

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

Dr W. Mezaghcha
Faculté de médecine de Sétif
Cours de microbiologie
2^e année médecine dentaire
Année 2019-2020

Il existe 02 méthodes:

- **Diagnostic direct:** détection du virus lui-même ou un de ses composants. (génomme, antigènes)
- **Diagnostic indirect:** mise en évidence de la réaction immunitaire humorale.

Diagnostic direct

MISE EN EVIDENCE DU VIRUS OU UN DE SES COMPOSANTS

Technique rapide

Microscopie
électronique

Isolement
du virus

Détection
d'antigènes
viraux

Détection
du génome

★ SUR ANIMAUX
VIVANTS
★ ŒUFS EMBRYONNE
★ CULTURE CELLULAIRE

★ ELISA
★ AGGLUTINATION
★ IFD

★ HYBRIDATION
SANS
AMPLIFICATION
★ HYBRIDATION
AVEC
AMPLIFICATION

Les prélèvements

- **Sang: virémie**
- **Selles: entérovirus, virus polio**
- **Prélèvements respiratoire: écouvillonnage nasal**
 - aspiration bronchique
 - lavage broncho-alvéolaire
 - Paramyxovirus, adénovirus
- **Les urines: CMV, rubéole**
- **Prélèvements cutanées: vésicules (HSV, VZV)**
- **LCR: HSV**
- **Prélèvements oculaires: par écouvillonnage conjonctival**
 - conjonctivite (adénovirus), kératite (HSV, VZV)
- **Liquide amniotique (CMV, VZV)**

- Les virus sont **fragiles**, sont présents dans des cellules infectées (risque de lyse et de mort)
- Le transport vers le laboratoire, doit être **rapide**
<1 h
- Si non conservation à **+4° quelques heures**
(glacière et icebox)
- Ou à **-80° > 36 heures**

I/ Isolement du virus

1- Isolement sur culture cellulaire

- **Systemes de cellules vivantes cultivées in vitro**
- **Pas de système cellulaire universel**

03 types de cellules

- **Cellules de culture primaire:** Issues d'organes frais: Leur durée de vie est limitée a quelques passages.

Exp: Cellules de rein de singe.

- **Cellules de culture secondaire:** Peuvent supporter 50 passages.

Exp: Fibroblastes humains d'origine embryonnaires (MRC5)

- **Lignées continues:** Cellules cancéreuses: Cellules immortelles.

Exp: Cellules HELA (cellules du cancer du col de l'utérus)

- Production de modifications morphologiques

ECP

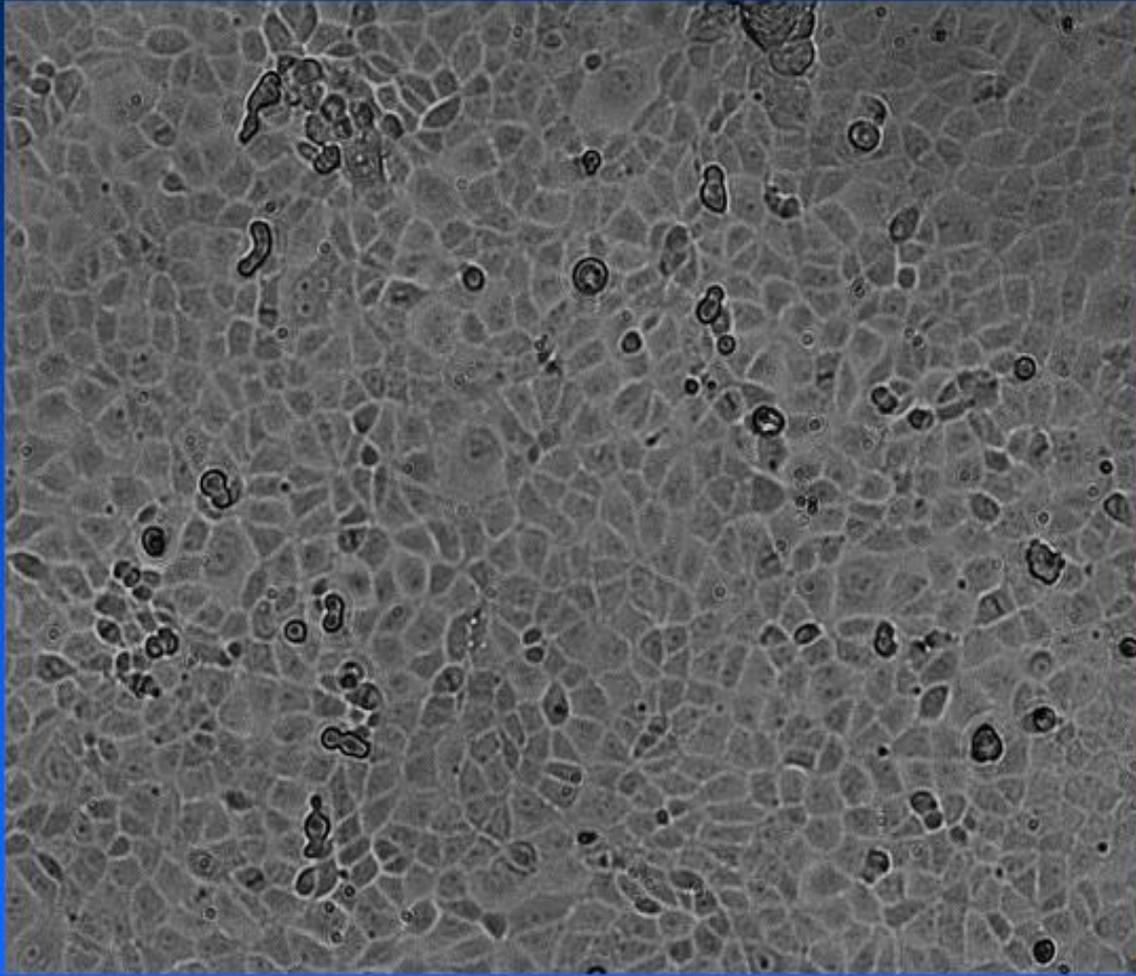
- Aspect de l'ECP est évocateur de tel ou tel virus
- ✓ **Ballonisation: HSV**
- ✓ **Arrondissement des cellules avec inclusions cytoplasmiques refoulant le noyau vers la périphérie: (entérovirus)**
- ✓ **Formation de syncytia: virus de la rougeole**
- **→ ECP (effet cytopathique): diagnostic d'orientation**

MANIPULATION DES VIRUS

(poste de travail)



Les cellules



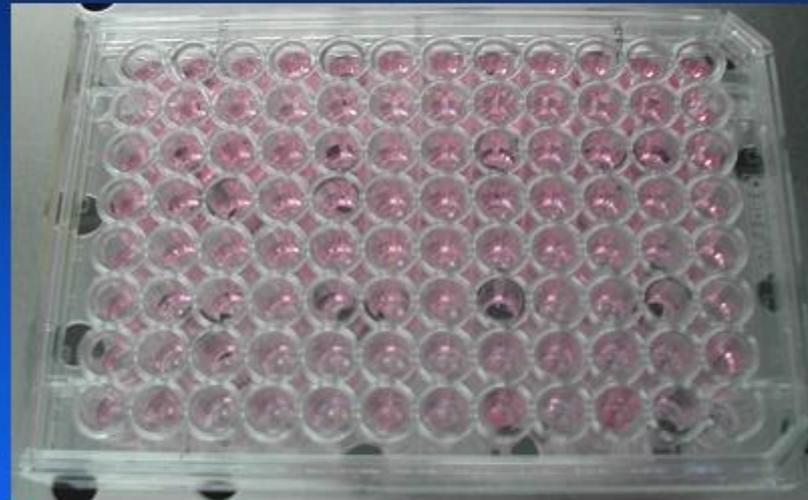
Les supports



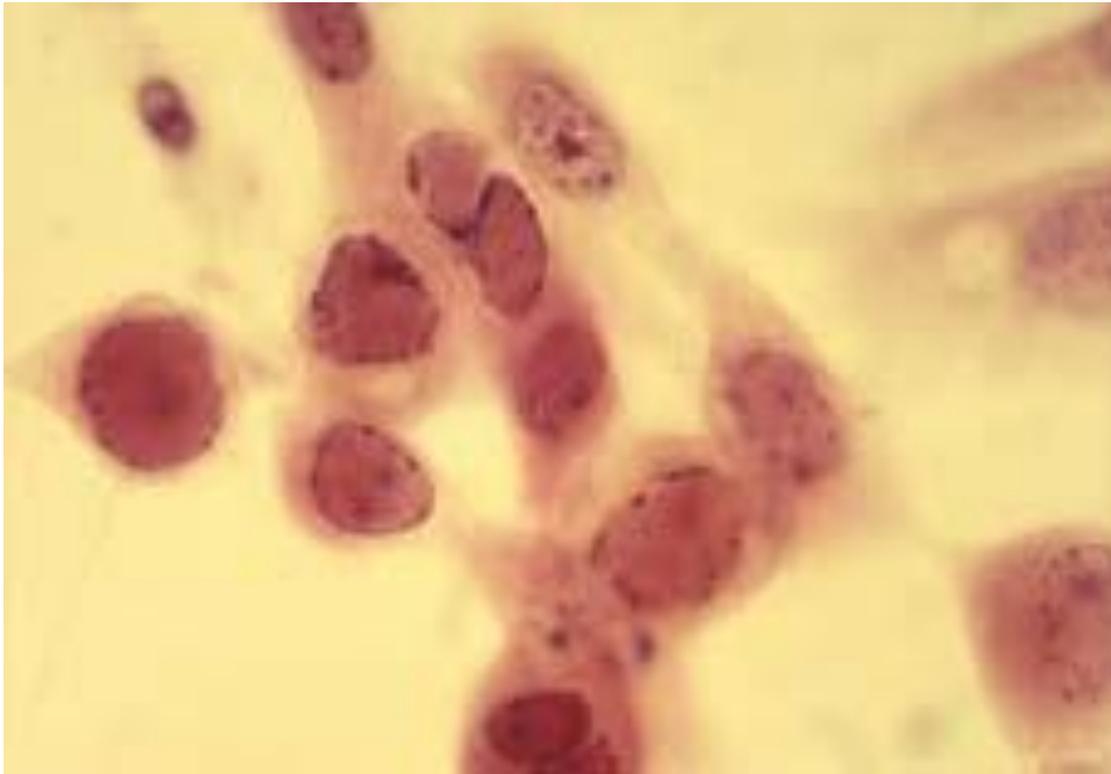
Supports de cultures cellulaires



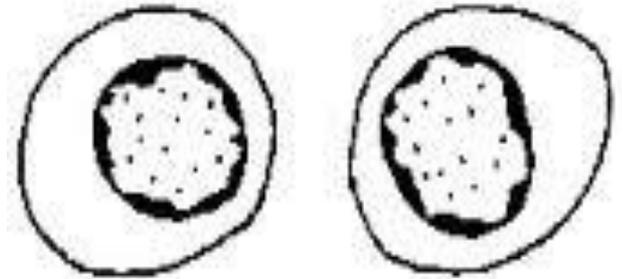
Plaque de 6 puits



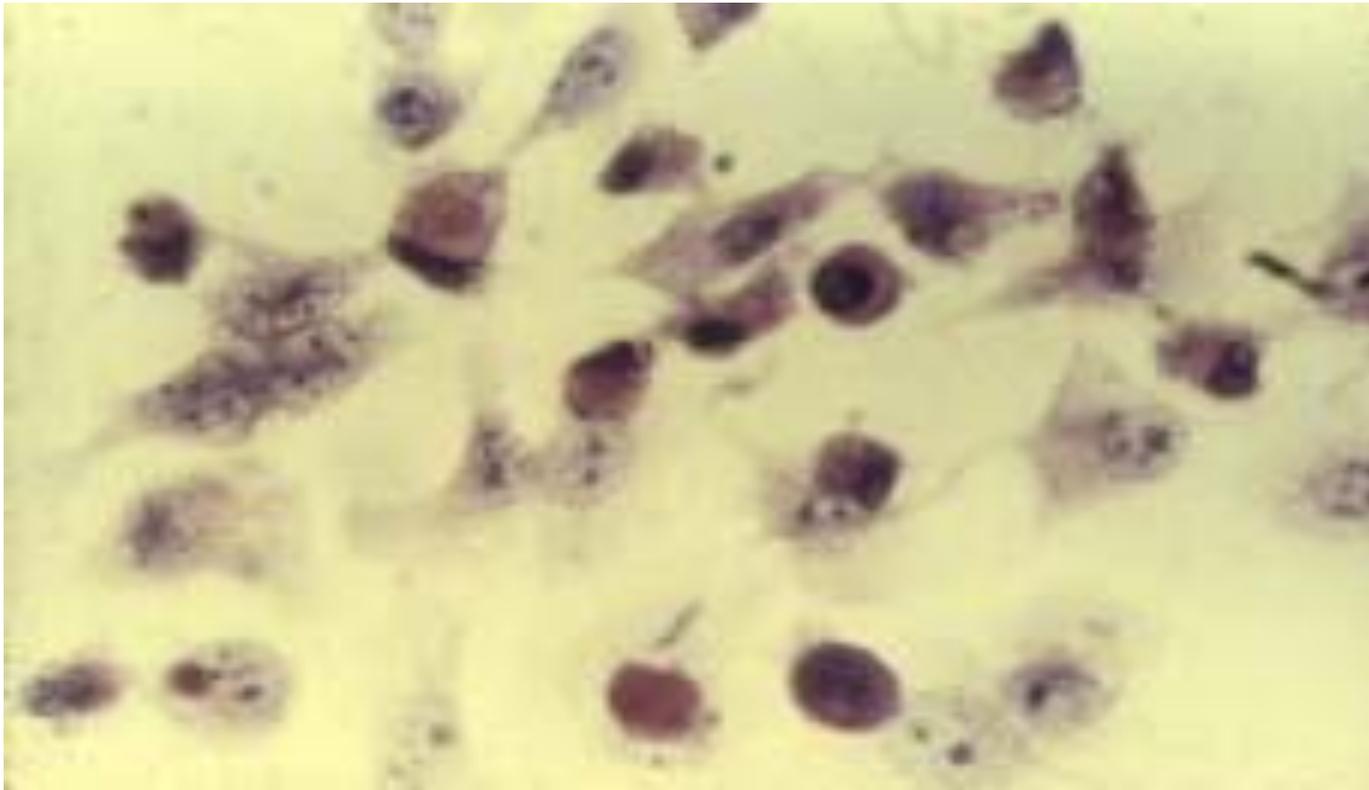
Plaque de 96 puits



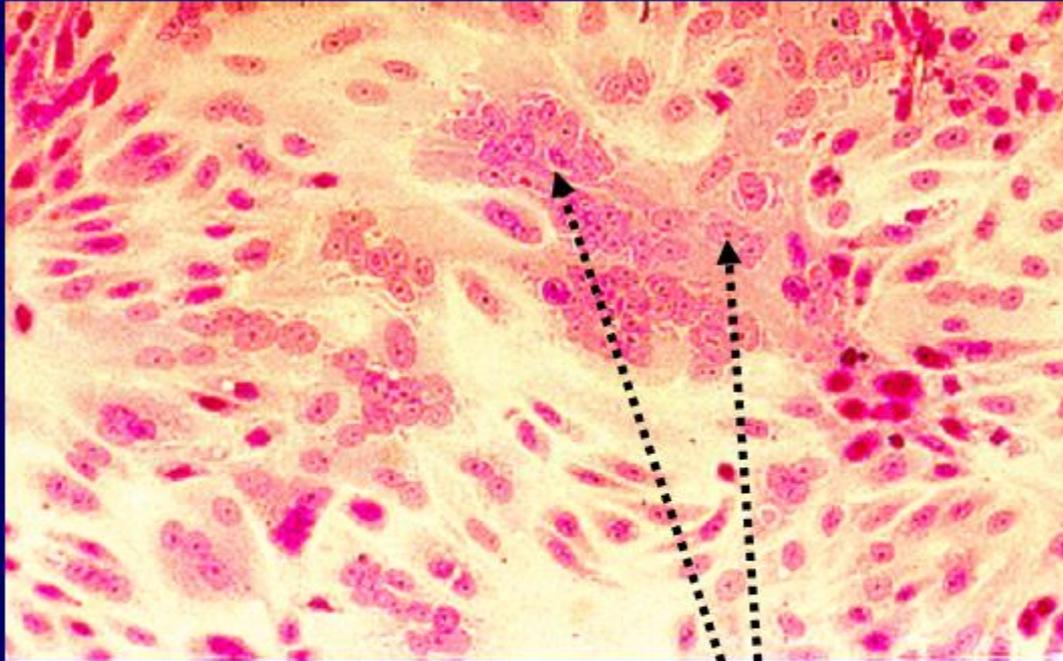
Effet cytopathogène des virus de l'herpès
(margination de la chromatine)



Coloration cellulaire montrant les particularités de cet ECP : disparition des nucléoles, chromatine éclatée sur les bords de la membrane nucléaire, inclusions nucléaires fortement colorées.



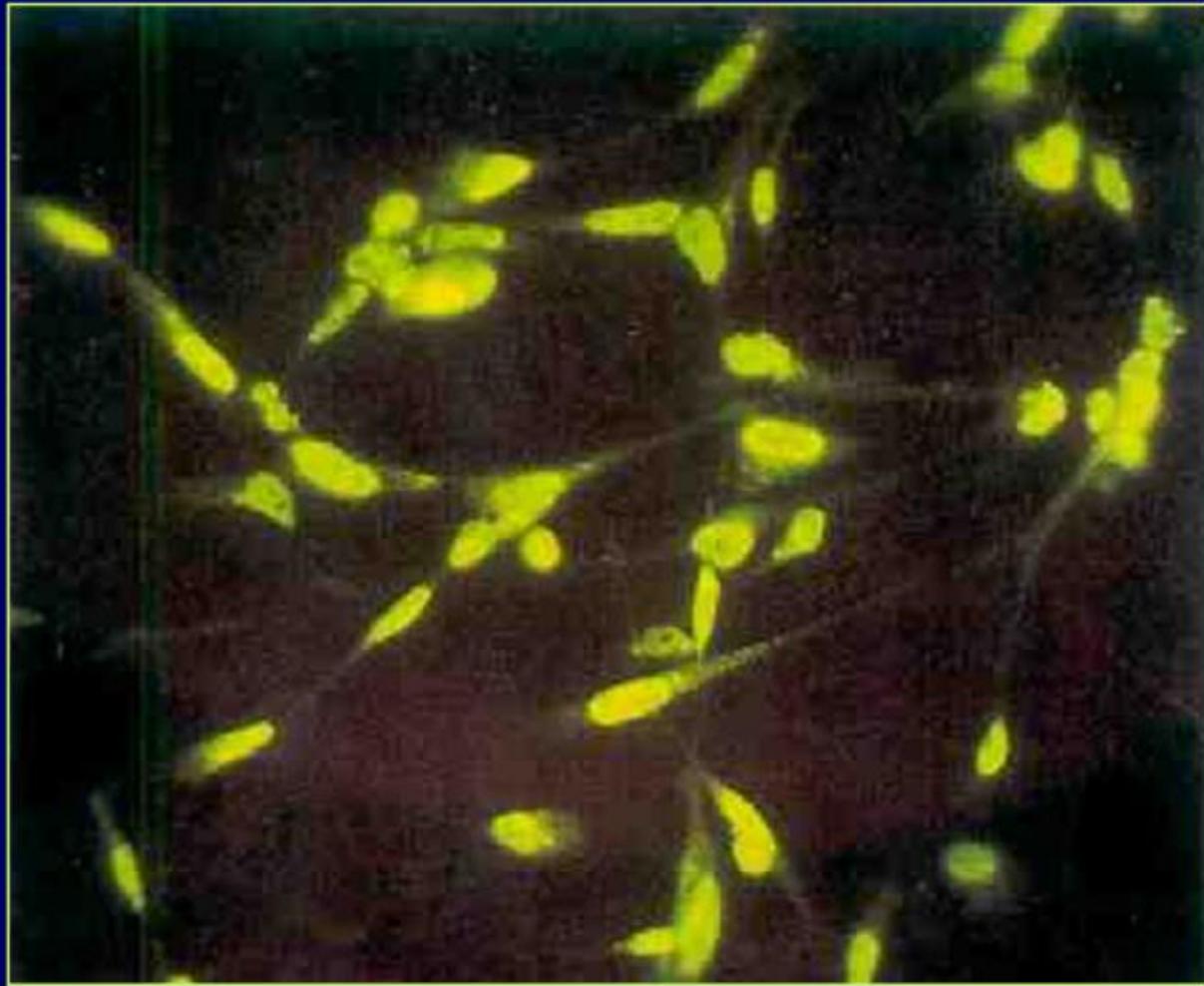
Par comparaison, ECP caractéristique d'une culture d'entérovirus : inclusions intracytoplasmiques et noyau hyperdense repoussé en périphérie de la cellule.



Formation de syncytia

Culture de virus respiratoire syncytial

- **La confirmation** fait appel à des méthodes immunologiques:
- **IF ou ELISA: par des Ac monoclonaux spécifiques**
- **Séroneutralisation avec des antisérums:**
 - ✓ inhibition de l'ECP virus cytopathogènes
 - ✓ inhibition de l'hémagglutination virus hémmagglutinants

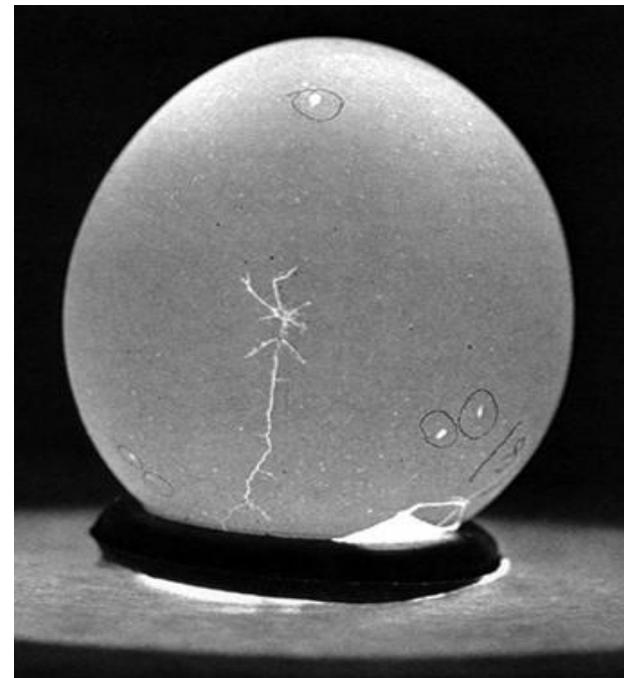
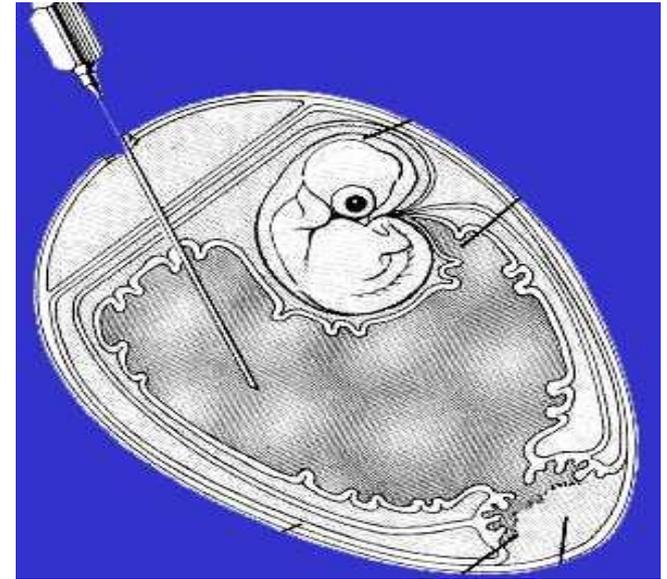


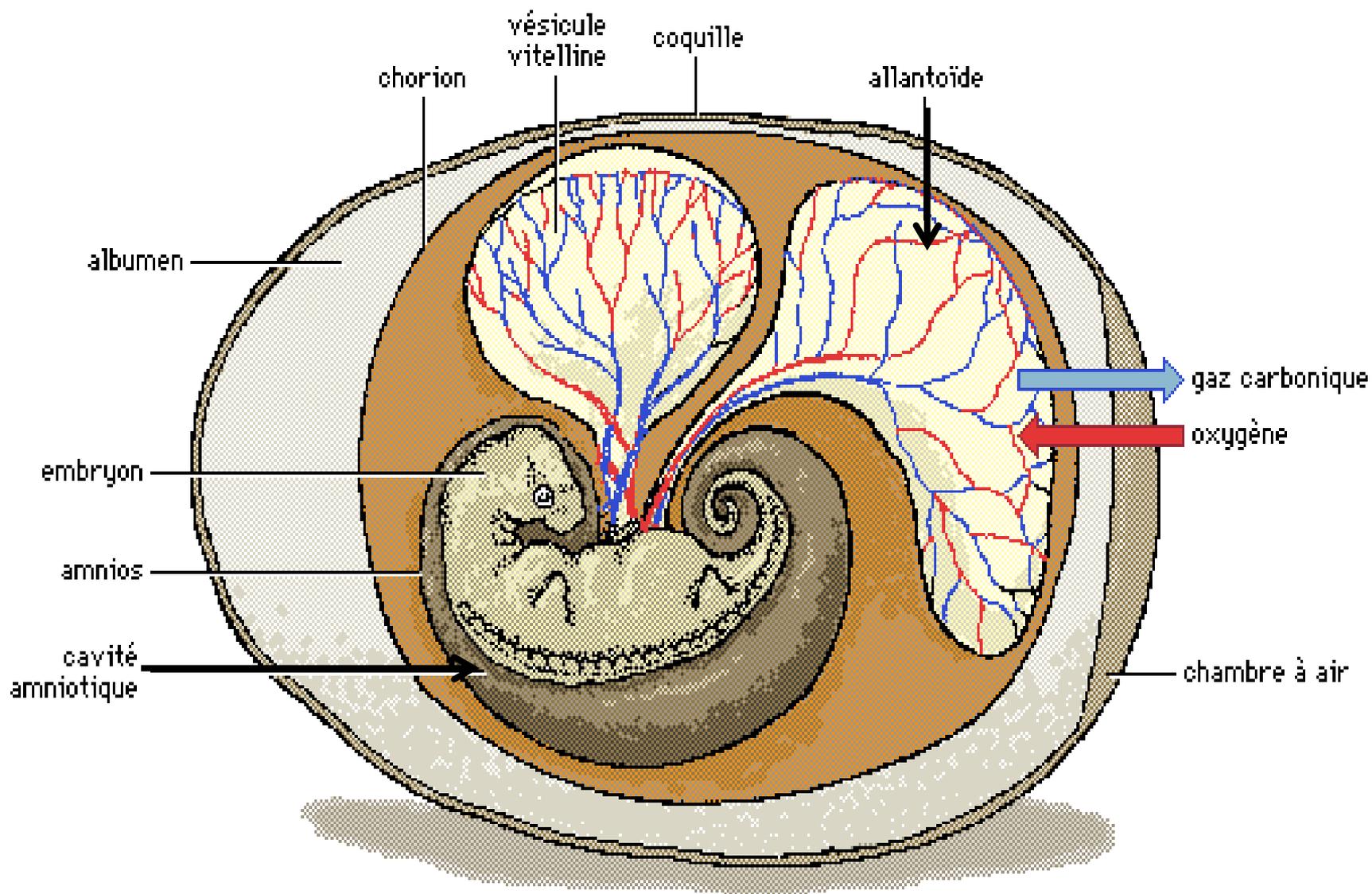
**Culture de virus grippal sur cellules MDCK
Révélation par immunofluorescence**

2/ Isolement sur œuf de poule embryonné

- **Virus de la grippe**
- Inoculation du prélèvement à des œufs embryonnés de 8 à 11j au niveau de la cavité amniotique ou allantoïque.
- Recueil du liquide après 72 h et détection par une réaction d'hémagglutination
- **Intérêt: production des vaccins**

Œufs de poule embryonné





3/ inoculation à un animal sensible

- Certains virus ne peuvent être isolés que sur animaux
- Exemple: coxsackievirus A injecté chez des souris nées → paralysie + mort

Isolement: technique laborieuse et fastidieuse

Avantages

- m.e.e virus Etude
- Sensibilité + + + +

Inconvénients

- Qualité du pvt (transport et conservation)
- Technique longue et couteuse
- Viruspas d'ECP
- Virus non cultivable

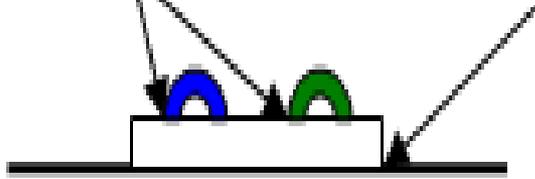
II/ détection des Ag viraux

- Directement dans le prélèvement grâce à des Ac monoclonaux spécifiques
- Le principe:
virus (prélèvement) + Ac spécifique → Réaction
- Méthodes:
 - ✓ Immunofluorescence
 - ✓ ELISA
 - ✓ Agglutination: +++ rapidité exp:
rotavirus dans les selles

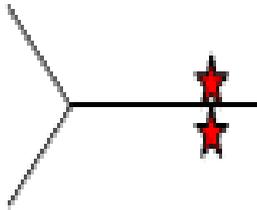
☀ Immunofluorescence directe.

Ag différents

cellules infectées



+ Ac



Lavage

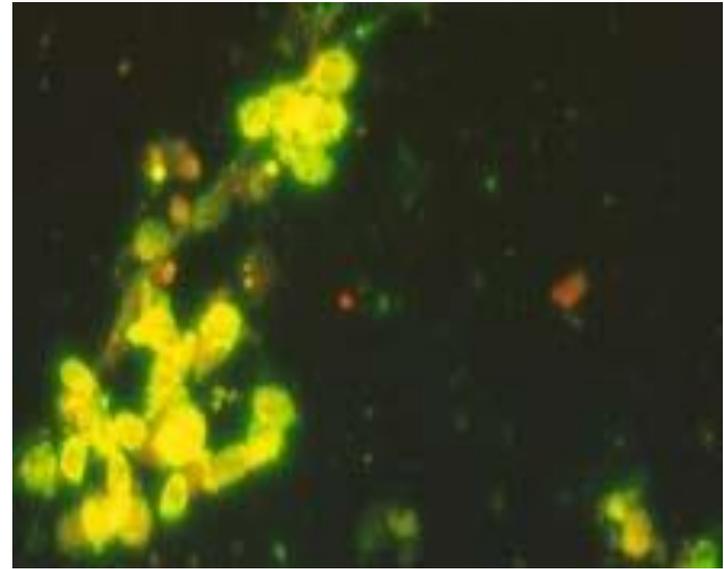
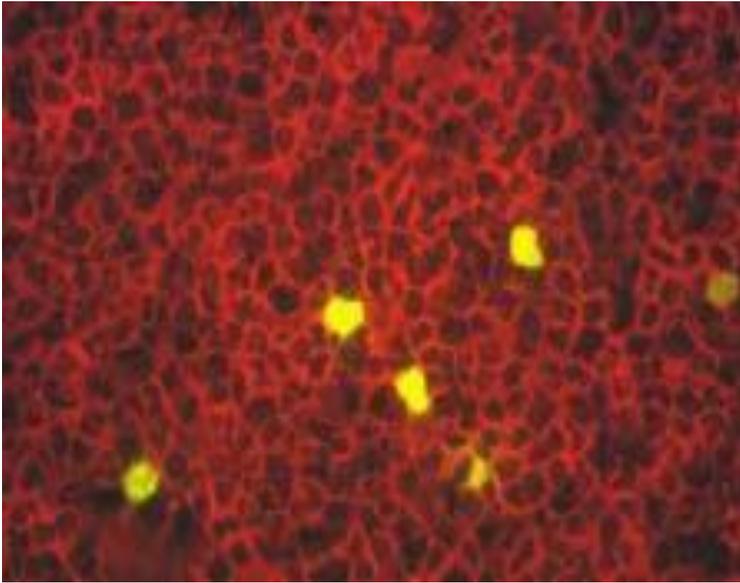


Passage dans un microscope à fluorescence.

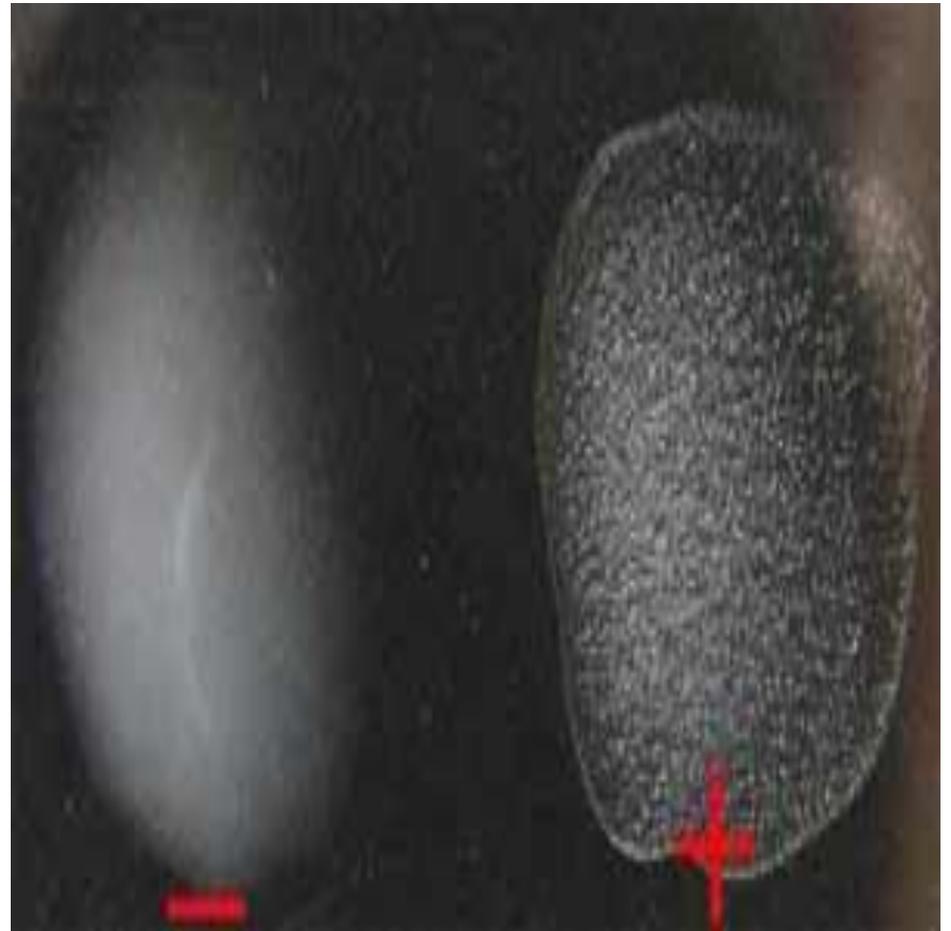
☀ Ag fixé sur lame + AC spécifique de l'Ag couplé à un fluorochrome.

☀ Lecture au microscope à fluorescence.

Ex: virus de la rage
virus respiratoires (grippe, VRS)

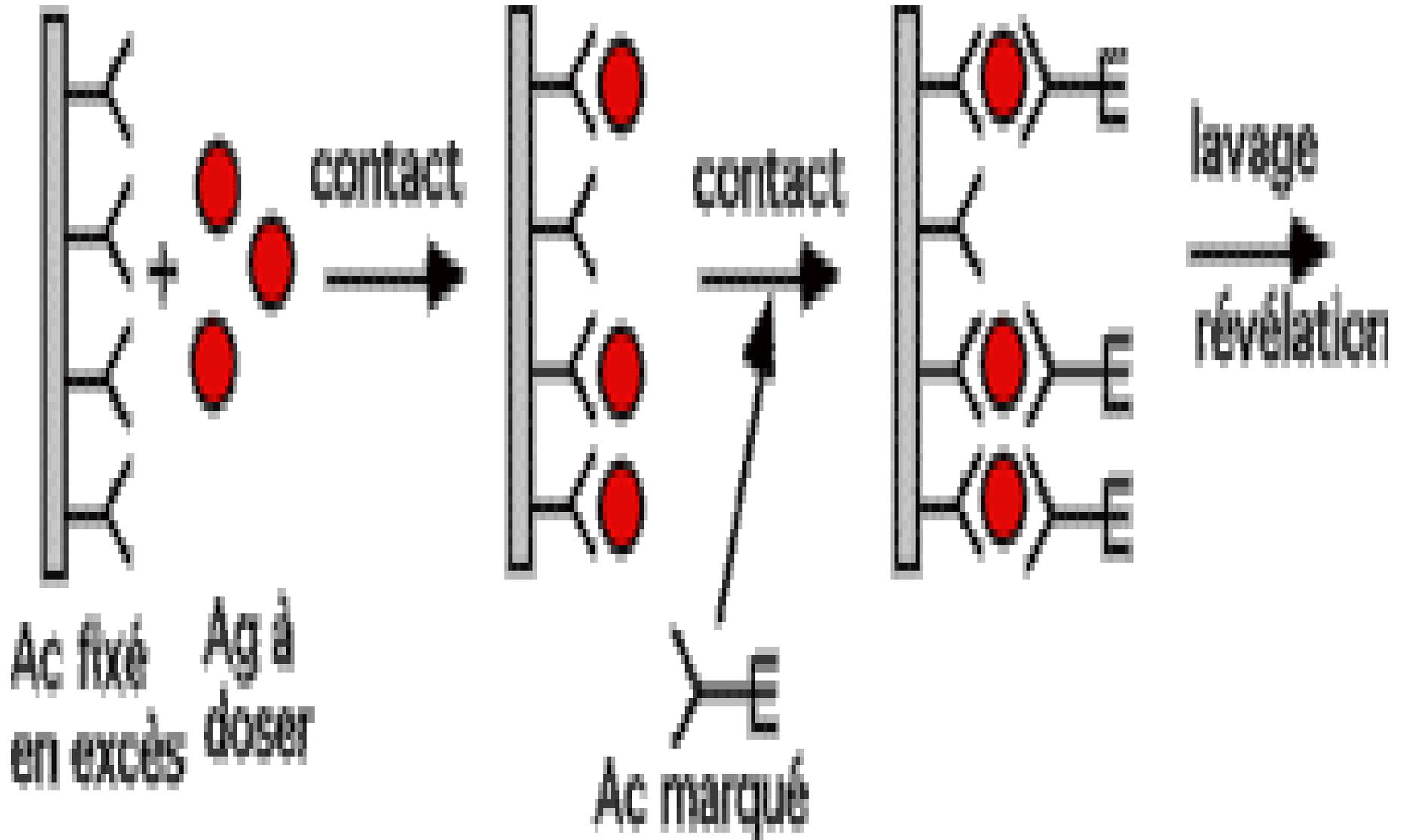


Immunofluorescence



**Test d'agglutination pour la recherche de
Rotavirus dans les selles**

ELISA DIRECTE



Aspect d'une plaque de réaction ELISA



- linked- immuno-sorbent-
Assy production d'une
réaction colorée
proportionnelle à la
quantité d'antigènes
contenus dans le
prélèvement

III/ Recherche du génome viral

- **prélèvements: sang, LCR, liquide amniotique**
- **Principe: m.e.e du matériel génétique ADN ou ARN**
- **biologie moléculaire: quantitative, qualitative**
- **02 techniques: hybridation et amplification**

Hybridation

- Utilisation de séquences nucléotiques (complémentaires à des séquences connues et stables du virus recherché), marquées (chimique, Rx actif) = **sonde**
- Matériel génétique du virus étudié + sonde si Rt + Radio activité ou révélation chimique

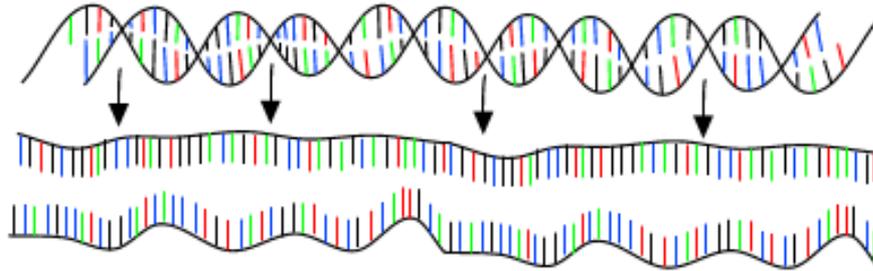
Amplification

- **PCR** (polymérase chaîne réaction) ou réaction de polymérisation en chaîne, très utilisée
- Extraction de l'ADN ou de l'ARN viral
- Amplification c.a.d production de plusieurs copies du génome
- + bases + enzymes
- Révélation par électrophorèse en gel d'agarose

- Chaque cycle de PCR comporte une étape de dénaturation de l'ADN, une étape d'hybridation des amorces, puis une étape de synthèse de l'ADN, étapes réalisées dans un thermocycleur par trois changements successifs de température (ex : 94°C, 60°C, 72°C).

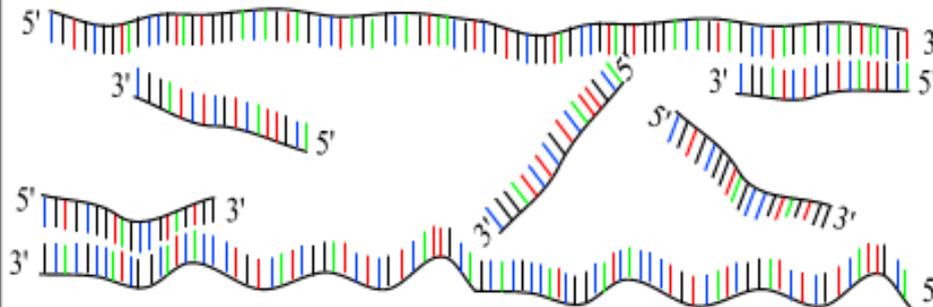
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

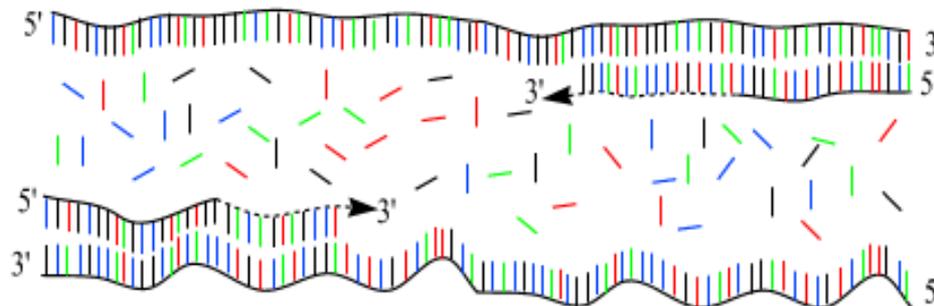
1 minut 94 °C



**Step 2 : annealing
hybridation**

45 seconds 54 °C

**forward and reverse
primers !!!**



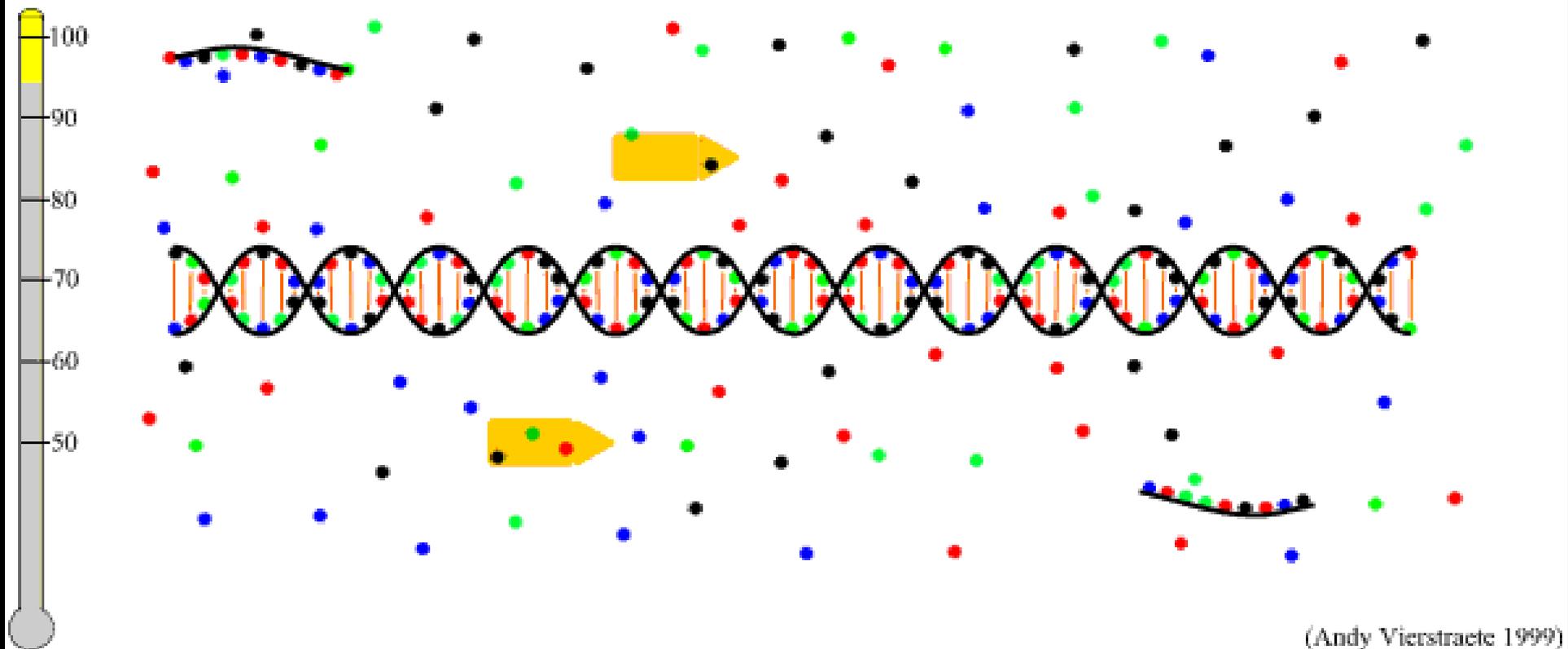
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

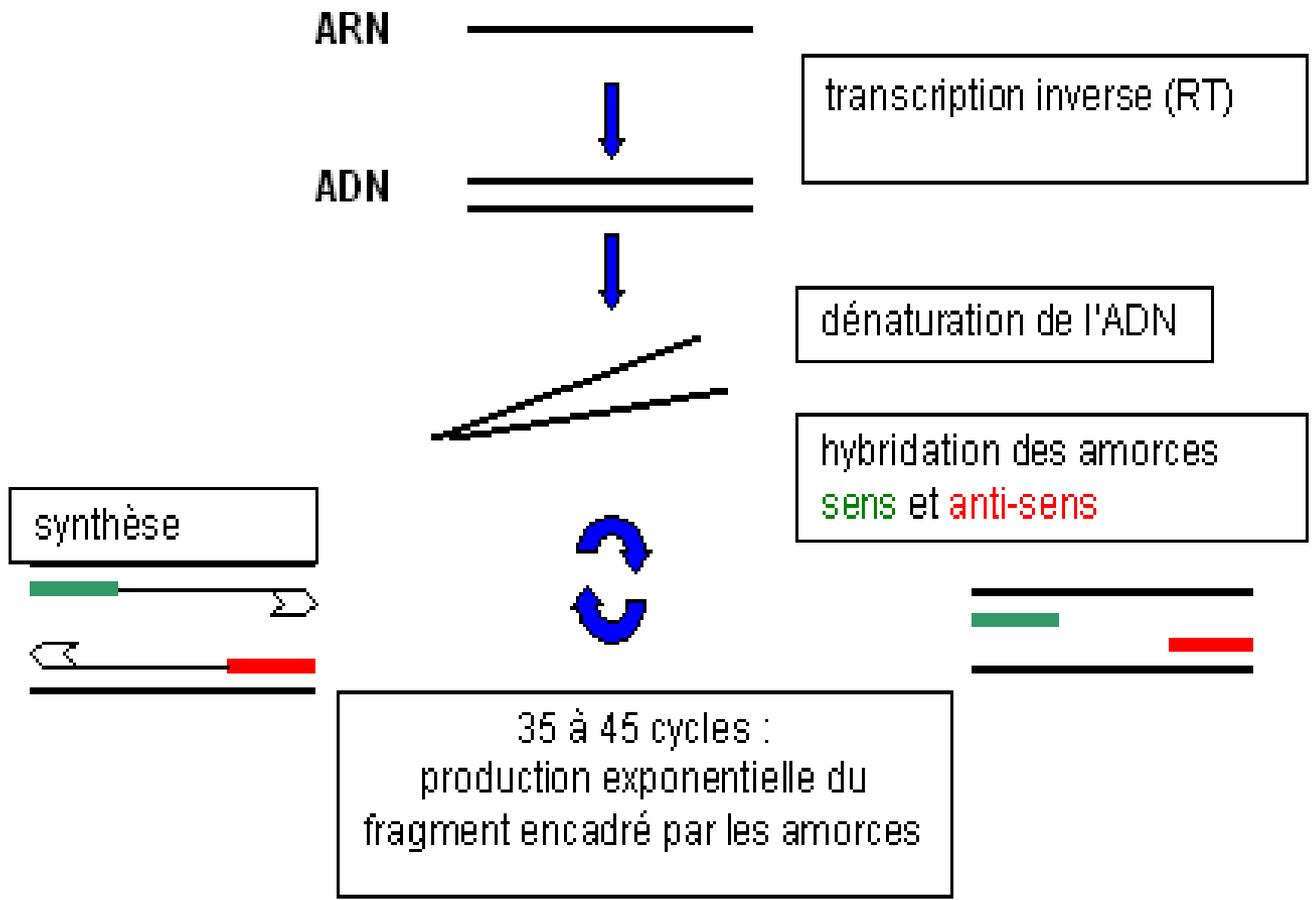
only dNTP's

Principe de la PCR

PCR : Denaturation 94°C



Pour amplifier l'ARN, une étape préliminaire de transcription inverse en ADN est indispensable avant la PCR ; elle est réalisée in vitro grâce à l'action d'une transcriptase inverse (d'origine aviaire ou murine).





Gel d'agarose après PCR et électrophorèse. Le gel est photographié sous lumière UV. Les signaux positifs apparaissent sous l'aspect de bandes claires nettes (flèche). Le résultat n'est interprétable que s'il existe des témoins positifs (la réaction a fonctionné) et un témoin négatif (il n'existe pas de contamination).

- **Inconvénient majeur: la contamination**
faux +



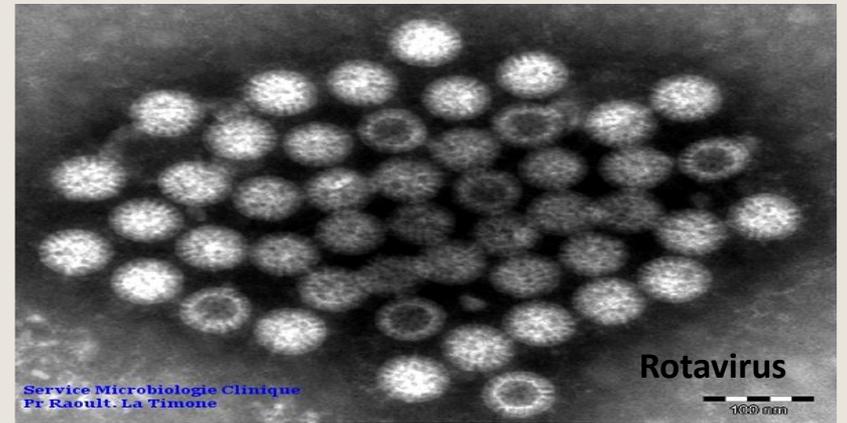
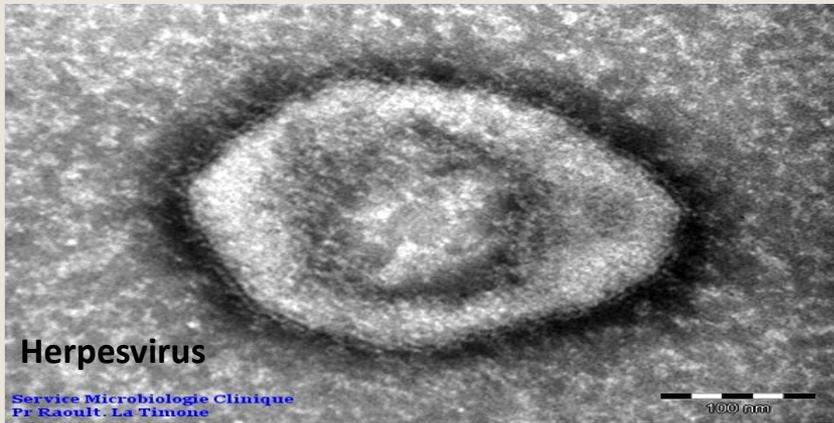
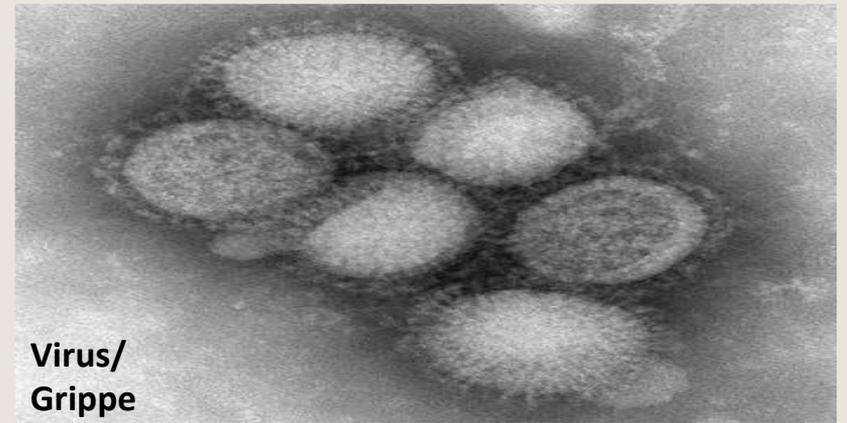
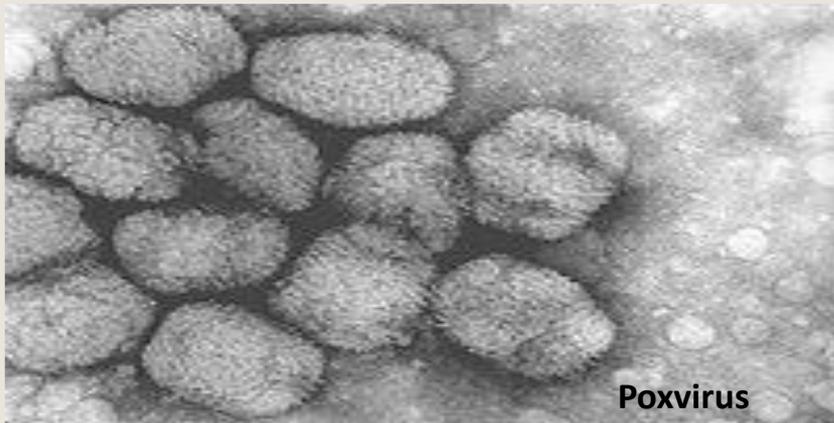
- **Avantages: -sensibilité**
-rapidité



IV/ Microscopie électronique

- **Morphologie du virus , image caractéristique**
- **Exp: rotavirus (forme de roue)**
coronavirus (forme de couronne)
- **+++ nouveaux virus**

ME: DETECTION DU VIRUS ENTIER



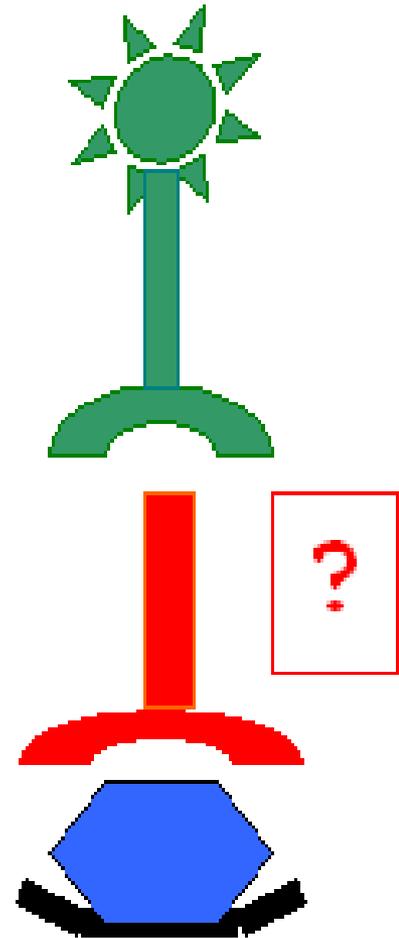
DIAGNOSTIC INDIRECT

- Rechercher le témoin de l'infection virale: les Ac antiviraux spécifiques
- +++ dans certaines infections: HIV, HBV, HCV, rubéole
- Rechercher les AC dans le **sang++++**, parfois autres compartiments (LCR, liquide articulaire)
- Les anticorps: **IgG++++**, parfois **IgM** (primoinfection rubéole), rarement **IgA** (EBV)

Le diagnostic sérologique:

- **Confirme une infection récente**
- **Témoigne d'une infection ancienne (rubéole, Hte A)**
- **Témoigne d'un titre vaccinal protecteur (hépatite B)**
- **Prouver que le sujet est porteur du virus (HIV) ou est susceptible de présenter des récurrences (CMV, EBV, HSV)**

Principe de la réaction ELISA





Aspect d'une plaque de réaction ELISA en fin de manipulation : les puits fortement colorés correspondent à des sérums positifs pour la réaction ELISA. La lecture automatisée des densités optiques est réalisée sur un spectrophotomètre.

- **Immunofluorescence:**

m.e.e du complexe (Ac-Ag) par des Ig humaines * par un fluorochrome fluoresceine

- **Inhibition de l'hémagglutination:** pour les virus possédant une hémagglutinine

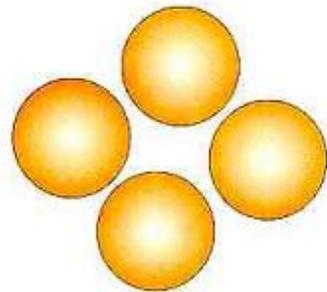
Principe: inhiber une fonction propre du virus (hémagglutination)

Ag (utilisé) + sérum du patient + GR:

Rt - : Ag-GR: hémagglutination

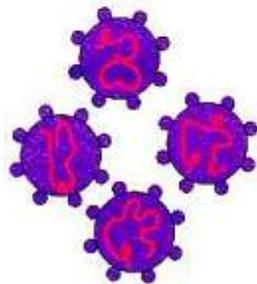
RT+: Ag-Ac: GR sédimentation

Inhibition de l'hémagglutination (IHA)

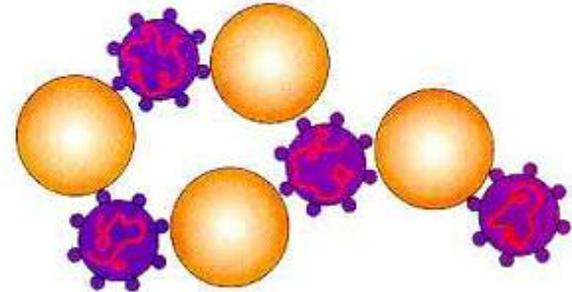


Hématies

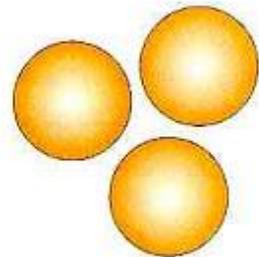
+



Virus hémagglutinant

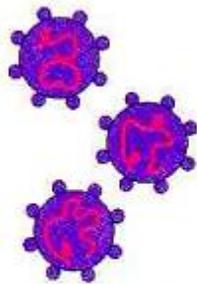


Hémagglutination



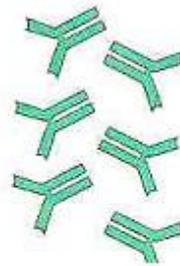
Hématies

+

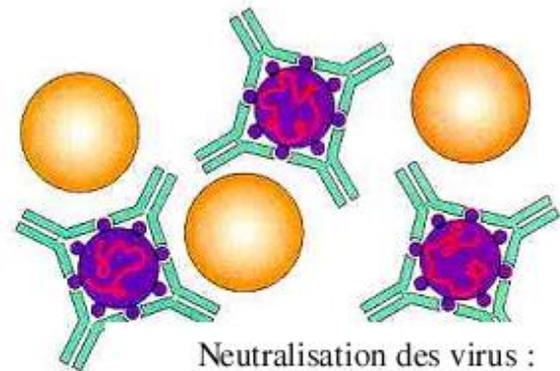


Virus hémagglutinant

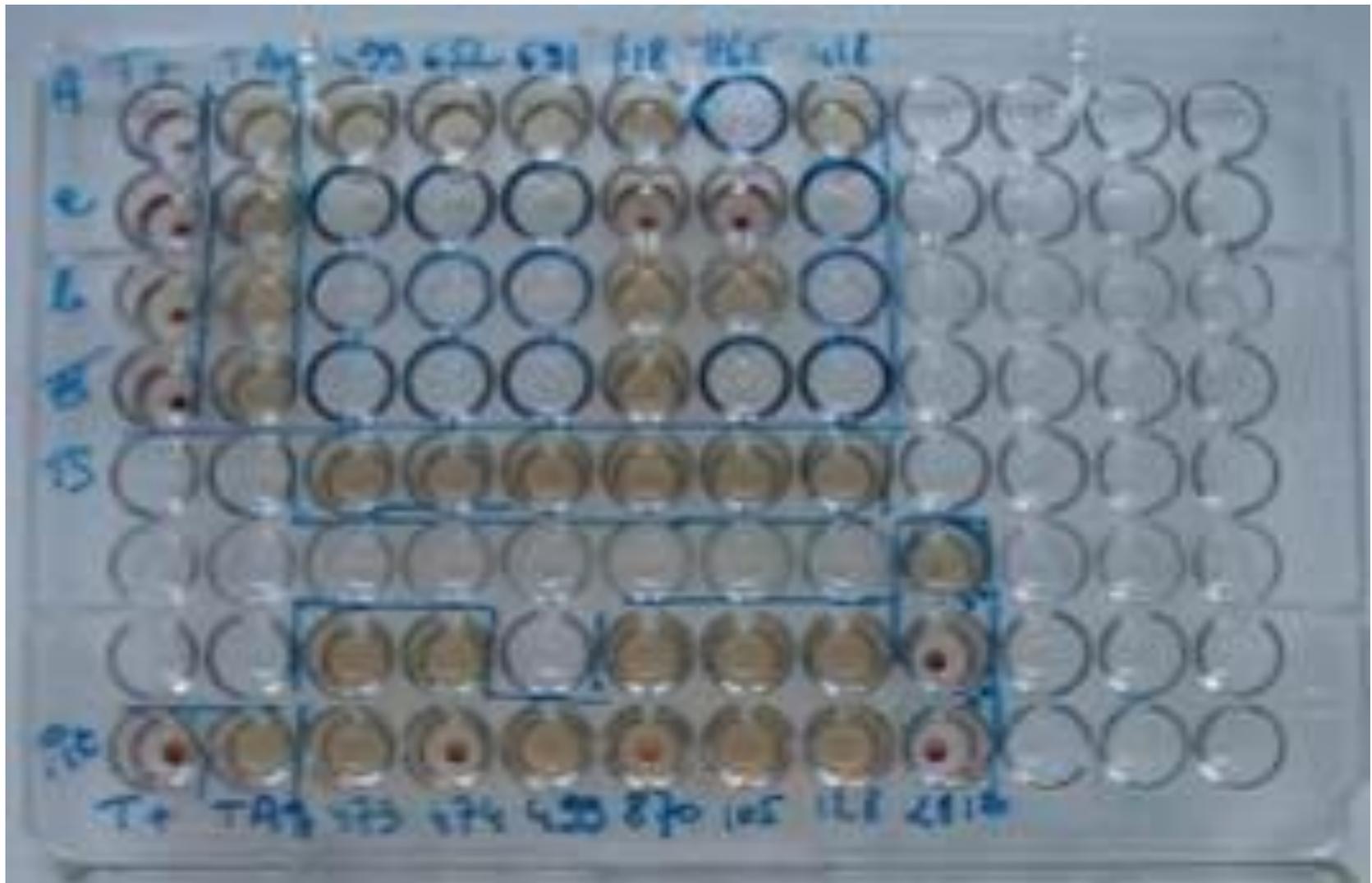
+



Anticorps anti-virus hémagglutinant



Neutralisation des virus :
inhibition de l'hémagglutination



- **Neutralisation de l'ECP pour les virus lytiques exp poliovirus**

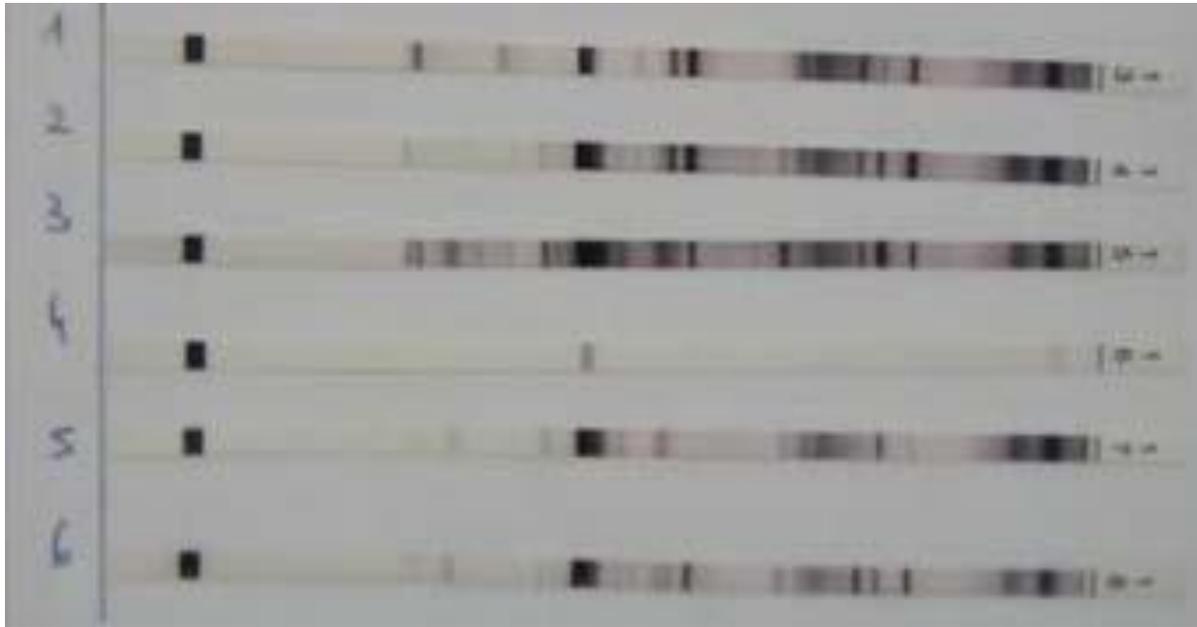
Principe:

- ✓ **Culture en cellules in vitro + sérum du patient**
- ✓ **ECP + → Rt - → absence d'Ac**
- ✓ **ECP- → Rt + → présence d'Ac**

- **Immunoblot: ELISA sur membrane**



Test sérologique HIV-1 et -2 rapide : ce type de test est particulièrement utile dans le cas d'un accident d'exposition au sang. Si le sérum du patient source est positif, un traitement anti-rétroviral est mis en route très rapidement chez le patient exposé



Bandelettes de western blot en fin de réaction : une bande colorée apparaît lorsque le sérum testé contient des anticorps reconnaissant l'antigène adsorbé à cet endroit-là sur la bandelette.

Comment interpréter une sérologie?

- Délai d'apparition des Ac (variable / virus)
- État immunitaire du sujet (immunodéprimé, nné)
- Interprétation:
 - ✓ 02 sérums: précoce (début des signes cliniques) et tardif (15 à 20j):
- Séroconversion ou ascension significative du taux d'Ac
- IgM +++ parfois indicateur de primo-infection