

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

Dr .BECHIR

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 pour :

- 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),
- Suivre une évolution biologique de l'infection (ex : VIH, Hépatite B),
- 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),
- Étudier les marqueurs sériques en population (ex : enquêtes de prévalence, études épidémiologiques).

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 réalisant :

Il existe 02 méthodes:

- Diagnostic direct: détection du virus lui même ou un de ses composants (génomme, antigènes)
- Diagnostic indirect: m.e.e de la réaction immunitaire spécifique contre le virus (anticorps Ac)

1. DIAGNOSTIC DIRECT : Recherche de Virus et de ses constituants

Les virus ne sont pas visibles en microscopie optique. Plusieurs approches sont possibles pour montrer la présence d'un virus responsable d'une infection :

- L'identification directe des cellules infectées au sein des prélèvements des patients
- L'amplification du virus par inoculation des prélèvements aux cultures cellulaires
- L'amplification du génome virale (ex : particules virales présentes dans le plasma).

Les méthodes avec amplification sont les plus sensibles, cependant tout dépend de la charge virale du prélèvement laquelle est variable selon le moment (primo-infection) selon l'état immunitaire du sujet (risque élevé chez les sujets immunodéprimés).

❖ Les prélèvements :

Différents types de prélèvements peuvent être utilisés pour la recherche de virus. On peut utiliser le sang (virémie), les selles, les sécrétions nasales, les urines, les prélèvements cutanés (vésicules, ulcérations), les prélèvements génitaux, les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA), les liquides céphalo-rachidien (LCR).

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 et l'aboutissement au diagnostic d'une infection virale:

- Sang: virémie: plusieurs virus
 - Selles: entérovirus, virus polio, rotavirus
 - Prélèvements respiratoires: écouvillonnage nasal, aspiration bronchique, lavage broncho-alvéolaire Paramyxovirus, adénovirus
 - Urines: CMV, rubéole
 - Prélèvements cutanés: vésicules (HSV, VZV)
 - LCR: HSV
 - Prélèvement oculaire: par écouvillonnage conjonctival, conjonctivite (adénovirus), kératite (HSV, VZV)
 - Liquide amniotique (CMV, VZV)
- 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 de prélèvement 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).
- Il faut souligner le caractère infectieux des prélèvements (Hépatite B, VIH) qui imposent un conditionnement protégé.

Le transport vers le labo, toujours respecter les conditions de transport : 4° dans des carboglace, doit être rapide ne dépasse pas 36 heures ,sinon il faut congelé à -80° ,

- règles de sécurité +++
- +/- traitement pour décontamination

A. La recherche de virus par cultures cellulaires

Les techniques d'isollements de virus en cultures cellulaires étaient les plus utilisées, elles sont de plus en plus abandonnées au profit des techniques de détection des antigènes viraux et surtout de celles d'acides nucléiques (PCR). Cependant, il peut être utile de faire des isollements de virus pour préparer des stocks importants de virus complets vivants et infectieux (caractérisation des types de souches virales : épidémies, recherche de mutations de résistance au traitement : HIV, CMV, HBV).

Les cultures cellulaires utilisent des lignées de cellules d'origine humaine ou animale. On citera les cellules épithélioïdes humaines en lignée continue (Hela, Hep, KB) ou les cellules fibroblastiques humaines (MRC5 : pour les CMV).

Chaque virus a un tropisme cellulaire propre

- 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 optique (accumulation des virus produits ou des antigènes dans le noyau, ou dans le cytoplasme des cellules infectées)..

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

B. LA RECHERCHE DES GÉNOMES VIRAUX

Les techniques de PCR sont les plus utilisées. Elles sont sensibles, elles sont spécifiques de chaque type de virus. Les appareils de PCR en temps réel constituent un progrès important puisqu'ils permettent des diagnostics rapides. L'application de ces techniques permet le diagnostic d'infections à Cytomégalovirus, (CMV) et Epstein-Barr-Virus (EBV), adénovirus, herpès-virus...

Elles sont quantitatives et permettent de suivre l'efficacité d'un traitement antiviral.

L'exemple du VIH est intéressant car il a permis le développement de techniques différentes pour la quantification de l'ARN VIH plasmatique (technique de DNA branché, technique NASBA et RT-PCR). Ces outils ont aussi été développés pour les virus HCV et HBV.

C. LA RECHERCHE DES ANTIGÈNES VIRAUX

La recherche des antigènes viraux consiste à identifier l'infection virale directement au sein des cellules infectées présentes dans les prélèvements des patients. Le meilleur exemple est celui du diagnostic des infections respiratoires. A partir des prélèvements naso-pharyngés, on peut rechercher les antigènes viraux dans les cellules du nez ou de la gorge et dans les LBA. Les virus grippaux, le virus respiratoire syncytial (VRS), les virus parainfluenzae s'accumulent dans le cytoplasme des cellules infectées. Les antigènes viraux peuvent être visualisés par technique d'immunofluorescence, en utilisant des anticorps spécifiques de chaque virus marqués par la fluorescéine. On utilise des anticorps monoclonaux. Cette technique est simple et rapide (une à deux heures), elle permet de rechercher simultanément plusieurs virus sur un même prélèvement.

Autres Méthodes:

- ELISA
- Agglutination: +++ rapidité exp: rotavirus dans les selles

D. LA RECHERCHE DE VIRUS RÉSISTANTS

La technique la plus utilisée est celle du séquençage des gènes cibles (ex : reverse-transcriptase, protéase du HIV). L'analyse des séquences obtenues permet d'identifier les mutations induites par la réplication virale en présence d'antiviral

E. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

- Moyen de diagnostic possible
- Morphologie du virus par image caractéristique
- Exp: rotavirus (forme de roue) coronavirus (forme de couronne) • +++ nouveaux virus

2. DIAGNOSTIC INDIRECT RECHERCHE DES ANTICORPS, SÉROLOGIES VIRALES

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.

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
- **immunofluorescence** . m.e.e du complexe (Ac-Ag) par des Ig humaines * par un fluorochrome fluorescéine
- Inhibition de l'hémagglutination: pour les virus possédant une hémagglutinine
Principe: inhiber une fonction propre du virus (hémagglutination) Ag (utilisé) + sérum du patient + GR: Réaction - : Ag-GR: hémagglutination Réaction +: Ag-Ac-GR: sédimentation Il y'a des tests rapides utilisent des réactions « témoin » .

3. INTERPRÉTATION DES RÉSULTAT

Le plus souvent, l'isolement, l'identification d'un virus ou la quantification d'un des constituants dans un produit pathologique tel qu'un LCR, une aspiration nasale, un prélèvement de gorge est en faveur de l'étiologie virale de l'infection. Il faut se souvenir que la présence d'un virus est la traduction de la réplication virale dans les tissus pouvant aboutir à une cytolysse dont découlent en partie les signes cliniques. Il peut aussi exister des portages à l'état latent de certains virus, par exemple. Chaque cas doit donc être analysé et interprété selon le contexte clinique, l'âge et le terrain

L'interprétation des sérologies virales n'est pas toujours facile. Il faut garder à l'esprit que la réponse immune 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 immunodéprimés. 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 recherche directe du virus peut aussi permettre un diagnostic rapide (infection congénitale à cytomégalovirus).

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

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. Enfin, la demande mal formulée, ou sans orientation clinique peut aussi être à l'origine d'un échec de diagnostic.

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.