

DIAGNOSTIC DES INFECTIONS VIRALES

La mission d'un laboratoire de virologie est de 2 ordres :

I. FAIRE UN DIAGNOSTIC D'INFECTION VIRALE CHEZ UN PATIENT, EN UTILISANT LES MARQUEURS VIRAUX ADEQUATS

Intérêts : apporter la preuve de l'origine virale de l'infection :

1. diagnostic d'une infection aiguë :
2. suivi d'une infection virale
3. diagnostic d'une infection chronique
4. suivi d'une infection chronique

Principales infection virales : apport du laboratoire

infections	Principaux virus	mortalité	Apport du laboratoire de virologie
<u>Aiguës non persistantes</u>	Virus des gastro- entérites	Faible sauf dans le tiers monde	faible
	Virus des infections respiratoires (VRS, grippe ...)	Faible sauf pour la grippe	faible
	Rubéole	faible	<u>Important chez la femme enceinte</u>
	Rage	élevée	faible
	Fièvres hémorragiques	élevée	faible
<u>Persistantes ou chroniques</u>	Herpesvirus	Faible sauf chez immunodéprimé	<u>important</u>
	VIH	élevée	<u>important</u>
	Hépatites B et C	Moyenne	<u>important</u>
	papillomavirus	Moyenne → cancers	<u>important</u>

Le but est de prendre une décision thérapeutique :

- traitement antiviral (cymévan, zovirax, AZT ..)
- césarienne
- proposer un avortement
- traitement par gammaglobuline : Ig à la naissance, Ig polyvalentes dans les infections à Parvovirus, Ig chez les immunodéprimés . et vaccination (Hépatite B)..
- envisager une transplantation dans le cas d'hépatite fulminante
- éviter une antibiothérapie
-

II. ACTION DE SANTE PUBLIC : SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE - SECURITE VIRALE POUR TOUS LES PRODUITS DISTRIBUES - DEPISTAGE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES

1. **Eviter la transmission des maladies virales** (problème de santé publique)
 - au cours des greffes
 - chez les immunodéprimés
 - au cours de transfusion
 - au cours de la grossesse
2. **apprécier un état immunitaire** (IgG) : intérêt épidémiologique
3. mise en oeuvre de **mesures de prophylaxie**, d'éviction scolaire
4. **contrôle des épidémies** : élaboration de nouveau vaccin et modification de la formule d'un vaccin
5. **découverte de nouveaux virus** (ex : hépatite C en 1990)

NB : 90 % des virus n'étaient pas connus avant la fin de la 2ème guerre mondiale
6. **études thérapeutiques**
7. **étudier la résistance phénotypique** des virus aux anti-viraux disponibles
8. **suspecter des infections nosocomiales** : on se limite sur la recherche d'antigènes dans les gastro-entérites ou les infections respiratoires ou à la pratique des sérologies chez les soignants et soignés. L'analyse génomique du virus est plus fine et permet d'apporter la preuve de l'infection d'une transmission d'un virus d'un individu à l'autre.

2 objectifs pour le biologistes : répondre dans les meilleurs délais avec la meilleur technique

→ critère de choix des techniques :

- **aspects biologiques** : reproductibilité, spécificité, sensibilité, quantification, prédictivité, délai de réponse
- **aspects pratiques** : facilité de mise en œuvre, nécessité d'infrastructures spécifiques, instrumentation spécifique, temps de mobilisation des techniciens, niveau et formation des techniciens, flexibilité de la méthode par rapport au nombre d'échantillon à tester, automatisation
- **aspects économiques** : coût des réactifs, investissement matériel, coût des technicien, temps des techniciens, infrastructure.

Diagnostic de maladies virales

On ne dispose pas de techniques polyvalentes permettant une recherche exhaustive de tous les virus à partir d'un prélèvement.

Afin de rechercher les principaux virus impliqués dans les pathologies, des techniques sont mises en oeuvre au laboratoire selon des prescriptions faites en fonction de différentes notions épidémiologiques ou cliniques...

On distingue **deux approches diagnostiques très différentes, mais complémentaires**, dans la démarche diagnostique d'une infection virale :

1. **le diagnostic direct** visant à révéler et à identifier, à partir de produits pathologiques, le virus lui-même et/ou ses constituants (Antigène, ADN, ARN)
2. **le diagnostic indirect** recherchant la réponse immunitaire humorale de l'organisme, en détectant la production d'anticorps circulants spécifiques du virus.

I . DIAGNOSTIC DIRECT

Mise en évidence du virus :

A. Virus infectieux

Et/ou

B. Ses constituants : antigènes viraux et génome viral à ADN ou ARN

- La qualité du diagnostic direct dépend d'abord de la qualité des prélèvements.
- IL permet d'affirmer la présence du virus dans les différents prélèvements.

A. PRELEVEMENTS

* **principe**

- réaliser des prélèvements en fonction des syndromes et de ce que l'on recherche (virus, pathogénie)
- au niveau du site de multiplication du virus, quand il est accessible (organe cible, porte d'entrée du virus, site d'excrétion virale)
- rapidement, au début des signes cliniques, pendant la **phase aiguë de la maladie** quand l'excrétion virale est maximale, voir avant comme chez les immunodéprimés (ex infections à cytomegalovirus)
- associer plusieurs prélèvements (maladies généralisées, infections congénitales) ex : CMV = sang et urine

* **type de prélèvements :**

- prélèvement nasal, gorge, aspiration naso-pharyngée par écouvillonnage profond
- LBA
- frottis cervico-vaginal : herpès (formes inapparentes fréquente chez la femme enceinte)
- conjonctive, cornée

- ❑ lésions vésiculeuses ou ulcérations
- ❑ biopsie (sans fixateur (pas de liquide de BOUIN) : encéphalite herpétique, infection à CMV chez les immunodéprimés
- ❑ condylomes.
- ❑ sang (leucocytes) : sur tube hépariné, la virémie précède l'apparition des signes cliniques
- ❑ le sérum
- ❑ selles
- ❑ les urines
- ❑ LCR
- ❑ le liquide amniotique à la 10ème semaine, le sang du cordon à la 18ème semaine. Néanmoins, il ne faut pas réaliser de prélèvement trop précocement :
 - par rapport à la date supposée de séroconversion de la mère car la contamination fœtale pourrait ne pas être encore détectable
 - **ni au moment où la mère présente une virémie** pour ne pas entraîner une infection iatrogène du fœtus. Les prélèvements sont déposés dans un tube stérile et apportés rapidement au laboratoire.

La viabilité des virus présents doit être préservée d'où la nécessité de transporter rapidement les prélèvements à l'abri de la dessiccation, de la chaleur, des variations de pH et d'une éventuelle pullulation bactérienne :

- ❑ Tous ces prélèvements effectués à l'écouvillon doivent être mis dans des milieux de transport, riche en albumine avec du sérum de veau fœtal, des antibiotiques et antifongiques.
- ❑ les échantillons de sang, d'urines, de selles, de lavage broncho-alvéolaire, de LCR, les biopsies d'organes sont recueillis dans un récipient stérile.
- ❑ Prélèvements correctement identifiés (nom, prénom, date de naissance, nature du prélèvement) et bien refermés. Fiche de renseignements cliniques correctement remplie.
- ❑ Les échantillons biologiques envoyés pour le diagnostic d'arboviroses, des fièvres hémorragiques virales, du SRAS susceptible de contenir des virus de classe 2,3 ou 4 doivent être emballés et acheminés conformément à la réglementation prévue pour le transport des matières infectieuses (triple emballage et transporteur agréé, et déclaration de matières dangereuses)

afin de conserver les virus vivants et infectieux en vue d'un isolement en culture :

- ❑ acheminer le plus rapidement possible au laboratoire < 1H sinon conservation à +4E (pour quelques heures), -80E++ ou azote liquide (au delà de 36 h), jamais à -20E
- ❑ le CMV et le RSV survivent rarement à la congélation et décongélation

Mais, pour la détection directe d'antigènes viraux intracellulaires par immunofluorescence ou immunopéroxydase, les conditions diffèrent. En effet, le prélèvement doit contenir des cellules intactes et en grande quantité. Aussi, il sera transporté et stocké à température ambiante ou à + 4 °C car la congélation altère les cellules. De plus, les antigènes viraux peuvent être détectés dans les cellules infectées même si le virus n'est plus viable.

Cas particuliers des prélèvements destinés à la détection des génomes viraux par biologie moléculaire d'une manière générale :

- ❑ le sang total doit être prélevé sur tubes stériles type Vacutainer. L'héparine doit être proscrite, mais les autres anticoagulants (EDTA, citrate ...) peuvent être utilisés.

- ❑ Les autres liquides biologiques et les biopsies sont recueillis tels quels dans un récipient stérile. Les prélèvements doivent parvenir au laboratoire très rapidement car les acides nucléiques, de type ARN, sont très labiles. Le plasma et le sérum doivent être centrifugés et aliquotés stérilement. Les prélèvements seront conservés par congélation à -80 °C ou à défaut à -20 °C.

Dans tous les cas, les prélèvements doivent être réalisés en liaison étroite avec le laboratoire, parfaitement étiquetés et accompagnés d'une feuille de renseignements cliniques et épidémiologiques. Enfin, le laboratoire doit être prévenu à l'avance pour les prélèvements particuliers (tels les prélèvements *in utero*), qui seront remis en main propre au technicien ou au biologiste responsable

B. les techniques

1. Microscopie Electronique (utilisée dans des cas très particuliers)

elle permet :

- de visualiser les virus
- de les quantifier
- de vérifier la pureté et la qualité d'une préparation virale.

les applications de la ME au diagnostic :

- disparues progressivement avec les progrès de immunologie et de la biologie moléculaire
- elle reste utilisée dans certaines situations épidémiques particulières.
- Applications rares pour des petites séries
- laboratoire de recherche et études épidémiologiques

❑ **Prélèvements**

- les selles,
- les prélèvements (pustules, biopsie) transmis au laboratoire en moins de 4 heures.
- tout produit pathologique contenant une grande quantité de virus (10^6 virus / ml \leq en dessous, la sensibilité est faible \Rightarrow centrifugation)

❑ **méthodes**

- méthode de coloration négative (délais de réponse est de 10 Minutes)
- utilisation de sels d'acide phosphotungstique ou d'acétate d'uranyle.
- L' immunomicroscopie électronique augmente le seuil de sensibilité de la ME : on traite les prélèvements par un Ac spécifique marqué à l'or

❑ **Principales indications**

- mise en évidence dans les selles de nouveaux virus. Actuellement, elle peut être utilisée en 2e intention dans le bilan des gastro-entérites pour la mise en évidence de structures virales (rotavirus n'appartenant pas au groupe A, calicivirus, astrovirus, virus de Norwalk, les coronavirus : en général, la quantité de virus est importante...), en particulier dans un contexte épidémique.

- recherche, dans des pustules, des vésicules ou des biopsies cutanées, de poxvirus (de l'orf ou du cow-pox) chez des personnes exposées aux ovins et bovins ou chez des sujets porteurs de *Molluscum contagiosum*.
- dans le cadre de lésions atypiques de l'immunodéprimé, on peut rechercher en 2^{ème} intention, un *herpesviridae* par coloration négative, exceptionnellement.
- un outil précieux pour caractériser un nouveau virus.

La mise en évidence de la structure virale permet de faire un diagnostic de groupe (*Herpesviridae* par exemple) sans qu'il soit possible d'aller plus loin dans l'identification (pas de distinction possible entre virus herpes simplex et varicelle-zona par exemple).

2. DETECTION DU VIRUS PAR ISOLEMENT

approche traditionnelle : seule méthode permettant la recherche du virus infectieux, c'est à dire du virus qui se réplique.

3 systèmes cellulaires :

- ❑ oeuf de poule embryon né de 10 jours
- ❑ animal
- ❑ culture cellulaire (système de choix) +++

a. ISOLEMENT DU VIRUS SUR OEUF DE POULE EMBRYONNE (1931)

utilisé uniquement dans les laboratoires de référence de la **Grippe** pour isolement, entretien des souches, la production d'antigènes et de vaccin

b. ISOLEMENT DU VIRUS CHEZ L'ANIMAL APRES INJECTION INTRAPERITONEALE OU INTRACEREBRALE DES PRELEVEMENTS.

Méthode utilisée uniquement pour le diagnostic des infections à **Coxsackie A (paralysie flasque) et les coxsackies B** (paralysie spastique) : on recherche l'apparition de signes telle la paralysie spastique ou flasque avant de sacrifier les souriceaux-nouveau né.

c. TECHNIQUE D'ISOLEMENT VIRAL SUR CULTURE CELLULAIRE IN VITRO

Malgré sa lourdeur et bien que de nombreux groupes viraux ne soient pas cultivables, le diagnostic virologique par culture virale représente toujours la méthode de référence car elle met en évidence la présence de particules virales infectieuses.

- ❑ **Principe** : obtenir des lésions cellulaires, c a d l'apparition d'un effet cytopathogène (ECP). En effet, on sait que le virus est un parasite intra[^] strict, il ne se réplique que sur des [^] vivantes. A partir d'une seule copie présente dans un prélèvement, on peut obtenir des millions de copies du virus après culture.

- ❑ **matériel**

rappel : à partir d'un organe, par trypsination, on obtient des cellules isolées que l'on met en suspension : ces cellules + milieu nutritifs + SVF sont introduit dans un récipient à fond plat : on obtient une couche monocellulaire qui en quelque jours devient confluite....passages successifs

- **le milieu de culture** doit satisfaire aux exigences nutritionnelles des cellules :

- milieux synthétiques complexes tamponnés à pH 7,2, stérilisés, (eau, sel, minéraux, glucose, acides aminés, vitamines constituent le milieu de base (milieu de Eagle) auquel sont ajoutés des facteurs de croissance apportés par du sérum animal (de veau le plus souvent),
- des antibiotiques,
- éventuellement des antifongiques,
- une substance tampon (bicarbonate de sodium, TRIS ou HEPES) permettant de contrôler le pH des cultures, et du rouge de phénol comme indicateur de pH.

- **Un environnement** bien équipé qui permet le respect des règles de sécurité vis-à-vis du risque infectieux, lequel peut nécessiter un confinement strict des activités de culture virale dans un laboratoire adapté de haute sécurité. **Les récipients** utilisés sont en verre neutre ou en plastique traité et stériles. Les cultures doivent rester stériles, les manipulations sont effectuées sous hotte à flux laminaire

- **Les cellules** (le laboratoire dispose de 3 ... types de ^)

Les cellules primaires ou dites de « primo-explantation » sont obtenues à partir d'organes (reins de singes (*ne sont plus utilisées en routine*), reins humains ...) ou de cellules sanguines :

- permettent la croissance de nombreux virus
- durée de vie limitée à quelques passages (3 passages) pour les cellules épithélioïdes
- dans les cellules de rein de singe : contamination par le virus simiens

Les cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires humains proviennent d'organes de foetus humains (poumon, rein ...) et conservent la propriété de se multiplier in vitro: fibroblastes pulmonaires embryonnaires humains : MRC5 (1950)

- demi-vie limitée à 40 passages : MRC5, mais le stockage par congélation des premiers passages et par décongélations successives permet l'utilisation de ces cellules sur plusieurs années
- Elles sont très utilisées et permissives à de nombreux virus

Les cellules en lignées continues sont des cellules hétéroplœides transformées, immortalisées, obtenues à partir de tissus cancéreux. Certaines proviennent de carcinome humain de col utérin (HeLa), du larynx (Hep-2), d'autres sont d'origine simienne (cellules Vero, MK2 qui dérivent de cellules de rein de singe), canine (MDCK) ou bovine (MDBK)...

- Croissance plus rapide que les diploïdes
- facile à cultiver : Le nombre de passages est illimité et la lignée peut, en théorie, être entretenue indéfiniment.
- utilisées pour certains virus

□ méthode

Aucun système ne permet l'isolement de tous les virus : les virus ont une spécificité d'hôte, on utilise en général les 2 ou 3 lignées cellulaires. Le choix des cultures cellulaires dépend du virus recherché. C'est ainsi que le cytomégalovirus est isolé uniquement sur fibroblastes humains diploïdes alors que le virus herpès simplex peut l'être sur de nombreux types cellulaires. Certains virus ne sont pas cultivables. Aussi dans un but diagnostique, il est nécessaire d'inoculer le produit pathologique en parallèle sur différentes lignées cellulaires pour élargir le spectre d'isolement des virus cultivables.

□ **RESULTATS** ==> **ECP et identification d'une famille de virus.**

L'**ECP** correspond à une modification caractéristique des cellules ou du tapis cellulaire due à une réplication virale. L'aspect et le délai d'apparition de l'ECP peuvent être caractéristiques d'un groupe viral donné et permettent l'orientation du diagnostic. Certains virus peuvent se multiplier sans provoquer d'ECP visible. Les signes de la réplication virale, **visibles** :

- **soit à l'état frais** (arrondissement ou rétraction des cellules, foyers de lyse)
- **soit après fixation et coloration** des cellules mises en culture sur des lamelles (inclusions intra nucléaires ou cytoplasmiques selon le site de multiplication du virus)

Les ECP peuvent être une **nécrose** : effet totalement destructeur des entérovirus, **un amas de cellules arrondies réfringentes** à bords nets, aspect en dentelle, rétraction de la masse cellulaire et son détachement du verre ← adénovirus (effet lié à l'action directe d'une protéine virale assimilée à la base des penton), **un syncytium** (cellules géantes) ← paramyxovirus, oreillons, rougeole, **des cellules arrondies**, très réfringentes, de taille irrégulières, en gouttelettes de mercure ← Rhino virus, **des cytomégalies** = cellules arrondies et augmentées de volume en petits foyers isolés peu extensifs CMV, **des cellules arrondies, ballonnées**, d'abord groupées en foyers ← herpès

Suivant 3 critères :

- aspect caractéristique de l'ECP
- type de cellules utilisées
- temps d'apparition de l'ECP CMV -> ECP en 9 semaines, HSV -> ECP en 1 à 3 jours

L'identification précise fait appel à des techniques immunologiques :

- tests de séroneutralisation de l'ECP en présence d'anti-sérums : on inhibe le pouvoir infectieux du virus avec un antisérum (identification et un typage) : application = les entérovirus : C'est la technique de base pour l'identification des virus et leur étude.

On peut avoir recours à d'autres techniques en fonction des propriétés de chaque virus. Recherche des hémagglutinines :

- inhibition de l'hémadsorption (propriété de la membrane des cellules infectées) : myxovirus. On introduit avant les globules rouges sur les cellules infectées, des anticorps qui vont masquer les sites membranaires et empêcher la fixation des globules rouges : Application : essentiellement l'identification des myxovirus sur cultures cellulaires. On n'utilise pas cette technique pour le titrage des anticorps.

- inhibition de l'hémagglutination : virus possédant une hémagglutinine en suspension + les anticorps puis les GR : les Ac inhibent l'absorption des virus sur les GR en s'interposant entre l'Hémagglutinine virale et le récepteur globulaire. Ex myxovirus (grippe, rougeole), rubéole, les arbovirus, les adénovirus, les réovirus, les poxvirus.

- *On peut caractériser les antigènes par des méthodes sensibles spécifiques* par immunofluorescence avec les Ac fluorescents ++ ou Elisa avec des Ac marqués à la peroxydase. On dispose d'un antigène de groupe ou peu de sérotype. (comme dans le diagnostic directe). Cas particulier pour la recherche du VIH => recherche de l'antigène P24 dans le surnageant de culture de lymphocytes ou recherche d'une activité enzymatique (transcriptase inverse du VIH)

INCONVENIENTS

- Prélèvements dans de bonne condition pour avoir du virus infectieux
- technique longue et coûteuse
- **certains virus sont non cultivables** (HAV, HBV HCV, cox A, rota)
- ABSENCE D'ECP : autres méthodes utilisés en fonction du virus suspecté

AVANTAGES

- MISE EN EVIDENCE DU VIRUS INFECTIEUX
- diagnostic non orienté
- possibilité d'étudier de façon + approfondie l'agent viral
- très sensible : son seuil de sensibilité est de $1 \text{ à } 10^2$ virions, mais technique lourde, longue, mal adapté au diagnostic d'une infection aiguë, sauf dans le cas d'infection respiratoire aiguë, d'infection congénitale à CMV, de pneumopathie à CMV chez les immunodéprimés, au diagnostic des infections chroniques (manques de systèmes cellulaires) sauf pour le HIV : cette technique complète souvent de manière très informative la recherche de génome virale pour le nouveau-né
- seule technique qui permet de faire un virogramme : **étude de la sensibilité aux antiviraux: tests phénotypiques**. Les tests phénotypiques permettent de déterminer la concentration d'une substance antivirale qui inhibe la réplication d'un virus donné de 50 % (CI₅₀) ou de 90 % (CI₉₀) voir de 99 % (CI₉₉).
- On peut augmenter la sensibilité de la culture cellulaire et le délais de réponse en centrifugeant l'inoculum sur la culture cellulaire
- quand on a une orientation précise, on peut actuellement, **réalisés des cultures rapides** avant l'apparition de l'ECP et mettre en évidence
 - soit des antigènes spécifiques exprimés précocement au cours du cycle de la réplication du CMV (Ac monoclonal E13), après 24 à 48 heures d'inoculation.
 - soit le génome viral (sonde CMV)

□ **INTERPRETATION DES RESULTATS parfois difficile : il dépend :**

- de la qualité des prélèvements et des cellules,
- du titre infectieux du prélèvement
- du caractère cultivable du virus.

risques d'échec nombreux -

la négativité des cultures ne permet pas d'éliminer formellement une infection virale

2 cas observés :

→ La présence d'un virus dans un prélèvement est **significative de son implication dans la pathologie observée** :

- entérovirus dans le LCR,
- virus herpes simplex dans un liquide vésiculaire

→ la présence d'un virus infectieux dans un prélèvement **ne témoigne pas obligatoirement de son pouvoir pathogène** :

- les virus de la famille des *Herpesviridae* sont souvent excrétés de façon intermittente ou chronique dans divers liquides biologiques (comme la salive pour EBV ou les urines pour CMV).
- De même, les adénovirus et les entérovirus peuvent être éliminés pendant plusieurs semaines dans les selles après l'infection aiguë.

Interprétation des résultats peut être difficile; elle doit se faire en fonction du contexte clinique, du virus isolé et de la connaissance de l'état immunitaire du patient.

Ces techniques d'isolement sur culture ^ tendent à être remplacées par des techniques de Δc plus rapide, chaque fois que cela est possible, en particulier dans les prélèvements concernant les infections respiratoires (HSV, RSV), les gastro-entérites (rota, adéno), les éruptions vésiculaires. Ce diagnostic permet la mise en route de mesures prophylactiques ou thérapeutiques immédiates MAIS, elle manque de sensibilité et ne s'applique donc qu'aux infections où des quantités importantes de virus sont produites. L'utilisation de ces techniques est à envisager dans le cadre d'une **stratégie diagnostique globale de l'infection virale et ne peut être dissociée de la culture, de la recherche du génome viral et du diagnostic indirecte.**

3 . DETECTION DIRECTE DES ANTIGENES VIRAUX

- **antigènes extracellulaires** solubles ou après lyse des cellules
- **antigènes intracellulaires** après lavage et fixation des cellules du prélèvement une lame pour immunofluorescence.

□ **Les prélèvements**

Les prélèvements doivent contenir **suffisamment de virus** pour le Δc direct. Dans le cas contraire, on aura recours aux techniques de biologie moléculaire, en particulier la PCR. Du fait de la bonne conservation des structures antigéniques, le prélèvement peut être conservé plusieurs heures à quelques jours à 4° C voire à température ambiante avant d'être transmis au laboratoire.

La détection des antigènes viraux ont été introduit avec la recherche de l'antigène HBs (technique d'immuno-précipitation : 1965)

Ex : l' Ag HBS

- Les premières méthodes en 1965, l'immuno précipitation permettait de déceler près de 40% des sujets porteurs
- les techniques de 2ème génération : électrocynérèse et la FC==> 60 %
- l'Elisa ==> 99%
- la recherche du génome viral

□ **les techniques**

Mise en évidence des antigènes viraux intracellulaires par Immunofluorescence ++ :

1er utilisation avec LIU en 1956 pour identifier le virus de la grippe dans les cellules épithéliales.

Sur coupe de tissu congelé ou sur cellules étalées sur lame et fixées à l'acétone, on utilise soit :

- un Ac monoclonal spécifique du virus marqué à la fluoresceine (IF direct)

- un Ac monoclonal spécifique non marqué et on ajoute une anti-IgG marquée à la fluorescéine (IF indirect ou sandwich) => sensibilité +++ (sélection d'anticorps monoclonaux reconnaissant des marqueurs antigéniques communs au groupe de virus que l'on veut identifier)

Les inconvénients de l'IF sont liés à des problèmes de prélèvements : pauvreté en cellules = résultat faussement négatifs et à des problèmes techniques (éliminer le mucus - examinateur fiable - pas d'automatisation) (on peut utiliser immuno-marquage à la peroxydase, alternative de l'IF)

Mise en évidence des Ag viraux solubles ou intracellulaires après lyse des cellules : Autrefois RIA (AgHbs), technique abandonnée, non remboursé par SS. Actuellement, **ELISA +++** dont la sensibilité est de 1 ng/ml

Principe de l'ELISA : il se fonde sur la propriété de certains plastiques traités d'absorber de façon stable l'Ag ou l'Ac. On utilise des marqueurs enzymatiques pour déceler la réaction Ag/Ac. Ce marqueur enzymatique peut être porté par l'Ag ou l'Ac.

Elisa direct :

- l'anticorps monoclonal utilisé est marqué avec un système enzymatique (peroxydase : peu stable, le substrat est le TMB ou l'OPD ou la phosphatase alcaline, le substrat est NADP = Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate)
- Ac peut être marqué avec la biotine, on ajoute la phosphatase alcaline couplée à l'avidine ==>amélioration de la sensibilité. Certaines trousse d'Ag P24 utilise ce principe.

Elisa indirect

- l'anticorps qui détecte l'antigène n'est pas marqué,
- anti IgG spécifique d'espèce marqué avec une enzyme
- meilleur sensibilité

Avantages de l' Elisa : rapide (2 h30)- sensible (utilisation d'anticorps monoclonaux) - information sur le sérotype - nombreux trousse commercialisées.

Inconvénients : non applicable à tous les virus - Δc orienté

techniques d' agglutination de particules de latex sensibilisées par des Ac

□ **applications**

Prélèvements de selles au cours des gastro-entérites virales :

Les quantités de virus présents dans les selles sont comprises entre 10^8 et 10^{12} particules virales par gramme de selles. Une recherche directe de rotavirus, d'adénovirus ou d'astrovirus peut être réalisée à d'un échantillon de selles diarrhéiques par **agglutination de particules de latex** sensibilisées ou **techniques immunoenzymatiques** plus sensibles.

Prélèvements de sécrétions respiratoires au cours des viroses respiratoires : mise en évidence les antigènes viraux dans les cellules du tractus respiratoire à partir d'écouvillonnages, d'aspirations rhino-pharyngées, de sécrétions trachéo-bronchiques et de liquide de lavage broncho-alvéolaire.

- Applications :
 - o les virus grippaux types A et B (des sous typages de virus A sont même possibles),
 - o le virus respiratoire syncytial,
 - o les virus parainfluenza,
 - o adénovirus
 - o les coronavirus.

- o la rougeole, du virus herpes simplex ou du cytomegalovirus, dans les pneumopathies rougeoleuses ou de l'immunodéprimé, il est possible de visualiser des antigènes du virus de dans des sécrétions du tractus respiratoire inférieur.

Prélèvements de lésions cutané- muqueuses en cas d'éruption vésiculeuse : le prélèvement doit être d'excellente qualité et comporter une quantité suffisante de cellules infectées, pour ce faire, il est conseillé de soulever le plafond de la vésicule avec une aiguille courte ou un vaccinostyle stérile et de frotter énergiquement la base de la lésion avec un petit écouvillon en dacron, de manière à détacher les cellules.

Applications : virus herpes simplex, virus varicelle-zona

Prélèvement de leucocytes du sang périphérique en cas de virémie à cytomegalovirus :

Mise en évidence la protéine pp65 (Ag précoce du CMV) dans le noyau des polynucléaires, à l'aide d'un anticorps monoclonal et un anticorps secondaire F(ab')₂ FITC

Prélèvements de sang pour recherche d'antigènes viraux dans le sérum

- Les antigènes du virus de l'hépatite B (antigène HBs, antigène HBe) sont recherchés par techniques immunoenzymatiques dans le sérum au cours des infections aiguës ou chroniques dues à cet agent. De même, récemment l'antigène de la capsid de l'hépatite C

- L'antigène p24 du virus HIV- 1 est détecté par technique immunoenzymatique dans le sérum lors de la phase précoce de la primo-infection.

Autres prélèvements : détection d'antigènes par immunohistochimie ou immunofluorescence à partir de biopsies (virus herpes simplex dans le poumon, cytomegalovirus au niveau digestif ou pulmonaire, virus de la rage dans le système nerveux central ...), virus de la rougeole dans les PEES

□ **Avantages de la détection directe des antigènes viraux**

- Règles de conservation et de transmission des prélèvements moins strictes
- Facilité de mise en œuvre - rapidité d'exécution
- grande spécificité de ces techniques par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Cette spécificité extrême peut devenir un inconvénient dans l'application diagnostic, car elle ne permettra la reconnaissance au sein d'un groupe de virus que de rares souches porteuses du déterminant antigénique correspondant. Donc il convient de sélectionner les anticorps monoclonaux reconnaissant les antigènes communs au groupe de virus que l'on veut identifier.
- Nombreux tests commercialisés (Tests souvent à la nomenclature)

□ **Inconvénients**

- Faible sensibilité : techniques intéressantes dans les infections où la réplication virale est importante : ROTA, ADENO et RSV, par contre peu efficace au cours des infections grippales ou à CMV : cette recherche est positive au début de l'infection.
- Coût relativement élevé
- Interprétation des résultats et signification de la présence d'Ag viral dans un prélèvement : dépend de la connaissance de la pathogénie du virus et de la maladie

Ex : Dans certains cas, la présence d'un virus n'est pas nécessairement responsable de la maladie : on peut retrouver longtemps après une phase aigue certains virus tels les adéno, les rota, l'AgHbs ou ces virus peuvent être responsable d'infections inapparentes. Certains sites sont à privilégier : le sang, le LCR par rapport aux prélèvements respiratoires ou au selles.

4. Détection du génome viral (ARN ou ADN)

L'utilisation des techniques de biologie moléculaire, très sensibles, a permis un essor du diagnostic virologique. Ainsi,

Ces techniques permettent :

- ❑ de porter le diagnostic d'infection par des virus difficilement ou non cultivables (parvovirus B19, HCV),
- ❑ de raccourcir le délai de diagnostic de certains virus cultivables (CMV, VZV),
- ❑ de détecter une réplication virale active (recherche d'ARN messagers), de suivre l'efficacité thérapeutique et éventuellement d'établir le pronostic des infections virales (quantification de l'ADN de l'HBV, de l'ARN du HIV ou de l'HCV ...)
- ❑ de conclure un diagnostic face à des profils sérologiques d'interprétation douteuse ou à une phase pré-sérologique de la maladie.
- ❑ ces techniques constituent des outils indispensables pour comparer les souches virales entre elles afin de réaliser des études épidémiologiques et d'établir des homologues entre des souches responsables d'infections nosocomiales.
- ❑ elles sont applicables à tous les virus, à condition de connaître la séquence du virus à rechercher

Ces techniques ne permettent pas :

- ❑ de rechercher aveuglément une présence virale, comme chez les bactéries,
- ❑ mais, il est possible de détecter des séquences conservées et communes à un groupe viral (herpès, entérovirus). Actuellement, on tente de développer un système d'amplification « multiplex » utilisant simultanément plusieurs couples d'amorces correspondant à différents virus, ou des systèmes de puces à ADN pour rechercher, dans un échantillon donné, un large éventail de génomes.

MAIS, l'utilisation des méthodes de biologie moléculaire dans le cadre du diagnostic virologique **de routine** est actuellement limitée par **le coût qui reste très élevé**. (simple hybridation en phase liquide : B 180=47 euros, L'ARN de l'hépatite C B 300 = 79 euro)

Il existe de nombreuses techniques de principes et d'applications différentes.

a. L'hybridation moléculaire

1) prélèvements :

- sang hépariné (HIV dans les leucocytes)
- sérum ou plasma (ADN de l'HBV, ARN de l'HCV, ADN du parvovirus)
- biopsies (formol) -> foie, condylomes ...
- liquide amiotique
- le LCR (isolement de virus après culture est souvent difficile)

2) conservation (fonction du virus)

- hépatite B : Tp ambiante et - 20E (ADN)
- hépatite C : - 80EC (ARN)
- sang hépariné (recherche du génome dans les leucocytes) : Tp ambiante
- biopsies dans du formol

3) principe et les techniques

Fixation sur le support et hybridation

→ **Hybridation en Southern Blotting**

→ **Hybridation en dot blot :**

- Peu utilisée

→ **hybridation *in situ*** : Elle permet l'identification de séquences d'acides nucléiques (ARN ou ADN) au sein d'une cellule ou d'un tissu : on utilise du matériel histologique pour localiser les séquences virales dans les tissus.

Technique :

- coupe de biopsie de 5 µm ou sur cellules cytocentrifugées
- fixées sur lame microscopique
- rendues perméables aux sondes par un traitement aux protéases.
- Le matériel cellulaire(les acides nucléiques) est dénaturé par chauffage à 100 °C, sans toucher pour autant la morphologie cellulaire
- Le brusque refroidissement de la lame permet de maintenir cette dénaturation (ADN simple brin)
- Une renaturation lente permet l'hybridation de l'ADN de la sonde avec l'ADN viral (T° basse)
- On utilise des sondes non radioactives
- Indications nombreuses : **HSV, CMV, dépistage d'infections persistantes ou de cancers d'origine virale, détection des papillomavirus sur coupe ultra fine** (typer = pronostic des lésions)

Fixation sur le support est secondaire

→ **Immucapture sur phase solide (Hybrid Capture System) :**

- Principe de l'immucapture « sandwich »
- Pour les virus àADN
- Capture de l'hybride : sonde ARN/ADN viral cible à l'aide d'un anticorps anti-hybride fixé sur un support".

Les échantillons contenant de l'ADN s'hybride avec une sonde ARN. L'hybride ARN/ADN est capturé à la surface d'un tube recouvert d'anticorps anti-hybride ARN/ADN. On ajoute un conjugué Ac anti hybride ARN/ADN lié à la phosphatase alcaline, puis le substrat chimioluminescent. L'intensité de la réaction est proportionnelle à la quantité d'ADN de l'échantillon.

- Application : ADN de l'hépatite B, CMV

*Ces techniques nécessitent la présence d'une certaine quantité de génome viral (10^5 copies d'acides nucléiques par échantillons) pour obtenir un signal, donc **manque de sensibilité***

Ces techniques sont réservées au virus qui se répliquent abondamment, tel le virus de l'hépatite B, les HPV. (tableau des principales trousse commercialisées utilisant les techniques d'hybridation)

b. Amplification du signal

Une technique dite « **ADN BRANCHE (bDNA)** » consiste à augmenter le signal post-hybridation, en utilisant des sondes ramifiées (ADN branché) ==> seuil de détection est alors de 500 copies /ml de plasma ==> application : le HIV, l'hépatite C

C'est une amplification du signal et non une amplification des acides nucléiques. On utilise des molécules d'ADN branché dont la configuration en branche permet la fixation d'un nombre important de **phosphatase alcaline**. Les sondes spécifiques du génome à rechercher capture par hybridation le génome viral, puis des molécules d'ADN branchés s'hybrident secondairement.

c. Amplification génique

Quand le virus est en petite quantité (peu d'ARN ou d'ADN), on aura recours à **la PCR** (polymerase chain reaction ou amplification génique) ou une **RT-PCR** (avec une étape supplémentaire de transcriptase inverse)

Cette technique consiste à copier à l'aide d'une enzyme (Taq polymérase), une région de l'ADN délimitée par des amorces (primers) => multiplication artificielle du génome viral. A partir d'une copie de virus, on peut obtenir 2^{30} copies d'ADN

Il s'agit en effet de réaliser une duplication de l'ADN in vitro reproduisant, en vitesse accélérée, la réplication de l'ADN in vivo.

Elle peut être réalisée :

- soit sur de l'ADN extrait des échantillons
- soit sur de l'ARN avec une étape préalable de transcription inverse pour transformer l'ARN en ADN complémentaire : on utilise une *reverse transcriptase* : on parle de RT-PCR

→ La PCR en phase liquide

==> 4 étapes

- extraction du génome viral : l'ADN ou de l'ARN dans les prélèvements (il faut éliminer les substances inhibitrices)
- les 2 brins complémentaires à amplifier sont dénaturés thermiquement à 94°
- le refroidissement du mélange au alentour de 55° , permet l'hybridation de deux courtes amorces nucléotidique "le primer" sur chacun des brins dissociés. Les 2 amorces se fixent (s'hybrident) ainsi de part et d'autre de la région à amplifier (en amont et en aval). Les deux amorces sont choisies pour encadrer un segment connu du virus, spécifique du virus et destiné à être amplifié.
- on ajoute ensuite l'enzyme thermostable nécessaire à la polymérisation du brin complémentaire (*la taq polymérase*) à partir de l'amorce fixé : cette réaction se déroule en présence de nucléotides et de ligase, d'ATP et de CTP qui vont être intégrés dans le brin néosynthétisé. Ainsi la *taq* polymérase fabrique une copie de chaque brin d'ADN.

En fin de cycle, on obtient deux doubles brins comprenant la séquence comprise entre les 2 amorces.

Ce cycle est répété 20 à 40 fois ce qui nécessite l'ajout d'enzyme et de nucléotides avant chaque polymérisation.

= = > La révélation des amplifias est réalisée par

- électrophorèse sur gel suivi d'une hybridation marquée.
- Capture des produits amplifiés sur une phase solide (format micro-plaque) : capture spécifique avec des sondes fixées sur le support

Le système complet de PCR n'est commercialisé que par la firme ROCHE (achat du Brevet PCR)

→ D'autres firmes commercialisent **d'autres systèmes d'amplification**, mais il s'agit toujours de l'amplification sélective d'un fragment d'acide nucléique grâce à des amorces spécifiques.

Les modifications portent :

- sur le système enzymatique d'amplification
- sur le système de révélation des produits amplifiés

Autres techniques :

- ❑ le Nasba (Nucleic Acid Sequenced Basal Amplification) d'Organon Technika : c'est une amplification cyclique ARN-ADN à T° constante révélée par électroluminescence. Le gène amplifié est le gène Gag
- ❑ la Ligase Chain Reaction (LCR) de Abbott Diagnostics,
- ❑ SDA ou Strand Displacement Amplification
- ❑ 3SR (Self Sustained sequence replication Reaction)
- ❑ LAT (Ligation Activated Transcription Amplification)
- ❑ QB R (Qbéta réplicase) réplicase du bactériophage Qbeta

Inconvénients :

- la spécificité, faux r liés à la contamination entre échantillons et à de mauvaises conditions techniques
- l'amplification peut être faussement négative en cas de variations génomiques au niveau des séquences cibles des amorces ou de la sonde de révélation
- manque de standardisation : nombreuses techniques "maison"
- Dans toutes ces techniques, nécessité d'une orientation précise dans le type de recherche.

Avantages :

- très sensible : détecte 1 à 10 copies d'ADN. La sensibilité est limitée par les étapes initiales d'extraction du génome, par la présence d'inhibiteurs d'amplification dans le prélèvement tel l'héparine, l'hémoglobine, par la mauvaise conservation du prélèvement (ARN labile)
- on peut augmenter la sensibilité par utilisation d'une seconde PCR réalisée sur le produit de la première amplification, à l'aide d'amorces internes au fragment amplifié. ==> risque important de faux positifs

Applications à tous les virus ; il suffit que le génome viral ait été entièrement séquencé. Le génome viral peut être recherché dans n'importe quel compartiment de l'organisme : sérum, LCR, LA,

Au départ, la PCR s'est orientée:

- vers la recherche de virus normalement absents de l'organisme (HIV, HépatiteC, HBV)
- vers des virus présents fréquemment dans l'organisme donc leur présence n'est pas synonyme de pathologie, sauf s'il se trouve dans des compartiments particuliers - *exemple* : HSV ou CMV dans le LCR ou parvovirus dans le liquide amniotique

En routine, les applications :

- HIV chez le nouveau-né
- ARN du VHC
- ADN HBV (quand technique d'hybridation en phase liquide ou d'ADN branché sont négatives)
- A partir du LCR, dans le cadre de méningite : entérovirus, herpesviridae
- le virus JC (polyomavirus) sur biopsie cérébrale - LCR - lymphocyte du sang périphériques : agent responsable de la leucoencéphalite multifocale progressive chez les immunodéprimés
- le virus BK dans les urines : atteinte de l'appareil urinaire chez les sujets immunodéprimés
- en pathologie prénatal : parvovirus, rubéole et CMV (atteinte fœtale)

d. Amplifications quantitatives : charge virale

- Quand un virus persiste à l'état latent dans certaines cellules de l'organisme (cas de la famille des herpèsviridae) et touche un grand nombre de personnes, la recherche de ces virus par PCR sera vraisemblablement positive : la quantification reflète le niveau de la réplication virale
- Intérêt de la quantification, basée sur la notion qu'un virus qui se réplique est présent en quantité plus importante que lorsqu'il est à l'état latent.
- prouver une infection active
- suivre l'évolution du processus infectieux
- suivre l'évolution du traitement
- compréhension de la physiopathologie de la maladie (ex : le HIV)

Applications

- **VIH** : 3 tests commercialisés : des techniques d'amplification de la cible comme HIV MONITOR de ROCHE – NASBA d'organon et des techniques de l'ADN branché comme QUANTIPLEX HIV RNA. Le seuil de sensibilité de ces tests est variable de 500 ==> 20 copies/ml. La charge virale est exprimée en log et ou en copies.
- **Hépatite C** : idem

e. PCR Multiplex

Un des principaux inconvénients de la PCR est le fait que la PCR est un diagnostic orienté.

L'objectif de la PCR Multiplex est de rechercher :

- des agents pathogènes de structure génomique proche en amplifiant une séquence suffisamment conservée commune aux différents virus recherchés ex : les virus de la famille des herpèsviridae : ARGENE commercialise :
 - des amorces qui amplifient une zone conservée codant pour l'ADN polymérase des herpèsvirus et des amorces
 - 6 sondes concernant les divers virus de la famille des herpès ; HSV1-HSV2-VZV-HHV6 - CMV-EBV
 - utilisé en routine dans les laboratoires pour le diagnostic de méningite herpétique
- des agents pathogènes éloignés ayant comme seul point commun de pouvoir provoquer des infections du même organe. On utilise des systèmes d'amorces spécifiques de chaque germe. Ex : recherche simultanée de haemophilus ducreyi, treponema pallidum et HSV dans les ulcères génitaux. idem pour les méningites, ou les gastroentérites.

f. Détection de la résistance au antiviraux

La méthode de détection de ses résistances est le séquençage.

ex : résistance aux anti-rétroviraux tel l'AZT : recherche de mutation sur les codons de la reverse transcriptase (215- 41- 67- 70 –et 219)

Autres méthodes :

- PCR sélective : on utilise des amorces des mutants

Cours Dr Bassignot Agnès : année 2003 _ DCEM 1

- utilisation de bandelettes de nitrocellulose sur lesquelles sont immobilisées des sondes spécifiques des zones mutées. Ces bandelettes doivent être hybridées avec un produit de PCR de la zone concernée (amplifiats de la zone de la reverse transcriptase). La révélation s'effectuant par une réaction enzymatique.

g. Le génotypage

Possibilité de différencier au sein d'une espèce virale donnée des souches plus virulentes que d'autres.

- les virus àADN sont stables
- les virus àARN font preuve d'une grande variabilité : VIH, VHC <=== intérêt du génotypage

Intérêt du génotypage

- intérêt épidémiologique. Pour le VHC : 9 types et 52 sous types Notion de quasi espèces
- intérêt thérapeutique : faible réponse à l'interféron au long cours pour les patients infectés par le génotype1b.
-

Méthodes et Applications :

- réactifs commercialisés (INNO-LIPA II pour le virus de l'hépatite C)

II. Mise en évidence de la réponse immunitaire : Sérologie

- ❑ outil biologique de **première intention** du diagnostic de nombreuses Infections virales (infection par HIV, hépatites. Mononucléose infectieuse, rubéole, rougeole, parvoviroses...).
- ❑ L'âge d'or de la sérologie virale est probablement derrière nous à cause des techniques plus rapides de culture ou de détection des antigènes viraux et surtout de la pratique des techniques de biologie moléculaire, bien que les méthodes sérologiques se soient automatisées et miniaturisées.

LES INDICATIONS

- ➔ mise en évidence des anticorps résiduels protecteurs témoins d'une infection ancienne (rougeole, rubéole, hépatite A ...)
- ➔ des anticorps vaccinaux à un titre protecteur (hépatite B, rubéole),
- ➔ des anticorps dont la présence prouve que le sujet est porteur du virus (HIV, HTLV) ou est susceptible de présenter des récurrences (CMV, EBV, HSV...)

Le diagnostic sérologique permet :

- d'établir un lien entre des manifestations cliniques et un virus donné au stade aigu de l'infection en mettant en évidence une séroconversion, une élévation significative du titre des anticorps et/ou la présence d'Ig M spécifiques,
- de suivre l'évolution d'une infection virale aiguë vers une guérison ou vers une infection chronique persistante (hépatite B).

A. PRELEVEMENTS

Le prélèvement doit être réalisé :

- avant toute thérapeutique susceptible de modifier l'interprétation du sérodiagnostic telles que sérothérapie, transfusion...,
- sur tube sec (sérum); plus rarement sur plasma : l'utilisation de certains anticoagulants peut perturber les résultats ; Il peut s'agir de LCR, humeur aqueuse, liquide articulaire, salive ou urines (domaine de la recherche)
- prélever un sérum précoce (dès le début des signes cliniques ou dès le contagé) et un sérum tardif 15 jours plus tard, afin d'objectiver une séroconversion, une élévation significative ou une stabilité du titre des anticorps dans la perspective d'un diagnostic (les 2 prélèvements seront traités en même temps)

Qualité du prélèvement :

- le transport de l'échantillon ne demande pas de précautions particulières
- il peut être conservé 24 à 48 heures à + 4 °C avant décantation avant la survenue d'une hémolyse qui peut perturber certains dosages

Cours Dr Bassignot Agnès : année 2003 _ DCEM 1

- les sérums lipémiques, riches en bilirubine, prélevés post mortem (examens médico-légaux) ou présentant des auto-Ac ne sont pas validés pour de nombreuses trousse commerciales.
- Plus rarement, une baisse de la performance des tests peut être observée lorsque ceux-ci sont réalisés sur plasma plutôt que sur sérum
- Les pools de sérum sont interdits

Les sérothèques :

- Le sérum aliquoté est conservé à - 20 °C au moins 1 an pour toutes sérologies, 3 ans pour le diagnostic anténatal
- Il est souvent utile de conserver des sérothèques sur plusieurs années, un stockage à -80 °C est alors recommandé : cette sérothèque n' est valable que si on réalise d'emblée des aliquotes de sérum à partir de l'échantillon pour n'avoir à décongeler qu'un aliquote en cas de besoin.

B. LES TECHNIQUES

4. Choix des techniques sérologiques :

Critères techniques : 3 paramètres

1. Le type de réaction utilisée

- réactions primaires : fixation de l'antigène sur l'anticorps sans intervention d'autres facteurs EX : RIA, ELISA, IF, western-blot (techniques très sensibles(0,00001µg/ml)
- réactions secondaires : elles font intervenir d'autres paramètres que la seule fixation Ag/Ac: tests qui inhibent certaines fonctions virales. Elles privilégient certains Ac : Ac fixant le complément, Ac neutralisant, agglutinant (réaction de fixation du complément (0,1 µg/ml), Inhibition de l'Hémagglutination virale (0,5 µg/ml), la neutralisation virale)

2. **la validité** : témoins internes différents de ceux de la trousse

3. **la simplicité**

Les critères économiques valeur du B , en 2001 B = 1,72 F

Les critères sémiologiques :

- a. la sensibilité = fréquence d'un test positif chez des malades atteints de l'affection
- b. la spécificité = fréquence d'un test négatif dans la population normale ou chez des sujets atteints d'une affection voisine

5. les Antigènes

Les antigènes viraux utilisés proviennent de virus entiers ou des antigènes natifs purifiés, des protéines recombinantes ou des peptides synthétiques. Il peut s'agir d'antigènes structuraux ou non structuraux.

□ Antigènes structuraux :

- liés à la capsid : capsomères (hexons, pentons), hémagglutinines, antigènes de « core »,

- liés à l'enveloppe : hémagglutinines, glycoprotéines (transmembranaires, de surface)
- **Antigènes non structuraux** : comme certaines enzymes immunogènes (endonucléase, polyniérase, transcriptase inverse ...).

6. Les techniques (nombreuses)

Réaction de fixation du complément

Rappels sur le complément : 20ème de protéines qui vont intervenir dans la défense de l'organisme. Ont la particularité de se fixer sur le complexe Ag-Ac. Cette fixation peut entraîner une activation enzymatique qui se traduit par une hémolyse.

Principe :

compétition du complément pour 2 systèmes : (Ag-Ac et GR de mouton/ anti-GR) → Ag étant connu, on recherche les Ac présents dans le sérum

- Pas d'hémolyse : le C est fixé sur Ag-Ac => réaction r
- Hémolyse : il n'y a pas d'Ac => réaction s

Technique :

- Non standardisée : elle nécessite de nombreux témoins
- Elle permet la recherche de nombreux anticorps dans une série : screening
- technique ancienne, encore utilisée car peu coûteuse

Applications : infections récentes, en particulier dans le cadre des viroses respiratoires (grippe A, B, RSV, adéno, paramyxovirus)

Séroneutralisation

Principe :

Les Ac présents dans le sérum neutralisent l'infectivité du virus, donc inhibe l'ECP visible au MO. Cette réaction nécessite une culture de ^ (donc posséder des systèmes cellulaires sensibles pour la réplication du virus)

Ces Ac, dits neutralisants *in vitro*, ont souvent une activité protectrice *in vivo*. Ils sont habituellement dirigés contre les constituants superficiels des particules virales, les moins conservés, ce qui garantit la **spécificité** de la technique.

Technique :

technique laborieuse car elle nécessite un laboratoire de culture cellulaire.

- ^ + virus sans sérum => ECP
- ^ + virus + sérum => pas d'ECP

Applications : Elle ne s'applique **qu'aux virus induisant un ECP d'apparition rapide** : entérovirus (70 sérotypes ... et il n'y a pas d'Ag de groupe, Coxsackies B1, 2, 3, 4, 5; Polio 1, 2, 3; Echovirus 5, 6, 7, 30), virus herpes simplex. Elle reste la technique de référence pour mesurer l'immunité anti-poliomyélitique

Inhibition de l'hémagglutination virale ou IHA

principe :

- Certains virus (de la rubéole, de la grippe... comprennent à leur surface une hémagglutinine capable d'agglutiner spécifiquement les hématies de certaines espèces animales (cobayes, poussins nouveau-nés...).

- Les Ac spécifiques du virus se fixent sur le virus => le virus n'a plus accès à la surface des hématies => il y a inhibition de l'hémagglutination donc inhibition de la formation d'un agglutinat visible à l'oeil nu

Techniques :

- L'IHA est souvent dépendante des conditions expérimentales (pH, température...) et exige de disposer de globules rouges frais de l'espèce sensible.
- Pour garantir la spécificité de la réaction, il faut éliminer de l'échantillon sérique les anticorps hétérologues dirigés contre les hématies tests (risque de faux positifs) et les inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination (bêta-lipoprotéines par exemple) (risque de faux négatifs). Les anticorps mis en évidence par IHA sont habituellement protecteurs *in vivo* et permettent d'apprécier le niveau de protection naturelle ou post-vaccinale d'un individu (intérêt pour la rubéole ou pour la grippe). La sensibilité de IHA est moindre que celle de l'ELISA
- Cette technique détecte les IgG et les IgM : réponse en IHA ==> l'interprétation ne pourra se faire que sur deux sérums prélevés à 15 jours d'intervalle

Applications :

encore utilisée pour la sérologie de la rubéole : virus hémagglutinant

L'Immunofluorescence indirect

Le principe : proche de celui des techniques ELISA. Le support sensibilisé est constitué de cellules infectées fixées sur une lame.

La technique :

- Le réactif utilisé pour reconnaître les Ac du patient fixés sur l'antigène est un immun-sérum anti-globulines humaines (totales ou spécifiques de classe) conjugué à un fluorochrome.
- La lecture est effectuée en microscopie optique à fluorescence.
- La mise en oeuvre de IFI est rapide (1 à 2 heures),

Inconvénients :

- spécificité imparfaite (interprétation subjective et présence éventuelle de FR dans le sérum du patient).
- absence d'automatisation, techniques réservées à de petites séries.

Applications : EBV, la recherche d'IgM du RSV, du Paramyxovirus

Techniques radio- immunologiques (RIA)

Le principe : proche de celui des techniques ELISA, le deuxième anticorps étant couplé ici à un radio-isotope. La détection des immuns complexes marqués est réalisée grâce à un compteur gamma. Du fait de la difficulté de leur exploitation (radioprotection, autorisations administratives, instabilité relative des réactifs), les techniques RIA sont de moins en moins utilisées dans les laboratoires de virologie.

Agglutination sur lames de particules de latex sensibilisé par un Ag

Principe :

Elle met en jeu des particules (latex, gélatine, hématies) sensibilisées par l'antigène viral dont l'interaction avec l'Ac (IgG et IgM) du sérum à tester conduit à une agglutination macroscopique rapide (quelques minutes à 2 heures).

Technique :

Lors de sa mise en oeuvre, il faut obligatoirement retester tout sérum trouvé négatif, après l'avoir dilué au 1/10e ou au 1/20e afin d'éliminer tout phénomène de zone (faux négatif lié à la formation de complexes immuns réversibles en grand excès d'Ac).

Application :

- petites séries effectuées en urgence.
- grande sensibilité permet de l'utiliser pour détecter un état d'immunité.
- La lecture manque de standardisation.

Applications : HIV, CMV, EBV (recherche des anticorps hétérophiles)

ELISA (méthodes +++)

Principe

Le sérum à tester est mis en contact avec un support solide (microplaque de titration, microparticules ...) sensibilisé par l'antigène viral vis-à-vis duquel est effectuée la sérologie.

Après incubation et lavage, le complexe immun ainsi immobilisé est révélé par l'addition d'Ac anti-immunoglobuline humaine (anti-IgG, IgG-1, IgG-3, IgM, IgA ou Ig totales), appelé conjugué, qui est couplé à un système de révélation de nature enzymatique (*enzymeimmuno assay* = EIA ou *enzlyMe linked invnunosorbent assay* = ELISA).

Le substrat de l'enzyme peut être fluorogénique, chimioluminescent ou chromogénique, les effets obtenus étant quantifiés respectivement grâce à un fluorimètre, un luminomètre ou un spectrophotomètre.

techniques :

méthodes :

- **Elisa indirecte avec un Ag marqué** (méthode à double site anticorps) permet la détection simple, rapide (quelques minutes ou heures) et semi-quantitative des classes ou sous classes d'Ac spécifiques d'un virus.
- **Elisa indirecte avec avec une Antiglobuline marquée**
- **Méthode par compétition** avec un anticorps marqué : moins sensible mais plus spécifique, les Ac sériques entrent en compétition avec un Ac de référence conjugué à l'enzyme, pour leur fixation sur l'antigène. La coloration obtenue est inversement proportionnelle à la quantité d'Ac à tester.
- Détection des IGM par technique ELISA est simple et sensible. Le protocole indirect décrit présente deux inconvénients :
 - o l'existence d'une compétition entre les IgG et les Ig M pour la fixation sur l'antigène
 - o l'obtention de réactions faussement positives en cas de présence de facteurs rhumatoïdes (FR) (Ig M dirigées contre les IgG du soi, qui se lient aux IgG humaines spécifiquement fixées sur l'antigène). → Pour pallier cet écueil, il convient d'absorber préalablement les FR de l'échantillon sérique par un immun -sérum anti IgG humaines.

Une alternative plus rapide et sans doute plus efficace est la **méthode dite d'immunocapture reverse**, actuellement très recommandée.

Les Ac anti-chaîne humaine liés au support capturent tous les anticorps de classe IgM du sérum (spécifiques, non spécifiques et éventuels FR). Par la suite, seules les IgM spécifiques sont révélées par l'adjonction soit d'antigène viral directement conjugué à l'enzyme (réaction directe), soit d'antigène viral non marqué révélé par un Ac conjugué (réaction indirecte).

Avantages :

- La grande **sensibilité** peut être optimisée grâce à une amplification du système de révélation (couple streptavidine-biotine par exemple). Néanmoins, on sait que toute augmentation de la sensibilité a tendance à réduire la spécificité.
- La **spécificité** d'une réaction est très liée à la pureté des antigènes viraux utilisés. Elle est optimale si des protéines recombinantes ou des oligopeptides de synthèse sont utilisés. Par contre, l'emploi de constituants viraux purifiés (même fortement) à partir d'un lysat de cellules humaines ne garantit pas toujours l'absence de déterminants cellulaires responsables de résultats faussement positifs.
- **Détection des classes d'Ac :**
 - o Ac spécifiques de classe IgG
 - o Ac spécifiques de classe IgM → preuve d'une infection virale aiguë ou active sur un échantillon sérique précoce unique, les IgM étant en règle générale synthétisées au cours des quelques semaines qui suivent la primo-infection et ont une durée de vie courte. Elles sont inconstantes lors des épisodes de réinfections ou de réactivation (cytomégalovirose, zona). Du fait de l'absence de passage transplacentaire, leur présence chez le nouveau-né ou dans le sang ~~foetal~~ *in utero* (après la 2^e semaine d'aménorrhée) signe l'infection foetale.
 - o Ac spécifiques de classe IgA
- **Automatisation :** l'immunoanalyse par ELISA a été développée sur deux types d'automates, autorisant une bonne reproductibilité (grandes séries et faibles volumes réactionnels - adaptées au dépistage (HIV, hépatite C) :
 - o les systèmes fermés" (n'acceptant que des réactifs propres) qui exploitent des supports sensibilisés performants permettent de raccourcir les temps d'incubation
 - o les systèmes "ouverts" capables d'effectuer toute la réaction ELISA sur support de microplaque à partir de réactifs commerciaux ou propres au laboratoire. Ces appareils identifient souvent les échantillons sériques par code à barres et peuvent être connectés de façon mono- ou bi-directionnelle à l'informatique centrale du laboratoire.
- **Quantification des Ac** (semi-quantitatif). Le titre obtenu par extrapolation à partir de la densité optique mesurée à une dilution unique faible du sérum est très approximatif. En effet, cette grandeur est corrélée à l'avidité et non au titre qui reflète le nombre de molécules d'Ac. Cela étant, en dehors de certains cas particuliers, la quantification de la réponse sérologique a perdu de son intérêt aujourd'hui. Un titrage exprimé en "**unités internationales**" est possible lorsque des sérums étalons de référence sont disponibles (rubéole, parvovirus B19).
- **Avidité des IgG :** exploitant l'existence d'une maturation de la réponse immunitaire humorale (augmentation de l'affinité intrinsèque paratope/épitope) au décours de l'infection, la détermination de l'avidité (affinité fonctionnelle) des IgG permet de **distinguer primo-infection et infection ancienne**, voire de dater approximativement une infection. La méthode consiste à mesurer par technique ELISA, le degré relatif de dissociation spécifique du complexe immun par l'action d'un agent dénaturant (urée). L'avidité représente un marqueur d'appoint (parfois le seul disponible) pour distinguer entre primo-infection et réactivation (rubéole ou infection à CMV au cours de la grossesse par exemple).

applications : détecte les Ac dirigés

- contre ... virus (HSV, CMV, rougeole, oreillons, varicelle, hépatites A, C, D, HIV, HTLV)
- contre ... protéines (étude des profils EBV, hépatite B)

Western blot ou immunoblot (techniques d'immuno-empreintes)

introduit en 1985 avec le HIV : utilisé pour confirmer un résultat r en ELISA

Principe : les protéines virales natives sont séparées par électrophorèse puis transférées sur membrane de nylon. Les Ac spécifiques éventuellement présents dans le sérum se fixent sur ces protéines. On révèle la liaison Ag-Ac par une anti-Ig marquée à l'aide d'une enzyme. On ajoute le substrat => réaction colorée.

Avantages :

- Plus spécifiques que l'ELISA
- Réponse en détail vis à vis des protéines virales

Applications :

- Stratégie diagnostic dans le cadre du HIV : Le dépistage des anticorps anti-VIH doit s'effectuer avec 2 réactifs mixtes (VIH 1 et VIH2). En cas de positivité des résultats des tests du 1^{er} prélèvement, un second prélèvement sera obligatoirement réalisé. La présence des anticorps ne sera validée que si les tests de dépistages du 2^{ème} prélèvement sont positifs : un western blot, confirmera le type de virus.
- hépatite C (RIBA) mais on utilise alors des protéines recombinantes ou synthétiques.(il n'est plus utilisé)
- confirmation d'une sérologie positive en HTLV1 et 2.
- Dans le cadre de la recherche : CMV....

7. LES CONTROLES DE QUALITE

- contrôle lors de la commercialisation des trousse (agrément auprès du LNS)
- contrôle continu des trousse proposées par les distributeurs
- contrôle au niveau de chaque laboratoire
- contrôle national de qualité (contrôle inter laboratoire) (Rubéole, HIV, HCV, Western-BLOT)

8. CINETIQUE D'EVOLUTION DES ANTICORPS et INTERPRETATION

Chez un sujet immunocompétent :

1. La primo-infection est le plus souvent suivi d'une réponse humorale mise en évidence par une séroconversion avec apparition des Ig M et/ou d'une élévation significative du titre des anticorps sur 2 prélèvements effectués à 15 jours d'intervalle

Chronologiquement apparaissent les anticorps de la classe des Ig M témoin de l'infection récente, puis d'une manière presque contemporaine les anticorps de type IgG . Les Ig M disparaissent en quelques semaines à plusieurs mois (en fonction des techniques utilisées), les IgG persistent longtemps et restent le seul témoin d'une infection ancienne et d'une immunité résiduelle.

Le délais de détection des anticorps varie avec :

- le type de virus,
- le test sérologique utilisé (pour le HIV, le délais d'apparition des anticorps est d'une 20 ène de jours avec les test ELISA. Pour l'hépatite B, les anticorps anti-HBc apparaissent dans un délais de 2 mois. Pour la grippe ce délais est de quelques jours)
- l'état immunitaire du sujet

Un sérologie précoce négative ne permet pas d'exclure une étiologie virale

2. Lors des réinfections, on observe une augmentation très rapide et significative des anticorps de type IgG et classiquement sans apparition des IgM. Cependant les techniques actuelles (technique d'immunocapture et élimination du facteur rhumatoïde) sont très sensibles et peuvent détecter des IgM lors des réinfections et lors des réactivations virales (HSV, EBV)

→ un problème d'interprétation va se poser lors de la persistance prolongée des IgM après une primo-infection ou les réapparitions des IgM lors des réinfections notamment chez la femme enceinte sans historique de séroconversion.

→ La détermination de l'index d'avidité des Ig G permet d'évaluer l'affinité des anticorps. Une valeur faible (inférieur à 30 %) serait en faveur d'une infection débutante alors qu'une valeur élevée (supérieur à 65 %) signifierait une infection ancienne.

Ce test d'avidité peut aider à dater une primo-infection chez une femme enceinte

Chez le nouveau-né :

La barrière placentaire est perméable au Ig G mais pas aux IgM et IgA. (transmission passive des Ig G d'origine maternelle.

- La détection des IgM dans le sang ~~fo~~ale, dans le sang du cordon ou dans le sang périphérique du nouveau né correspond à une synthèse propre du ~~fo~~us ou du nouveau-né et donc à une infection
- La détection des IgG chez le nouveau né est difficilement interprétable du fait de la transmission passive des Ig G d'origine maternelle.
 - Ces Ig G disparaissent progressivement mais peuvent persister jusqu'à l'âge de 12 mois .
 - A partir de 6 mois, la persistance, puis l'augmentation du titre des IgG correspond à une synthèse propre à l'enfant. (intérêt de conserver les sérums et de traiter les prélèvements simultanément)

Chez le patients immunodéprimés :

Interprétation délicate, la cinétique des anticorps est modifiée, parce que :

- la réponse immunitaire spécifique est perturbée
- ces patients bénéficient de transfusions et ou de sérothérapie
- ces patients bénéficient de traitement anti-viraux préventifs

Chez ces patients, il faut privilégier le diagnostic direct

L'expression des résultats sérologiques est très variable selon le virus, la technique, la laboratoire et surtout l'hôte. Aucune norme ne peut être établie. Il n'existe pas de titre significatif des IgG ou des Ig totaux pour dater une infection : leur présence est uniquement révélatrice d'un contact , actuel ou antérieur avec le virus.

Autre examens :

La mesure du taux d'interféron alpha peut constituer une aide au diagnostic virale dans le cadre d'une infection congénitale (rubéole) ou d'une infection neuroméningée virale :

Le rôle de l'interféron alpha (IFN) dans les défenses naturelles contre les virus est important, pour :

- ces propriétés antivirales
- ces propriétés immunomodulatrices, qui contribuent à limiter l'infection virale

ex : La présence d'interféron à un taux supérieur à 2 UI/ml dans le sang d'un fœtus dont la mère a eu une séroconversion dans les 4 premiers mois de la gestation est un marqueur d'infection in utéro (concordance avec la présence d'IgM anti-rubéole dans 95 % des cas)

En conclusion, tout bilan viral doit être proscrit. Les prescriptions doivent être ciblées → le dialogue entre biologistes et cliniciens permet d'effectuer les prélèvements les plus adéquats et au moment opportun, d'utiliser les techniques virologiques, les plus appropriées en termes de sensibilité, de spécificité et de rapidité, afin d'obtenir une interprétation optimale.