UE9 Agents infectieux

03/02/2014 15h30-16h30

Pr. Charpentier

Rt : Typhaine TOUTAIN

Rf : Ambre TONDREAU

Cours n°13 :

Démarches diagnostiques des infections virales

Plan :

I Prélèvement

II Diagnostic direct
1 .Visualisation du virus dans le prélèvement
2 .Détection d'antigènes viraux
3 .Isolement du virus sur cultures cellulaires
4 .Détection du génome viral

III Diagnostic indirect
1 .Sérodiagnostic
2 .Autres sérodiagnostics

I Prélèvement

- Etape pré- analytique :

La qualité des résultats et de l'interprétation dépend essentiellement de la qualité du prélèvement.

Les échantillons cliniques doivent être :

- appropriés à l'examen demandé
- prélevés à un moment adapté à la chronologie de l'infection
- conservés dans des conditions favorables en attendant et durant l'acheminement au laboratoire

En cas de pathologie aigue, les prélèvements doivent être :

- réalisés le plus tot possible après le début de l'infection, au moment des symptômes cliniques (pour le diagnostic direct)
- avant la mise en route d'un traitement antiviral
- leur site dépend des symptômes cliniques et du mode de transmission des virus suspectés

En cas de diagnostic indirect, il faut penser au délai d'apparition des Ac par rapport au contage (= fenêtre sérologique) et réaliser un second prélèvement à distance.

Type de receuil :

- tube sec (=sans anticoagulants)
- tube contenant un anticoagulant (EDTA)

Le tube ou le milieu de transport est fonction de :

- la nature du prélèvement
- la technique à mettre en œuvre

!! Ne jamais prendre de tube héparine pour la biologie moléculaire (car l'héparine est un inhibiteur de la Taq polymérase= enzyme d'amplification de la PCR) !!

Technique envisagée	**Biologie Moléculaire** (charges virales, PCR, séquençages)	**Sérologies virales**
Tube	EDTA	Sec
Délai pour arriver au laboratoire	< 24h	>24h

Demande de mise en culture :

- écouvillon
- en présence OBLIGATOIRE de milieu de transport pour décharger l'inoculum viral

Le milieu de transport est un milieu de culture (milieu nutritif qui permet au virus de rester infectieux pendant le délai entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire)

!! **Importance de la présence de CELLULES dans le prélèvement (virus= parasite intracellulaire strict)** !!

Prélèvement « précieux » :

- prélèvements respiratoires => milieu de transport, arrivée le plus rapidement possible au labo ou conservation a +4°C pendant 48h maximum
- LCR => tube sec stérile, arrivée dans les 24h, conservation à +4°C

- Feuille de demande :
  - Nom, prénom, date de naissance
  - Date et heure du prélèvement
  - Nature et site du prélèvement
  - Nom du prescripteur
  - Nom du préleveur

Ces données font partie de la norme « ISO 15189 » et permettent l'accréditation de toutes les demandes, s'il manque une information soit il y a non conformité (demande refusé et examen non réalisé) soit l'analyse est non informatif (si le patient est traité pour le virus de l'hépatite B et que ce n'est pas précisé, le virologue ne va pas interpréter le résultat de la même manière).

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES (motif et chronologie ++) => ESSENTIELS pour le choix de la technique et l'interprétation des résulats.

II Diagnostic direct

⇨ Mise en évidence du virus lui même ou d'un de ses composants (ADN, ARN, Ag)

1 . Visualisation du virus dans le prélèvement

Elle se fait par **microscope électronique**, on voit le virus à partir du prélèvement par coloration négative, elle est **simple et rapide** mais nécessite un fort grossissement (X 50000/60000). Cette technique ne permet que le diagnostic de famille assez spécifique de virus (gros ou de morphologie caractéristique).

Elle permettait le diagnostic :

- des gastro-entérites: Rotavirus, Adénovirus, Norwalk like, Astrovirus, Calcivirus
- à partir de liquide vésiculaire : HSV (herpes), VZV (varicelle)
- à partir de grattage cutané : Orf

INCONVENIENTS :

- Nécessité d'un microscopiste entrainé

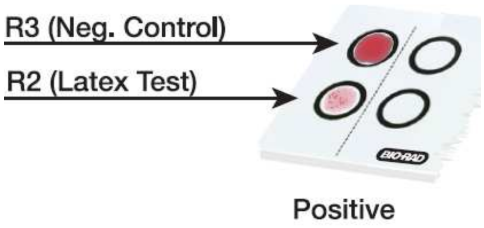
- Equipement très couteux, maintenance lourde
- Sensibilité faible (nécessité d'au moins 106 particules virales)

⇨ **N'a plus d'indications en pratique courante**

2 . Détection d'antigènes viraux dans le prélèvement

- Détection d'antigènes intracellulaire :

  - **réaction d'immunofluorescence** (CMV, HSV)
  - **réaction immuno-enzymatique** de type « immunoperoxydase » (détection Ag précoces et rendu rapide en 48h)
  - **réaction d'immunodiffusion**= immuno-chromatographie (bandelettes), technique très utilisée : on trempe la bandelette dans le prélèvement qui contient les anticorps spécifique du virus à mettre en évidence (virus de la grippe ou VRS= virus respiratoire syncitial)
  - **réaction d'agglutination au latex,** seule indication en virologie clinique pour le rotavirus et l'adénovirus dans les selles : on dépose le prélèvement dans de petits cercles sur des cartes contenant des réactifs, si il y réaction Ag/Ac on obsèrve des petits agglutinats.



Type de prélèvement pour la détection d'antigènes viraux :

- **Prélèvements respiratoire** : VRS, Influenzavirus A et B, Parainfluenza, Adenovirus
- **Selles** : Rotavirus, Adenovirus
- **Peau** : HSV (herpes simple virus) , VZV (varicelle)
- **Sang** : CMV (cytomégalovirus)

AVANTAGES :

- Résultats disponibles rapidement (de 10min à 2h)

INCONVENIENTS :

- Faible sensibilité par rapport a la culture (jusqu'à 20% de moins) et à la biologie moléculaire (jusqu'à 50%)
- Spécificité dépendant de la qualité des Ac
- Nécessité de prélèvements de bonne qualité
- Technique manuelle avec une lecture longue et subjective nécessitant un technicien expérimenté

- Détection d'antigènes libres :

Ce sont des antigènes produits en excès et excrétés dans le sérum

Réaction **immuno-enzymatique** (type ELISA)

- Support solide (plaque, tube)
- Anticorps de capture monoclonal ou polyclonal
- Anticorps de révélation couplés au système révélateur
- Quantification possible

Deux principales indications :

- Détection de **l'antigénémie HBs** (Virus Hépatite B)
- Détection de **l'antigénémie p24** (VIH)

Dans les deux cas, si le résultat est positif il doit être suivi d'une **neutralisation** (incubationavec des Ac anti-p24 ou anti-HBs dans le tube déjà testé pour vérifier la négativation en raison du complexe Ag/Ac formé auparavant).

3 . Isolement du virus sur cultures cellulaires

L'isolement viral est une **réplication virale au sein de cellules vivantes**, il existe 3 modèles possibles : l'animal entier (n'est plus utilisé en pratique mais en recherche), l'œuf embryonné (influenza virus=> fabrication du vaccin antigrippal) et les cultures cellulaires (support de choix).

Il existe différents types de cellules utilisées pour la culture cellulaire :

- Les cellules Diploides (=durée de vie limitée), leurs caractéristiques sont : **pas de passage** possible ou limité (passage= nombre de remise en culture), il y a une **inhibition de contact** (arrêt du développement quand la boite de pétri devient trop étroite) et un nombre **pair de chromosomes**.
  Il s'agit soit de cellules de primo-explantation (rein de singe, chères), soit de cellules embryonnaires (fibroblastes humains embryonnaires)

- Les cellules Continues (=immortelles), ce sont des cellules **cancéreuses** transformées (plus d'inhibition de contact), des **lignées cellulaires** (HeLa = cellules cancer col utérus HPV, Vero=cellules épithéliales rein du singe…), peu onéreuses. Elles ont un spectre de susceptibilité virale limité pour chaque lignée cellulaire (un virus va plus facilement se développer sur telle ou telle lignée).

!! **Sensibilité variable** des types cellulaires au différents virus => nécessité de disposer de plusieurs types de cellules=> **au minimum** fibroblastes embryonnaires humains plus une ou deux lignées continues !!

=>Le choix du type de cellules à inoculer dépend du virus recherché

Une fois le prélèvement mis en culture,on ne voit pas le virus mais il va y avoir un **effet cytopathogène** (ECP) du virus sur les cellules, c'est l'ensemble des **modifications induites** dans les cellules infectées :

- nature des cellules modifiées et délai d'apparition
- Arrondissement des cellules, augmentation du volume ou formation de syncytia
- Evolution de la progression des foyers

L'effet cytopathogène peut être assez caractéristique d'un virus mais on ne peut pas être totalement sur de la nature du virus, cela nécessite donc une étape de **confirmation** (immunofluorescence, hemabsorption, neutralisation avec Ac spécifiques) et de **conservation des cellules souches** (études ultérieures : sensibilité au antiviraux, épidémiologie).

INTERETS :

- Diagnostiquer l'infection virale
- Apporter la preuve du caractère infectieux des particules virales présentes dans le prélèvement => isolement et conservation de souches
- Etudier la résistance du virus aux antiviraux
- Réaliser des enquêtes épidémiologiques

INCOVENIENTS :

- Technique souvent longue (jusqu'à 4 semaines)
- Souvent faible sensibilité qui dépend énormément de la qualité du prélèvement mais aussi du milieu de culture utilisé
- Sensible a la contamination bactérienne
- Sensible à diverses substances toxiques présentes dans le prélèvement
- De nombreux virus ne sont pas cultivables (VHB, Papillomavirus)

Virus faciles à isoler en culture :

- Herpes simple
- Cytomegalovirus
- Adenovirus
- Virus Coxsackie B
- Influenza
- Parainfluenza
- Oreillons
- VRS
- Varicelle et Zona

Virus moins fréquemment isolés :

- Rougeole
- Rubéole
- Coxsackie A

Cas particuliers du VIH => Culture sur des lymphocytes de donneurs séronégatifs.

REGLES DE SECURITE pour la culture du VIH : **Laboratoire de haute sécurité microbiologique L3** (microorganismes de classe 3) : ayant un pouvoir pathogène important chez l'homme mais présentant un risque mineur pour la collectivité et contre lesquels une prophylaxie ou des traitements efficaces sont connus.

4 . Détection du génome viral

Il prend de plus en plus de place dans les examens, la détection des acides nucléiques se fait sur des **génomes viraux soit d'ADN soit d'ARN** (les virus à ARN nécessite une étape de reverse transcription pour obtenir après extraction de l'ADN).

Les prélèvements se font à partir de sang total (**plasma++**, sérum, leucocytes), d'urines, de LCR…

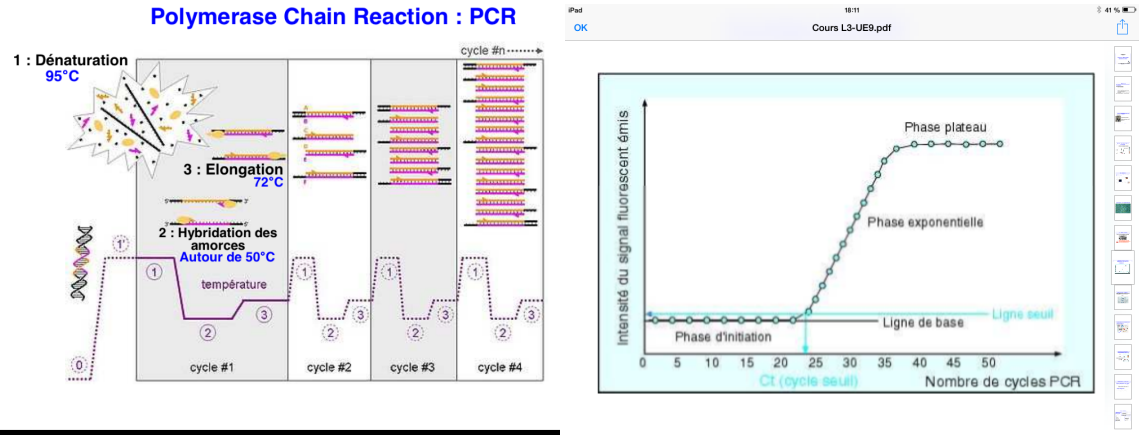
Les conditions de prélèvements doivent respectées certaines règles et on doit s'assurer de l'absence d'inhibiteur de PCR.

1ere Etape : **Extraction** du génome viral à partir de sang total (automatisée) :

- Lyse de la cellule et dénaturation des complexes nucléo-protéiques (détergent)
- Séparation des protéines (solvant)
- Précipitation des acides nucléiques (par l'alcool)

2eme Etape : **Amplification** par PCR, le principe repose sur l'augmentation exponentielle de matériel génétique à chaque cycle d'amplification, on obtient alors des courbes sigmoïdes d'amplification, avec a la fin une phase de plateau car tous les réactifs sont utilisés, il y a trois étapes par cycle :

- Dénaturation à 95°C
- Hybridation des amorces à 50°C
- Elongation à 72°C



- La PCR Qualitative :

On l'étudie en **phase plateau,** une fois la PCR effectuée grâce à un **thermocycleur** vient une étape de **migration élétrophorétique** des amplicons sur gel d'agarose et enfin vient la **révélation** de l'ADN sur le gel d'agarose grâce au bromure d'éthidium (BET).

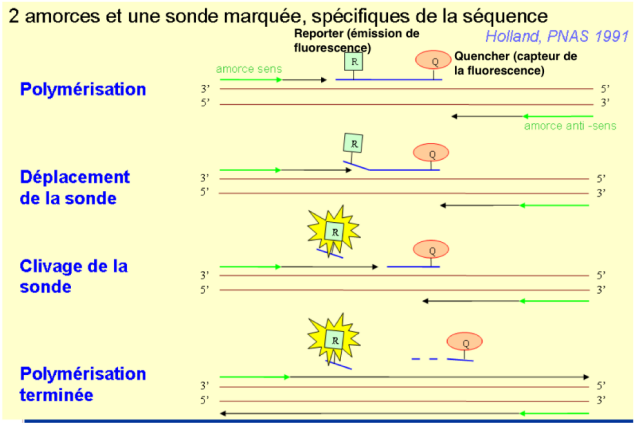
Ses applications en virologie sont :

- Recherche de virus dans le LCR (HSV,VZV, entérovirus)
- Recherche de virus dans les prélèvement respiratoire (CMV, influenzavirus)

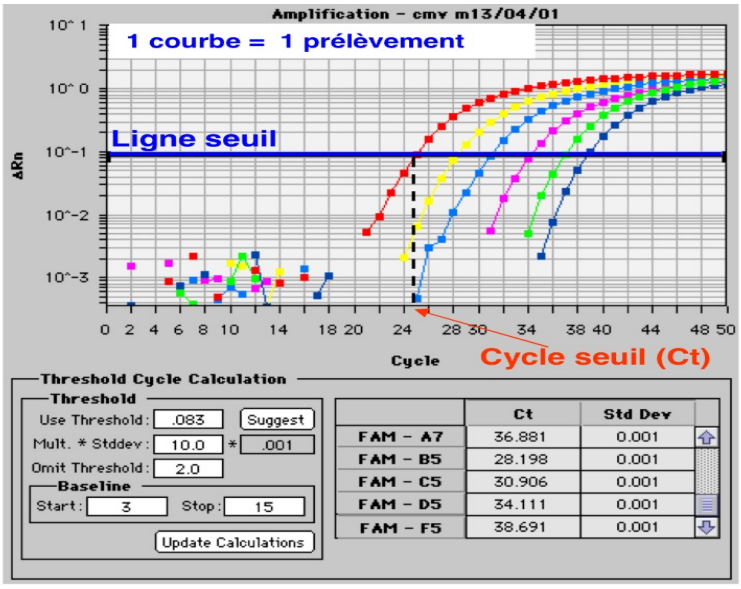
- Recherche de virus dans les prélèvements de biopsie cutanéo-muqueuses
- Recherche de l'ADN provirakl du VIH (nouveau nés d'une mère séropositive)

- La PCR Quantitative :

On étudie en **phase exponentielle** de la PCR le nombre de copie de virus, elle est aussi appelée « PCR en temps réel ». C'est le même principe qu'une PCR normale mais on rajoute une sonde marquée (R sur le schéma) avec à l'autre bout de la sonde un capteur de fluorescence (Q).



Il y a émission de fluorescence progressive lorsque l'hybridation avance et que la sonde se casse ce qui permet la formation d'une courbe, cela permet une quantification des charges virales et du nombre de copies de virus/mL.



La ligne seuil est en général au milieu de la phase exponentielle, selon à quelle cycle la courbe va traverser la ligne seuil, elle donnera une indication sur la quantité de virus possédée par l'ARN. Ici la courbe tout à gauche coupe la ligne seuil à 25 cycles elle possède le plus de virus dans son ARN.

Ses applications en virologie sont :

- Charges virales CMV, EBV (Epstein barr) chez les patients en post greffe ou immunodéprimés
- Charges virales VIH, VHB, VHC

- Autres PCR :

Qualitative **« multiplex »** : recherche de plusieurs génomes viraux dans la même réaction de PCR (plusieurs couples d'amorces), dans le meme test on peut chercher 16 virus ARN, 2 virus ADN et 4 bactéries (utilisés pour VRS)

Qualitative **« technologie clé en main »** : intégration de toutes les étapes (extraction, amplifiation…) en un seul instrument, résultat en 1h, très cher…

- Autres techniques de biologie moléculaire :

Hybridation inverse avec sondes spécifiques : détection à l'aide d'oligonucléotides (disposés sur une bandelettes) spécifiques d'un génotype donné. Deux grandes indications=> identification des génotypes **VHC** et **Papillomavirus** (très important car selon génotype de VHC traitements différents)

Séquencage du génome viral : détection des mutations de résistances aux antiviraux (VIH, VHB,VHC)

Analyses phylogénétiques : très peu utilisées, évaluation de la proximité de différentes séquences (lien épidémiologiques)

AVANTAGES de la biologie moléculaire :

- Rapidité
- Sensibilité
- Très spécifique
- Applicable à l'analyse de l'ensemble des virus

INCOVENIENTS :

- Impact de la variabilité génétique+++ => non hybridation du génome avec les amorces du fait de la diversité génétique (++ virus ARN) donc les charges virales VIH peuvent être faussement négatives
- Pas d'informations sur le caractère infectieux des virus infectés
- Présence possible d'inhibiteur
- Risque de contamination par les amplicons

IIIDiagnostic indirect

1 .Sérodiagnostic

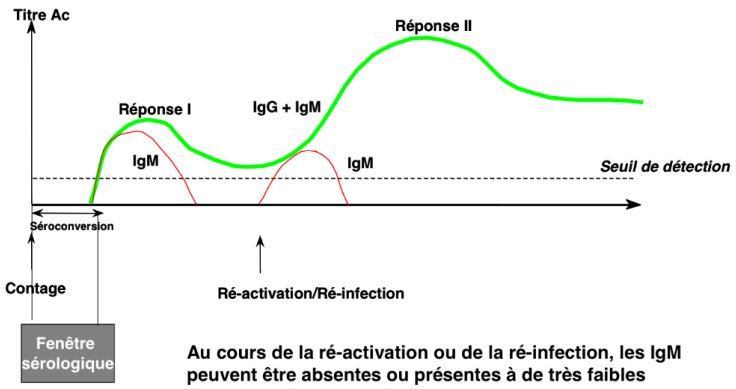
C'est la **mise en évidence des anticorps spécifiques synthetisés par l'hôte en réponse à l'infection virale.**

Nature du prélèvement : sérum ++, plasma, LCR, liquide articulaire…

Qualité : la décantation du sang doit être faite dans les 24h et il faut vérifier l'aspect du sang

Sérothèque : conservation légale pendant un an à -20°C ou trois ans pour le diagnostic anténatal

PROFIL SÉROLOGIQUE TYPIQUE APRÈS UNE INFECTION VIRALE AIGUË



Au cours de la ré-activation ou de la ré-infection, les IgM peuvent être absentes ou présentes à de très faibles titres et de façon transitoire.

Lors de la première rencontre du virus, la réponse primaire comporte des IgM et de IgG, s'il y a réactivation ou ré-infection, les IgM peuvent être absentes ou présentes a de faibles quantités et de façon transitoires, on aura aussi des IgG. Avant qu'apparaissent les anticorps il faut qu'il y ait la phase de séroconversion aussi appelés **fenêtre sérologique.**

La recherche d'anticorps se fait par réaction immuno-enzymatique de type **ELISA :**

On a des antigènes fixés dans des puits, on rajoute le sérum du patient et ses anticorps spécifiques se fixent aux antigènes on rajoute ensuite des anticorps marqués qui permet la révélation par spectro-photomètre.

Test ELISA (Dépistage VIH)

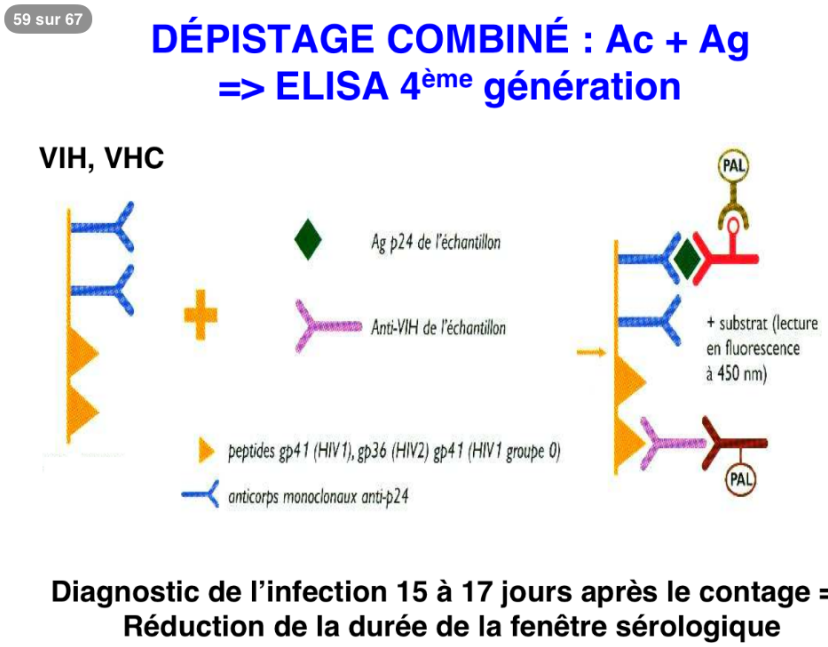
Les puits colorés correspondent à un signal positif : présence d'Ac

Nature de l'antigène de capture : virus entier purifié (1er génération d'ELISA), protéines virales natives ou recombinantes (2eme génération), peptides de synthèse (3eme génération)

Détection des anticorps : soit totaux (IgG+IgM) soit IgG/IgM seul

Expression des résultats : qualitatifs ou quantitatifs

ELISA 4eme génération : *(la prof en a parlé rapidement savoir les grandes lignes)*



Diagnostic de l'infection 15 à 17 jours après le contage => Réduction de la durée de la fenêtre sérologique

INDICATIONS :

- Détermination du **statut immunitaire** d'un individu vis à vis d'un virus : **dépistage** avant vaccination ou bilan de greffe, examen d'un seul sérum, résultat **qualitatif.**

- Evaluation de **l'immunité résiduelle** après une infection ou une vaccination : examen d'un seul sérum, **quantitatif**, **VHB.**

- **Diagnostic d'une infection aigue** en cours ou récente : nécessité de l'examen de deux sérums successifs à 15/21 jours d'intervalle (**séroconversion** ou élévation significative des Ac). Recherche d'IgM et de l'index d'avidité des Ac IgG (capacité d'un Ac a se fixer à l'Ag) permet de dater l'infection. Si l'avidité est faible => infection <3mois, si l'avidité est forte infection >3mois.

INTERPRETATIONS :

⇨ **Si abscence d'IgG** : Prélèvement **très précoce** (à réitérer) ou patient i**mmunodéprimé** (pratiquer une recherche directe)

⇨ **Si résultat quantitatif isolé :** ne permet pas de dater l'infection

⇨ **Si résultats séquentiels** (à 2 semaines d'intervalle) : ne comparer que les résultats obtenus par un **même laboratoire**, au cours de la meme manipulation

⇨ **Si détection d'IgM :** possibilité de **faux négatifs** et **faux positifs** (manque de spécificités des préparations antigéniques, présence de facteur rhumatoïde, réactions antigéniques croisées, activations polyclonales non spécifiques du système immunitaire)

⇨ **Critères pour le diagnostic de primo-infection :**
- Augmentation X4 ou plus du titre des IgG ou des Ac totaux entre un sérum « aigu » et un sérum « convalescent »
- Présence d'IgM
- Séroconversion

⇨ **Critères pour le diagnostic de réinfection :**
- Augmentation X4 ou plus du titre des IgG ou des Ac totaux entre un sérum « aigu » et un sérum « convalescent »
- Abscence ou faible titre d'IgM

!! Interet de confronter les résultats de la sérologie avec ceux du diagnostic direct !!

2 . Autres techniques du sérodiagnostic

Western Blot de confirmation : devant tout ELISA positif pour l'infection au VIH

Tests Rapides à Orientation Diagnostique (TROD) :

- Ne nécessitent pas « d'équipements » de laboratoire
- Donnent le résultat en 10/20min
- Leur sensibilité est inférieure
- Aide au diagnostic d'urgence (Accidents d'exposition au sang ou sexuels)
- En France, en association obligatoire avec un test ELISA