

Le diagnostic virologique

Cibles de la détection des virus

Structure virale détectée	Méthode	Applications courantes
---------------------------	---------	------------------------

Diagnostic Indirect

Anticorps anti-protéine virale	Sérologie virale Immunoblot	Presque tous les virus
--------------------------------	--------------------------------	------------------------

Diagnostic direct

Particule virale complète	Culture Virale	HHV, enterovirus
Protéine virale	Immunoenzymologie, Immunofluorescence	Rotavirus, ADV, Norovirus, VRS, Grippe, HHV...
Acides nucléiques viraux	Biologie moléculaire (PCR, Séquençage)	Presque tous les virus

Le diagnostic indirect

Diagnostic indirect : sérologies virales

□ Prélèvements :

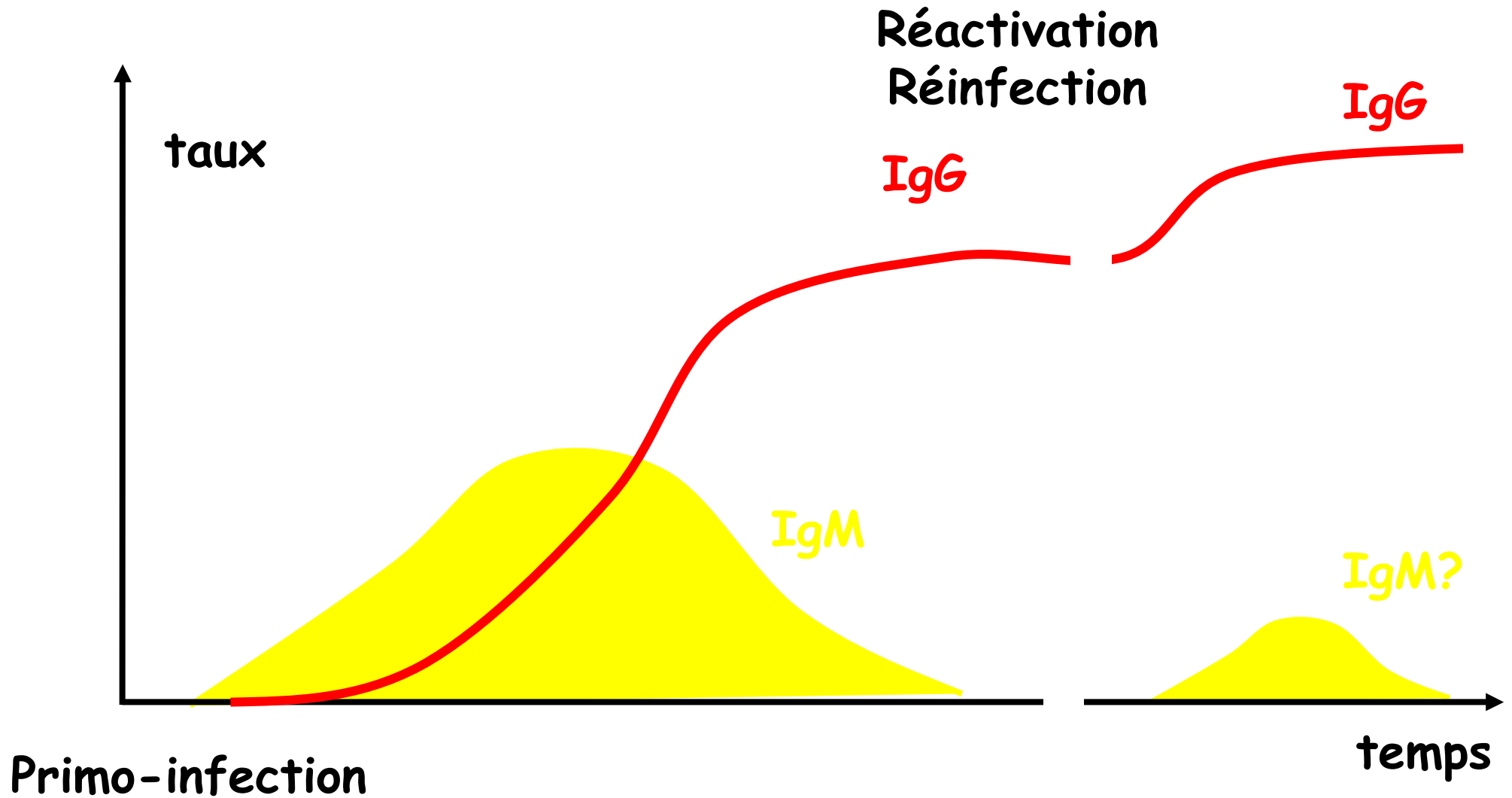
- Sérum principalement, acheminé à température ambiante au laboratoire
- Autres liquides biologiques : LCR, LA, LBA...

□ Techniques :

- Méthodes ELISA
- Autres : HA, IHA, RFC ...
- Tests de confirmation : Western Blot et Immunoblot

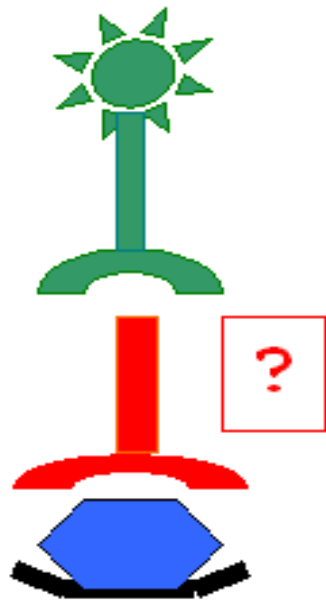


Cinétique des Anticorps



Principe de la réaction ELISA

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay



Anti-Ac

Anticorps

Antigène

1/ Formation d'un complexe Ag-Ac

2/ Détection du complexe Ag-Ac par fixation d'un Ac anti-immunoglobuline humaine marqué

✓ Par une enzyme (méthode immuno-enzymatique)

➤ Par une molécule fluorescente (immuno-fluorescence)

Supports de sérologie virale

Techniques Manuelles

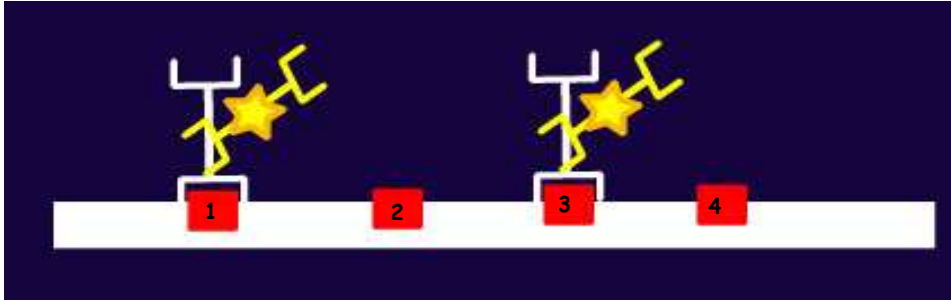


Puits colorés = sérums positifs pour la réaction ELISA. Lecture des DO par spectrophotométrie

Techniques Automatisées

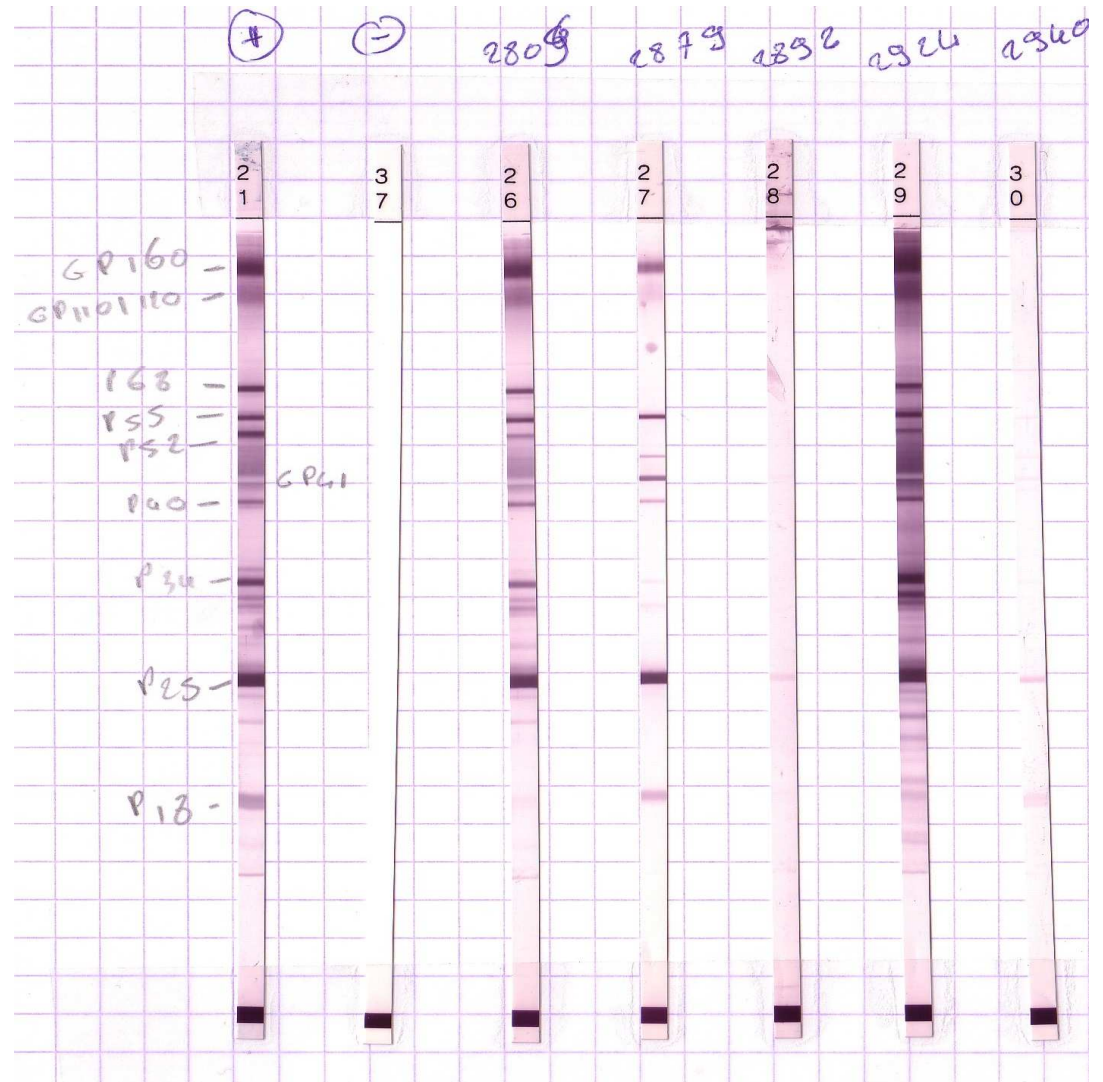


Tests sérologiques de confirmation



Une bande colorée apparaît si le sérum testé contient l'Ac reconnaissant l'Ag adsorbé sur la bandelette

Ex : diagnostic sérologique d'une infection par le HIV



Indications

Mise en évidence d'un contact plus ou moins récent avec un virus :

- ◆ **Séroconversion d'anticorps spécifiques** : nécessite 2 prélèvements à 15 jours d'intervalle
- ◆ **Présence d'IgM spécifiques**
- ◆ **Augmentation significative des IgG spécifiques**
- ◆ **Mesure de l'avidité des anticorps**

Avantages et limites

Avantages :

- ◆ Bonnes sensibilité et spécificité
- ◆ Automatisation
- ◆ Délai de rendu du résultat

Limites :

- ◆ Moindre sensibilité chez certaines catégories de patients (nourrissons et sujets immunodéprimés)
- ◆ Interprétation parfois délicates : réactivité croisée au sein d'une même famille, présence possible d'IgM lors de réactivation (HHV)

Le diagnostic direct

Diagnostic direct : prélèvements

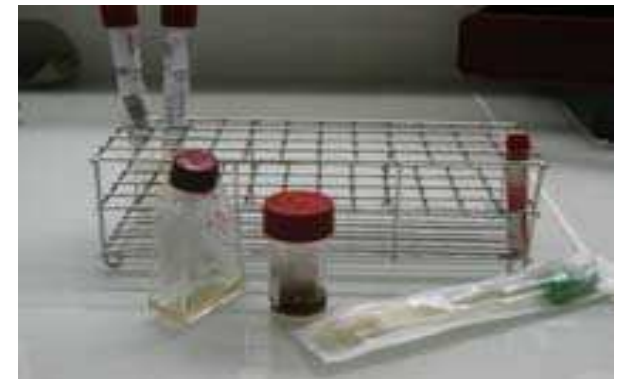
□ Prélèvements ne nécessitant pas de milieu de transport

- ✧ Tube sec stérile : LCR, LBA, urines, selles, prélèvements liquides divers
- ✧ Tube contenant un anticoagulant (EDTA) : sang total pour recherche de virus dans le plasma ou les cellules

□ Prélèvements effectué avec un écouvillon stérile ou une brosse immergé dans un milieu de transport

- ✧ Gorge, vésicules, conjonctives, uro-génital ...

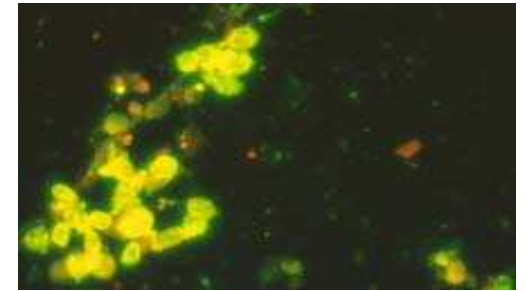
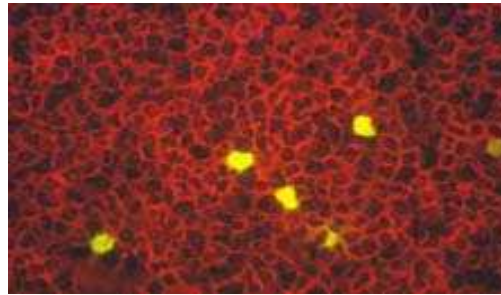
La qualité du résultat résulte de la qualité du prélèvement et des conditions de transport et/ou de conservation (transport rapide à +4°C)



Diagnostic direct « rapide » : méthodes

Immunomarquage spécifique sur lame de verre avec un Ac dirigé contre une protéine virale

Détection par immunofluorescence



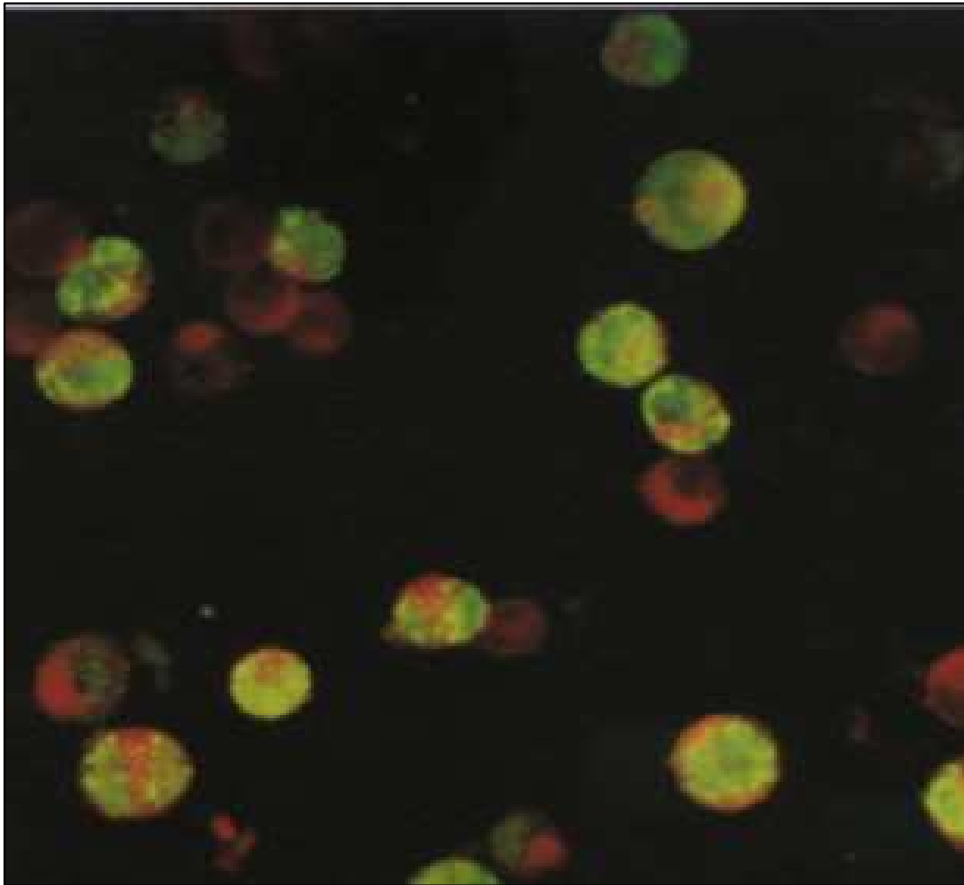
Détection par immunoenzymologie



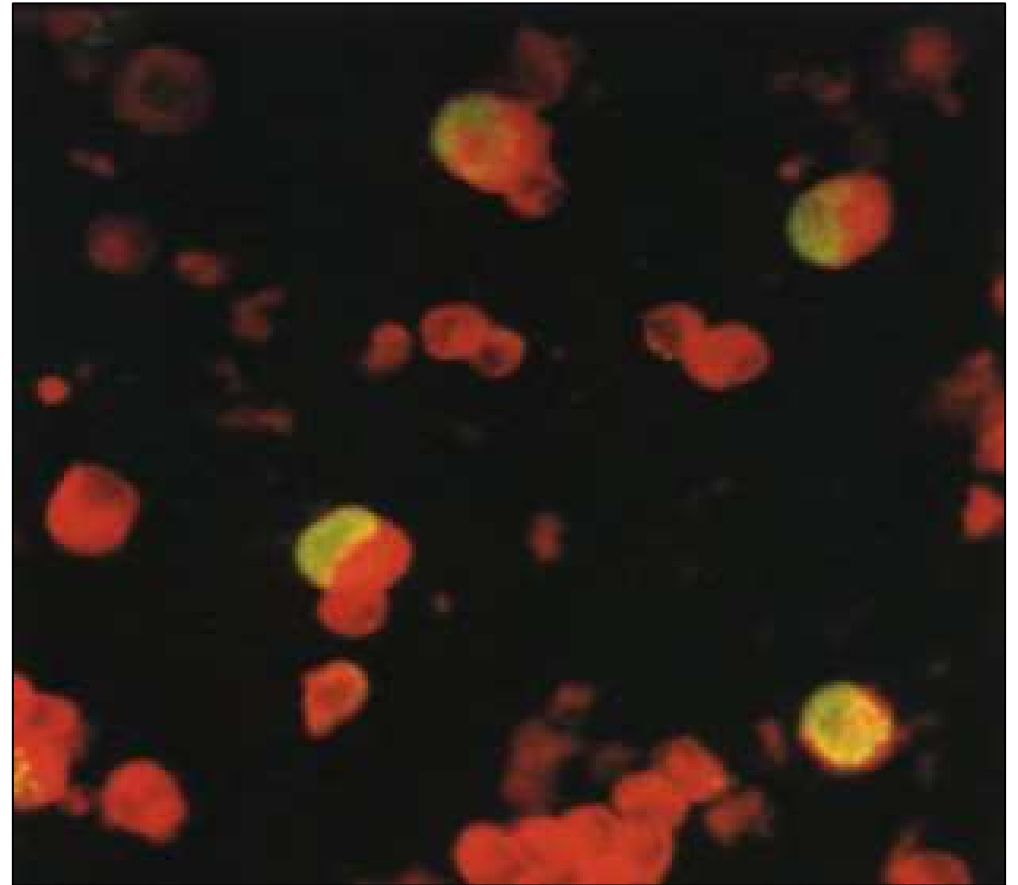
Agglutination de particules de latex sensibilisées



Diagnostic par immunofluorescence



Adenovirus

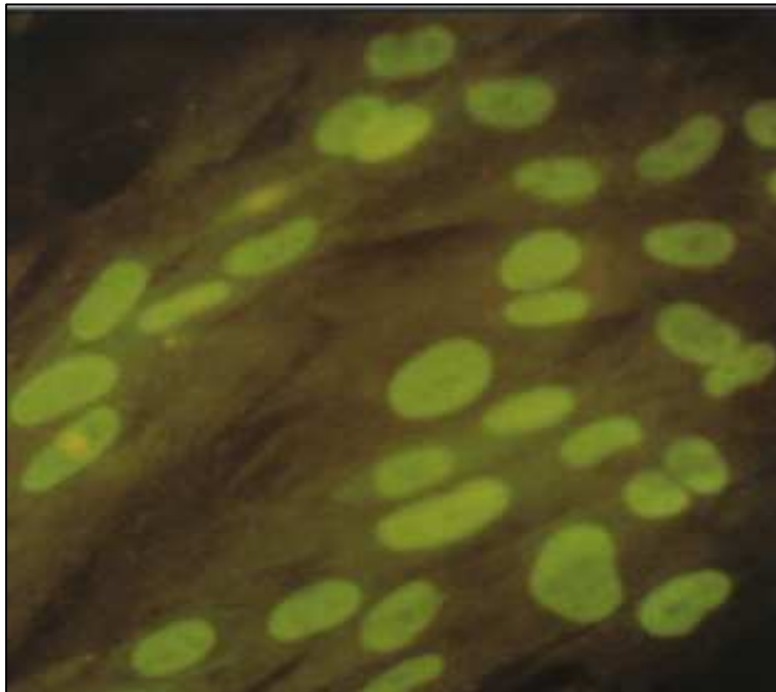


Parainfluenza 3

Détection d'antigène précoce du CMV

Culture rapide

Révélation par IF ou IP



IF



IP

Cellules MRC5

Diagnostic direct « rapide » : indications

Prise en charge **spécifique et rapide** du patient dans certaines circonstances :

- ➔ **Femme enceinte** pré-partum (HSV)
- ➔ **Infections respiratoires** : grippe, VRS +++
- ➔ **Diarrhées du nourrisson** (ADV, Rotavirus)
- ➔ Recherche d'une **infection à CMV infra-clinique** chez un patient immunodéprimé

Diagnostic direct « rapide » : avantages et limites

□ Avantages :

➔ Rapidité de rendu de résultat

□ Limites :

➔ Manque de sensibilité

➔ Immunofluorescence : lecture au microscope fonction de l'expérience de l'observateur

Diagnostic direct par culture : méthodes

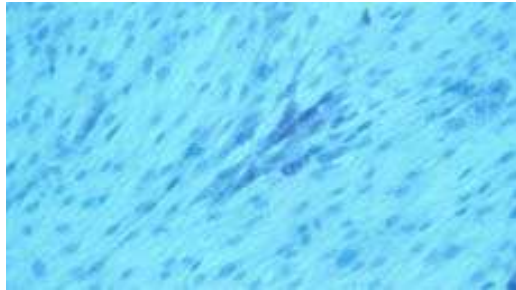
Virus = parasite obligatoire des cellules, cultivé dans des cellules eucaryotes entretenues au laboratoire

1/ Ensemencement d'une lignées

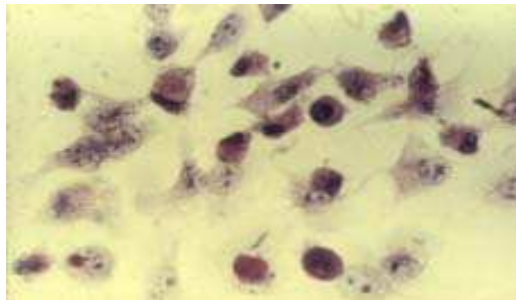
2/ Recherche d'un effet cytopathogène (ECP)



ECP en culture sur cellules MRC5



CMV : ECP en banc de poisson



Enterovirus : inclusions intra-cytoplasmiques et noyau hyperdense repoussé en périphérie



Coloration montrant la disparition des nucléoles, chromatines éclatées, inclusions nucléaires colorées +++

Diagnostic direct par culture : indications

Isolement d'un virus dans un milieu biologique :

- Preuve du caractère infectieux
- **Caractérisation du phénotype** d'une souche virale pour la résistance aux antiviraux (HHV, HIV) ou le tropisme (HIV)
- **Etudes épidémiologiques** et **synthèse de vaccin** (grippe)

Diagnostic direct par culture : avantages et limites

□ **Avantages :**

- ➔ Très bonne sensibilité (méthode de référence)
- ➔ Indispensable pour disposer de souches utilisées pour la mise au point de vaccins (vaccin grippal)
- ➔ Coût raisonnable

□ **Limites :**

- ➔ Délai d'obtention du résultat : 48h à 10 jours
- ➔ Subjectivité de la lecture
- ➔ Certains virus sont non cultivables : HCV, HBV

Diagnostic direct moléculaire : principes

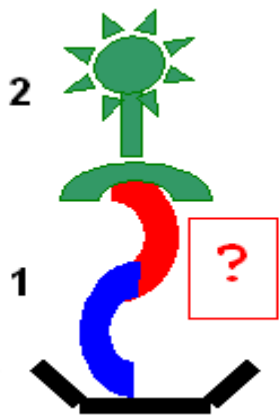
Trois méthodes principales :

- **Hybridation moléculaire** et ses variantes : bDNA, hybridation avec amplification du signal ; hybridation à la recherche de mutations sur le génome viral
- **Amplification génique ou PCR**
- **Séquençage nucléotidique**

Hybridation moléculaire : principe

Définition : détection directe d'ADN ou d'ARN sur différents supports

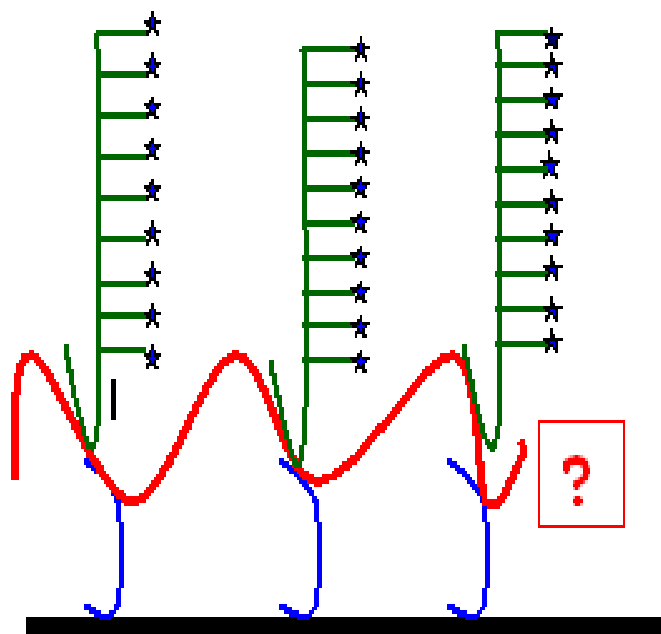
Principe :



1/ Formation d'un hybride acide nucléique viral du prélèvement (ADN ou ARN)/sonde spécifique du génome recherché, sur supports (membrane, microplaque...)

2/ Détection immuno-enzymatique de l'hybride par Ac anti-acide nucléique double brin puis détection colorimétrique, fluorescente ou chimioluminescente

Hybridation moléculaire avec amplification du signal: méthode de l'ADN branché



sondes de révélation
luminescentes

sondes ramifiées :
ADN branché

ARN ou ADN viral
à quantifier

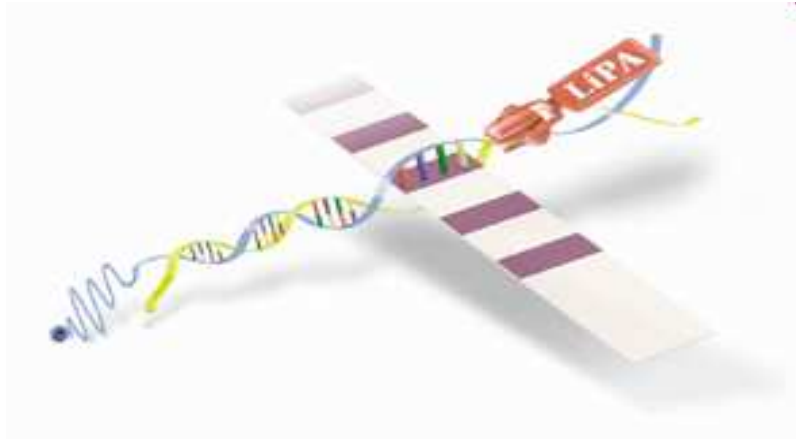
sondes de capture
adsorbées sur le

1/ **Adsorption** de l'acide
nucléique par sonde de capture

2/ **Détection** à l'aide de sondes
ramifiées sur lesquelles
s'hybrident des sondes de
révélation portant des molécules
luminescentes

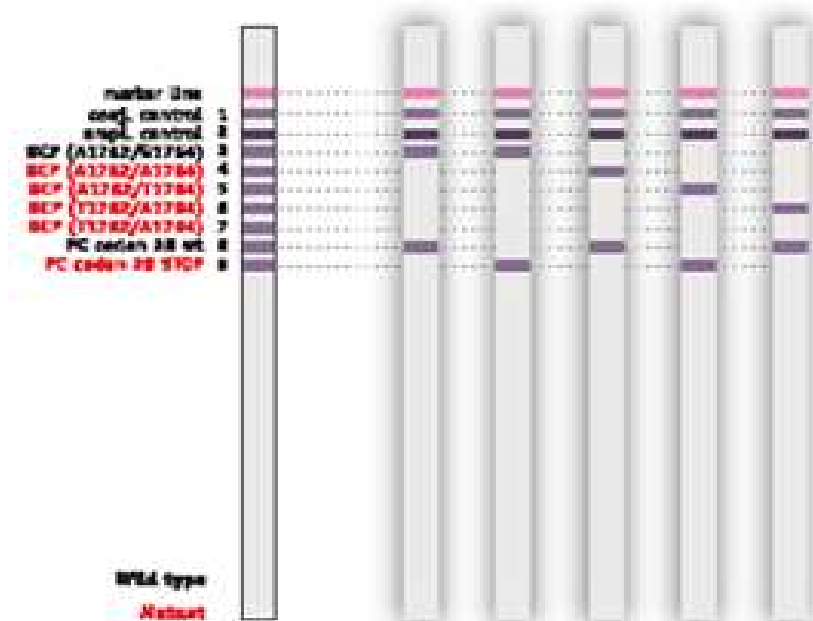
Le signal luminescent est proportionnel au nombre de molécules d'acide
nucléique viral adsorbé

Hybridation sur membrane et puces



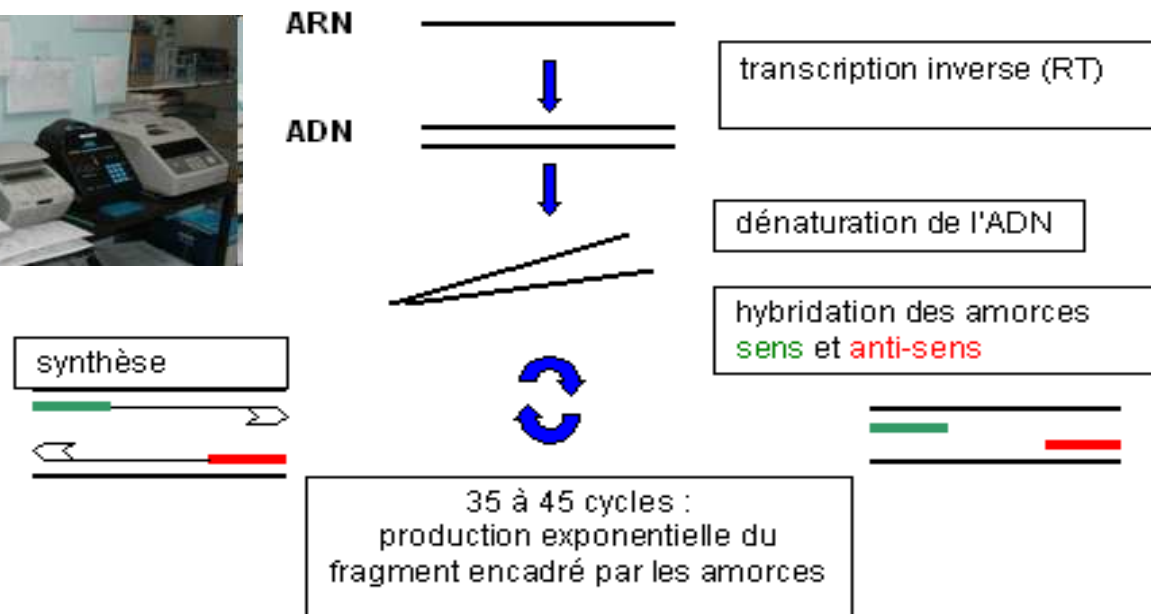
1/ **Hybridation** à des sondes moléculaires fixées sur un support

1/ **Détection immuni-enzymatique**



Puces : multiples sondes adsorbées sur des supports de silice

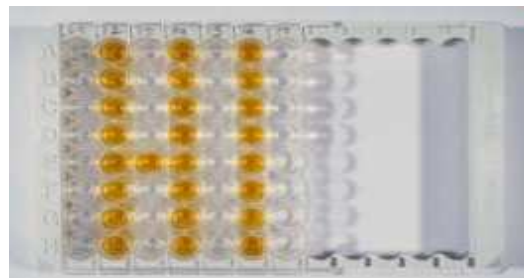
Amplification génique: principe de la PCR



1/ **Amplification génique** +
recopiage d'une portion du
génom viral grâce à des
amorces et à l'action d'une
polymérase



(a)



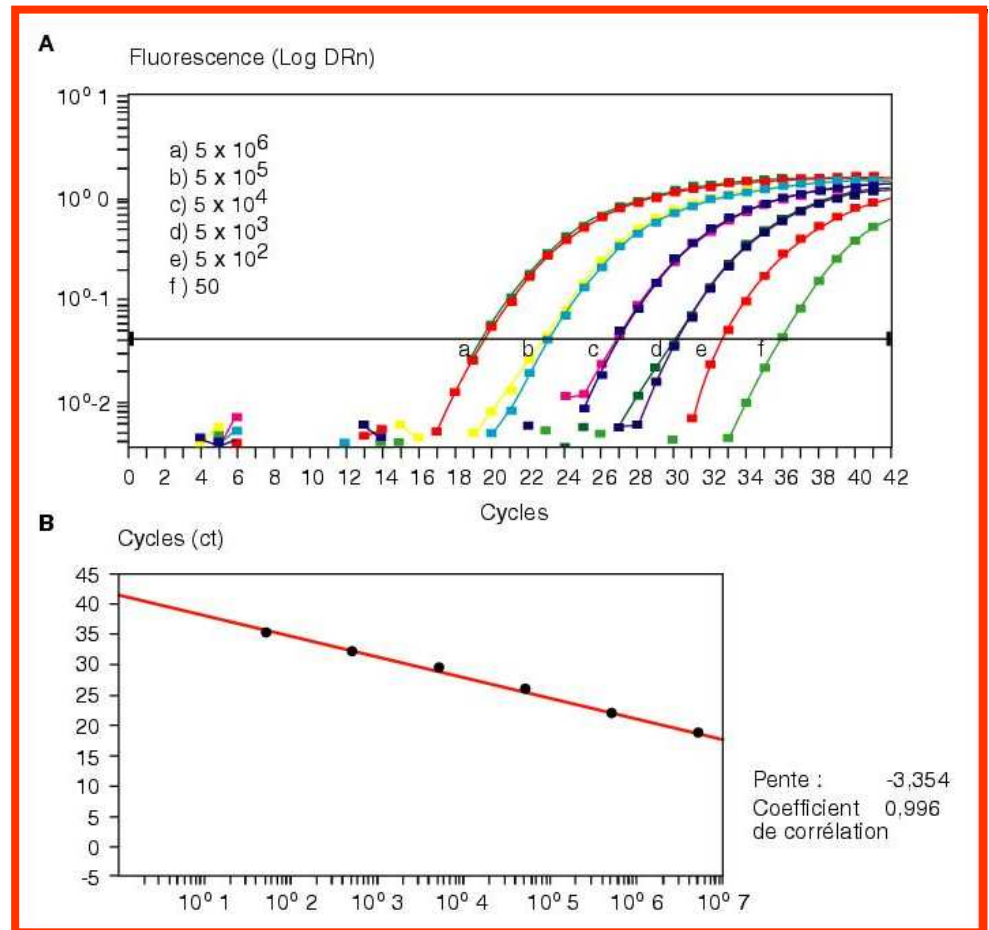
(b)

2/ **Détection** par
électrophorèse en gel
d'agarose ou par
hybridation moléculaire
post-PCR

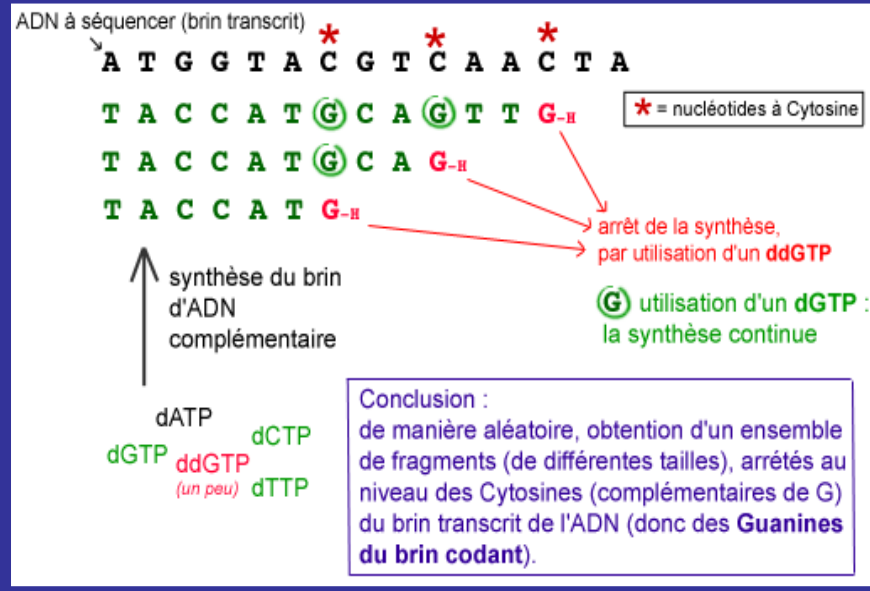
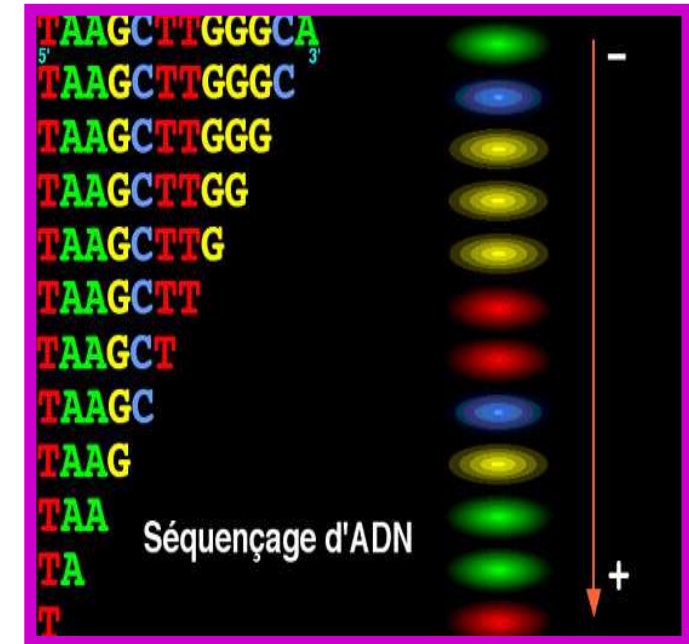
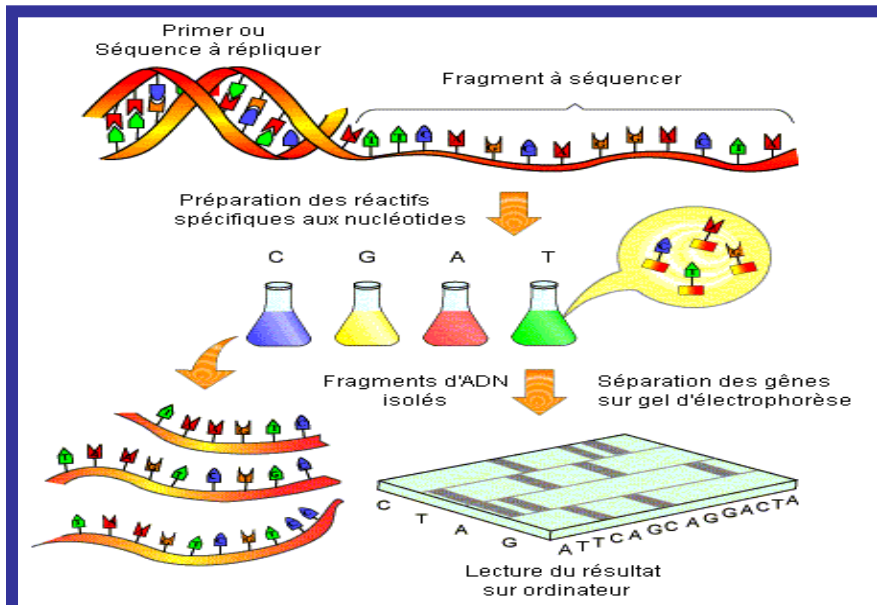
La PCR temps réel



Détection ou quantification de l'ADN pendant la phase exponentielle par incorporation d'une molécule fluorescente (SyBr Green) ou hybridation de sondes spécifiques émettant une fluorescence (sondes à hydrolyse ou sondes de fret)

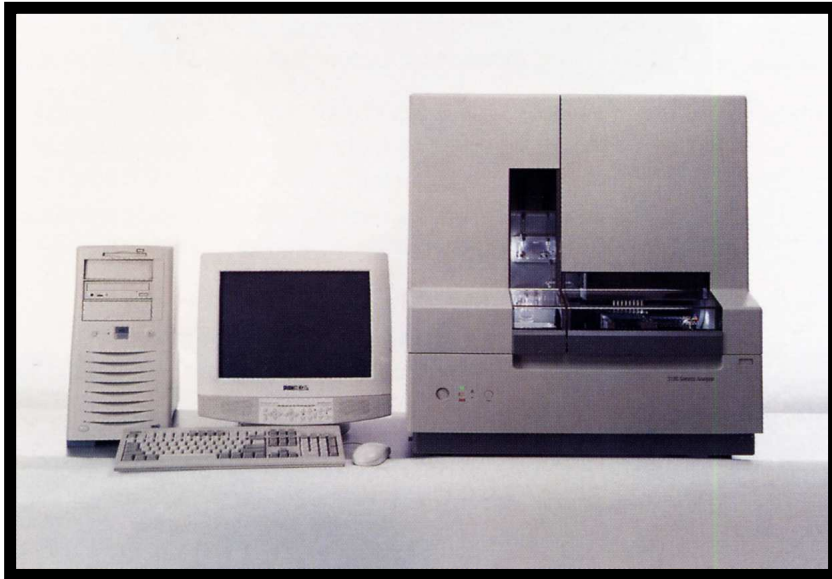


Séquençage nucléotidique



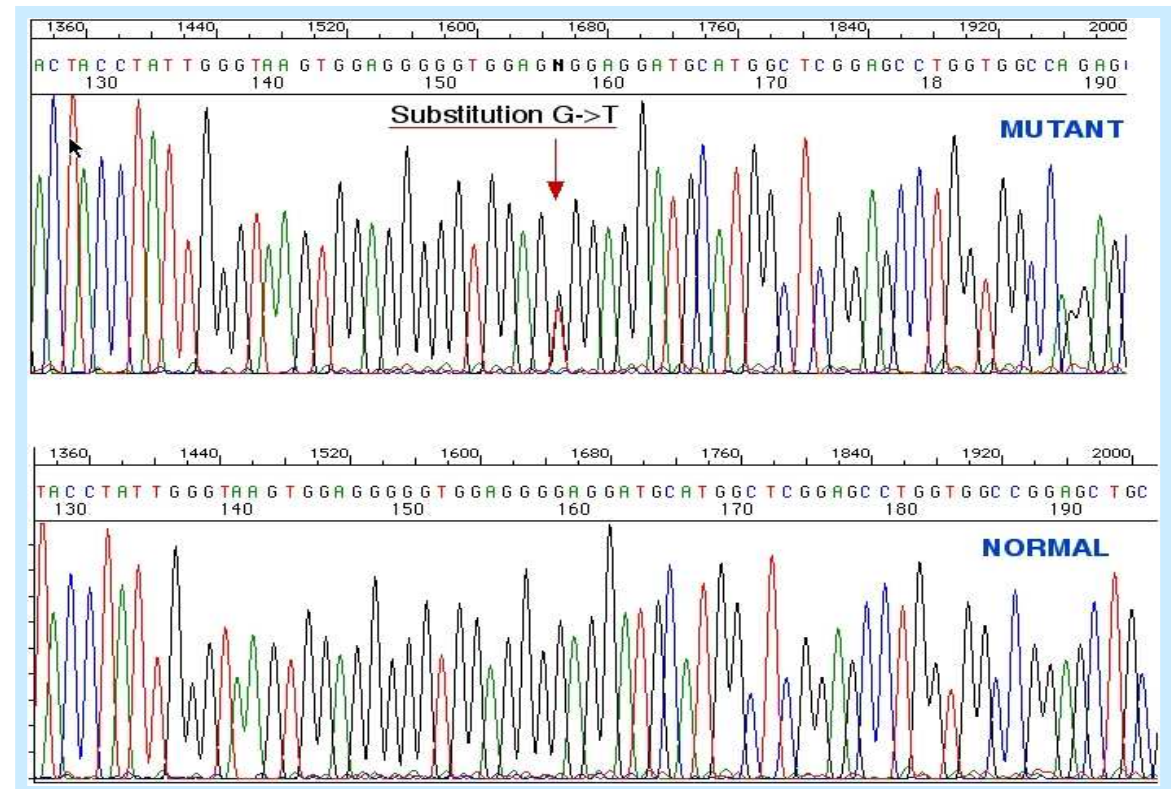
Méthode de Sanger

Séquençage automatique



Le séquenceur permet la détection automatique par électrophorèse du fluorochrome sur les fragments d'ADN formés

Electrophorégramme

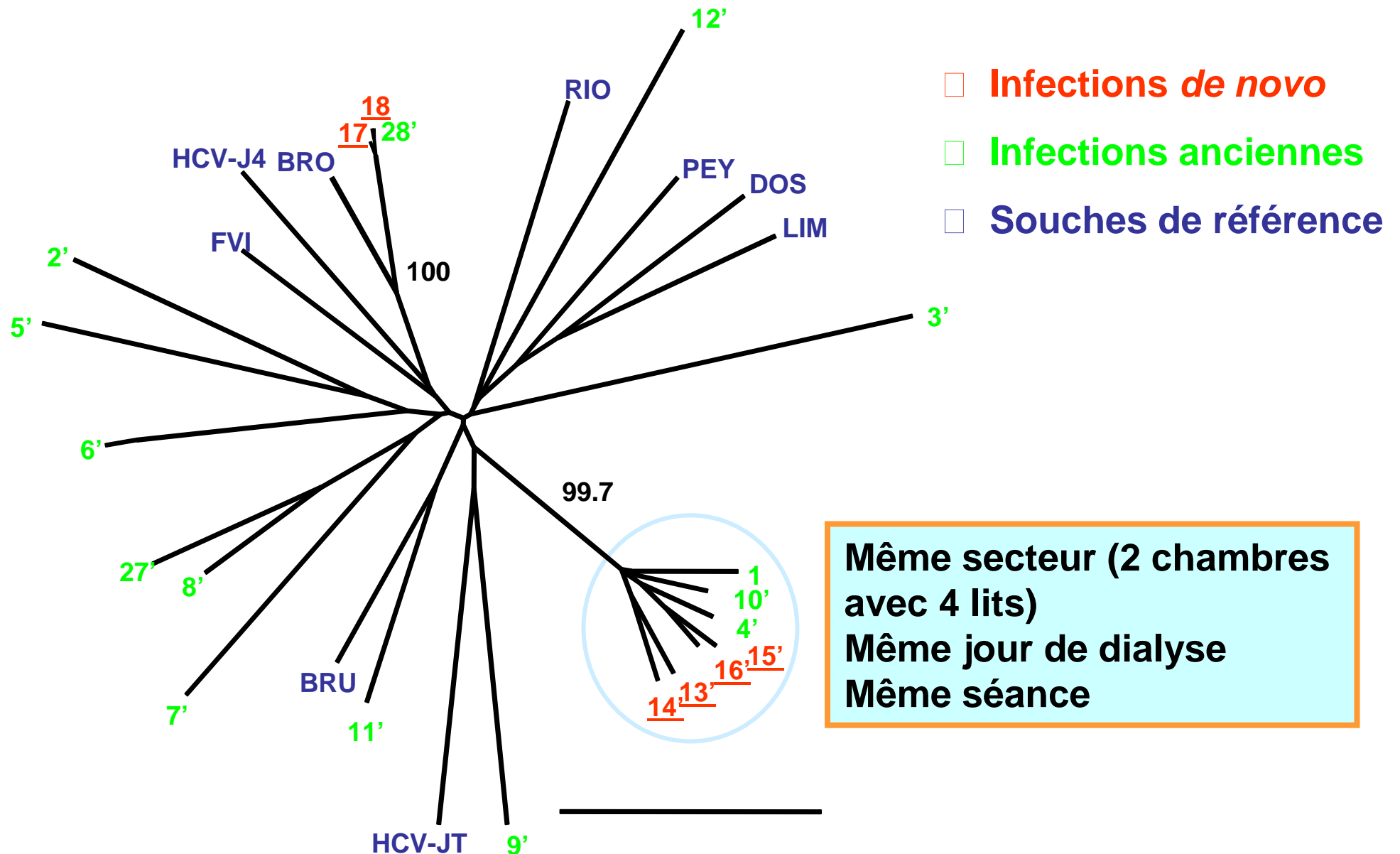


Analyse des séquences

		41	62	67	69	74	103	184	210	215	219
LAI	:	M.....AIKKKDKSTKWRKL.....K.....M.....LRWGLTTPDK									
a-1	:	L	---	N	---	-	-	WK	--FY	---	
a-2	:	L	---	N	D	---	-	-	W	--FY	---
a-3	:	L	---	N	---	-	-	W	--FY	---	
a-4	:	L	---	N	---	V	-	-	W	--FY	---
a-5	:	L	---		---	-	-	W	--FY	---	
b-1	:	-	---		---	-	-		F	---	
b-2	:	-	---	N	---	-	-		F	---	
c-1	:	-	---		---	-	-		F	---	
d-1	:	L	V	---	N	---	N	V	W	--FY	--N
d-2	:	L		---	N	---	N	V	W	--FY	--N

Comparaison à des souches de référence

Analyse phylogénétique



Diagnostic moléculaire : indications

- **Techniques qualitatives** : montrer la présence d'un virus
- **Techniques quantitatives** : suivi des patients traités par des antiviraux (HIV, HBV, HCV, CMV...)
- **Séquençage** :
 - ➔ Caractérisation des génotypes viraux (HCV)
 - ➔ Détection de mutations nucléotidiques associées à la résistance aux antiviraux (HIV, HBV)
 - ➔ Caractérisation du tropisme viral (HIV)
 - ➔ Analyse phylogénétique pour retracer l'origine d'une infection

Diagnostic moléculaire : avantages et limites

Avantages :

- ➔ Grande sensibilité des tests disponibles
- ➔ Automatisation +++
- ➔ Délai raccourci de rendu de résultat (urgences)

Limites :

- ➔ Absence de preuve du caractère infectieux du virus
- ➔ Equipements et personnels expérimentés
- ➔ Coût relativement élevé

Institut Fédératif de Biologie de PURPAN

perspective depuis le bâtiment Lefèvre



















