

Diagnostic virologique

Introduction :

La majorité des infections virales présentent un tableau clinique très évocateur et régressent d'elles-mêmes sans que le clinicien ait recours au diagnostic virologique. Par contre, dans certaines situations, le diagnostic précis d'un virus responsable de la pathologie observée est nécessaire et il faut faire appel au laboratoire de virologie.

Le diagnostic virologique doit se faire uniquement dans des conditions précises. Les infections virales fréquentes chez les sujets immunodéprimés nécessitent tout particulièrement des diagnostics rapides et le suivi des traitements antiviraux. Le diagnostic virologique fait appel à deux groupes de techniques, différentes mais complémentaires, réalisant :

- soit la mise en évidence du virus ou de ses constituants,
- soit celle de la réponse immunitaire spécifique.

Buts du diagnostic virologique :

- ⊕ Apporter la preuve de l'origine virale des signes cliniques observés et diagnostiquer le virus en cause (ex : hépatites, herpès) ;
- ⊕ Suivre l'évolution biologique de l'infection (ex : quantification du virus dans le sang : VIH, VHB, VHC),
- ⊕ Permettre une décision thérapeutique et juger de l'efficacité des traitements antiviraux (ex : traitement d'une infection à cytomégalovirus par Ganciclovir),
- ⊕ Prévenir la transmission d'infections virales à l'occasion du don de sang, d'organes et de tissus,
- ⊕ Apprécier l'état immunitaire (ex : rubéole),
- ⊕ Etudier les marqueurs sériques en population (ex : enquêtes de prévalence, études épidémiologiques).

Techniques directes : mise en évidence du virus et/ou ses constituants :

❖ Les prélèvements :

Différents types de prélèvements peuvent être utilisés pour la recherche de virus.
Sang (virémie), les selles, les sécrétions nasales, les urines,.....

Détection du virus par isolement

Prélèvements	virus
selles	enterovirus
Urines	CMV, rougeole
Salive	CMV, virus ourlien
Aspiraion naso-pharyngée, LBA, aspiration bronchique..	Paramyxo, ADV, Grippe,...
Privts cutanés	HSV, VZV
Privts oculaires: conjonctive, grattage de la cornée	ADV, HSV
LCR	Herpes, CMV, Enterovirus...
Privts génitaux	HSV récurrent
Sang	HIV, ... (virémie persistante)

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 :

- ⚡ 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 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).
- ⚡ Doit être le plus précoce possible (phase aigüe) → excrétion virale maximale

Conservation des échantillons:

- + 4° C : quelques h
- - 80°C ou dans l'azote liquide: la conservation la plus longue
- - 20°C: à éviter
- Transport dans une glacière

❖ *La recherche de virus par cultures cellulaires*

Les virus parasites stricts utilisent la machinerie cellulaire pour leur multiplication.

L'isolement *in vitro* utilise des cellules vivantes, ou *in vivo* comme l'animal (ex : souris nouveaux-nés pour la rage) ou œuf embryonné (grippe).

La **culture cellulaire** est une technique de laboratoire permettant de faire vivre *in vitro* des cellules, de diverses natures et d'origines, d'en modifier leurs propriétés ou d'augmenter leur nombre, afin d'en disposer en grande quantité

3 types de cultures cellulaires:

- ✓ **Cellules de culture I aire**: obtenues à partir de tissus, d'organes ou de cellules. Meurent après un nombre de passage limité ex: rein de singe, rein de lapin...
- ✓ **Cellules de culture II aire**: diploïdes embryonnaires humaines de nature fibroblastique pour la majorité; ½ vie limitée à 40-50 passages)
- ✓ **Cellules de lignées continues**: cellules hétéroïdes transformées, immortalisées à partir d'animaux (Vero) ou obtenues de tissus cancéreux (HEp2)

⚡ Inoculation des cellules

Ajouter un certain volume de prélèvement à la nappe cellulaire confluyente, formée sur une cupule de plaque d'isolement ou un fond de tube de culture.

Les signes de multiplication virale induisent l'apparition de l'effet cytopathogène (ECP) défini par un changement de l'aspect des cellules, visible en microscopie (accumulation des virus produits ou des antigènes dans le noyau, ou dans le cytoplasme des cellules infectées).

⚡ La preuve d'une production virale:

- ECP : pour les virus lytiques. Il est caractéristique pour certains virus (en 4-5 jours) examiné sous microscope optique inversé

- pour les virus non lytiques et parfois certains virus lytiques, pour une recherche précoce, sont détectés par l'intermédiaire de leurs antigènes, exprimés au niveau des membranes cellulaires infectées, sur lesquels se fixent des anticorps spécifiques. Des techniques immunoenzymatiques ou d'immunofluorescence sont utilisées.

⚡ Identification des virus :

Une fois les virus isolés, une identification précise est nécessaire pour conduire au diagnostic de certitude.

Elle fait appel à des techniques immunologiques qui, en utilisant des anti-sérums spécifiques correspondants connus, permettent de confirmer le type de virus, le sous-type et le variant.

- Séroneutralisation de l'ECP (Enterovirus)
- Inhibition de l'hémadsorption
- Inhibition de l'hémagglutination
- Caractérisation des Ag: IFD ou ELISA

L'interprétation des résultats reste tributaire de la qualité et du titre infectieux du prélèvement, ainsi que du caractère cultivable du virus.

Détection du virus par isolement

Avantages	Inconvénients
Mise en évidence du virus	Le prélèvement doit contenir le virus
Très sensible	Technique lourde, longue et onéreuse
Seule technique permettant l'étude de la sensibilité aux antiviraux	Structure spécialisée; personnel qualifié
	Certains virus sont non cultivable

❖ *Mise en évidence directe des virus ou de leurs antigènes dans le prélèvement :*

‡ Microscopie électronique:

- **Intérêt:** virus non cultivable et virus avec aucun système de détection antigénique connu
- **Inconvénient:** le prélèvement doit être suffisamment riche en virus.
- Permet de reconnaître la morphologie du virus → plutôt dg de famille
- L'immunologie couplée à la ME a ↗ la sensibilité
- Indiquée surtout dans les gastroentérites virales

‡ Techniques immunologiques:

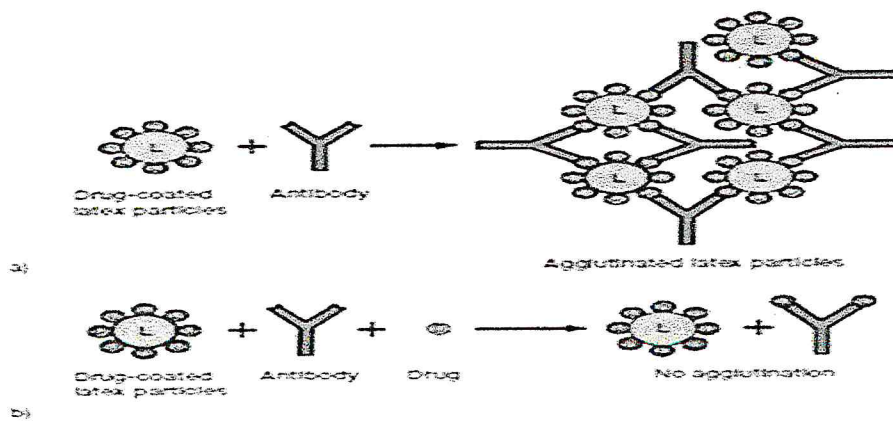
Les protéines et glycoprotéines virales sont autant d'antigènes qui peuvent être reconnus par des anticorps spécifiques (polyclonaux ou monoclonaux)

Pour visualiser la formation du complexe Ag-Ac, plusieurs techniques existent:

- L'Ac peut être fixé sur un support → agglutination si Ag correspondant
- Ac marqué: fluorochrome ou enzyme

✓ *Agglutination :*

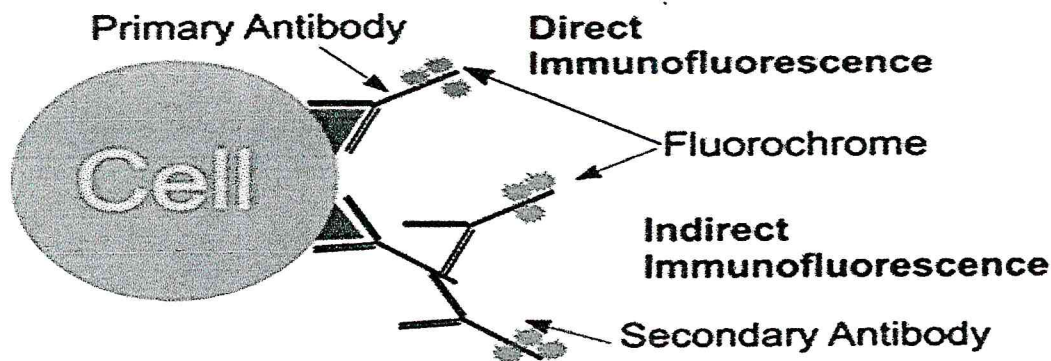
Des billes ou particules de latex recouvertes d'anticorps spécifiques d'un virus peuvent agglutiner en présence du virus correspondant. Lecture à l'œil nu.



✓ **Immunofluorescence :**

Ces techniques recherchent des antigènes viraux, au sein des cellules infectées à partir de prélèvements, directement au moyen d'anticorps spécifiques viraux conjugués à l'isothianate de fluorescéine → immunofluorescence directe

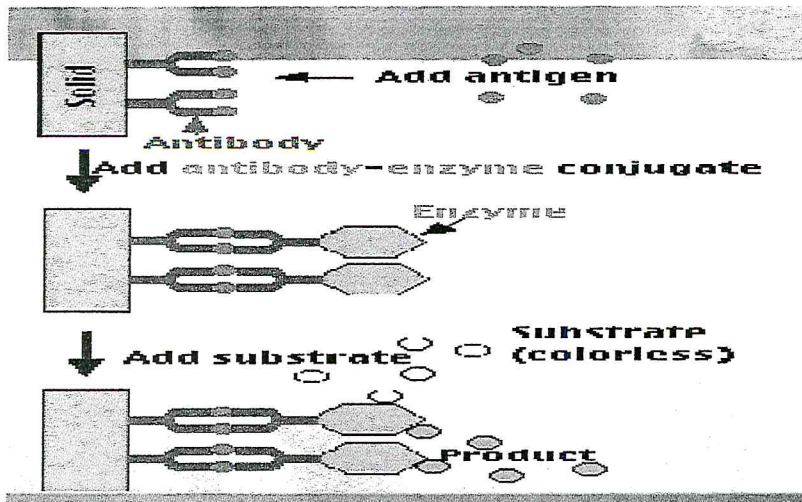
La méthode indirecte consiste à marquer des immunoglobulines d'origine animale, dirigées contre les anticorps spécifiques viraux et de les faire réagir avec le complexe Ag-Ac formé.



- Nécessite des cellules infectées intactes en nombre suffisant.
- Rapide. Faible cout

✓ **Techniques ELISA :**

La technique ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay) est une technique **immuno-enzymatique** de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.



- Plusieurs types d'ELISA : directe, indirecte, sandwich, par compétition...
- Techniques rapides, automatisables, bonne sensibilité et spécificité
- S'applique théoriquement aisément à tous les examens virologiques.

✓ *Tests unitaires : bandelettes :*

Recherche ponctuelle d'un virus dans un prélèvement.

Principe:

L'immunochromatographie associe une technique de chromatographie et l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Elle met ainsi en jeu :

- Une membrane de chromatographie sur laquelle sont fixés :
 - Dans la zone test : un anticorps monoclonal anti-virus recherché
 - Dans la zone contrôle : un anticorps polyclonal anti-IgG de souris
- Un support imprégné d'un conjugué constitué du mélange d'un anticorps monoclonal anti-virus recherché couplé à des microsphères de polystyrène de couleur.

Si l'échantillon contient le virus recherché, celui-ci forme un **complexe antigène-anticorps** avec les anticorps présents sur les microsphères de couleur, **complexe qui migrera** le long de la membrane et se fixera sur les anticorps de la zone test : **apparition d'une ligne de couleur** à ce niveau.

- **Application :** diagnostic rapide des gastro-entérites virales (*Rotavirus, Adenovirus*) et de la grippe.
- **Intérêts :**
 - Détection de **charges virales très faibles**
 - Résultat obtenu en 10 minutes
 - Spécificité élevée.

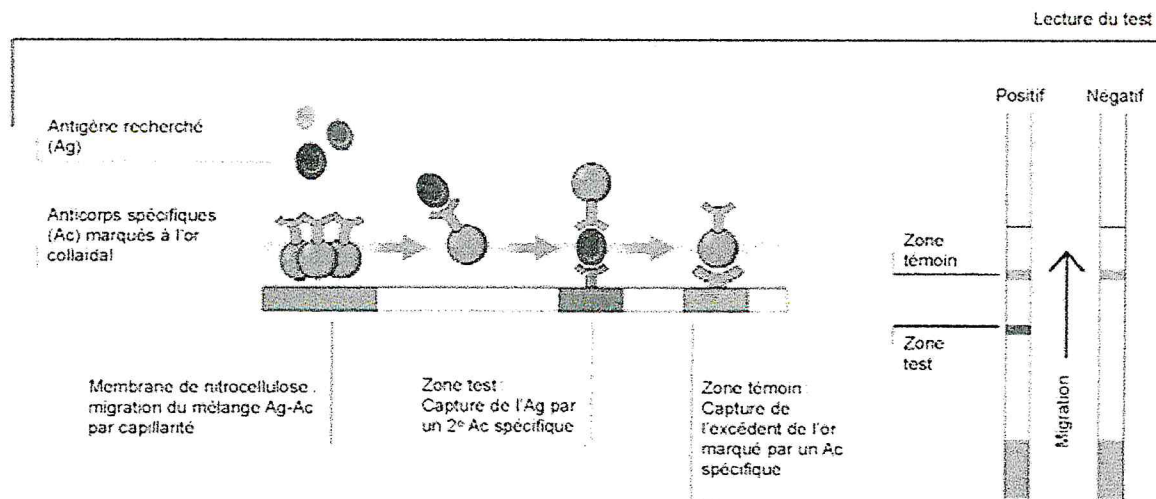


Figure 1 Schéma d'un test d'immunochromatographie (ICT)

❖ *Détection du génome viral par les méthodes moléculaires :*

- ✓ La virologie doit énormément au développement des technologies de biologie moléculaire
- ✓ Ont permis de découvrir des virus jusque là inconnus : HCV, HHV8, Metapneumovirus
- ✓ Raccourcissent le délai de Dg
- ✓ Détecter une répllication virale active (charge virale HBV, HIV, HCV)
- ✓ Permettent de conclure à un dg face à des profils sérologiques douteux ou à une phase pré-sérologique
- ✓ Applicable théoriquement à tous les virus, à conditions de connaître les séquences

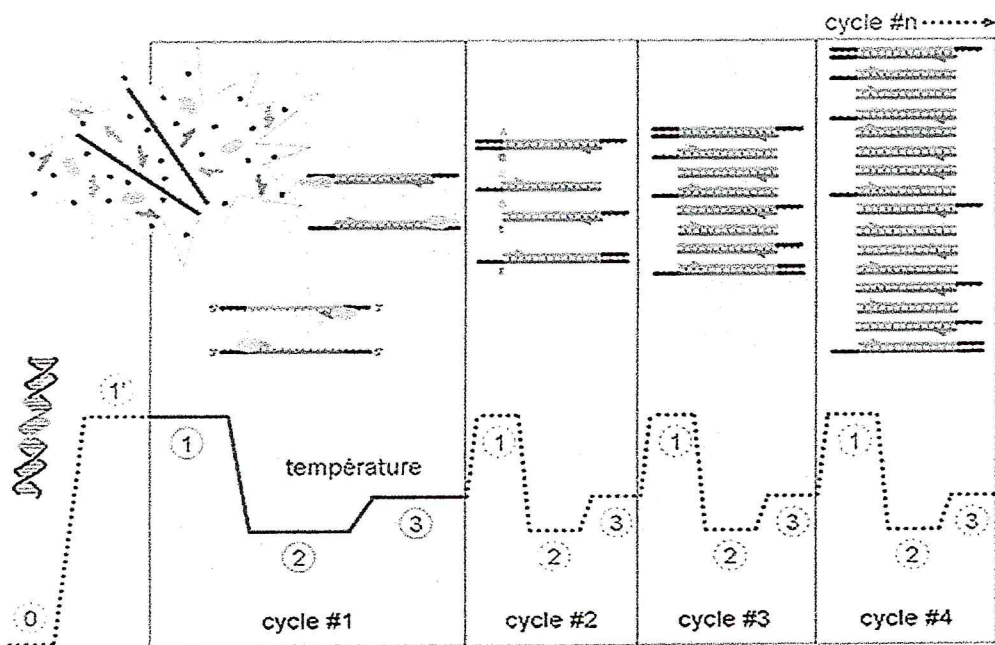
Elles consistent en la détection des génomes ou de fragments de génomes viraux, soit directement soit après amplification.

La méthode la plus utilisée est : la PCR

PCR :

- ✦ La méthode **PCR** (Polymerase Chain Reaction) est utilisée dans le but d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.
- ✦ Les réactions de **PCR** sont constituées de plusieurs 'cycles PCR' permettant la répllication d'une matrice d'ADN double brin. Ainsi, les produits PCR obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle
- ✦ La PCR se déroule en trois étapes :
 1. Dénaturation : Séparations des « matrices doubles brins en simples brins »
 2. Bornage : pour cibler l'amplification sur la région ADN souhaitée à l'aide d'amorces PCR spécifiques.

3. Amplification PCR : étape de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, de l'ADN double brin est synthétisé.
- ⊕ Ainsi, deux amorces complémentaires respectivement aux deux brins de l'ADN sont choisies pour encadrer un segment connu destiné à être amplifié, lequel est spécifique du virus recherché.
 - ⊕ Au cours du cycle *in vitro*, les amorces viennent s'hybrider à l'extrémité 3' du segment à amplifier et une enzyme, la Taq polymérase, fabrique une copie du génome tronquée de sa partie 3' en aval de l'amorce.
 - ⊕ Après dénaturation, elles vont s'hybrider secondairement sur la copie tronquée du génome à l'extrémité 3' du segment et la polymérase va synthétiser finalement le segment à amplifier.
 - ⊕ Une PCR comporte n cycles.
 - ⊕ La révélation peut s'effectuer après électrophorèse sur gel d'agarose ou par hybridation après transfert sur une membrane.



❖ *PCR en temps réel :*

La PCR en temps réel est fondée sur la détection et la quantification des produits d'amplification au cours de la réaction de PCR, dans le tube fermé, plutôt qu'à la fin de la réaction comme c'est le cas des techniques de PCR classiques. Elle présente l'avantage de quantifier l'acide nucléique viral initial sur un intervalle plus étendu de valeurs que les techniques classiques, et ce, avec la même efficacité mais plus de sensibilité.

Application : charge virale hépatite B hépatite C, HIV.....

❖ *génotypage :*

Hépatite C++ par séquençage → obligatoire avant traitement car les schémas thérapeutiques (protocoles et durées) sont fonction du génotype

Diagnostic indirect : Sérologies Virales

❖ *Objectifs :*

- ⚡ L'infection virale est le plus souvent suivie par une réponse immunitaire humorale traduite par la production d'anticorps spécifiques des antigènes du virus (immunoglobulines IgG et IgM).
- ⚡ La connaissance d'un statut sérologique présente différents intérêts : elle permet de connaître l'état immunitaire du sujet : un titre positif permet d'affirmer que le sujet est immunisé et a rencontré une fois le virus dans sa vie (CMV, HIV, Rubéole) ou bien qu'il est vacciné (hépatite B).
- ⚡ Elle permet aussi de suivre l'évolution de l'infection virale (anticorps anti HBc et HBs).

❖ *Prélèvements*

- Les anticorps sont présents dans les différents liquides biologiques de l'organisme et notamment dans le sang périphérique (plasma ou sérum selon que le sang est prélevé avec ou sans anticoagulant).
- Sérum : le plus souvent, rarement plasma, LCR (synthèse intrathécale)..
- Cinq à dix millilitres de sang veineux suffisent pour effectuer la recherche de plusieurs marqueurs ou faire plusieurs sérologies.
- Les sérums sont conservés au plus tard 24-48h à +4 °C, une année à -20°C, plusieurs années à -80°C.

❖ *Techniques*

- ⚡ Différentes techniques sont utilisées : ELISA, agglutination, Western blot et immunoblot. L'ELISA est devenue la technique la plus utilisée car elle est rapide simple spécifique et adaptable sur automate.
- ⚡ Elle permet d'utiliser différents types d'antigènes : lysats de virus, protéines virales natives, protéines de recombinaison génétique ou peptides de synthèse.
- ⚡ Ceci permet des sérologies analytiques selon les antigènes utilisés (exemple suivi de l'infection par le virus de l'hépatite B).

Cinétique des anticorps :

- ⚡ Les IgM qui apparaissent en premier peuvent être recherchés, quand c'est possible, et témoignent d'une primo-infection, ils disparaissent rapidement

- ⚡ Suit après l'apparition des IgG, durent plus longtemps et subissent un rappel lors d'une réinfection par un même virus
- ⚡ Dépend du virus, change chez les ID, nouveau-né

2 prélèvements (sérums) à 15 jours d'intervalle (l'un précoce, l'autre tardif) sont nécessaires

Seules les 2 situations suivantes permettent de conclure à une infection récente:

- Absence des Ac sur le 1^{er} sérum et leur présence sur le 2^{ème} → séroconversion
- Le titre du 2^{ème} sérum est = à au moins 4 fois celui du 1^{er}

Interprétation des résultats

L'interprétation des sérologies virales n'est pas toujours facile. Il faut garder à l'esprit que la réponse immunitaire est différente d'un sujet à l'autre (ex : vaccination contre la rubéole) qu'il n'y a pas de relation directe entre le titre d'anticorps et la symptomatologie clinique.

La quantification du titre d'anticorps est intéressante pour effectuer le suivi clinique en primo-infection notamment.

Par contre, les sérologies virales sont peu informatives chez les sujets immuno-déprimés.

Chez le nouveau-né, la présence d'anticorps IgG maternels gêne l'interprétation des sérologies pendant six à douze mois. La recherche des IgM, qui sont produites par l'enfant et ne passent pas la barrière placentaire, peut être contributive (rubéole)

La négativité des résultats des examens virologiques peut les faire apparaître souvent comme des examens peu contributifs. En fait, ils sont souvent prescrits trop tardivement (après avoir éliminé un problème bactérien ou parasitaire), ou ont été acheminés tard, dans de mauvaises conditions.