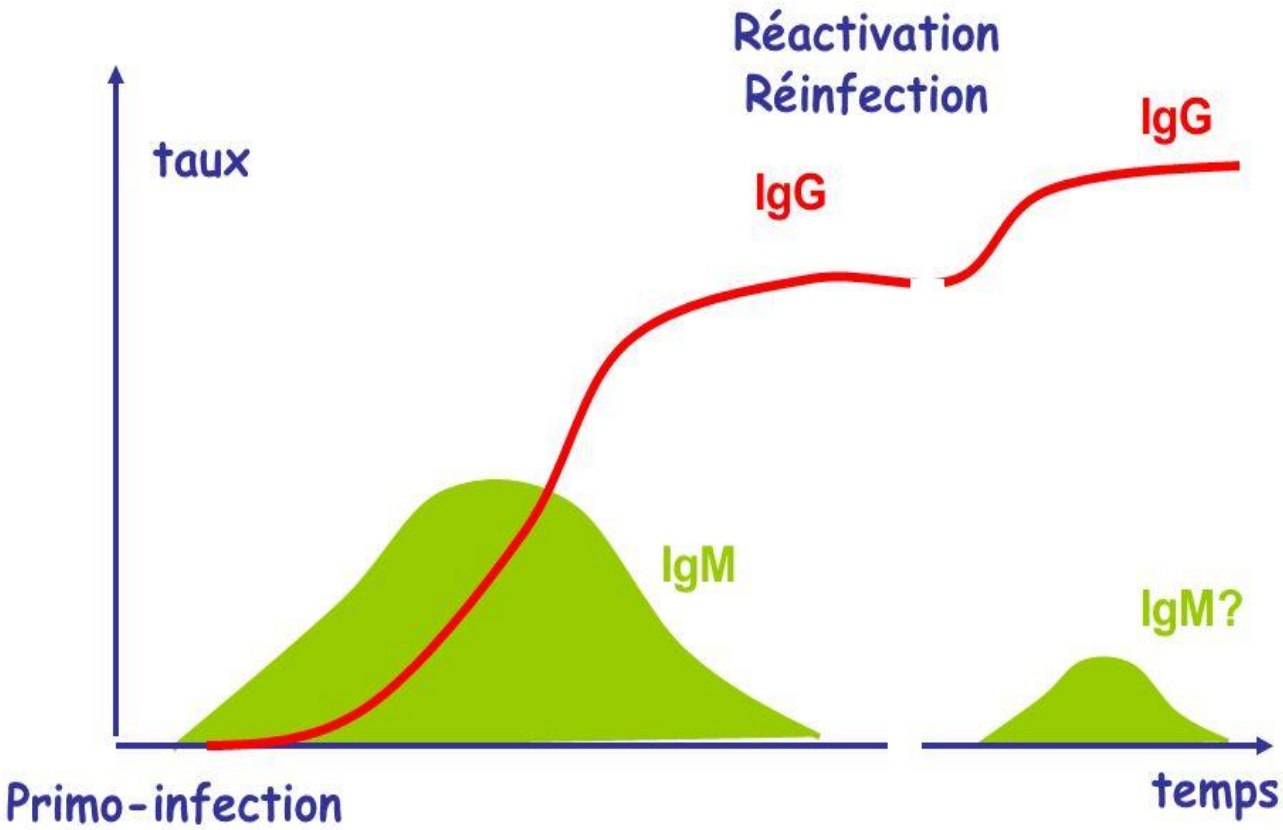
→ Génotype: HCV, HBV, HIV,…

NGS (New Generation Sequencing) ou séquençage à haut débit

- débits de 50 à 1000 fois supérieurs.
- permettent une lecture en profondeur et détectent des variants présents en faible proportion dans une population de génomes (aux environs de 5%, alors qu'elle est de 20% pour Sanger)

SEROLOGIE

Cinétique des Ac



Prélèvements

- Sang total sur tube sec → sérum
- Sang total sur tube avec anticoagulant → plasma
- Si sérum/plasma était congelé → clarifier avant analyse = centrifuger

Conservation à + 4°C sinon à – 20°C

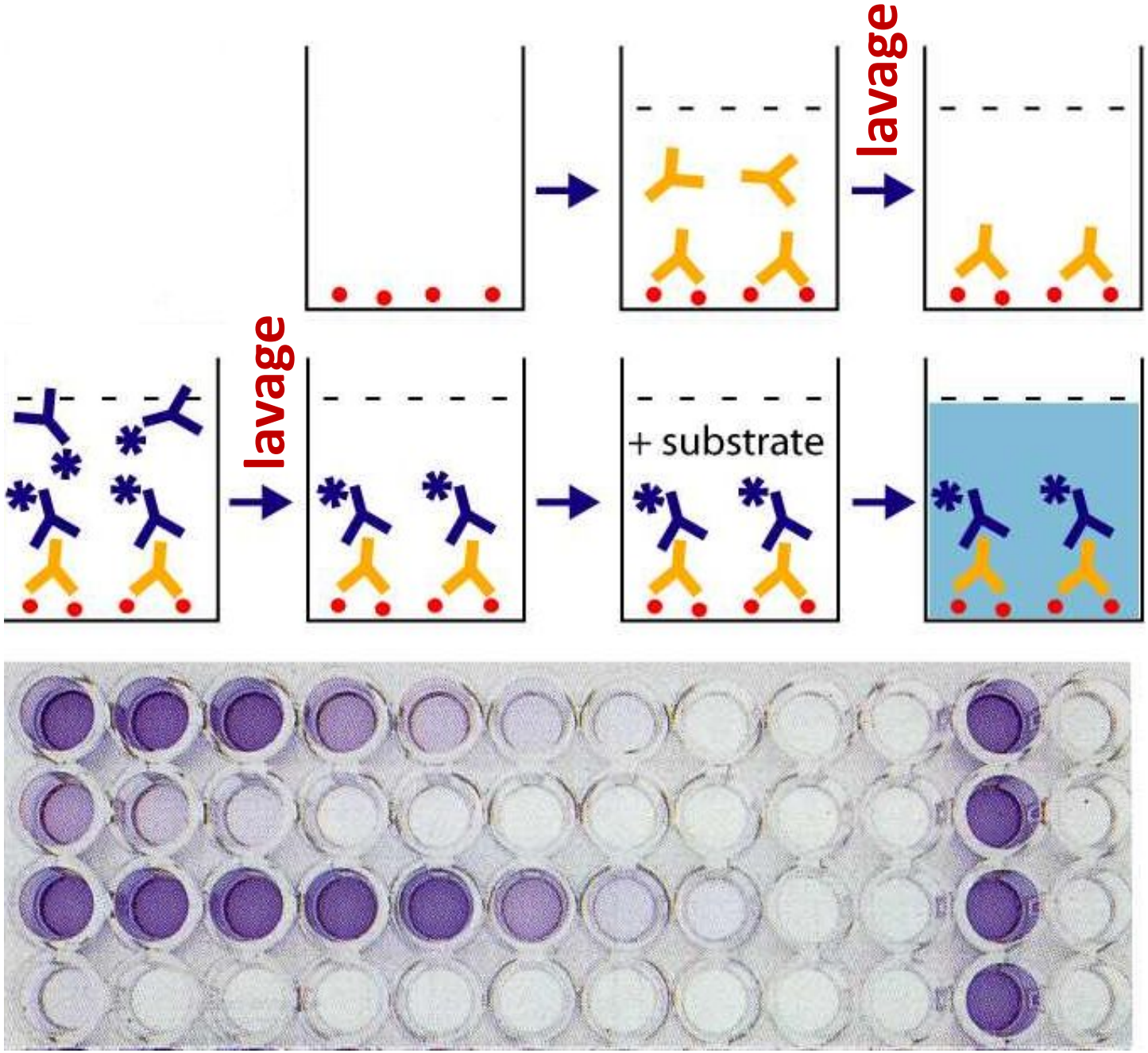
Techniques sérologiques

- Séroneutralisation
- Réaction de déviation du complément (RFC)
- Inhibition de l'hemagglutination (IHA)
- Immunofluorescence indirecte
- **Tests immuno-enzymatiques (EIA), Chimiluminescence +++**

Test ELISA

Principe général (recherche des Ac dans le sérum):

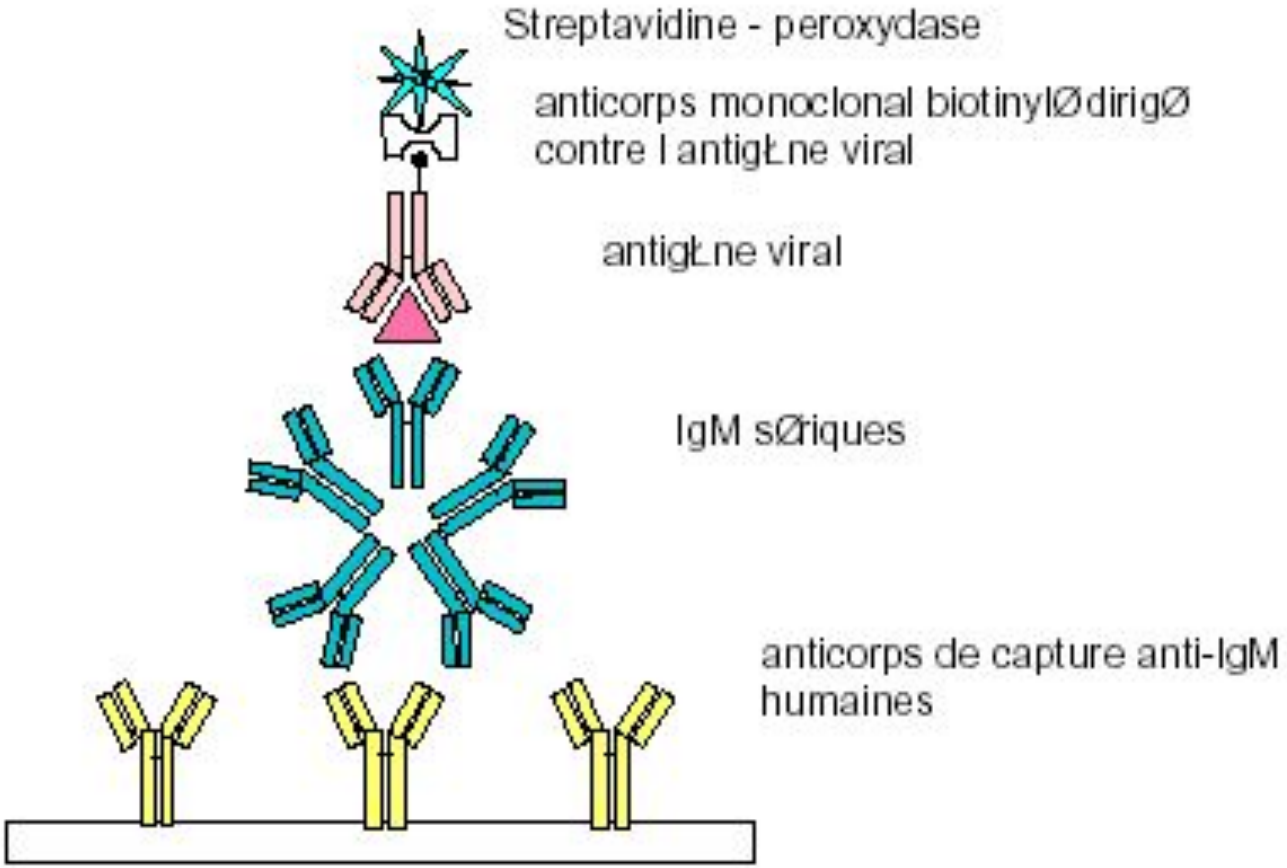
- l'antigène viral est immobilisé sur un support solide (puits de microplaque);
- le sérum à tester est mis en contact avec l'Ag ;
- étape de lavage,
- un anticorps anti-immunoglobuline humaine est ajouté;
- cet Ac est couplé à une enzyme → réaction colorée → Densité Optique (spectrophotomètre)


lavage
lavage
+ substrate

Test ELISA

- Rapide, automatisable
- Sensible
- Spécifique
- Permet de discriminer entre IgM et IgG

ELISA immunocapture (IgM)

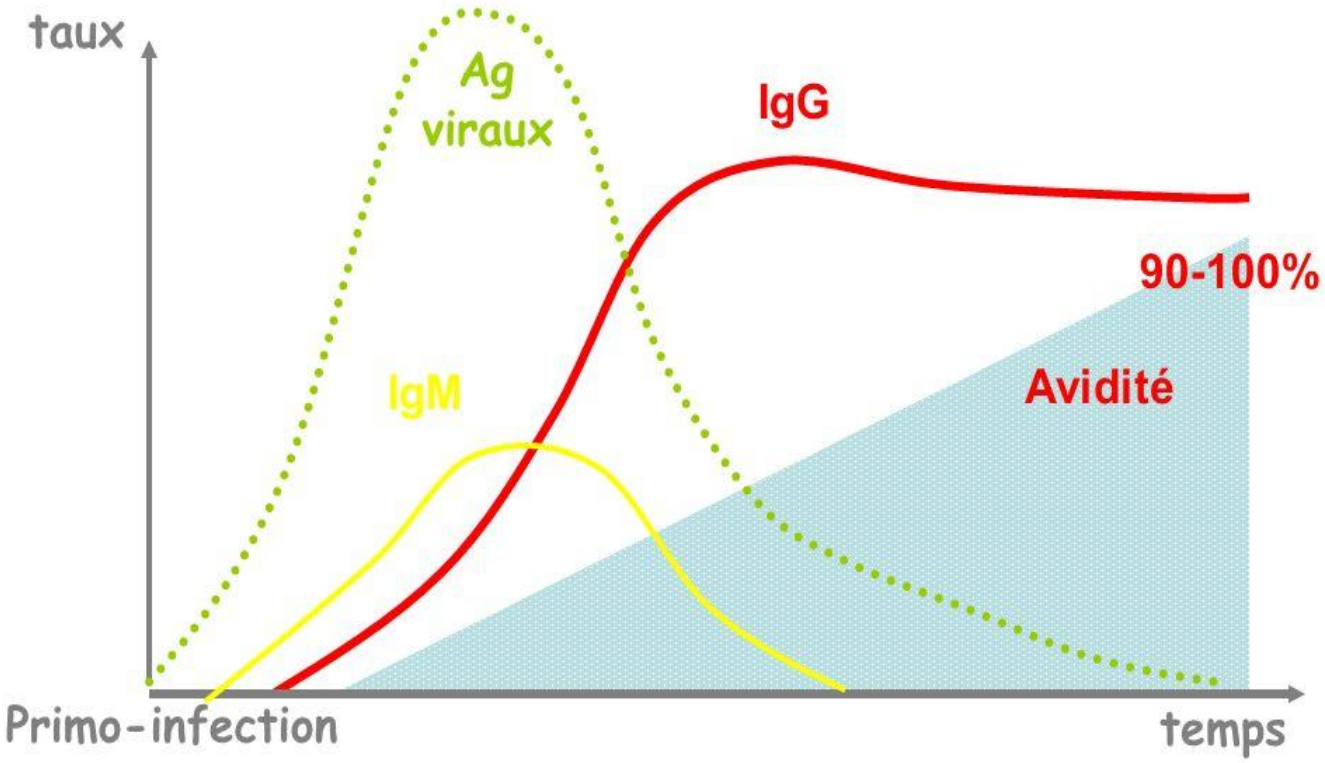


Dc de l'hépatite A, Rubéole, Rougeole,..

Chimiluminescence

- Emission de lumière consécutive à une réaction chimique
- Automatisation ++

Avidité des IgG



Avidité des IgG

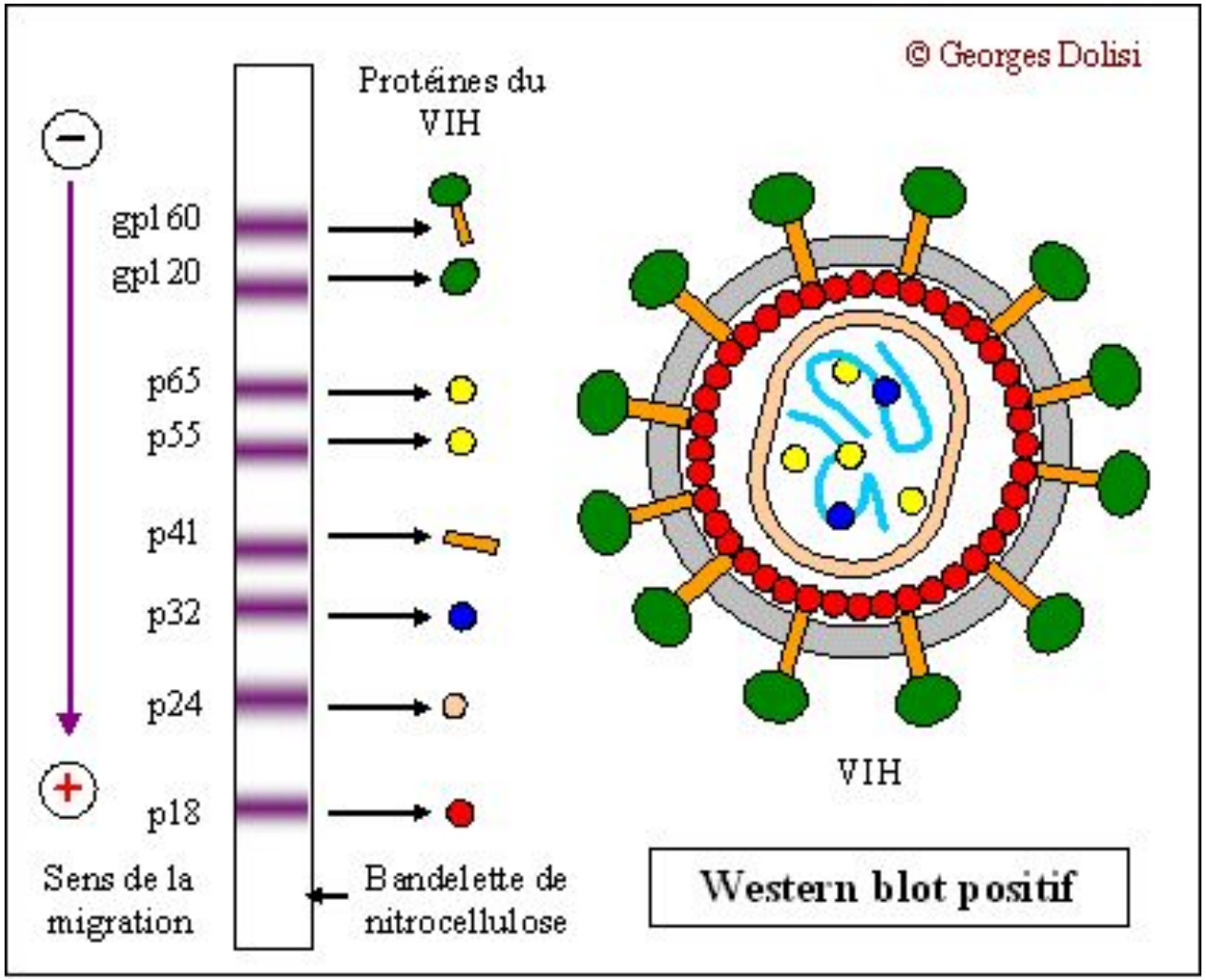
Présence d'IgM spécifiques :

- au cours des primo-infections
- au cours des réinfections/réactivations
- stimulation polyclonale du système immunitaire
- Persistance

→ **Mesure de l'avidité des IgG (rubéole, CMV)**

Avidité faible en faveur d'une primo-infection

Western blot : confirmation de l'infection HIV



TROD (Test Rapide d'Orientation Diagnostique)

- Résultat en 30 minutes maximum
- principe d'immunochromatographie ou d'immunofiltration sur membrane
- Lecture visuelle
- dépistage de l'infection à VIH et de l'infection à VHC
- sensibilité moindre par rapport aux tests classiques au cours de la phase de séroconversion (fenêtre sérologique)

Test rapide / Immunochromatographie (Recherche d'Anticorps : HIV, HCV)

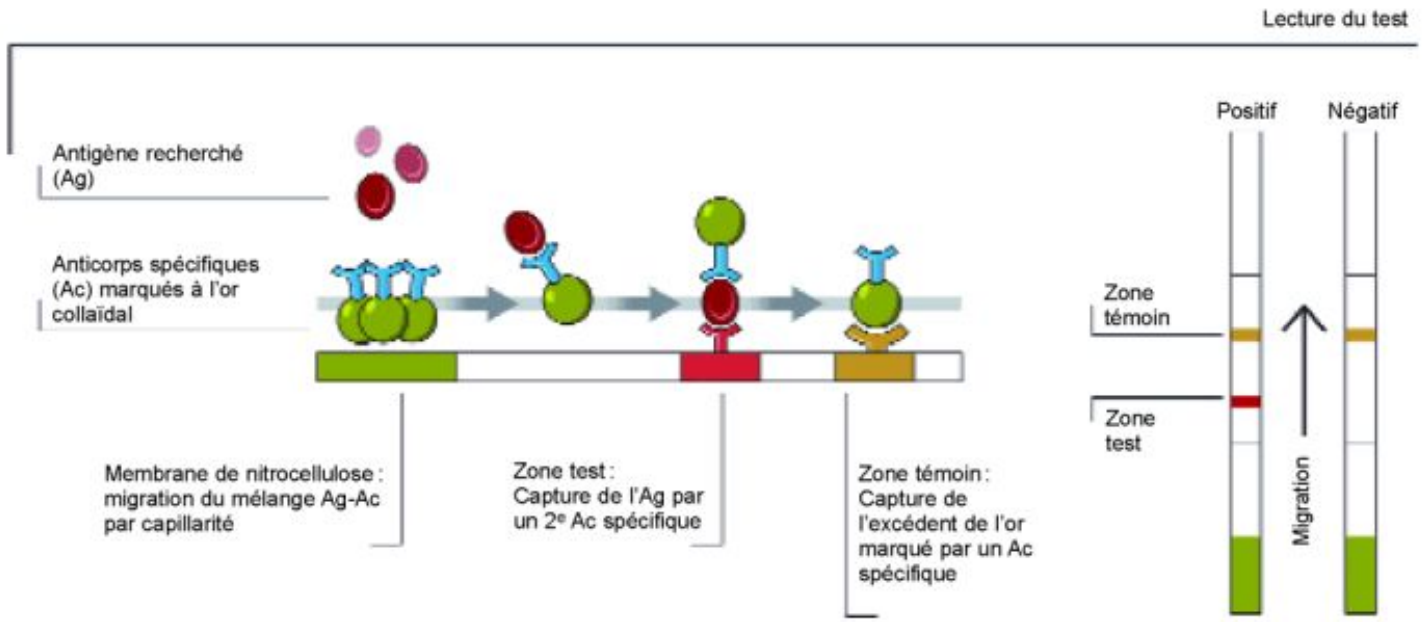


Figure 1. Schéma d'un test d'immunoch