

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

Tp 1^{ère} année médecine
2023-2024

Dr FETTAH-ZAHRA

INTRODUCTION

Les virus = agents infectieux originaux par leur structure et fonctionnement □

Infections = caractéristiques particulières.

Méthodes de diagnostic différentes de celles utilisées pour les bactéries, les champignons ou les protozoaires.

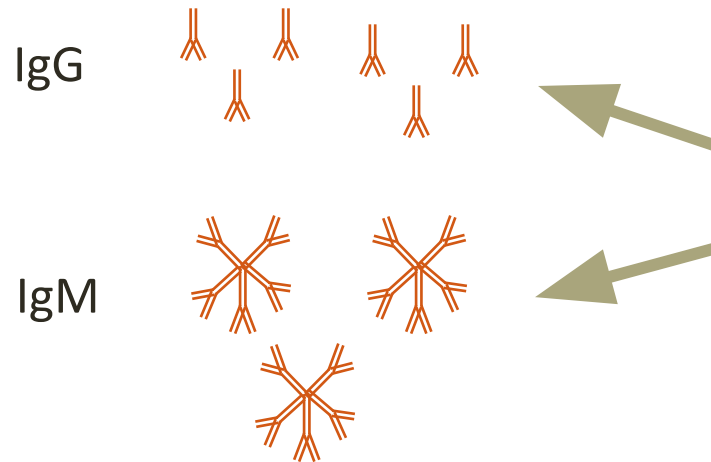
Le diagnostic virologique = détecter , identifier , quantifier et suivre les infections virales humaines .

Deux approches diagnostiques:

- 1. Le diagnostic direct:**
- 2. Le diagnostic indirect:**

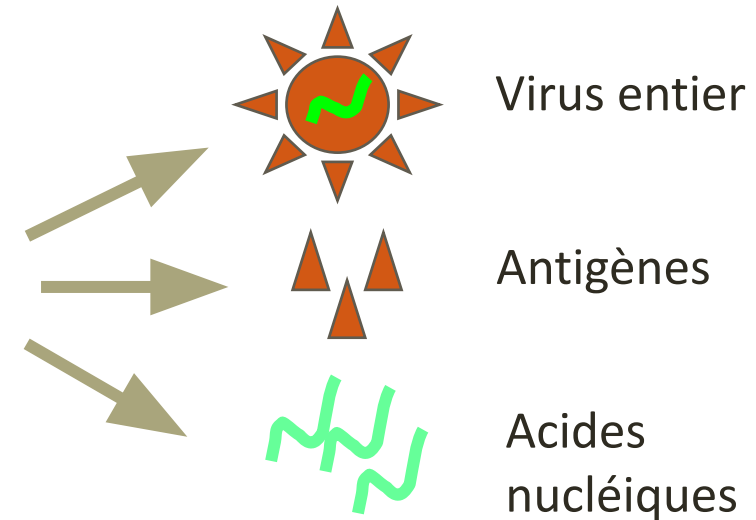
Deux approches

□ Diagnostic indirect



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

□ Diagnostic direct



Détection (directe) **du virus ou de ses composants,** dans les liquides biologiques

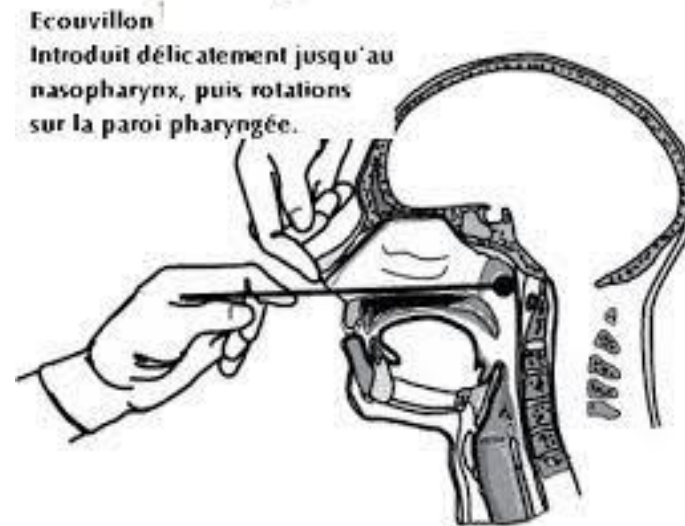
INDICATIONS

Les principales indications sont :

1. La gravité de l'infection virale suspectée (VRS ,HSV1)
2. La mise en route d'une chimiothérapie antivirale,
3. Le criblage virologique des dons de sang, d'organe, de tissu, de cellule
4. L'identification d'une épidémie menaçant une communauté
5. Le suivi du traitement

PRÉLÈVEMENTS

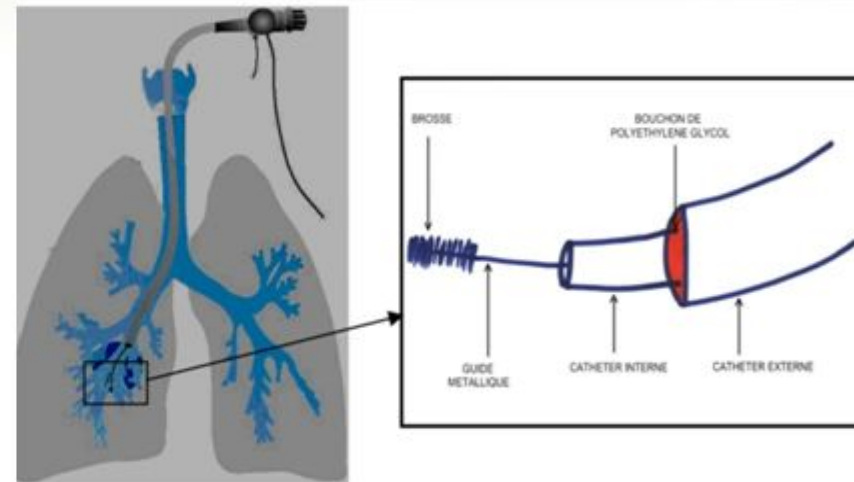
- ❖ En fonction des syndromes cliniques.
- ❖ **Au niveau du site de multiplication ou d'excrétion du virus recherché.**
- ❖ **Le plus tôt possible : au début des signes cliniques.**
- ❖ Parfois, en associant plusieurs types de prélèvements.



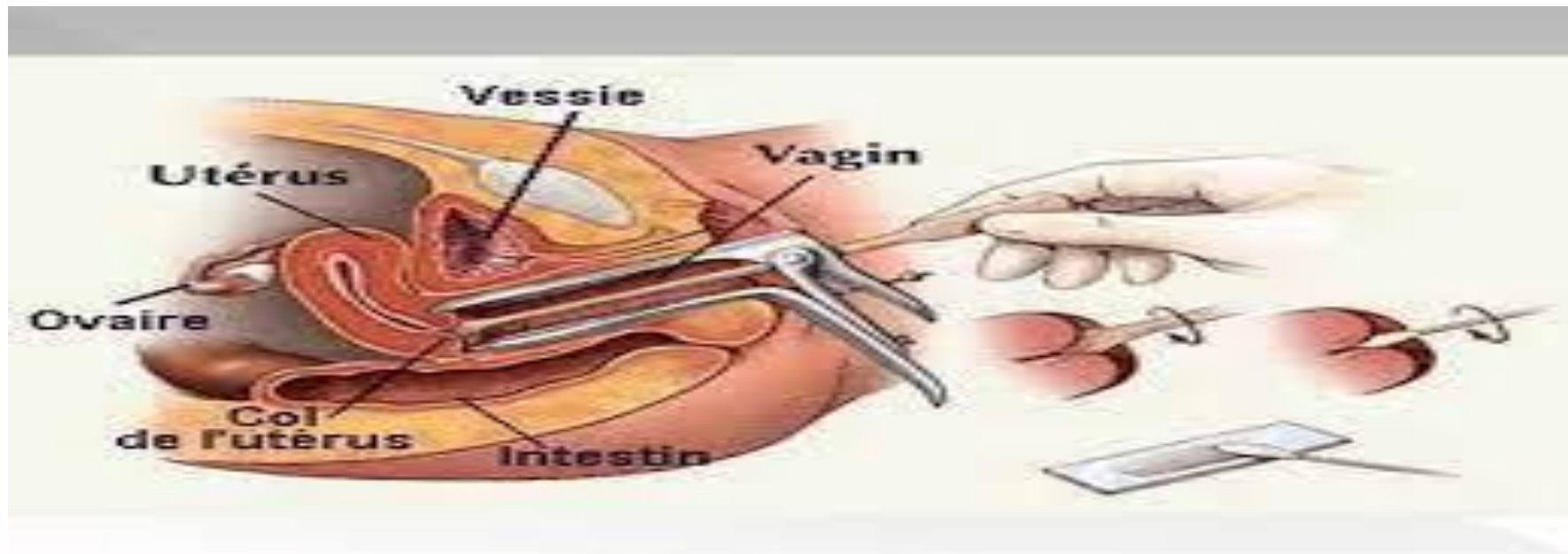
Prélèvement Nasopharyngé



Prélèvement de Gorge



Secrétions broncho-pulmonaires



Frottis cervico-vaginal



Lésions vésiculeuses



Ulcérations



Condylomes

Prélèvement cutanés



Frottis conjonctival



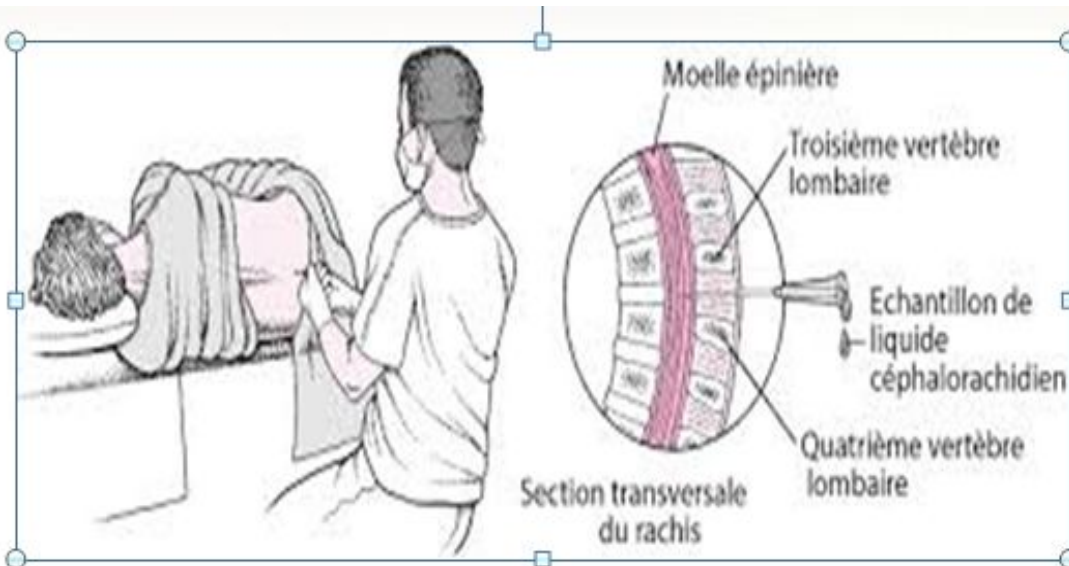
Sérum ou Plasma



Urines



Selles



Liquide céphalo-rachidien (LCR)



Amniocentèse



Liquide amniotique

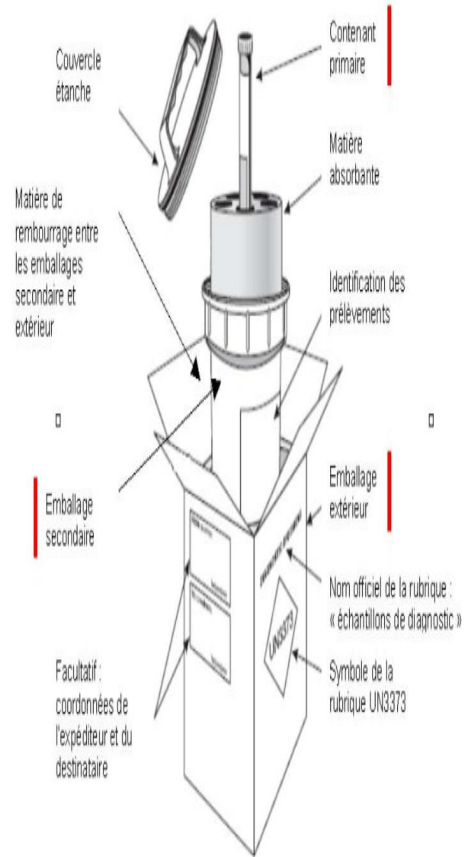
RECEUIL DU PRÉLÈVEMENT



Milieux de transport



Récipient stérile



Triple emballage

CONDITIONS DU PRÉLÈVEMENT

Si on veut isoler le virus ☐

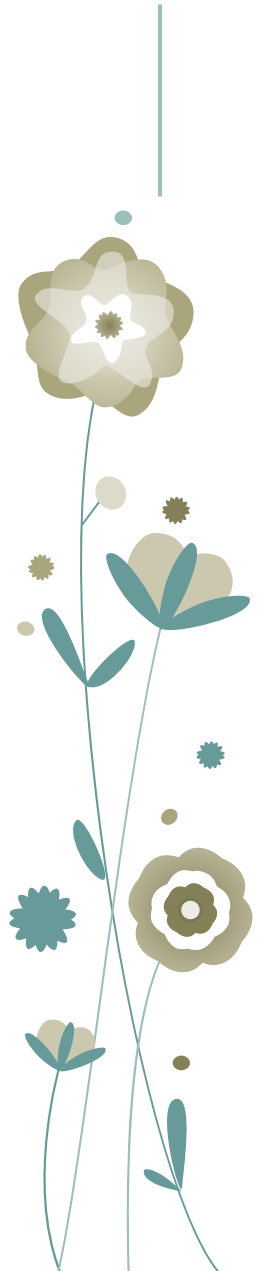
- ❖ **Transport rapide : < 01 h,**
- ❖ **Si laboratoire éloigné conserver**
☐
- ✓ **A + 04°C** pendant quelques heures.
Ou
- ✓ **A - 80°C.**
Ou
- ✓ **dans l' Azote liquide**

Si on veut détecter les antigènes viraux intra-cellulaires ☐ Il faut :

- ✓ **Des Cellules intactes en grande quantité.**
- ✓ **Transport et stockage à température ambiante ou à + 04°C.**

Fiche de renseignements bien remplie ++++

LES TECHNIQUES DU DIAGNOSTIC DIRECT



DIAGNOSTIC DIRECT

Isolement du virus



- sur animaux
- sur œuf embryonné
- sur culture cellulaire
 - ECP
 - Immuno-cyto-dg

Microscopie électronique



- Immuno M.E.

Détection d'antigènes



- Immuno-cyto-
diagnostic
- ELISA
- Latex

Détection du génome




- Hybridation
sans PCR
- RT-PCR
- PCR/real time
- PCR-RFLP
- PCR-
Hybridation

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

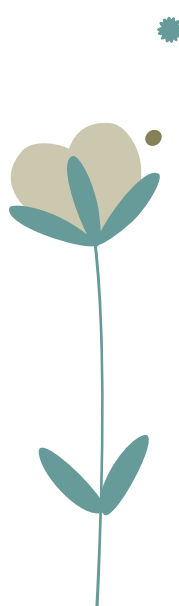


☐ Permet de voir le virus

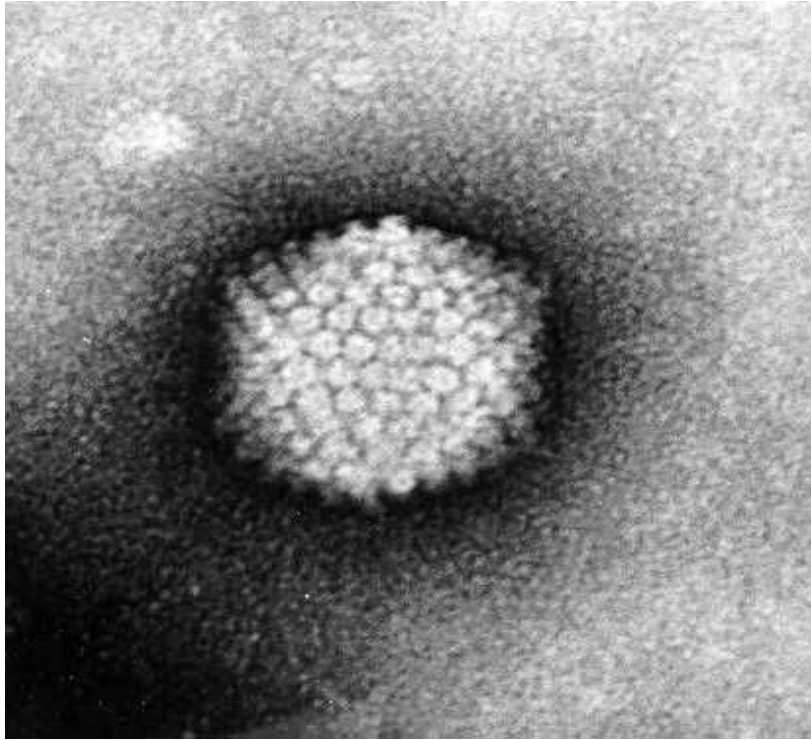


Permet de visualiser la morphologie des virus et les classer en grandes familles (Coronavirus: apparence de couronne, Filovirus: virus filamenteux).

Principe :

- Les échantillons sont colorés par l'acide phosphotungstique:
 - Les virus, non pénétrés par le colorant, se présentent sous forme de particules blanches sur un fond sombre.
- 

RÉSULTATS DES OBSERVATIONS AU MICROSCOPE

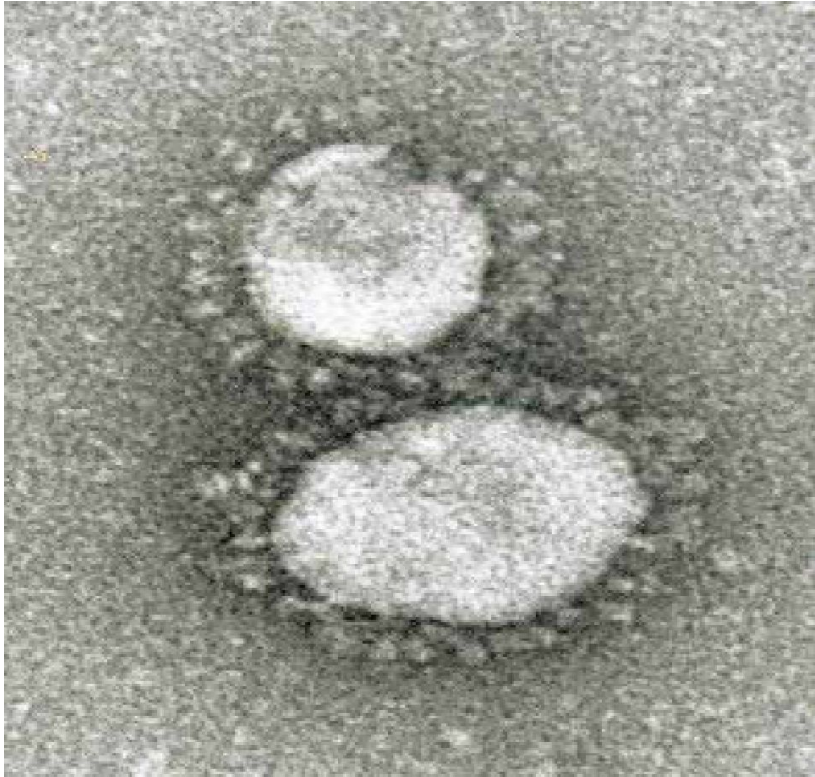


Adénovirus

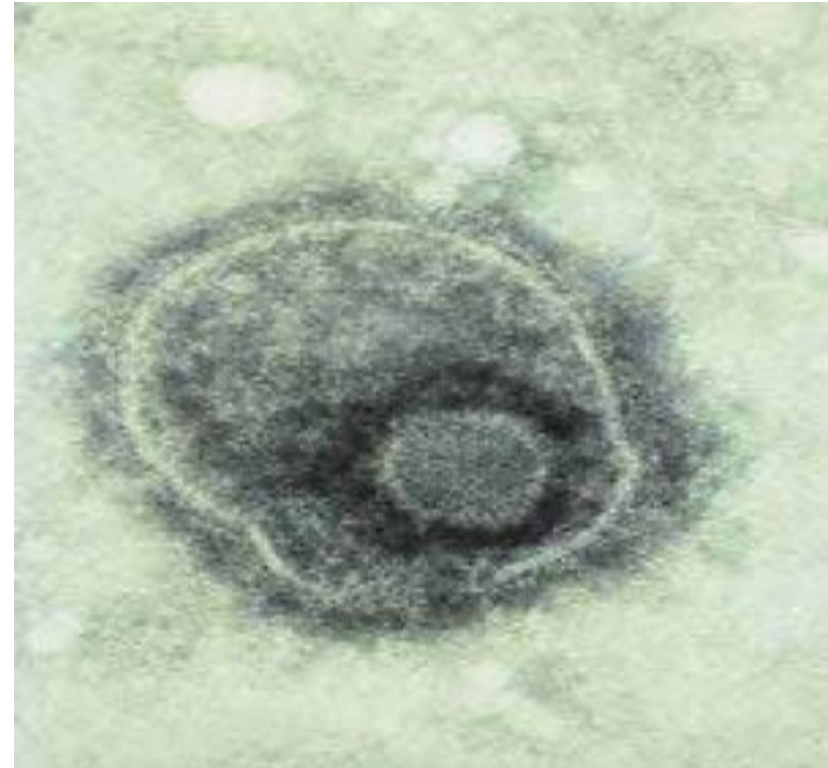


Virus grippal

RÉSULTATS DES OBSERVATIONS AU MICROSCOPE

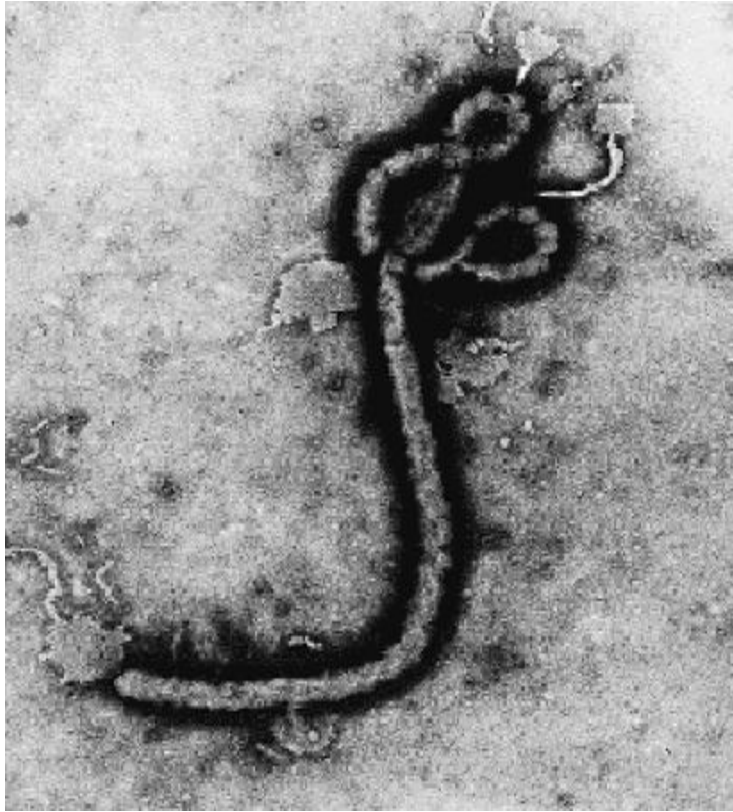


Coronavirus

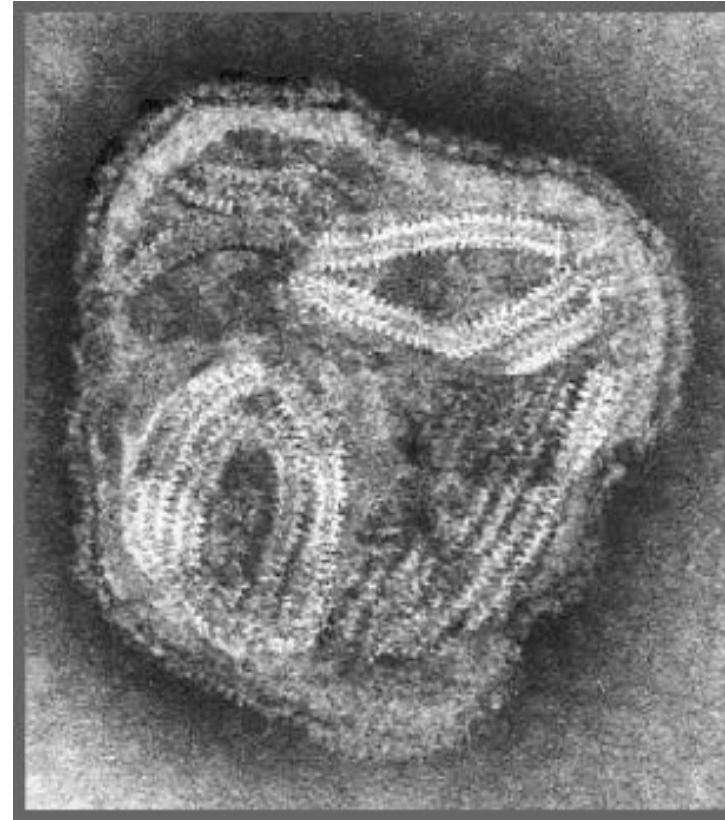


Virus herpes simplex

RÉSULTATS DES OBSERVATIONS AU MICROSCOPE

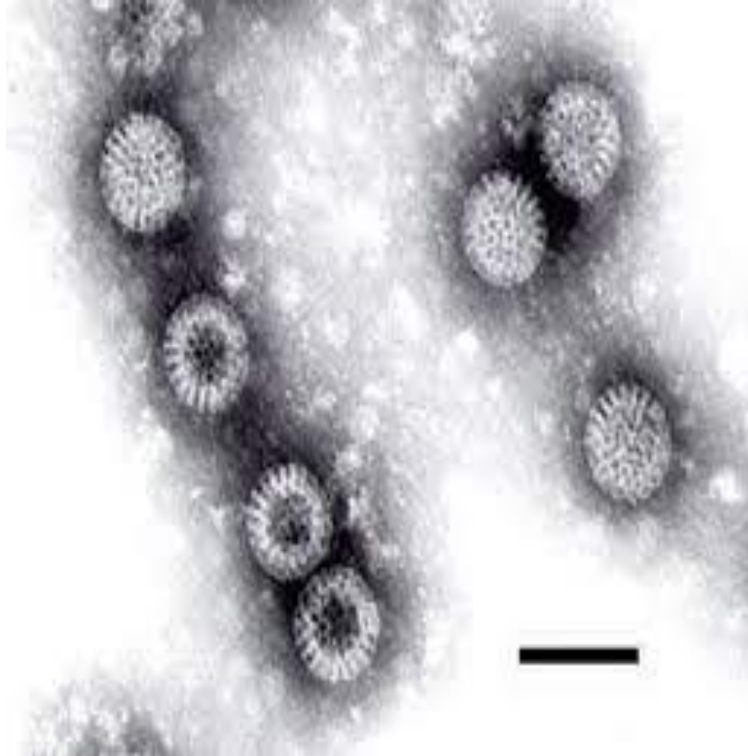


Virus Marburg

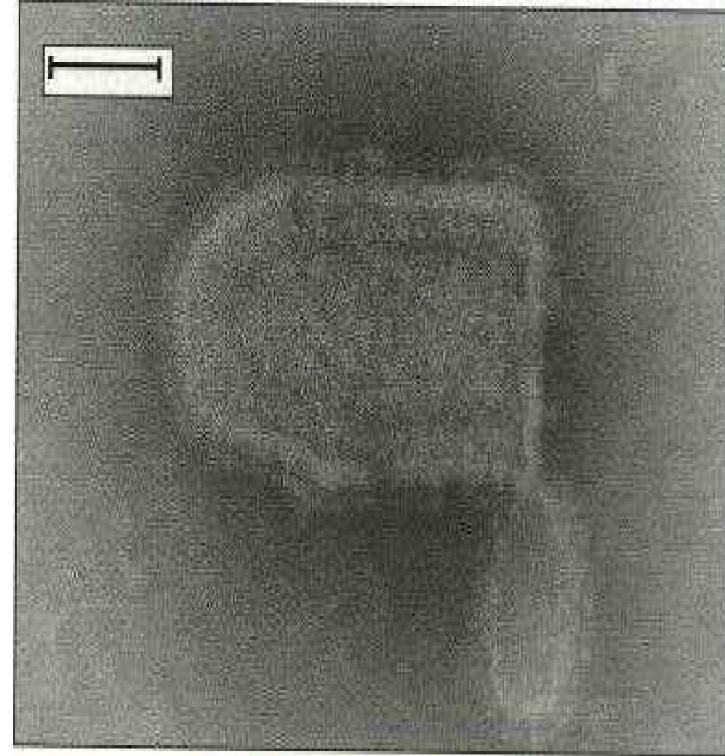


Virus parainfluenzae

RÉSULTATS DES OBSERVATIONS AU MICROSCOPE



Rotavirus



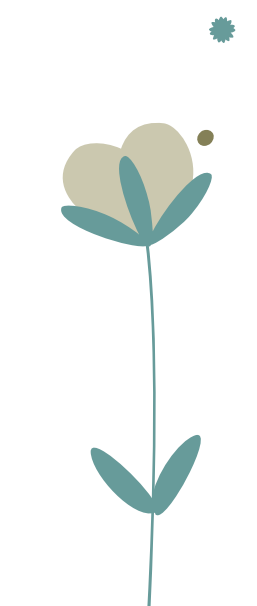
Virus de la rage



Avantages

- ☐ Simple
- ☐ Rapide
- ☐ MEE des virus non cultivables (Ex. Norwalk virus)

Inconvénients

- ☐ Cout élevé
 - ☐ Seuil de détection élevé: 10^6 particule/mL
 - ☐ Ne permet pas de différencier les virus de la même famille
- 

ISOLEMENT DU VIRUS

1-Isolément sur Animaux

par inoculation intracérébrale
au souriceau nouveau-né



Exp : virus de la rage

Principe

Pour le diagnostic de la rage :
inoculation du prélèvement chez les
souriceaux nouveau-né par voie
intracérébrale ensuite on sacrifie
ces souriceaux aux 7ème ,9ème et
11ème j. Leur matière cérébrale
aspirée sera étalée sur lames pour
la recherche des Ag par
immunofluorescence.

2-Isolement sur œuf de poule -embryonné



Exp : virus de la grippe

Principe

L'échantillon est inoculé dans la cavité amniotique => 3 à 7j à 35°C d'incubation.

- Récolte environ 1,5 ml du liquide pour un second passage, par voie allantoïque sur embryon de 11 jours

- technique considérée longtemps comme méthode de référence pour l'isolement des virus A et B.

La multiplication virale est décelée par l'apparition d'une hémagglutinine dans le liquide amniotique, L'ag viral détecté par un test d'hémagglutination .

3-ISOLEMENT DU VIRUS SUR CULTURE CELLULAIRE

Principe

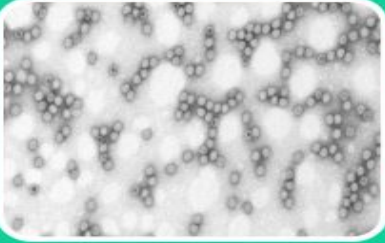
- ✓ Inoculer le prélèvement sur une **nappe cellulaire** et observer l'apparition d'un **effet cytopathogène (ECP)**.
- ✓ La technique la plus utilisée.

Effet cytopathogène (ECP)

- ❖ **Modifications cellulaires observées dans le cytoplasme, les vacuoles ou le noyau : spécifiques de chaque famille virale.**
- ❖ **Lié à la multiplication virale .**
- ❖ **Survient plusieurs jours après l'inoculation.**

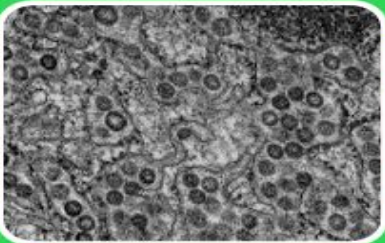
IL EXISTE TROIS TYPES DE CULTURES CELLULAIRES

:



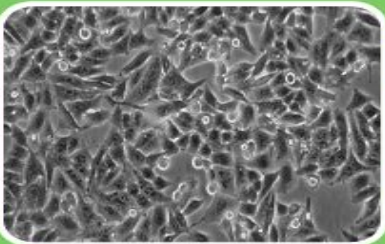
Cellules primaires

- Isolées directement à partir d'un tissu ou d'un organe vivant.
- Durée de vie est limitée à quelques passages (2 à 3).



Cellules diploïdes

- Cellules embryonnaires humaines de nature fibroblastique pour la majorité
- Peuvent supporter 50 passages.



Cellules en lignées continues

- Cellules cancéreuses, hétéroploïdes transformées et immortalisées.
- Pas d'inhibition de contact.
- La culture facile et rapide

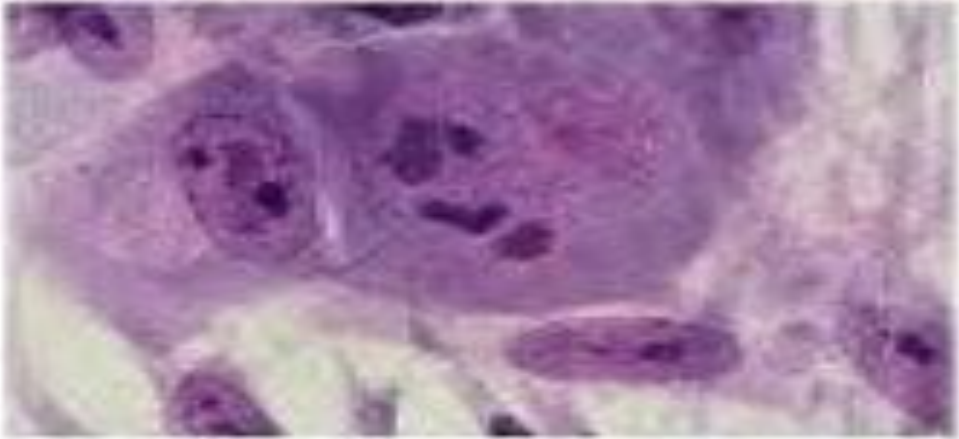


Observation de cultures cellulaires (tubes, boîtes multi-puits de plastique et flacons) au microscope optique inversé

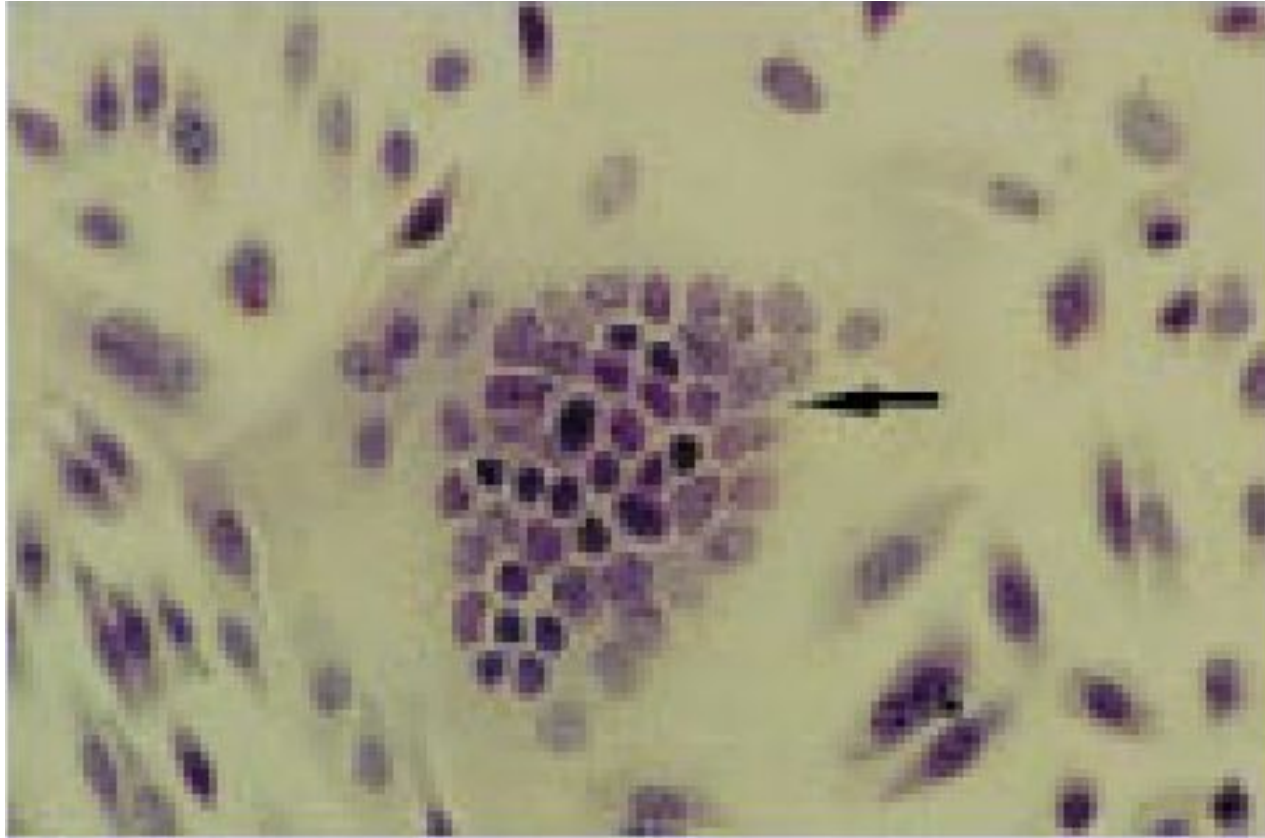
ECP DE CYTOMÉGALOVIRUS



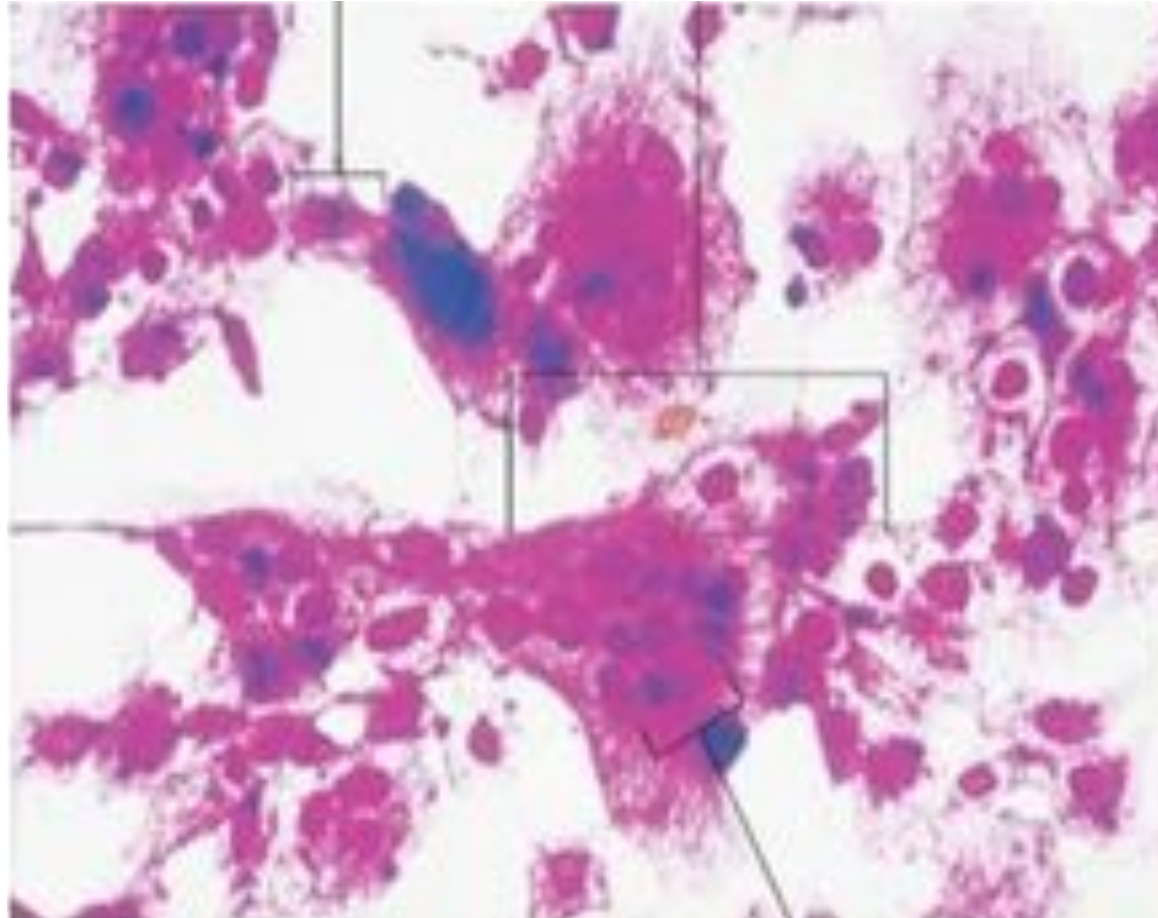
isolement du virus
effet cytopathique sur
cellules MRC-5
(état frais)



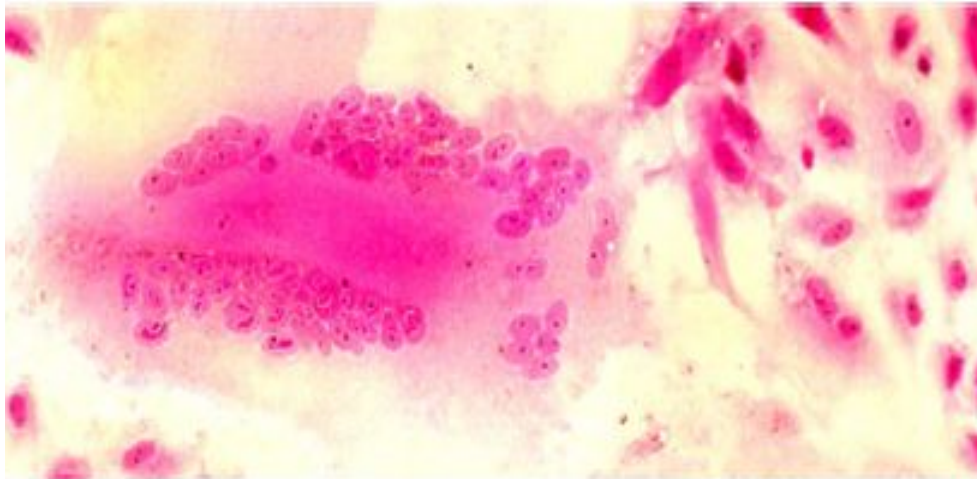
Coloration au Giemsa
inclusions
cytoplasmiques et
nucléaires



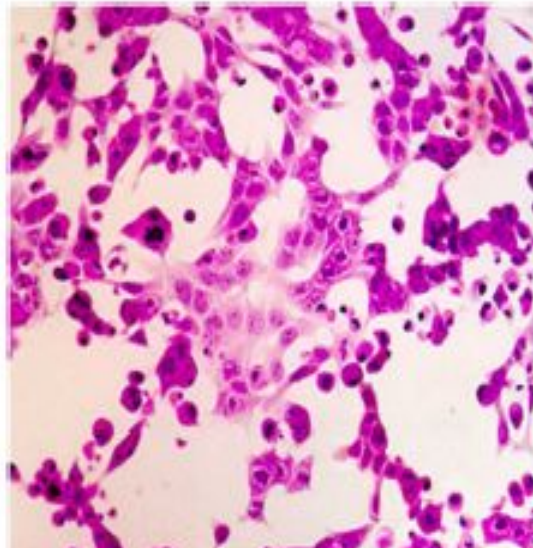
**L'ECP est présent dans les 24 à 48 heures sur
cultures cellulaires (MRC5) :**
Cellules rondes, réfringentes en grappe de raisin
(□ Virus de la poliomyélite)



**Formation du syncytium: grosse cellule
multi nucléée (□ paramyxovirus)**



Formation de Syncytia par le virus
de la rougeole (courtesy of Linda Stannard,
University of Cape Town, S.A.)



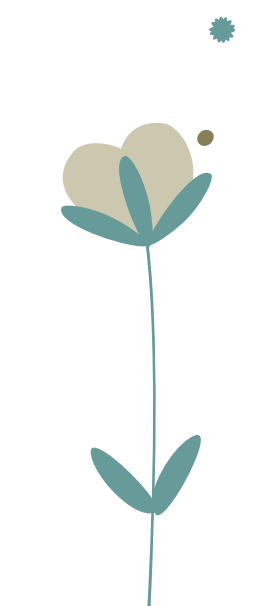
ECP Adénovirus (aspect en
dentelles)



Avantages

- ☐ MEE du virus infectieux
- ☐ Sensible (10^{-10} particule virale)
- ☐ Permet de tester la sensibilité aux antiviraux

Inconvénients

- ☐ Longue et couteuse
 - ☐ Absence d'ECP pour certain virus
 - ☐ Certains virus ne sont pas cultivables
 - ☐ Les prélèvements doivent contenir des virus vivants: acheminement rapide au laboratoire
- 

MISE EN ÉVIDENCE DES ANTIGÈNES VIRAUX :

REPOSENT SUR DES RÉACTIONS IMMUNOLOGIQUES DE TYPE AG-AC

Techniques plus ou moins rapides.

Reposent sur des réactions immunologiques de type Antigène-Anticorps.

4 types:

- ❖ Immunofluorescence directe/indirecte (IFD/IFI)

- ❖ Tests Immunoenzymatiques (ELISA)

- ❖ Immunochromatographie.

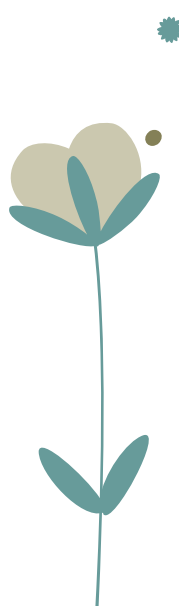
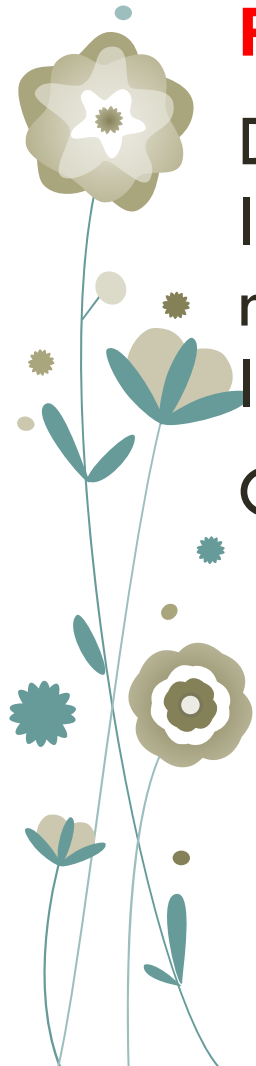
- ❖ Agglutination sur particules de Latex.

IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE (IFD)

Principe

Détecte la présence d'antigènes viraux dans les prélèvements à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques liés à un marqueur fluorescent: l'isothiocyanate de fluorescéine.

Observation au microscope à fluorescence.

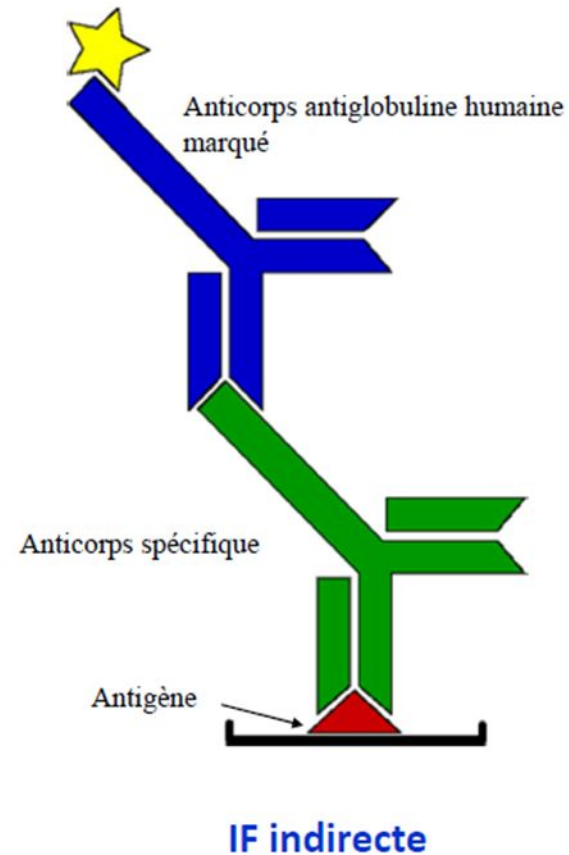


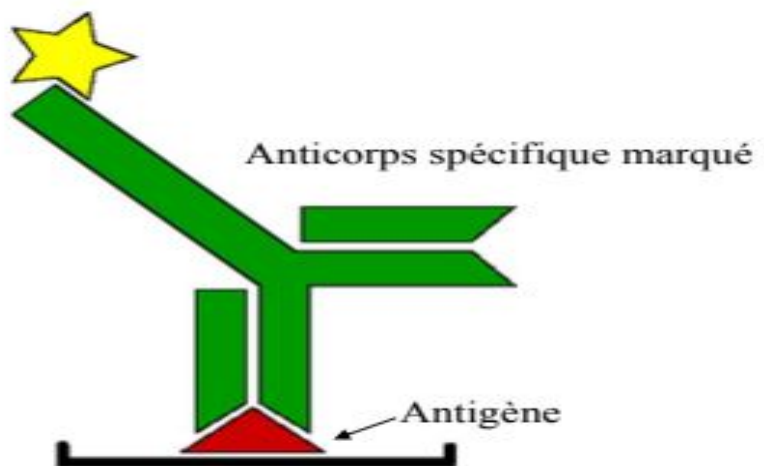
IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI)

Principe

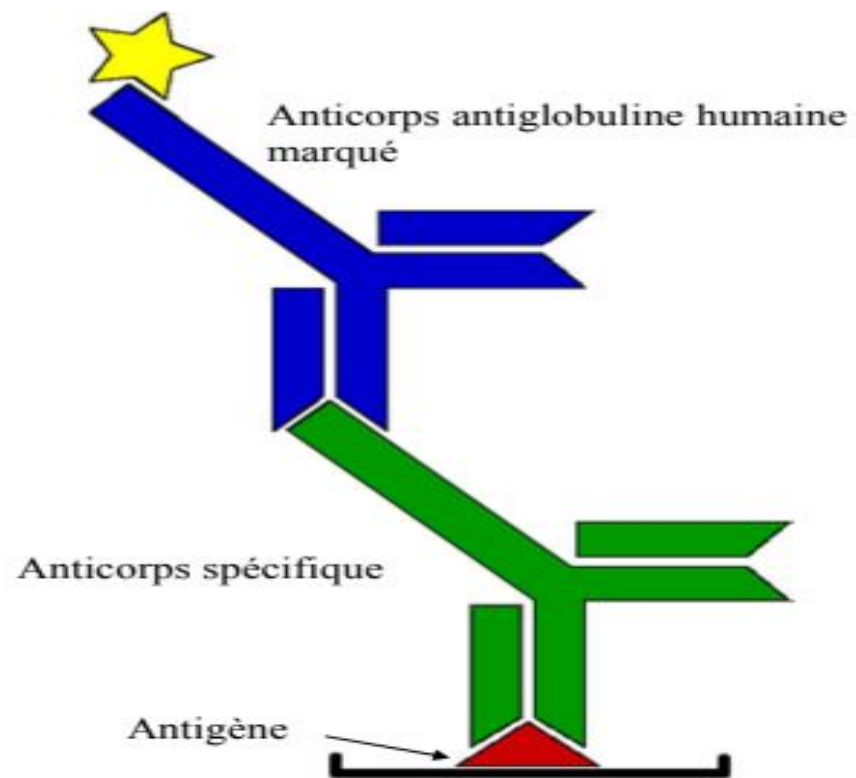
Détecte la présence d'antigènes viraux dans les prélèvements à l'aide d'un 2eme anticorps liés à l'isothiocyanate de fluorescéine dirigé contre l'Ig spécifique de l'antigène.

Observation au microscope à fluorescence.

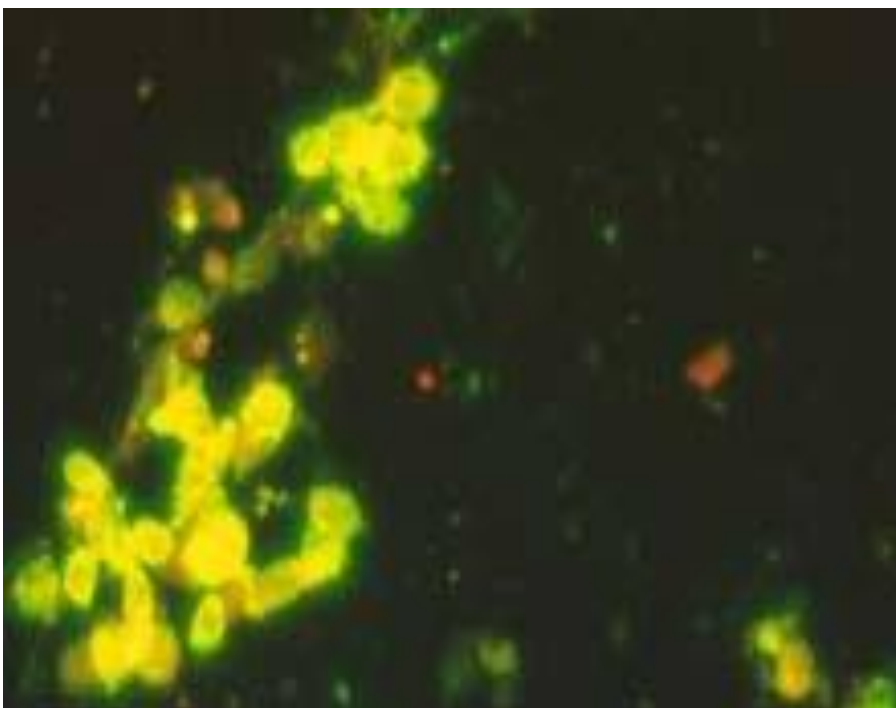




IF directe

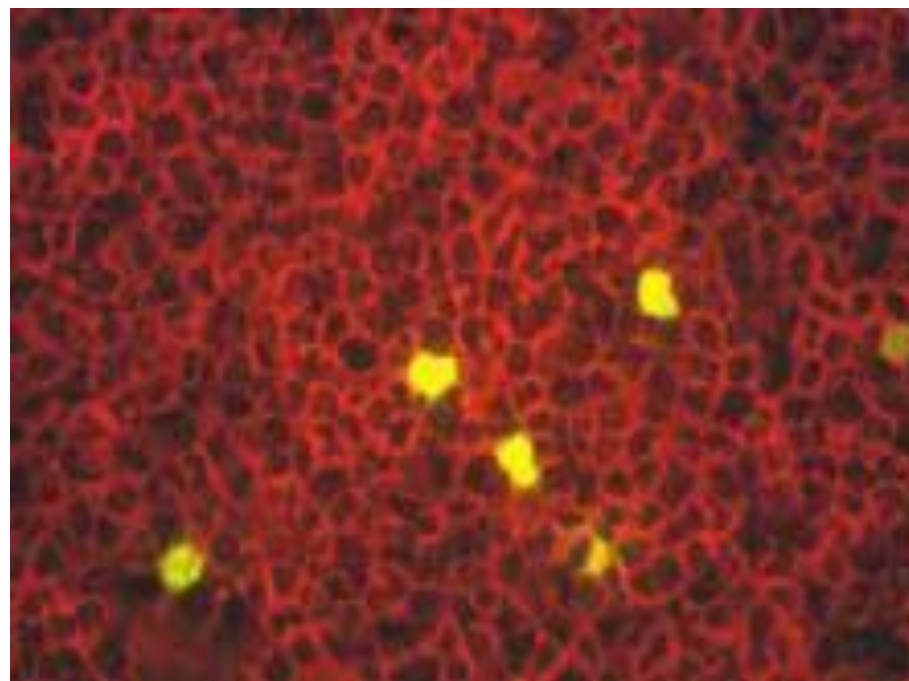


IF indirecte



*Immunofluorescence spécifique du HHV
sur un frottis vaginal*

*Antigénémie pp65 du CMV positive
: les leucocytes marqués par l'anticorps*



MISE EN ÉVIDENCE DES ANTIGÈNES VIRAUX

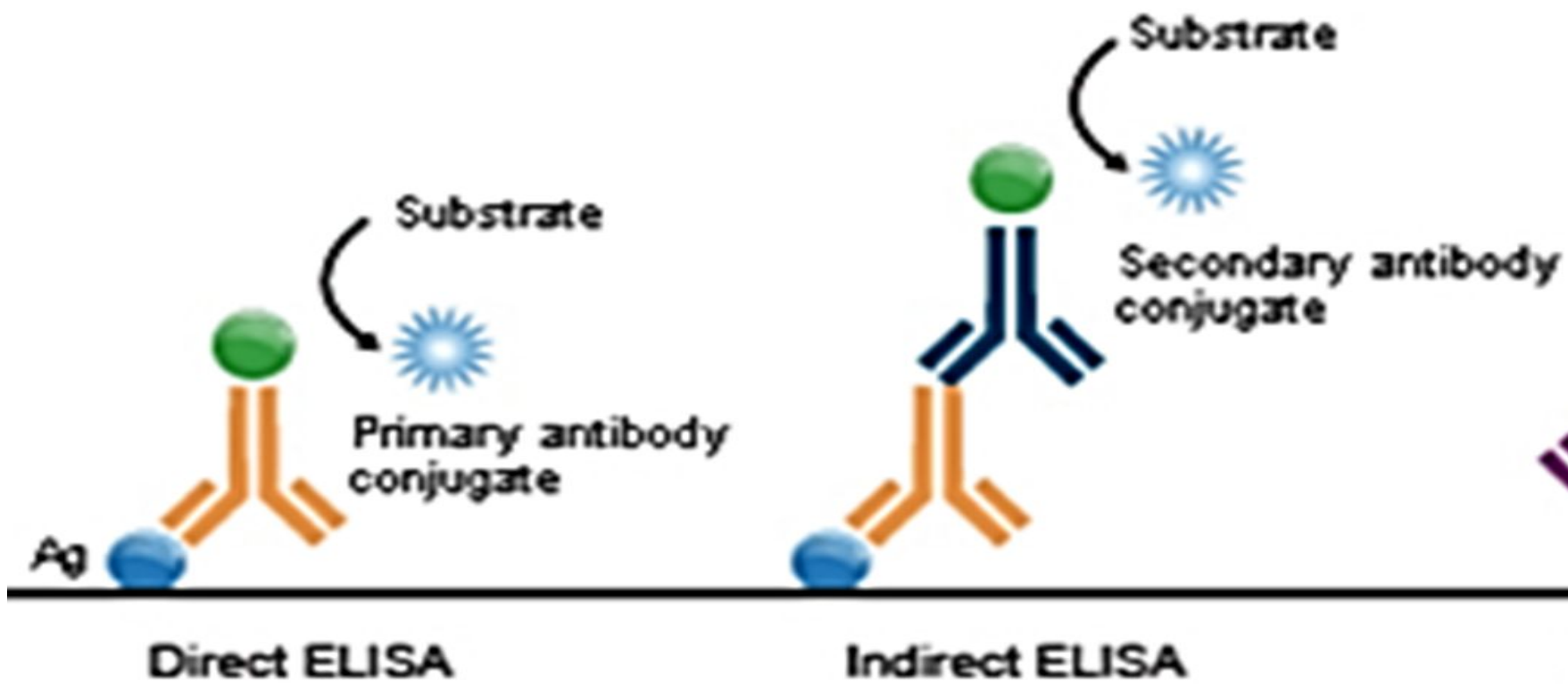
2. ELISA (plusieurs types de technique ELISA)

Principe

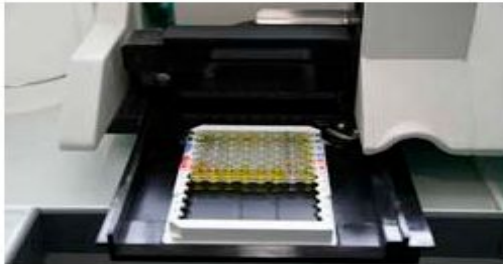
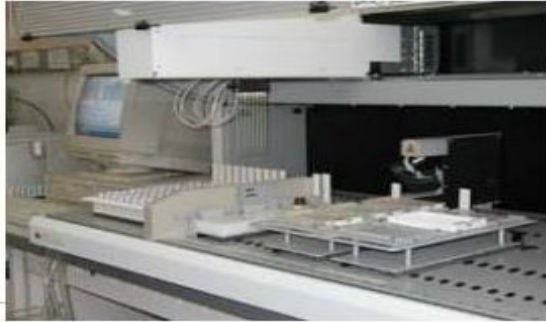
Détecte l'Ag viral grâce à un anticorps monoclonal spécifique (direct) marqué par une enzyme: la phosphatase alcaline et la peroxydase.

ELISA indirecte utilise des anticorps anti-anticorps marqué par l'enzyme, et ce afin d'augmenter la sensibilité.

- Après l'ajout du substrat, la réaction colorée permet de confirmer la présence du virus recherché et l'intensité de la couleur donne une indication de la quantité d'antigènes ou d'anticorps dans l'échantillon donné.



ELISA = ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY



Sur automates: Les sérums sont reconnus par lecture d'un code-barres, puis leur distribution et la réaction ELISA sont réalisées automatiquement, en connexion avec le système informatique du laboratoire.

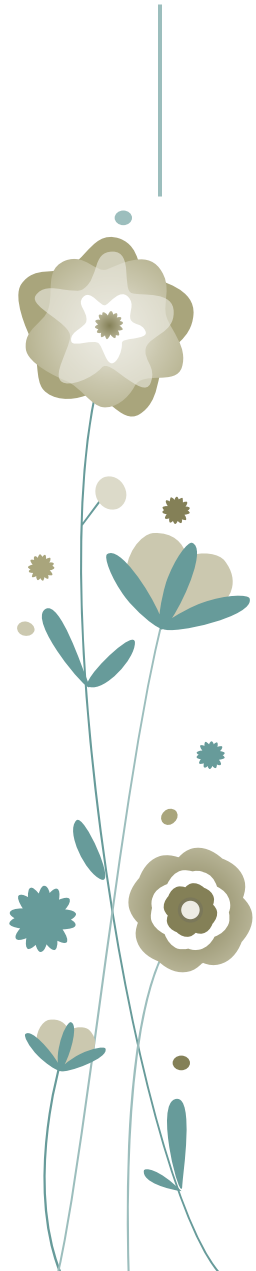
Les résultats sont "validés" et interprétés individuellement par le technicien puis le biologiste, en fonction des valeurs des différents témoins et des renseignements cliniques.

3. IMMUNOCHROMATOGRAPHIE

Principe

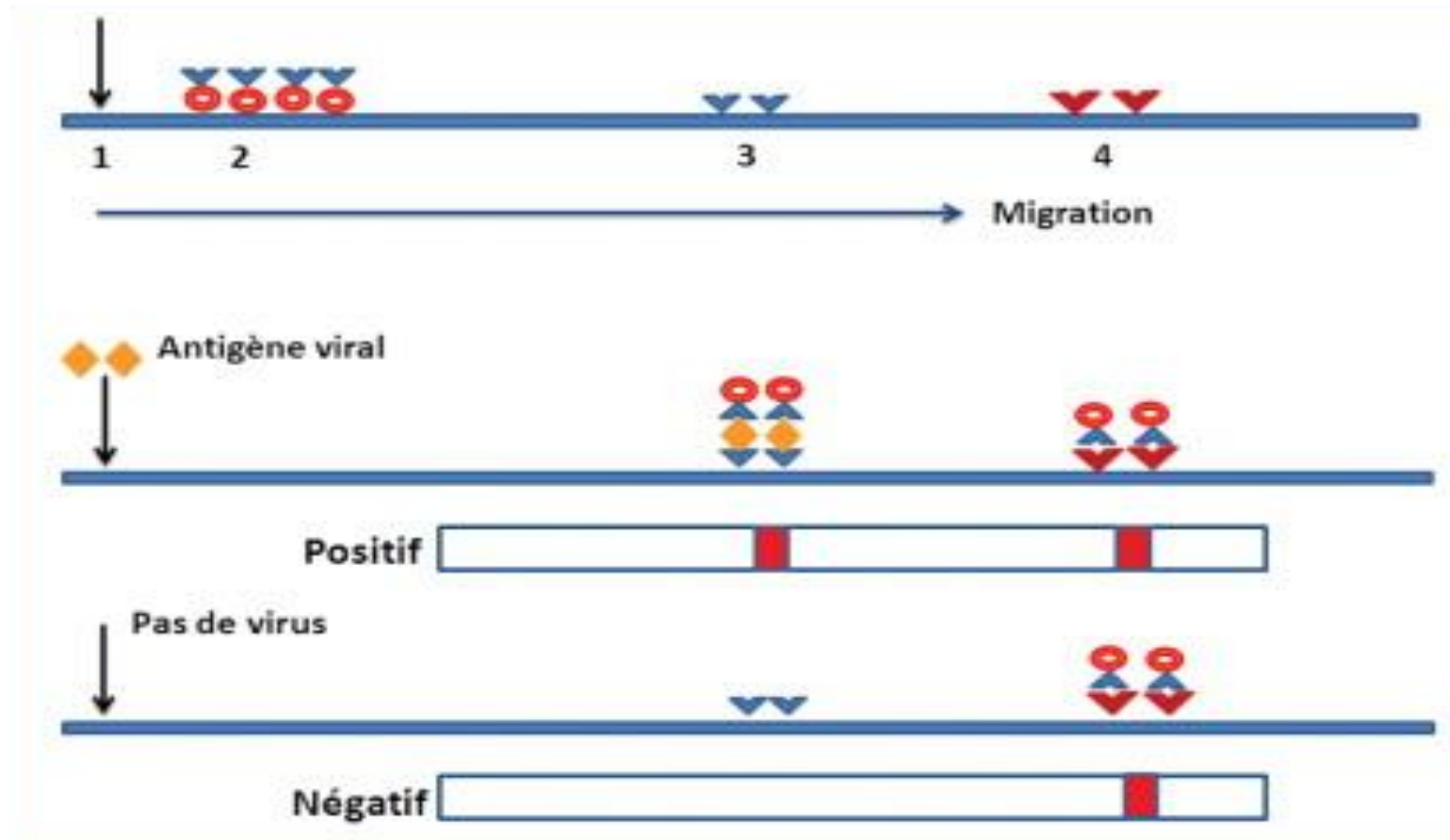
Consiste à détecter la présence d'antigènes viraux à l'aide d'anticorps spécifiques adsorbés sur la membrane.

Ce sont des tests rapides qui peuvent être pratiqués par un technicien non spécialisé au laboratoire de biologie médicale ou directement au cabinet médical.



MISE EN ÉVIDENCE DES ANTIGÈNES VIRAUX

3. Immunochromatographie



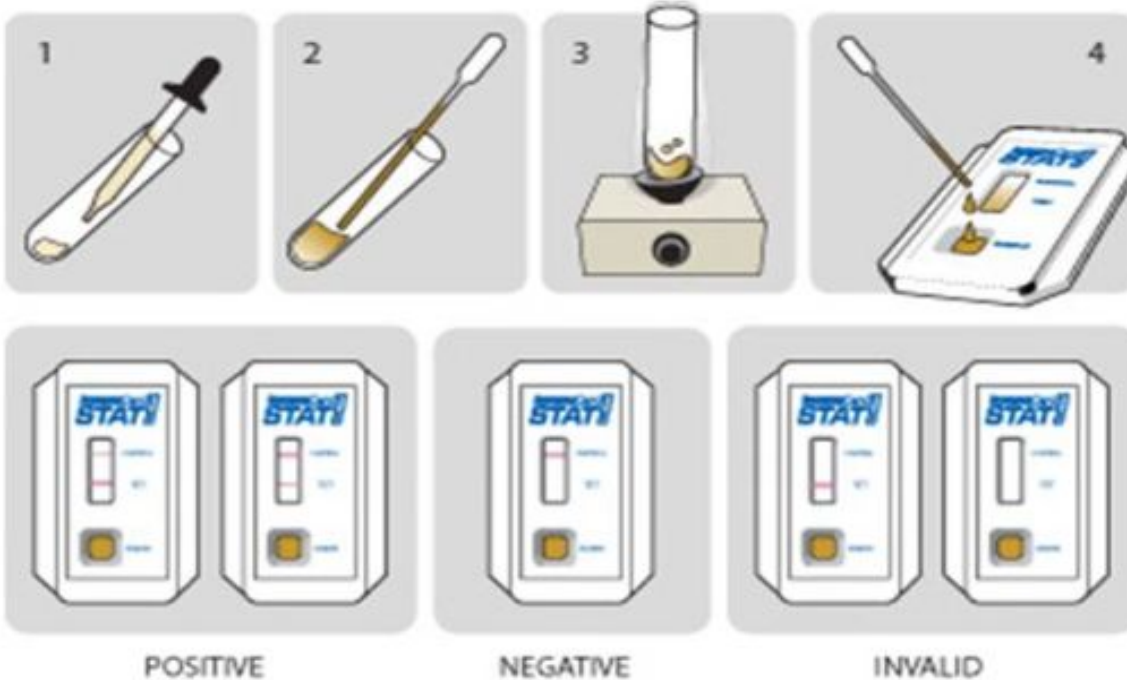
Techniques simples et rapides à mettre en œuvre mais **manque de sensibilité**

MISE EN ÉVIDENCE DES ANTIGÈNES VIRAUX

3. Immunochromatographie

Applications :

- selles (rotavirus, adénovirus)
- pvts respiratoires (VRS, grippe)



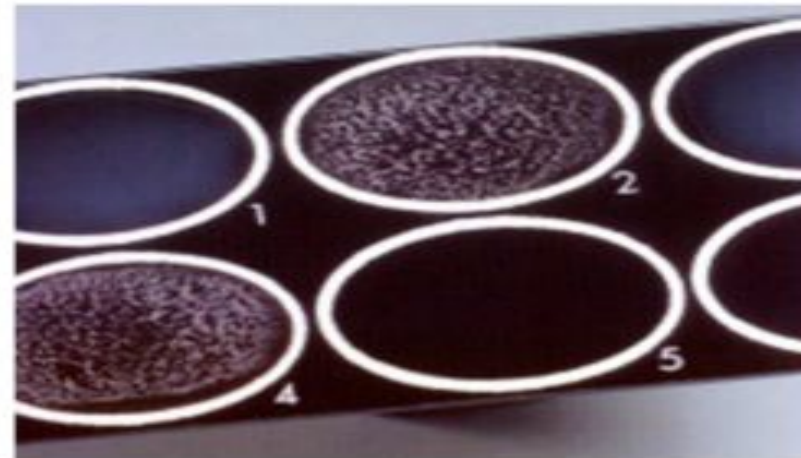
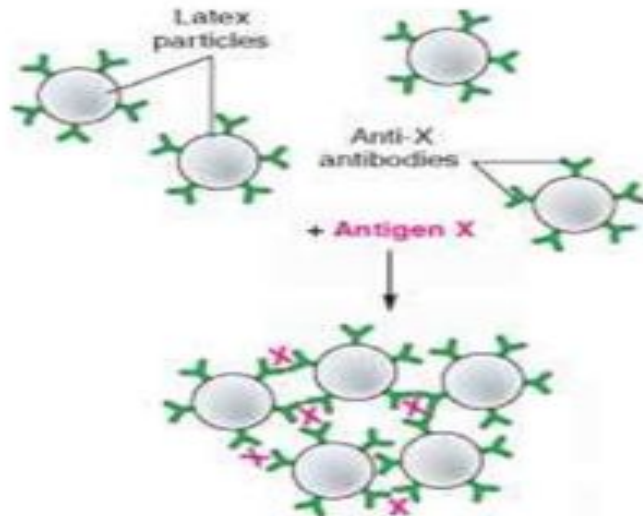
MISE EN ÉVIDENCE DES ANTIGÈNES VIRAUX

4. Test d'agglutination

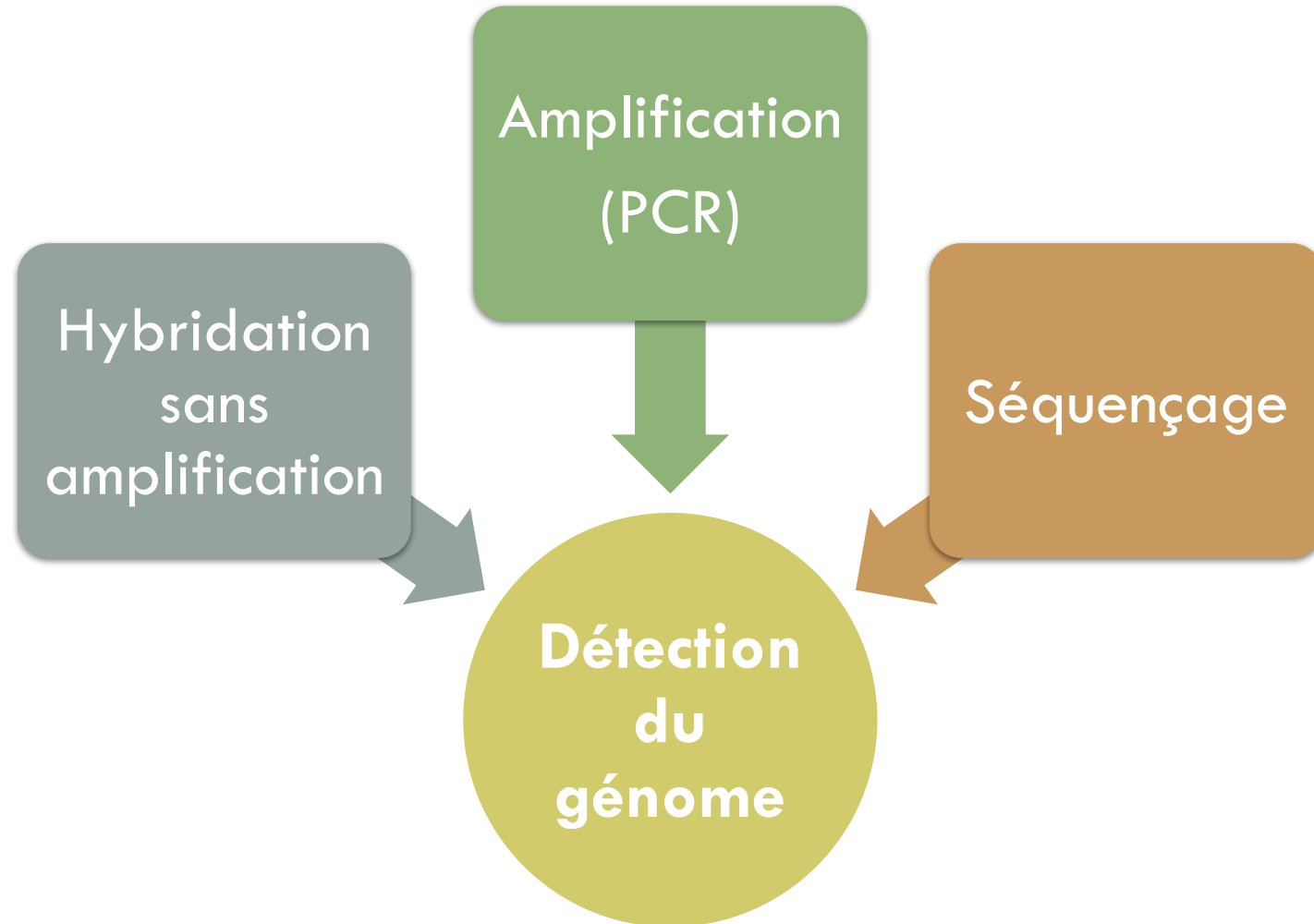
Principe

Les anticorps anti-virus sont fixés à des billes de latex, en cas de présence de virus, l'agglutination est visible à l'œil nu.

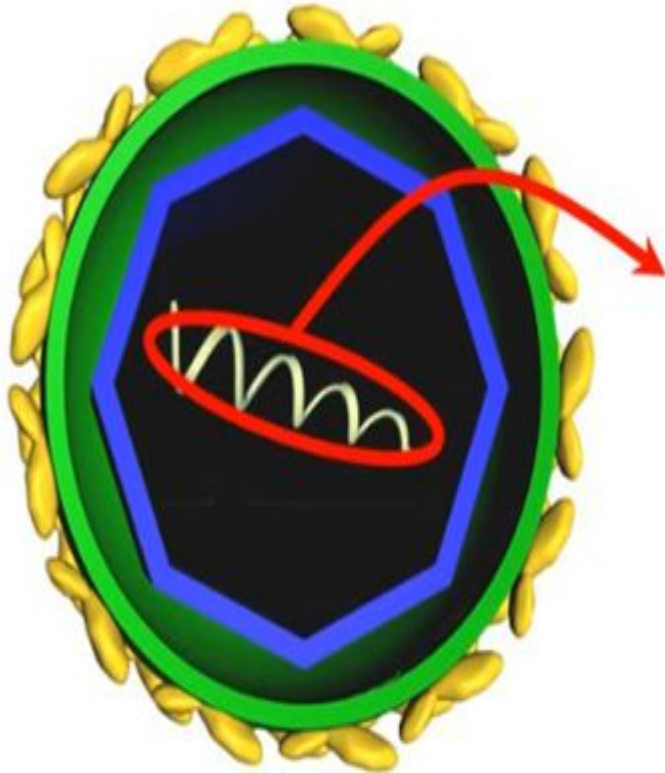
- **Agglutination de particules de latex sensibilisées par des Acs** : à partir de selles au cours des gastro-entérites virales (10^8 et 10^{12} particules virales par gramme de selles : rotavirus, adénovirus ou astrovirus)



DÉTECTION DU GÉNOME: BIOLOGIE MOLÉCULAIRE



MISE EN ÉVIDENCE GÉNOME VIRAL



Par la technique PCR

(réaction de polymérisation en chaîne) :

1. PCR qualitative : simple détection du génome
(Exp : virus respiratoires)
2. PCR quantitative : PCR en temps réel pour la quantification des génomes viraux : □ notion de **charge virale**. (Exp : CMV, HIV....)

1- Réception et aliquotage des prélèvements



2- Extraction automatisée des acides nucléiques

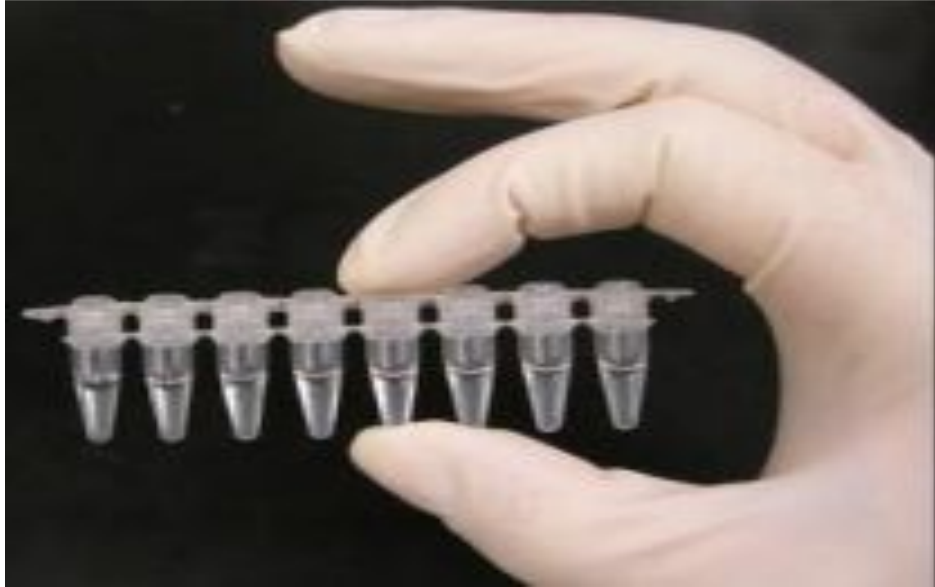


3- Préparation du mix



4-Amplification





**Microtubes (mix+ADN
extrait) à mettre dans le
thermocycleur**



Thermocycleur.

PCR EN TEMPS RÉEL = PCR QUANTITATIVE

Exemples de thermocycleurs temps réel

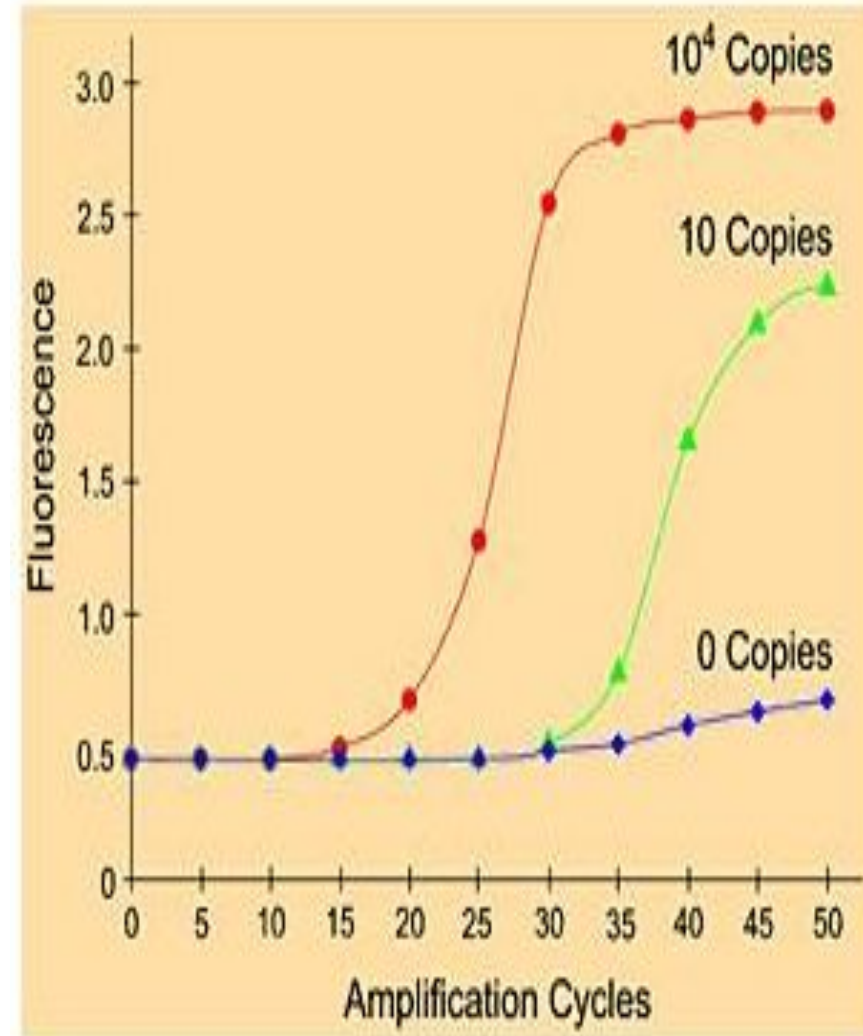
ABI7500 Applied Biosystems



LightCycler Roche



RotorGene Cepheid



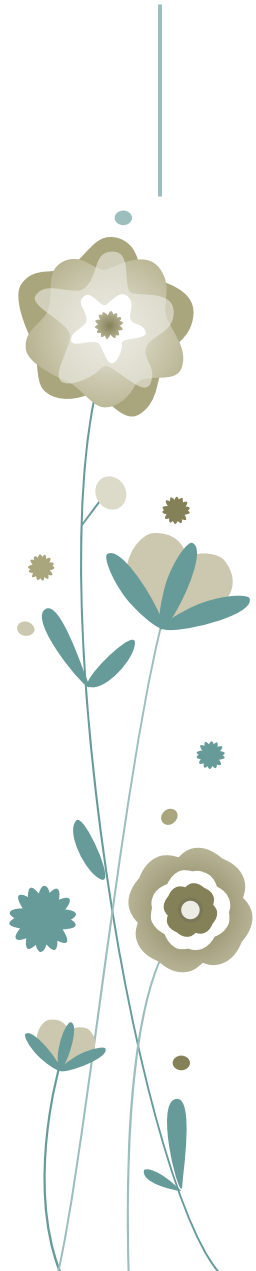
DIFFICULTÉS DE LA PCR

Faux négatifs :

1. Mauvais prélèvement.
2. Mauvaise extraction.
3. Inhibiteurs (Héparine, Hémoglobine..)

Faux positifs :

Contaminations.



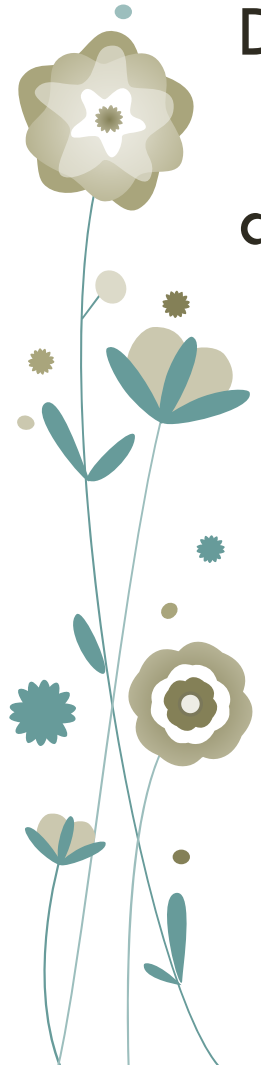
Comparaison des techniques

<i>Technique</i>	<i>Détection</i>	<i>Sensibilité</i>	<i>Spécificité</i>	<i>Temps de réalisation</i>
ME	Particule virale	Faible ($> 10^6 \text{ml}^{-1}$)	Groupe/famille	15 min-1 heure
Isolement	Infectivité et ECP Particules virales	Elevée (1 particule infectieuse/essai)	Groupe/famille	2-14 jours (voir 3 semaines)
IF	Antigène viral	Elevée	Type/groupe	1-3 h
ELISA	Antigène viral	Elevée (1 ng/ml)	Type/groupe	1-3 h
PCR	Génome viral	Elevée (1-50 molécules essai)	Type/groupe/famille	4-8 h

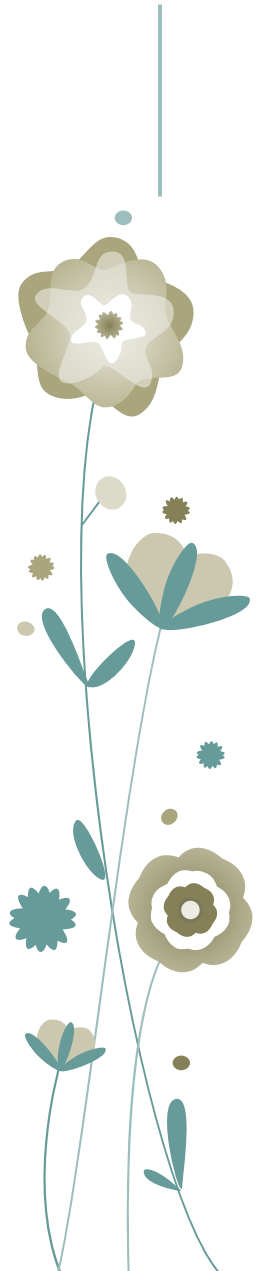
SÉQUENÇAGE

Détermination de l'enchaînement des nucléotides constituant l'ADN.

Permet de détecter les mutations et d'établir la carte génotypique du virus.



LES TECHNIQUES DU DIAGNOSTIC INDIRECT



DIAGNOSTIC INDIRECT

□ Mise en évidence de la réponse immunitaire spécifique

Intérêt :

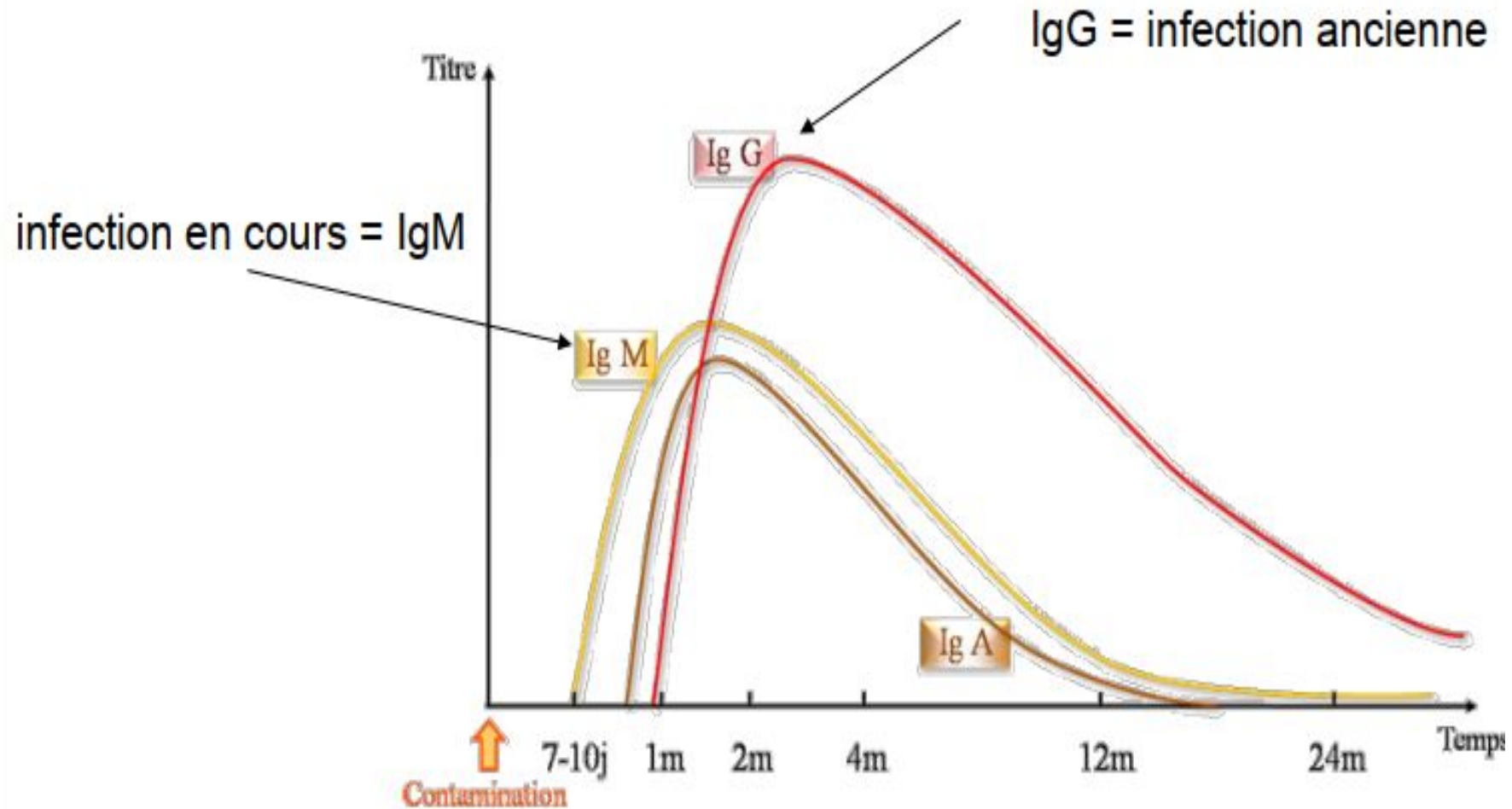
A. Connaitre le statut d'un individu vis-à-vis d'un virus:

1. Infection guérie : Rubéole, Rougeole, Varicelle, Covid-19
2. Infection chronique : Hépatite C, Hépatite B , VIH
3. Donneur de sang, d'organes, de tissus...
4. Patient-source suite à un accident d'exposition au sang ou une exposition sexuelle.

B. Diagnostiquer une infection en cours.

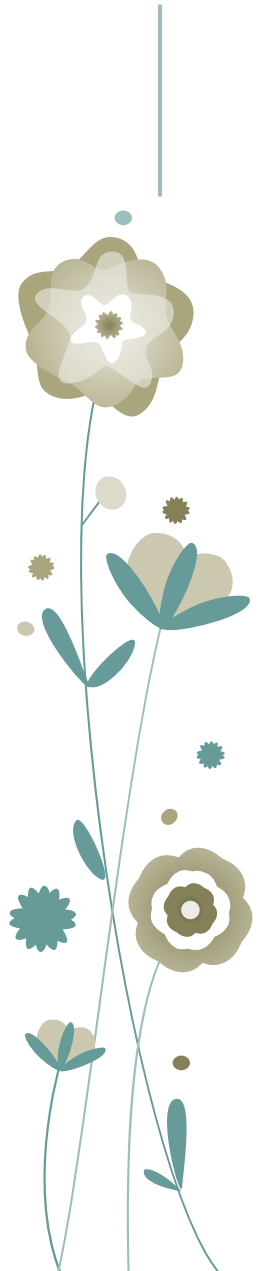
C. Evaluer l'efficacité d'une vaccination.

Réponse immunitaire humorale



TECHNIQUES DU DIAGNOSTIC INDIRECT

- 1) **Séroneutralisation**
- 2) **Inhibition de l'hémagglutination**
- 3) **ELISA**
- 4) **Immunofluorescence**
- 5) **Immunoblot**
- 6) **Réaction de fixation du complément**
- 7) **Agglutination de particules de Latex**
- 8) **Test rapide sur bandelette par chromatographie**



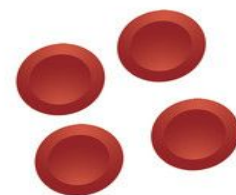
AGGLUTINATION DE PARTICULES SENSIBILISÉES

Principe :

- Elle met en jeu des particules (latex, gélatine, hématies) sensibilisées par l'antigène viral dont l'interaction avec l'Ac (IgG et IgM) du sérum à tester conduit à une agglutination macroscopique rapide (quelques minutes à 2 heures).

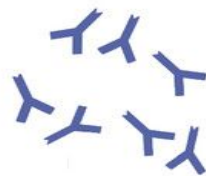
- Applications :
 - petites séries effectuées en urgence
 - grande sensibilité : utiliser pour détecter un état d'immunité.
 - la lecture manque de standardisation.
 - HIV, CMV, EBV (recherche des anticorps hétérophiles)

Première
phase

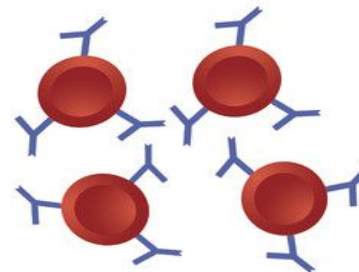


Globules rouges
commerciaux

+

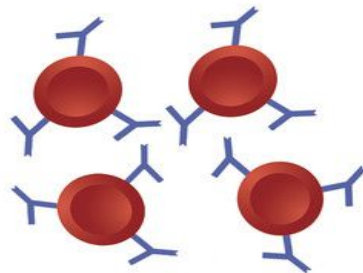


Anticorps
du patient



Globules rouges
enrobés d'anticorps

Deuxième
phase

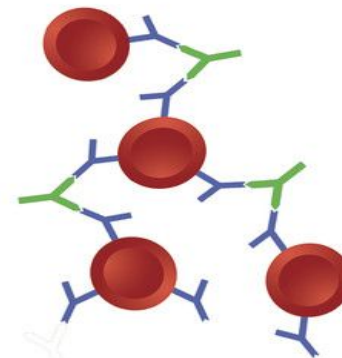


Globules rouges
enrobés d'anticorps

+

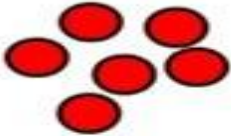

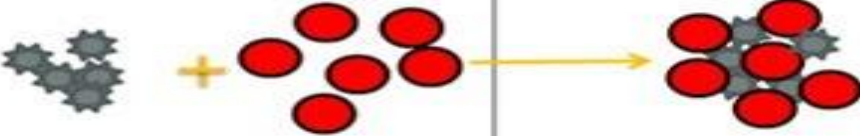

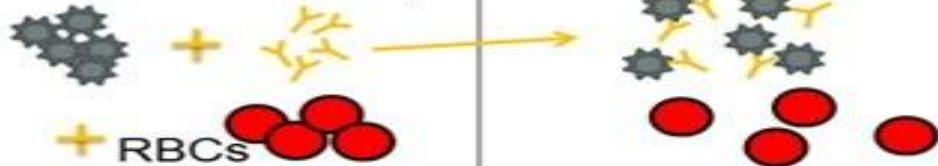



Antiglobuline humaine
(IgG)



Agglutination

HÉMAGGLUTINATION ET IHA

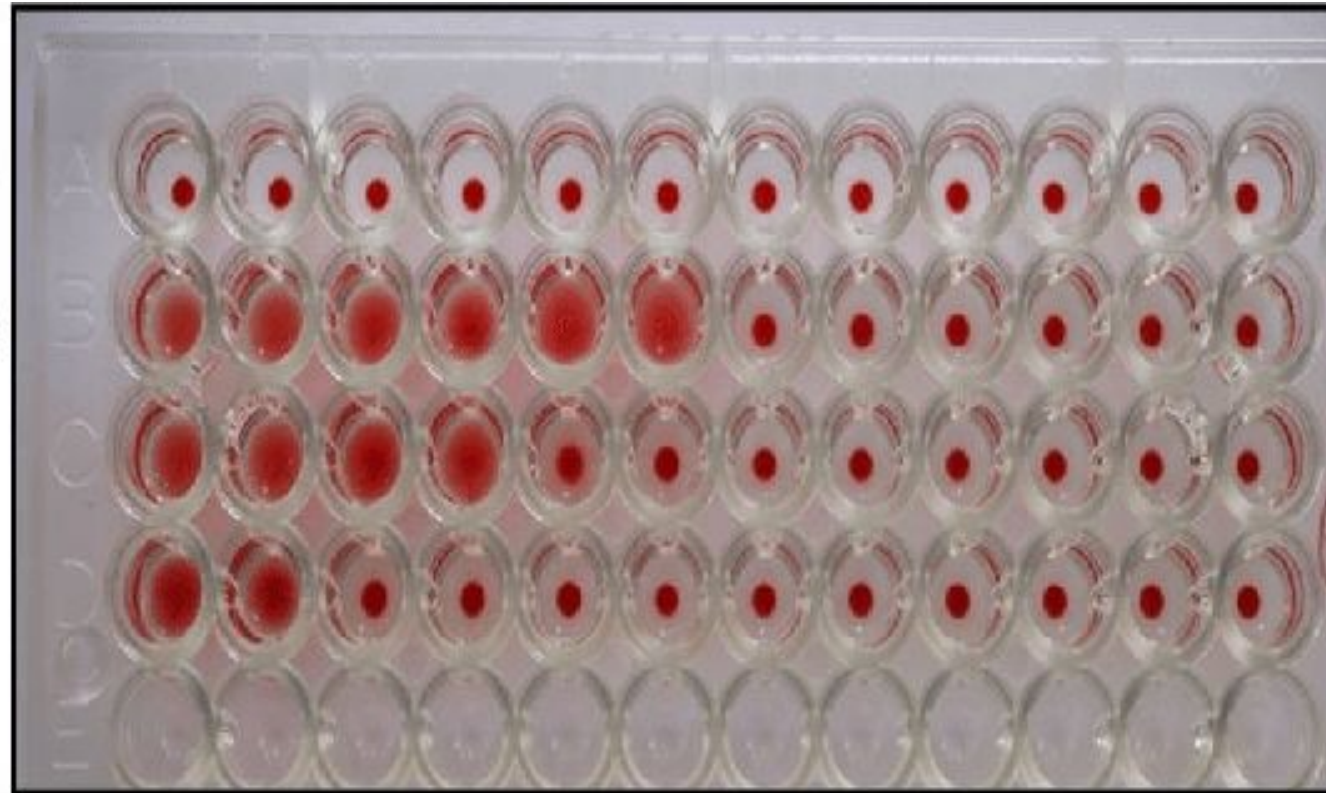
	Components	Interaction	Microtiter Results
A	RBCs		No Reaction 
B	Virus + RBCs		Hemagglutination 
C	Virus + Antibody + RBCs		Hemagglutination Inhibition 

A: absence de virus et absence d'AC = réaction négative = un bouton de précipitation

B: présence de virus agglutinants = réaction positive = un voile d'agglutination

C: consiste à une réaction d'inhibition d'hémagglutination (IHA)

Negative control



Titer
0.2mg/ml

1 2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 2048

Test d'hémagglutination sur des microplaques

ELISA

Principe :

- l'Ag viral adsorbé sur un support solide sensibilisé pour fixer l'Ac spécifique
- anti-Ig humaines ou Ag viral couplés à un enzyme forment le conjugué
- le substrat de l'enzyme peut être fluorogénique, chimioluminescent ou chromogénique

ELISA

