

Le diagnostic virologique

Le diagnostic virologique doit se faire dans des conditions précises, Les infections virales fréquentes chez les sujets immunodéprimés et les virus oncogènes, nécessitent tout particulièrement des diagnostics rapides et le suivi des traitements antiviraux.

➤ Un laboratoire de virologie assure :

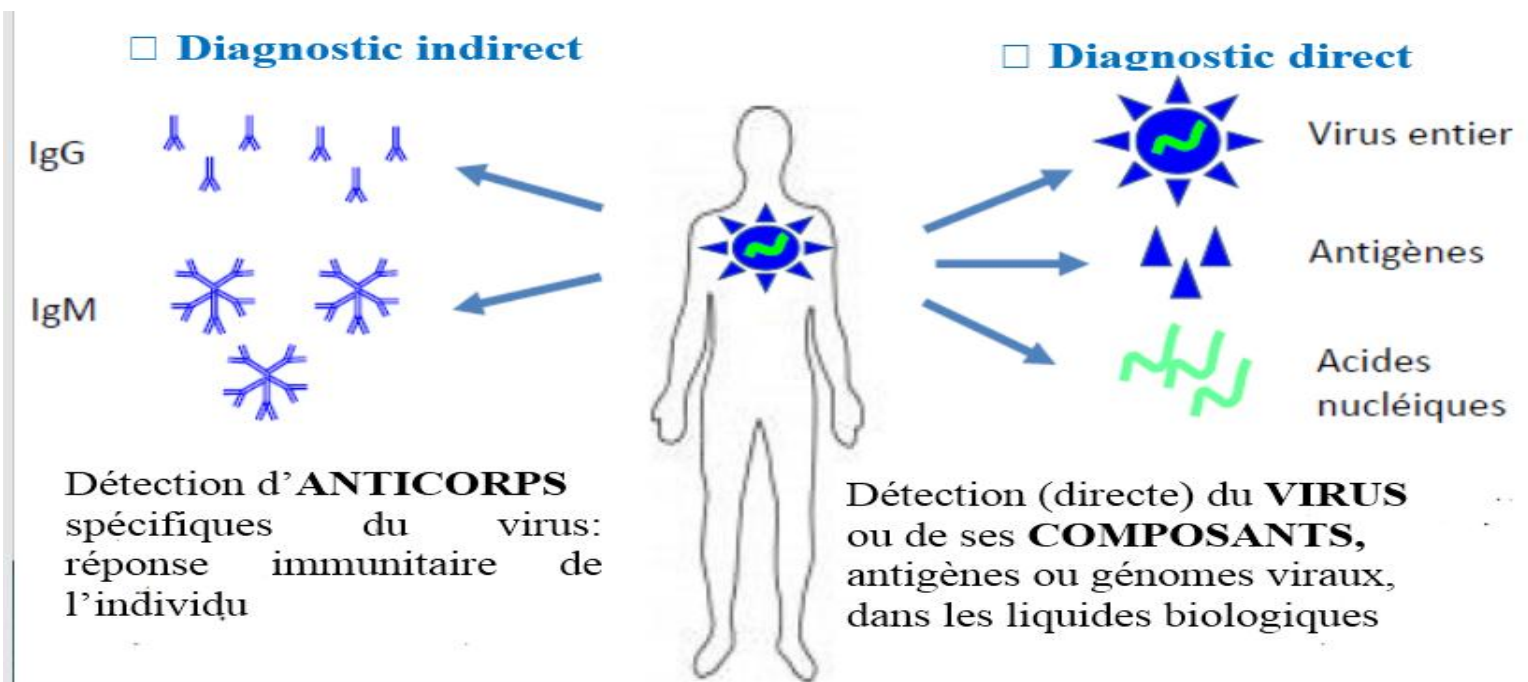
- le **diagnostic** de l' infection virale
- le **suivi** de l'infection virale
- une **aide** à la prise en charge thérapeutique
- des **actions** de santé publique

➤ 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 :



Dans certaines infections virales, le diagnostic ne peut être que direct, comme les IRA (*infections respiratoires aiguës*) et les infections à papillomavirus, mais

- la sérologie représente toujours l'outil de première intention du diagnostic de nombreuses autres infections (rubéole , hépatites, HIV...)
- le statut immunitaire d'un individu ou d'une population ne peut être déterminé que par les tests sérologiques.

Diagnostic direct vs Diagnostic indirect :

<i>Diagnostic direct</i>	<i>Diagnostic indirect</i>
diversité des prélèvements et des techniques utilisés : LCR, sang, liquide pleural ; Aspirations nasopharyngées (IRA),..	le prélèvement est simple: le sang
l'interprétation des résultats est relativement facile	l'interprétation des résultats est plus compliquée et dépend de: <ul style="list-style-type: none"> - l'état immunitaire de l'hôte - du moment de prélèvement par rapport à la déclaration de la maladie

➤ Les prélèvements :

• Différents types de prélèvements peuvent être utilisés pour la recherche de virus. On peut utiliser le sang (virémie), les selles, les sécrétions nasales, les urines, les prélèvements cutanés (vésicules, ulcérations), les prélèvements génitaux, les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA), les liquides céphalo-rachidien (LCR).

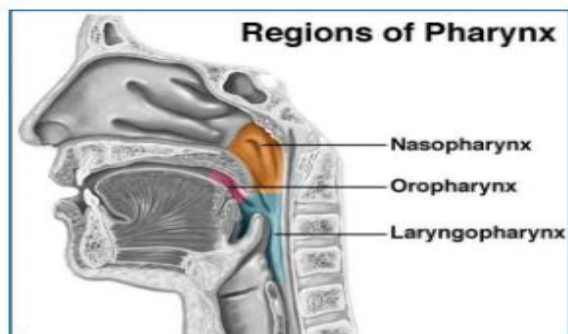
• Les virus sont fragiles, ils sont présents dans les cellules infectées qui elles-mêmes survivent dans des conditions particulières. Plusieurs éléments conditionnent la réussite d'un bon prélèvement et l'aboutissement au diagnostic d'une infection virale:

- **Sang:** virémie: plusieurs virus
- **Selles:** entérovirus, virus polio, rotavirus
- **Prélèvements respiratoires:** écouvillonnage nasal, aspiration bronchique, lavage broncho-alvéolaire Paramyxovirus, adénovirus
- **Urines:** CMV, rubéole
- **Prélèvements cutanés:** vésicules (HSV, VZV)
- **LCR:** HSV
- **Prélèvement oculaire:** par écouvillonnage conjonctival, conjonctivite (adénovirus), kératite (HSV, VZV)
- **Liquide amniotique** (CMV, VZV)

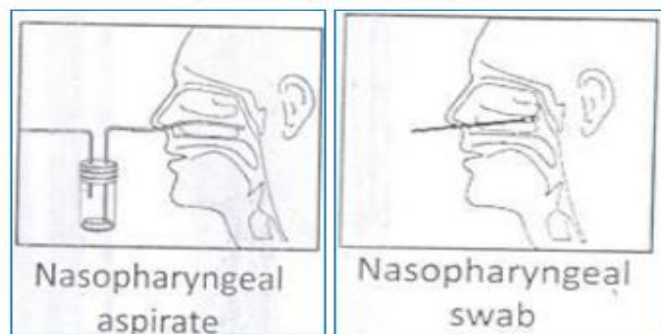
Le prélèvement doit être bien fait (quantité suffisante, bonnes conditions de transport, transfert rapide vers le laboratoire),

- Le choix du site de prélèvement doit être fait selon les signes cliniques, selon les virus recherchés et en fonction de la physiopathologie de l'infection virale,
- L'identification du nom, prénom date de prélèvement et lieu de prélèvement sont indispensables; les principaux signes cliniques peuvent aider et orienter la recherche des virus (feuille de prescription systématiquement associée aux tubes).
- Le transport vers le labo, tjrs respecter les conditions de transport : 4° dans des carboglace,
- doit être rapide ne dépasse pas 36 heures ,sinon il faut congelé à -80°, règles de sécurité +++

Exemple de Site de prélèvement (IRA)



Prélèvements : Écouvillonnage/Aspiration Nasopharyngés



1. Diagnostic Direct :

La détection du virus ou de ses composants

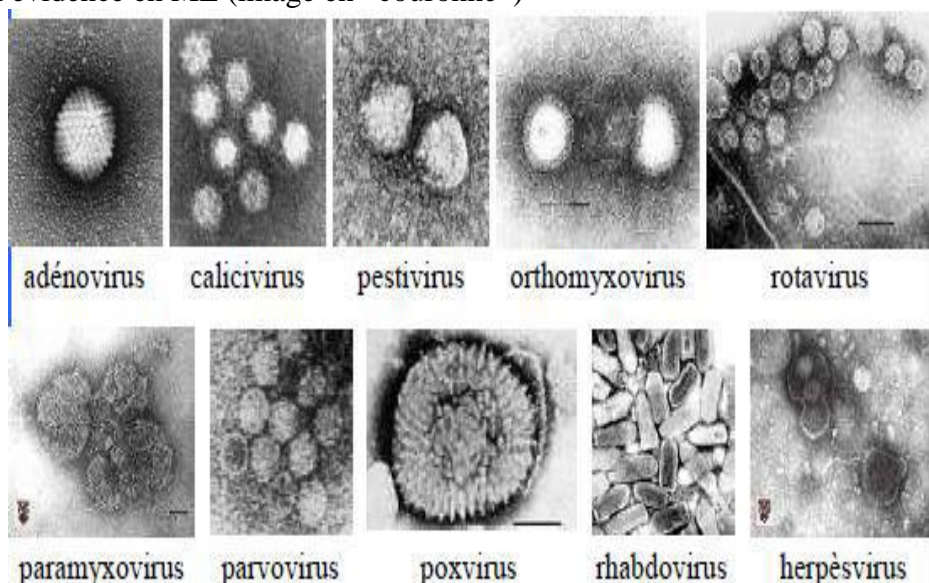
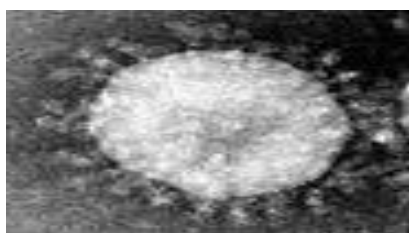
Détection du virus		Détection des composants viraux	
Microscopie électronique	Isolement du virus	Détection des antigènes viraux	Détection du génome viral
	-sur animaux -sur œuf embryonné -sur culture cellulaire : • Effet Cyto-Pathogène (ECP) • Immuno-cyto-diagnostic	-Immuno-cyto-diagnostic par: • Immunofluorescence (IF) • ELISA • Agglutination (Latex) • Immunochromatographie	-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-CoV2) 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'immuno-microscopie électronique augmente le seuil de sensibilité de la 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** +++

- *Ouf de poule embryonné (virus de la grippe)*

- *Animal (Coxsackievirus)*

➤ **Isolement du virus sur culture cellulaire in vitro :**

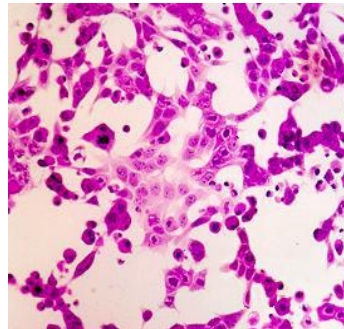
- Méthode de référence

- 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 synthétique complexes (sels minéraux, a. aminés, vitamines, glucose etc...), tamponnés à pH7,2, additionnés des facteurs de croissance apportés par du sérum animal (veau le plus souvent)+Antibiotiques+Antifongiques+tampon(Hepes, Tricine).

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



➤ **Avantages et inconvénients de la Culture Cellulaire :**

- **Avantages**

- Mise en évidence du virus infectieux

- Possibilité d'étudier l'agent viral

- Très sensible

- 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, CoxsackievirusA, Rotavirus)

➤ **Isolement du virus sur œuf de poule embryonné(1931) :**

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

- l'isolement, et entretien des souches,

- la production d'antigènes

- la production de vaccins.

Inoculation des Pvts au niveau des cavités amniotique et allantoïdienne

-Après incubation **Récolte des liquides amniotique** et allantoïdien pour rechercher une **activité hémagglutinante**

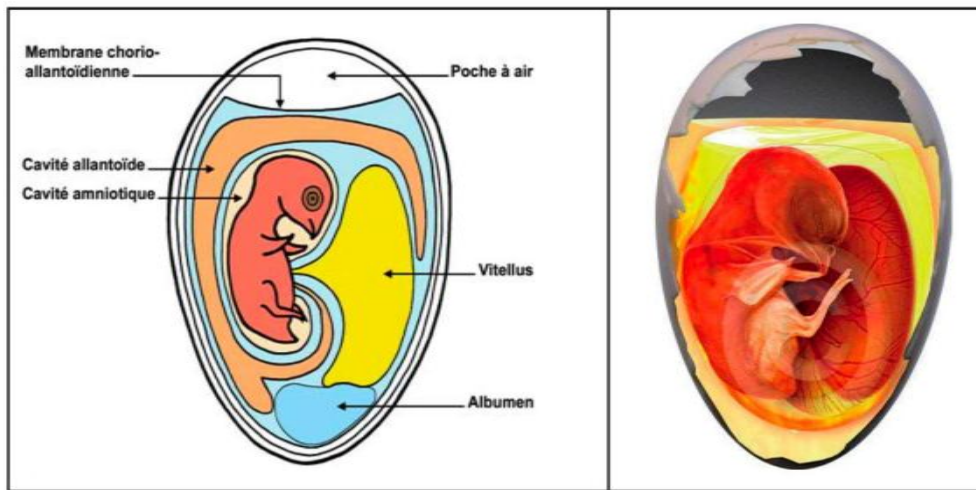
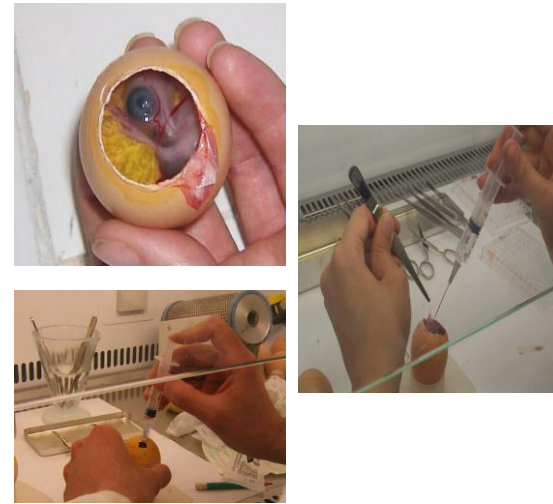


FIGURE 5 - ŒUF DE POULE EMBRYONNÉ DE 10 JOURS
A. Représentation schématique. B. Image de Science-Art (© W.G.ROTH)



➤ 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 souris nouveau-nés
- Diagnostic de la rage qui entraîne une paralysie flasque puis mort des souris nouveau-nés

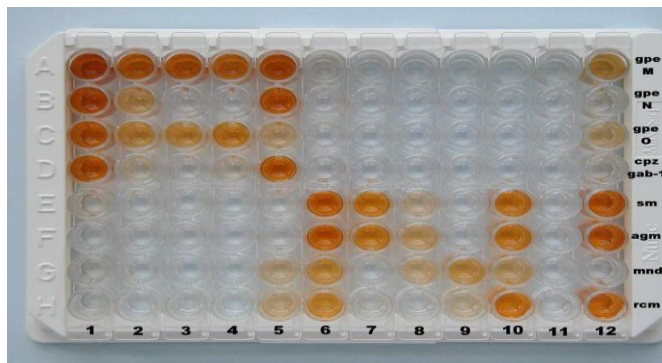
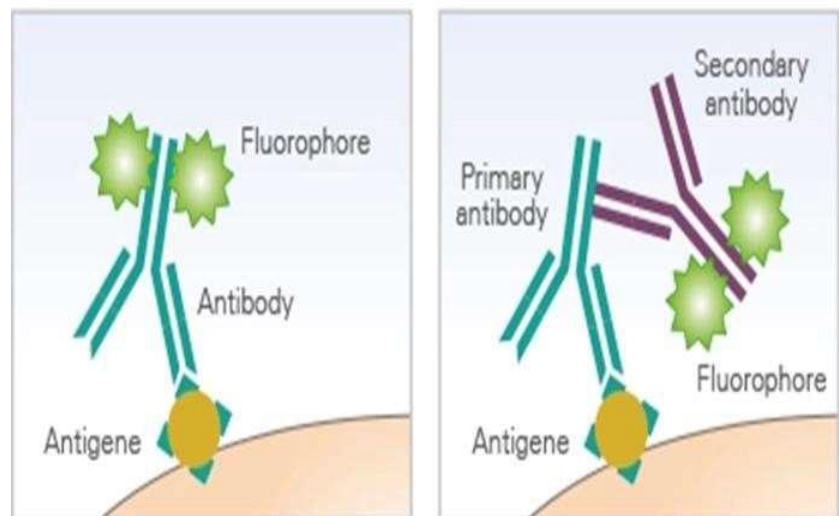
3. Détection directe des Antigènes viraux

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

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

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

Direct Immunofluorescence Indirect Immunofluorescence



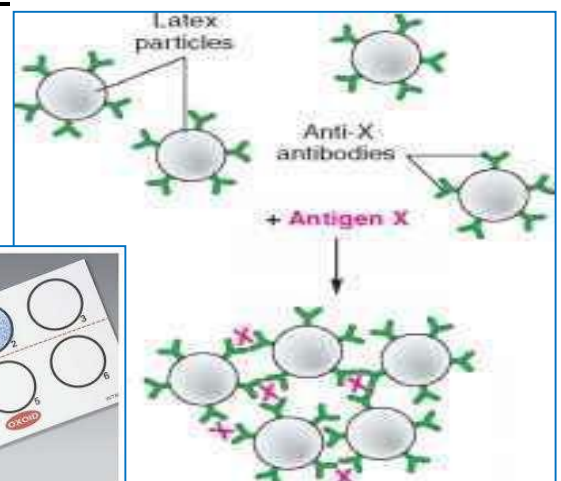
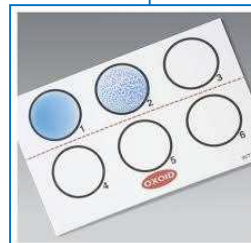
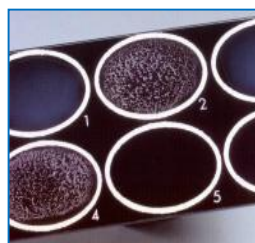
Agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps :

Test au latex où une suspension de particules de latex enrobées d'anticorps antiviraux est mélangée à un extrait liquide de produits biologiques ;

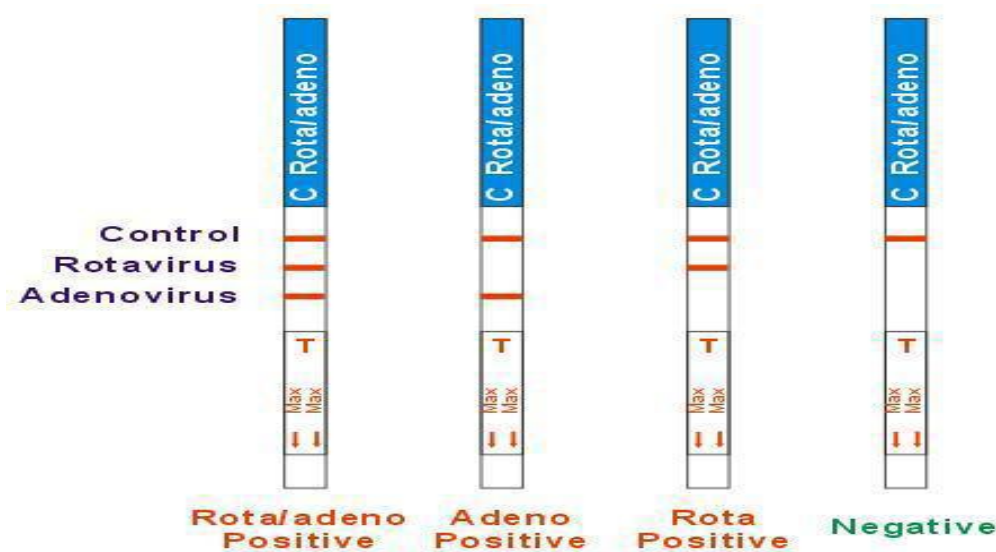
les particules de latex vont se trouver agglutinées par l'intermédiaire de l'antigène viral correspondant,

à l'œil nu, la suspension de particules de latex, d'homogène va devenir granuleuse

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



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



Avantages de la détection directe des antigènes viraux :

1. Conservation et transport des prélèvements moins strictes
2. Facilité de mise en œuvre
3. Rapidité d'exécution
4. Grande spécificité de ces techniques
5. Nombreux tests commercialisés

Inconvénients

1. Faible sensibilité : infections où la réplication virale est importante
2. 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

Diagnostic direct moléculaire : Trois méthodes principales dominent la routine:

1-L'hybridation moléculaire

2-L'amplification génique(PCR)

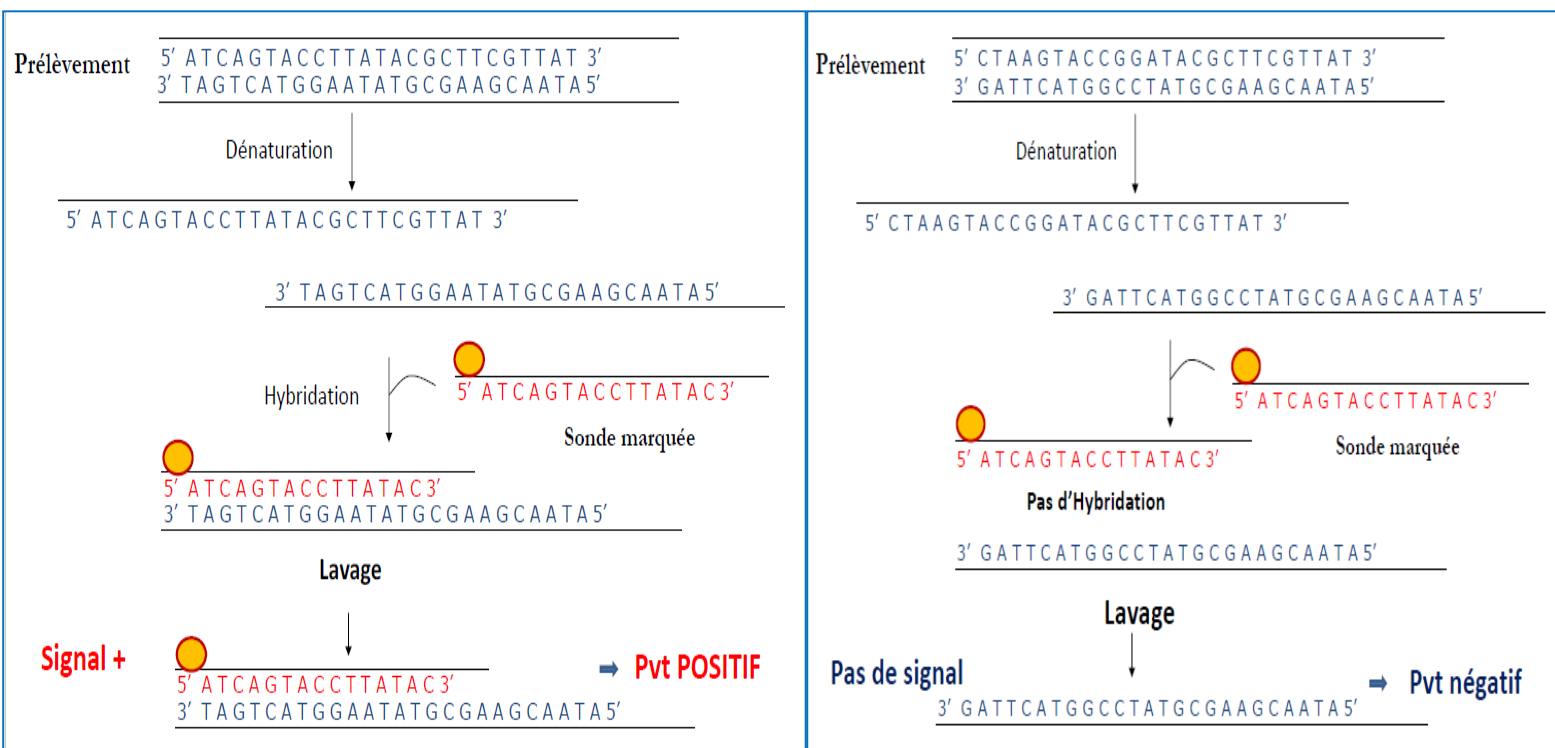
3-Le séquençage nucléotidique.

- ✓ Les techniques de PCR sont les plus utilisées. Elles sont sensibles, elles sont spécifiques de chaque type de virus.
- ✓ Les appareils de PCR en temps réel constituent un progrès important puisqu'ils permettent des diagnostics rapides. L'application de ces techniques permet le diagnostic d'infections à Cytomégalo virus, (CMV) et Epstein-Barr-Virus (EBV), adénovirus, herpès-virus....

- ✓ Elles sont quantitatives et permettent de suivre l'efficacité d'un traitement antiviral. L'exemple du VIH est intéressant car il a permis le développement de techniques différentes pour la quantification de l'ARN VIH plasmatique (technique de DNA branché, technique NASBA et RT-PCR). Ces outils ont aussi été développés pour les virus HCV et HBV.

1. Techniques d'hybridation :

La complémentarité des bases est à la base de cette technique

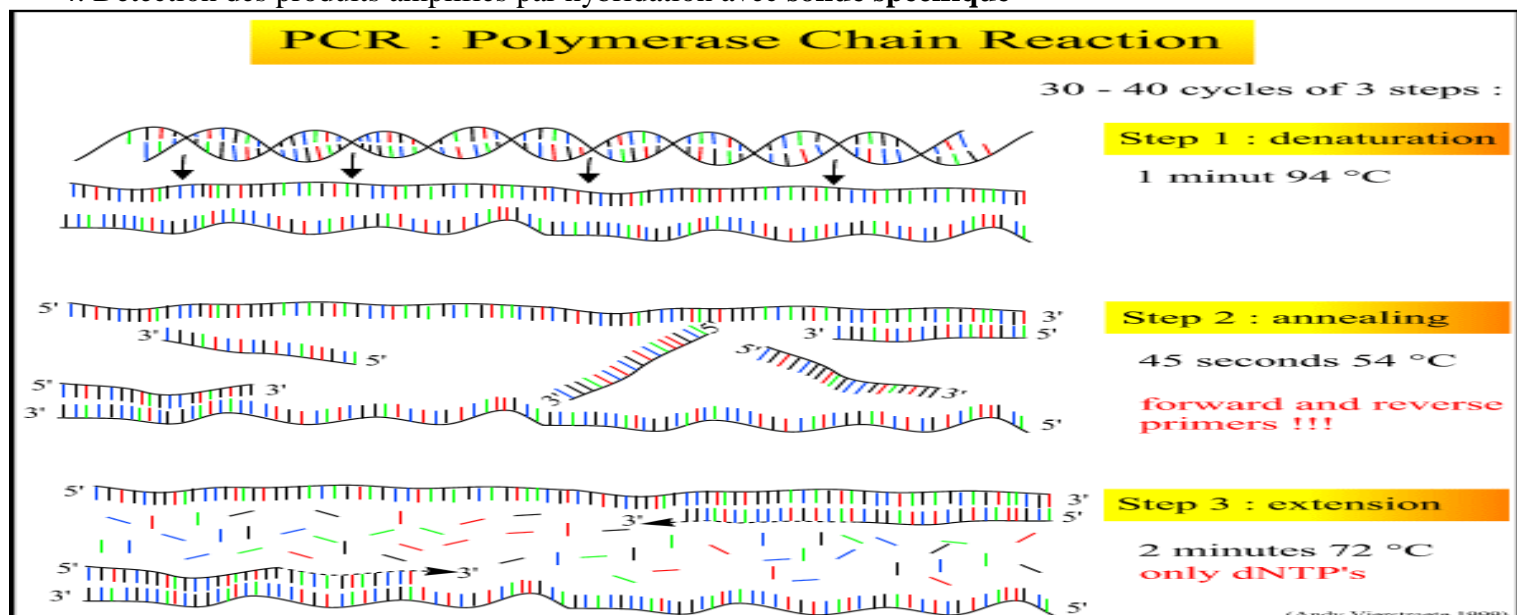


2. PCR : Amplification de la cible avant détection pour améliorer la sensibilité

❖ PCR conventionnelle

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



Diagnostic indirect recherche des anticorps, sérologies virales :

Principe

Il consiste à rechercher dans le sérum la présence d'anticorps spécifiques d'une infection virale, au moyen d'antigènes viraux.

La détection peut être qualitative ou quantitative et porter sur les anticorps totaux, sur les IgG ou sur les IgM théoriquement spécifiques d'une primo-infection. (*Les IgG sont produites lors d'un contact avec un antigène qui se prolonge ou lors d'un second contact de l'organisme avec un antigène.*

Les IgM sont des immunoglobulines secrétées lors du premier contact de l'organisme avec un antigène).

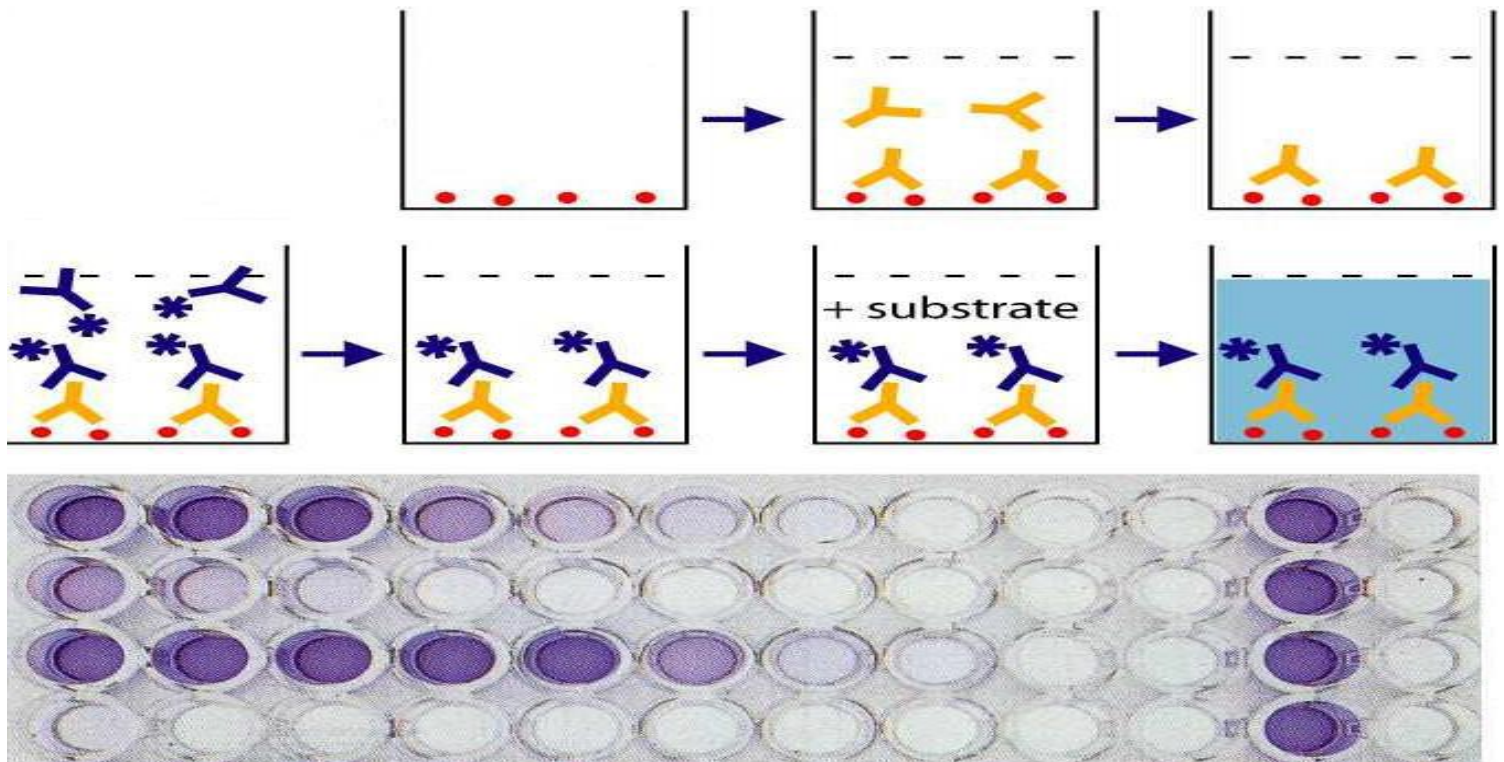
Prélèvements Les anticorps sont présents dans les différents liquides biologiques de l'organisme et notamment dans le sang.

• Différentes techniques sont utilisées : ELISA, agglutination, Western blot et immunoblot.

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)



Les examens virologiques deviennent particulièrement contributifs grâce au développement de nouvelles techniques rapides sensibles et spécifiques pour la détection des virus.

Elles permettent le diagnostic et le suivi thérapeutique d'infections chroniques (HIV, HBV) ou d'infections sévères chez les sujets immuno-déprimés.

Il faut souligner la nécessité de contacts entre cliniciens et biologistes pour orienter le choix des examens, cibler les recherches selon chaque pathologie observée et adapter les traitements

