

# DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

TD de Microbiologie

4<sup>ème</sup> année Pharmacie

Année Universitaire 2019-2020

Par : Dr Lounis Assia

Pr Ag Benammar Sonia



# Plan

**I. Introduction**

**II. Indications**

**III. Diagnostic virologique**

**IV. Diagnostic direct**

▶ **Microscopie électronique**

▶ **Isolement viral**

▶ **Détection directe des Ags viraux**

▶ **Techniques de biologie moléculaire**

**V. Diagnostic indirect =  
Sérologie**

**VI. Conclusion  
Bibliographie**



# Introduction

- ▶ Les virus sont des agents infectieux et potentiellement pathogènes, ce sont des entités nucléoprotéiques possédant un seul type d'acide nucléique; se reproduisent à partir de leur matériel génétique et sont incapable de croître et de se diviser.
- ▶ Le diagnostic des infections virales humaines a donc des caractéristiques particulières, imposées par la petite taille des virus, la nécessité d'un hôte cellulaire pour leur réplication.
- ▶ Le diagnostic virologique définit un ensemble de principes méthodes et stratégies visant à identifier, quantifier et suivre les infections virales humaines.

# Indications

le diagnostic ne doit pas être pratiqué de façon systématique chaque fois qu'une infection virale est suspectée.

Les principales indications sont :

- ▶ La gravité présente ou potentielle, pour le malade ou son entourage de l'infection virale suspectée
- ▶ La mise en route et le suivi d'une chimiothérapie antivirale
- ▶ Le criblage virologique des dons de sang; d'organe, de tissu, de cellule
- ▶ l'évaluation du risque d'infection ou, au contraire, de la protection vis-à-vis de l'exposition potentielle ou avérée à un virus
- ▶ L'identification d'une épidémie menaçant une communauté

# Diagnostic virologique



Le diagnostic virologique repose sur 2 approches :

\* Le diagnostic direct : décelant dans les produits biologiques la présence du virus ou de ses composants, antigènes ou génomes viraux

\* Le diagnostic indirect : décelant l'apparition dans le sang d'une réponse immunitaire sous forme d'anticorps spécifiques du virus.

Ces deux approches ne s'excluent pas et sont parfois complémentaires

# Diagnostic direct :

## Prélèvements :

▶ Prélèvements ne nécessitant pas de milieu de transport : amener au laboratoire le

prélèvement

1. Dans un tube sec stérile : selles, urines, LCR, prélèvements liquides divers

2. Dans un tube contenant de l'EDTA : sang total

▶ Prélèvements effectués avec un écouvillon stérile immergé dans un milieu de transport fourni par le laboratoire : gorge, vésicules,

conjonctives



# Diagnostic direct :

- ▶ Frottis sur lame = l'écouvillon est exprimé sur la lame de verre par le préleveur), acheminer à sec, à température ambiante.
- Les prélèvements sont correctement identifiés et bien refermés.
- Fiche de renseignements cliniques correctement remplie.

# Diagnostic direct :

- ▶ Les échantillons biologiques envoyés par poste et susceptibles de contenir des virus doivent être emballés et acheminés conformément à la réglementation prévue pour le transport des matières infectieuses (triple emballage)
- ▶ Acheminer le prélèvement le plus rapidement possible au laboratoire ( $< 1$  h), sinon conservation à  $+ 4^{\circ}\text{C}$  (quelques heures),  $- 80^{\circ}\text{C}$  ++ ou dans de l'azote liquide (au delà de 36 h).



# Diagnostic direct :

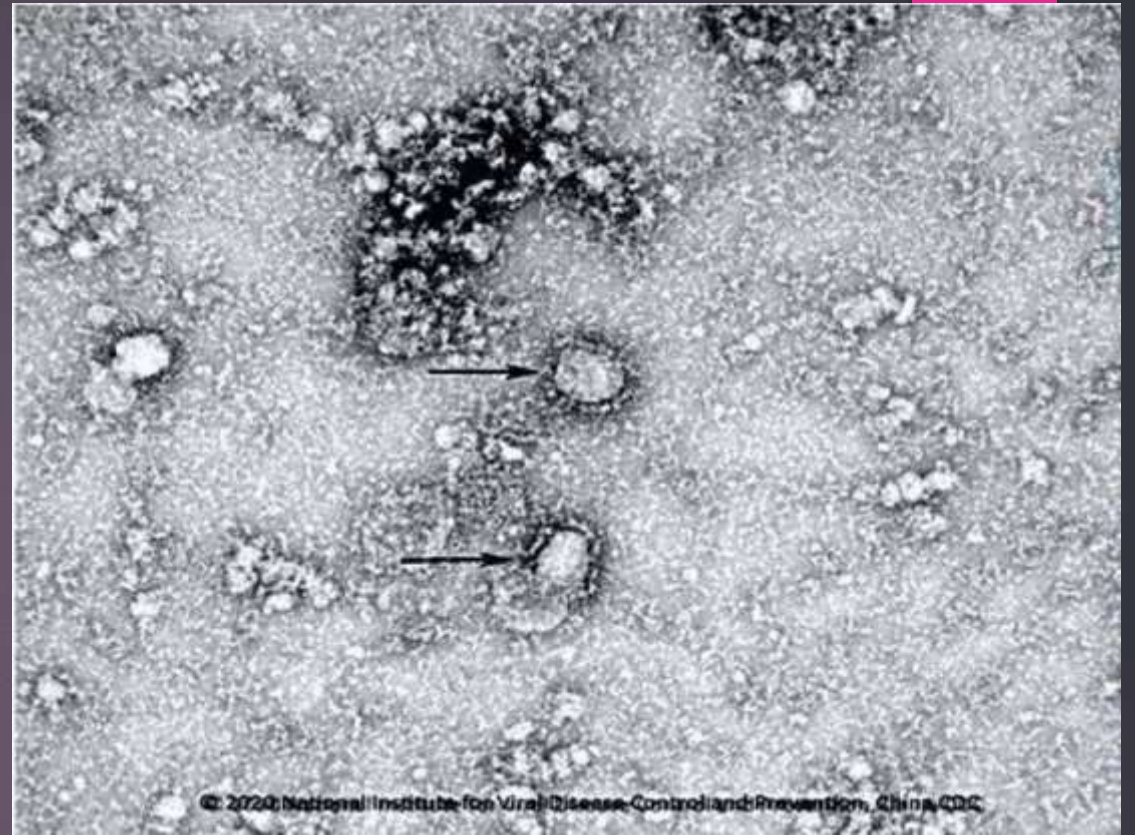
## 1. Microscopie Electronique

- ✓ Utilisée dans des cas très particuliers
- ✓ Elle permet :
  - De visualiser les virus (diagnostic de groupe) et de les quantifier
  - Tout produit pathologique contenant une grande quantité de virus ( $10^6$  particules /ml de selles ). En dessous la sensibilité est faible





Microscopie électronique : virus grippal



Première image (24/01/2020) au microscope électronique du nouveau Coronavirus (Centers for Disease Control and Prevention)

## 2. Isolement viral

□ Cette méthode de référence permet d'isoler le virus, de l'identifier et de le purifier pour obtenir une souche virale

□ **Systemes cellulaires utilisés pour cet isolement viral :**

1. Culture cellulaire +++

2. Œuf de poule embryonné: est réservée à l'étude de quelques virus particuliers (virus grippal notamment).

3. Animal (coxsackies virus)

□ Aucun système ne permet l'isolement de tous les virus

## Culture cellulaire

- ❖ En pratique, on a recours essentiellement aux cultures cellulaires.
- ❖ La multiplication des cellules est effectuée dans un milieu stérile, sur un support plastique auquel elles adhèrent pour former une couche monocellulaire, ou en suspension
- ❖ Différents types de culture cellulaire :
  1. Les cellules primaires ou dites de premier explant (rein de singe...)
  2. Les cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires humains (MRC5...)
  3. Les cellules de lignées continues sont des cellules hétéroploïdes transformées, immortalisées (MDCK) ou obtenues à partir de tissus cancéreux (HEp2).

# Travail sous hotte à flux laminaire



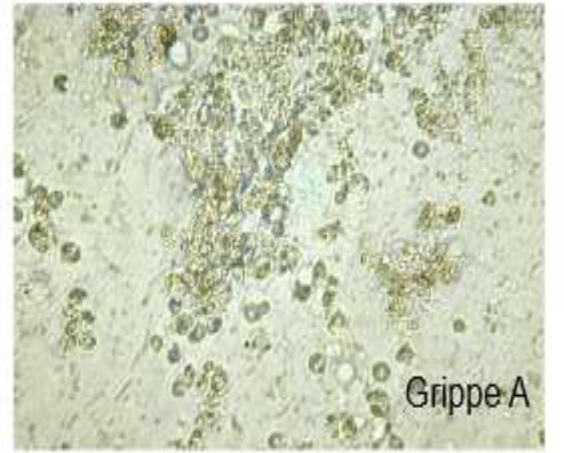
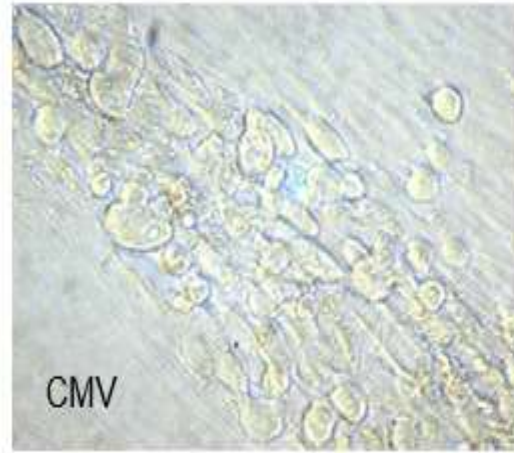
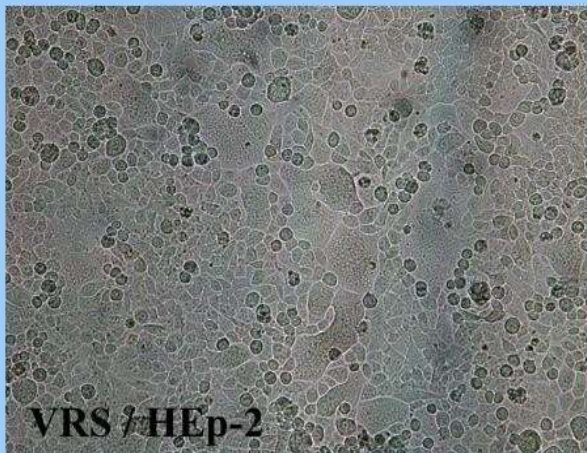
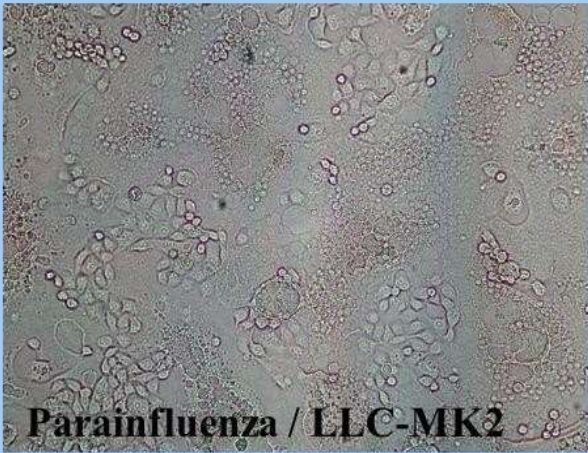
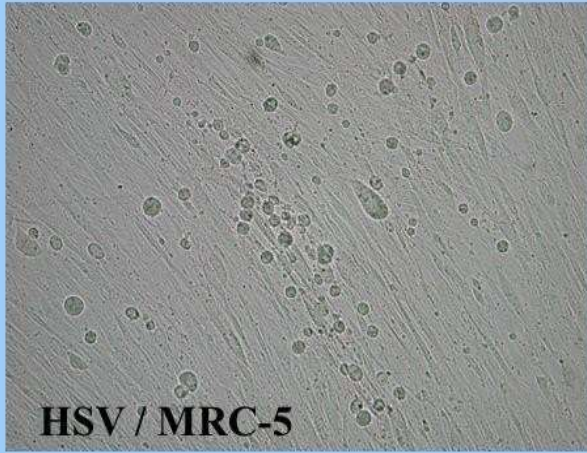


Flacons de culture cellulaire



Mise en culture = > Incubation des cultures à l'étuve durant une période différente d'un virus à un autre

# Observation au microscope des ECP (effet cytopathogène) caractéristiques d'espèces de virus



## Avantages de la culture cellulaire :

- Les techniques de culture de virus sont indispensables pour effectuer des titrages de virus et quantifier le nombre de virus infectieux
- Mise en évidence du virus infectieux (multiplication virale)
- Etude de la sensibilité aux antiviraux.
- Bonne sensibilité



## Inconvénients :

- Prélèvements dans de bonnes conditions pour avoir du virus infectieux
- Technique longue et coûteuse
- Certains virus sont non cultivables (HAV, HBV ,HCV, Coxsackie A, Rotavirus)
- Subjectivité de la lecture : expérience de l'observateur.

# 3. Détection directe des antigènes viraux

☐ Mise en évidence des antigènes viraux intracellulaires par immunofluorescence++

-IF directe:

Utilise directement un Ac spécifique du virus marqué à la fluorescéine

-IF indirecte:

On met un Ac spécifique non marqué et on ajoute un anticorps anti-IgG marqué à la fluorescéine => sensibilité +++

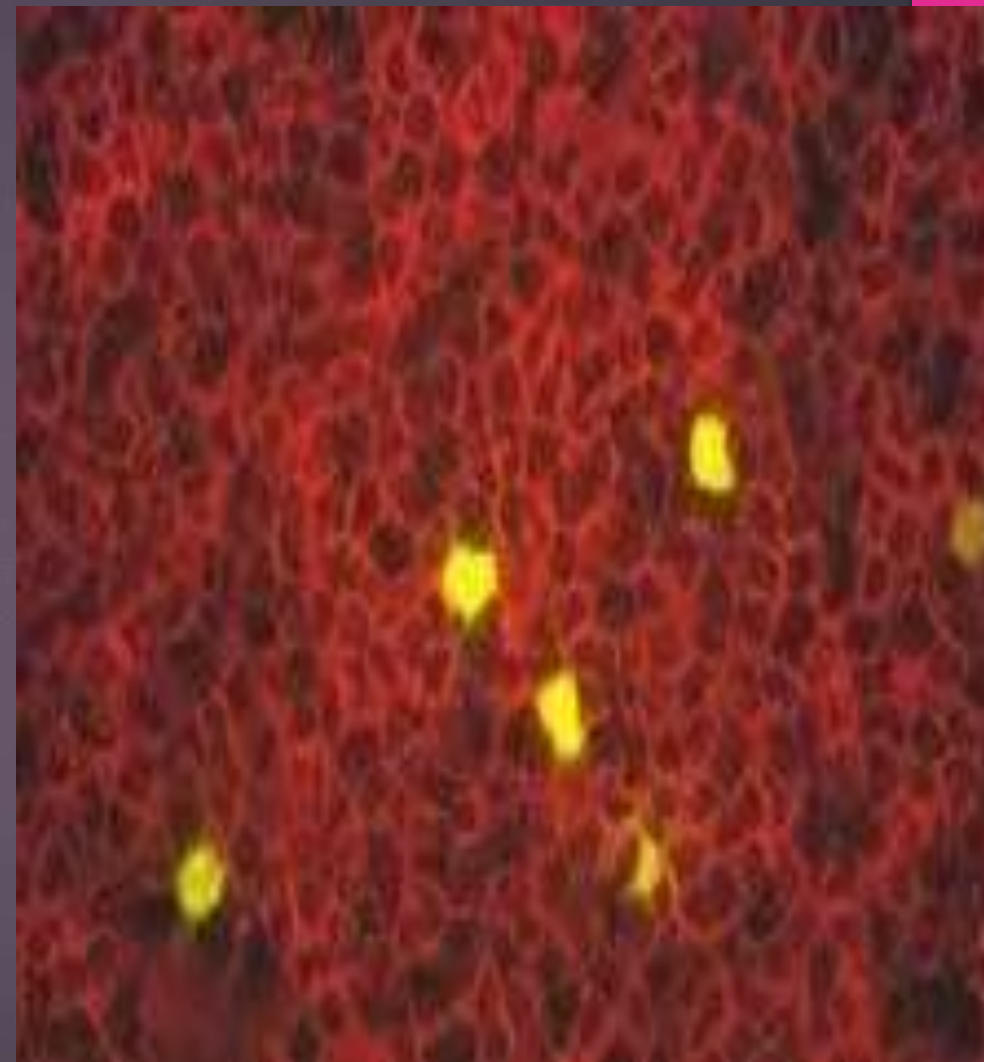
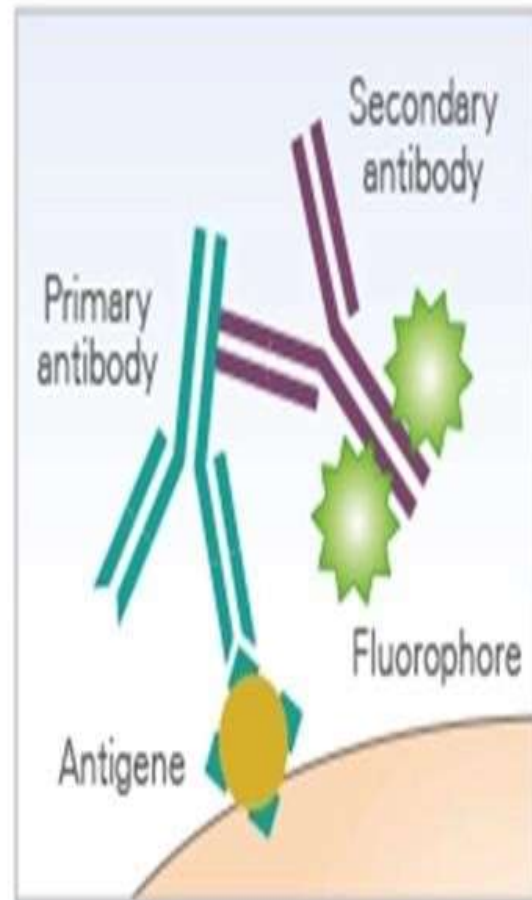
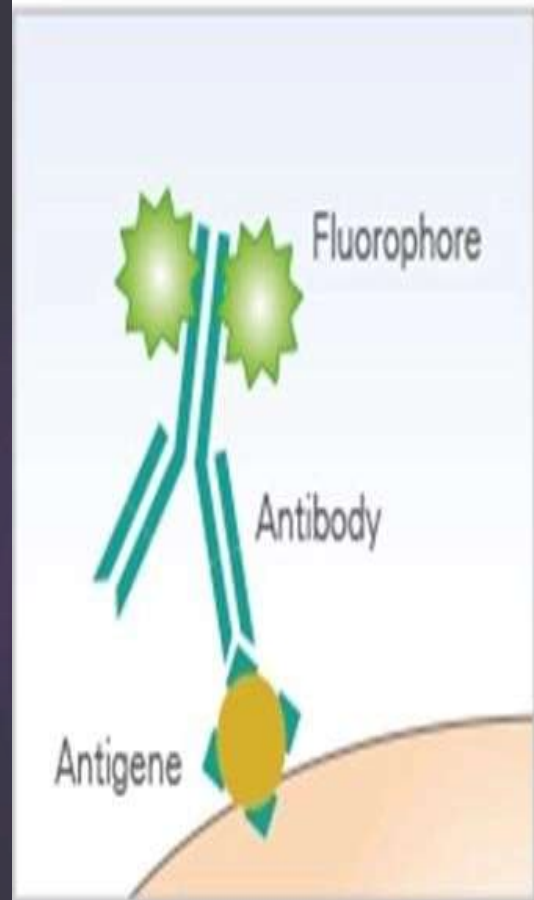
☐ Nécessité de cellules intactes :

Si pauvreté en cellules = résultats faussement négatifs

☐ Problèmes techniques : éliminer le mucus importante , pas d'automatisation

Direct Immunofluorescence

Indirect Immunofluorescence

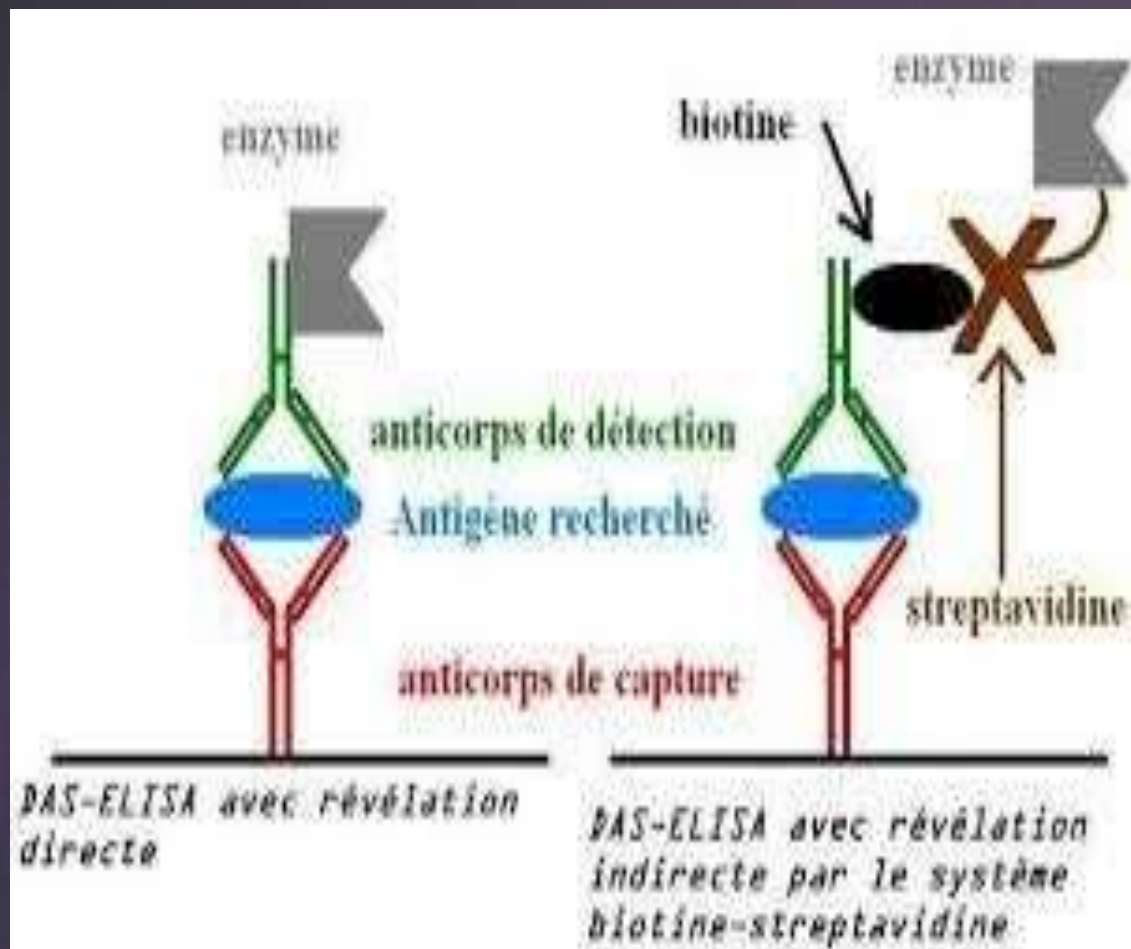


Antigénémie pp65 du CMV positive

# 3. Détection directe des antigènes viraux

La détection d'antigènes solubles (indépendants de tout support cellulaire) dans les produits pathologiques liquides ou extraits liquides, s'effectue selon plusieurs techniques :

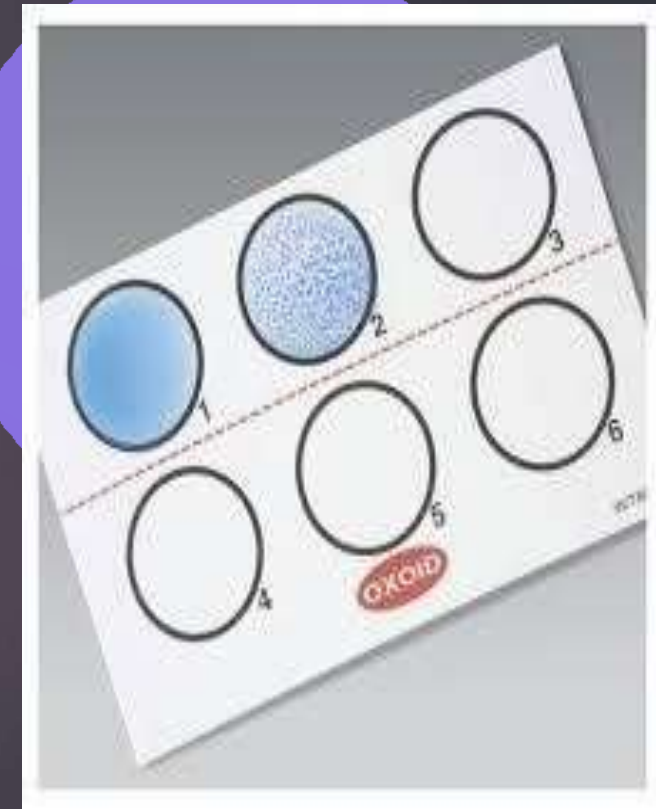
- 1. Elisa direct** : l'anticorps monoclonal utilisé est marqué avec un système enzymatique
- 2. Elisa indirect** : anti IgG spécifique d'espèce marquée avec une enzyme meilleure sensibilité



### 3. Détection directe des antigènes viraux

Agglutination de particules de latex sensibilisées par des Acs

- ✓ 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,
- ✓ A l'œil nu, la suspension de particules de latex, d'homogène va devenir granuleuse






## ❑ Avantages de la détection directe des antigènes viraux

1. Conservation et transport des prélèvements moins strictes
2. Facilité de mise en oeuvre
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)

## Diagnostic direct moléculaire

Trois méthodes principales dominant la routine :

- 1- L'hybridation moléculaire
- 2- L'amplification génique (PCR)
- 3- Le séquençage nucléotidique.





## 4. Détection du génome viral (ARN ou ADN)

- Détection des génomes viraux directement dans les produits biologiques
- Applicable à tous les virus, à priori,
- Permet de :
  1. Porter le diagnostic d'infection par des virus difficilement ou non cultivables (Parvovirus B19, HCV)
  2. Raccourcir le délai de diagnostic de certains virus cultivables (CMV, VZV)
  3. Détecter une réplication virale active = quantification de l'ADN ( ou charge virale par PCR quantitative) de l'HBV, de l'ARN du HIV ou de l'HCV ...
  4. Conclure un diagnostic face à des profils sérologiques d'interprétation douteuse ou à une phase pré-sérologique de la maladie.
  5. Comparer les souches virales entre elles : études épidémiologiques

# V. Diagnostic indirect

## 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.

## Principales techniques utilisés

Toutes utilisent une réaction de type antigène/anticorps, dans laquelle l'antigène viral est apporté par le réactif de détection, et l'anticorps présent ou non dans le sérum testé

(Voir TD principales techniques sérologiques)

# Conclusion :

- 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

# Références

- ▶ H.Agut, D.Boutolleau, S.Burrel Diagnostic virologique EMC 2017
- ▶ T.Mourez, S.Burre, D.Boutolleau, S.Pillet Traité de virologie medicale2019
- ▶ M. SEGHIER DIAGNOSTIC DES INFECTIONS VIRALE Faculté de Médecine d'Alger2016