



Université Alger 1.Faculté de  
Médecine.

Conférences de l'internat Médecine

Année Universitaire 2017/2018

# Diagnostic en virologie

*Pr. Samir Gourari*

Virologie – CHU Mustapha

# Ampleur du problème (1)

## Hépatites virales :

- 240 millions de porteurs chroniques du **VHB**
- 130 à 150 millions de porteurs chroniques du **VHC**
- En Algérie: prévalence de l'Ag HBs = **2.15%** (1998)
- En 2013, l'hépatite virale était la 7<sup>e</sup> cause de mortalité dans le monde. Elle serait responsable de 1,4 million de décès/an (cirrhoses et hépatocarcinomes)

# Ampleur du problème (2)

## Infection VIH/SIDA :

- environ 37 millions de personnes dans le monde vivaient avec le VIH en 2015
- On estime que ce virus a infecté 2,1 millions de personnes rien qu'en 2015.
- A ce jour, on estime à 35 millions le nombre de personnes décédées des suites du sida dont 1,1 million en 2015.

# Ampleur du problème (3)

## Infections Respiratoires Aigues (IRA) :

- Les IRA virales sont les premières infections en terme de fréquence.
- Les épidémies de grippe se déclarent régulièrement avec leurs lots de surmortalité, parfois des pandémies sont enregistrées avec une létalité qui peut être exceptionnelle

## Pandémie de 1918 :

- la plus meurtrière de tous les temps  
**20 à 40 millions de morts** (létalité de 2,5% contre 0,1% au cours des épidémies classiques)
- **pic chez les jeunes adultes**

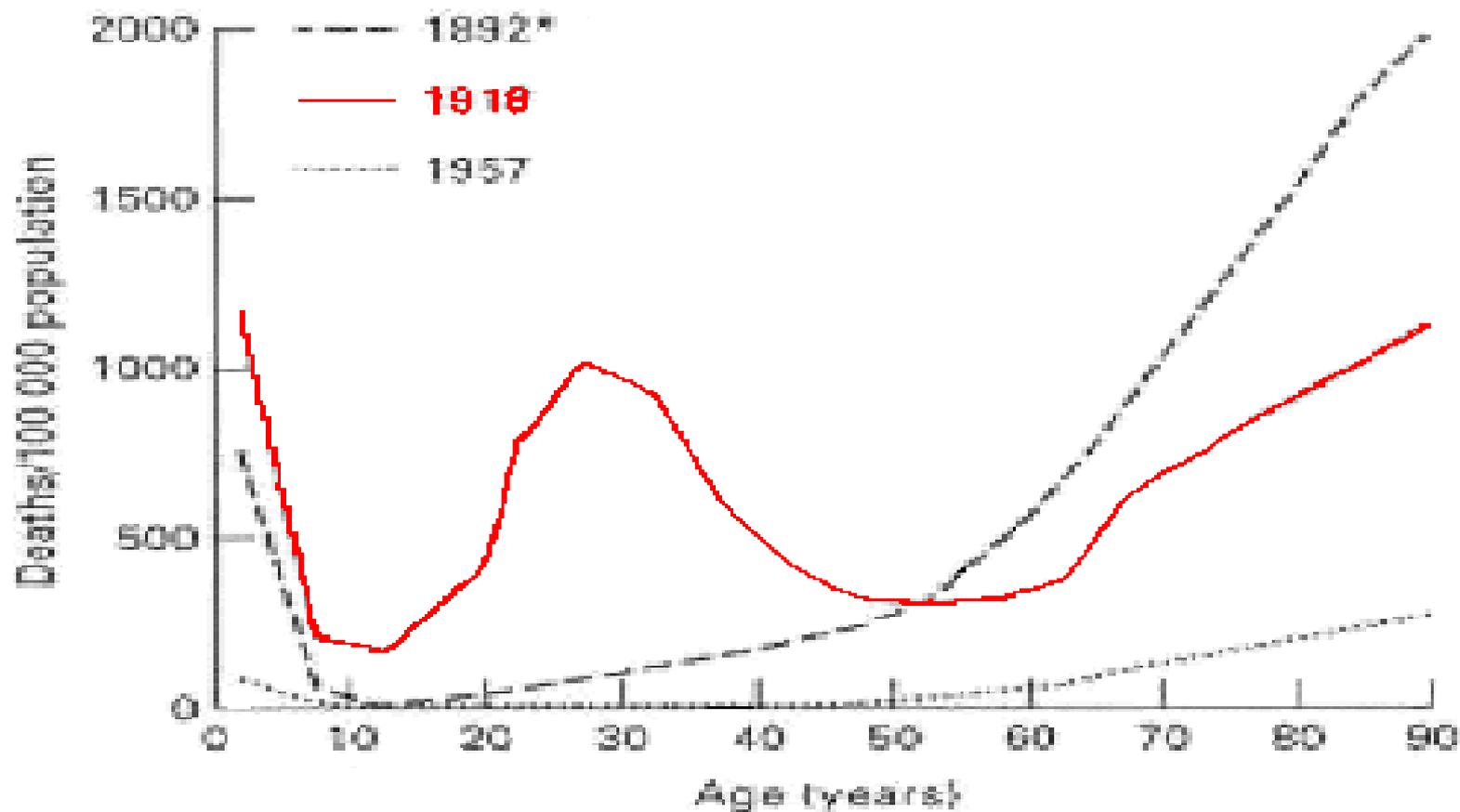


Fig. 1.3 Deaths from pneumonia and influenza in USA in three influenza pandemics. \*Massachusetts only. (Adapted from Dauer & Serfling 1961.)

# Ampleur du problème (4)

## Infections virales et immunodéprimés :

Le cytomégalovirus (CMV) est considéré comme le premier responsable d'infections opportunistes chez les greffés d'organes solides ou de moelle

## Infections congénitales :

Le CMV en est le premier responsable dans le monde.

# Ampleur du problème (5)

## Virus associés aux cancers :

Par exemples,

- Le papillomavirus (HPV) est associé au cancer du col utérin
- Epstein Barr Virus (EBV) est associé au cancer du nasopharynx

deux cancers qui sont endémiques chez nous

# Ampleur du problème (6)

## Virus émergents :

Depuis 2003, émergence de nombreux virus :

- Un nouveau coronavirus à l'origine du SRAS (syndrome respiratoire aigu sévère) en 2003
- Le virus de grippe pandémique H1N1 en 2009
- Le syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS) dû à un nouveau coronavirus détecté pour la première fois en Arabie saoudite en 2012
- L'épidémie à virus Ebola en 2014 en Afrique
- L'épidémie à virus Zika en 2015 en Amérique

# Indications

Dc individuel :

hépatites virales

infection à VIH,..

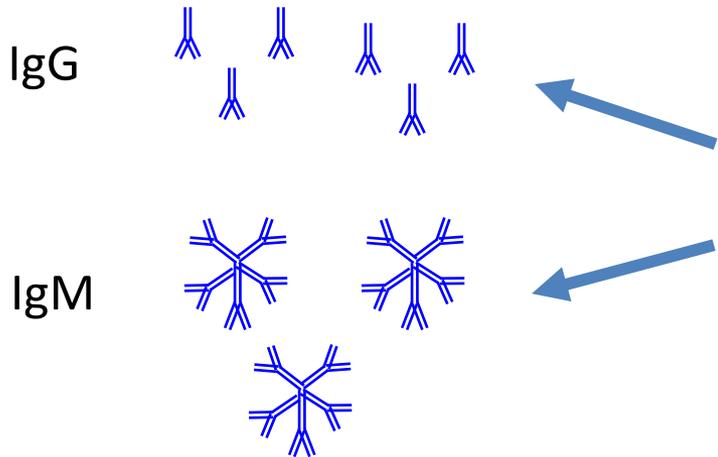
Dc épidémiologique / Dc des formes atypiques :

infections respiratoires aiguës

infections cutanées,..

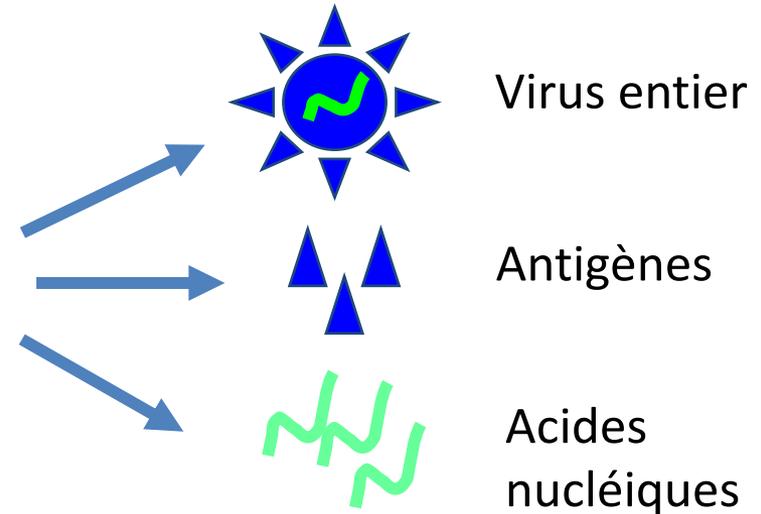
# Deux approches:

## □ Diagnostic indirect



Détection d'**ANTICORPS** spécifiques du virus: réponse immunitaire de l'individu

## □ Diagnostic direct



Détection (directe) du **VIRUS** ou de ses **COMPOSANTS**, antigènes ou génomes viraux, dans les liquides biologiques

# Dc direct versus Dc indirect

- Dans certaines infections virales, le diagnostic ne peut être que direct, comme les IRA et les infections à papillomavirus, mais
- la sérologie représente toujours l'outil de première intention du diagnostic de nombreuses autres infections (rubéole, hépatites, VIH...).
- le statut immunitaire d'un individu ou d'une population ne peut être déterminé que par les tests sérologiques.

# Dc direct versus Dc indirect

## Dc direct

diversité des prélèvements et des techniques utilisés :  
LCR, sang, liquide pleural  
Aspirations nasopharyngées (IRA),...

l'interprétation des résultats est relativement facile

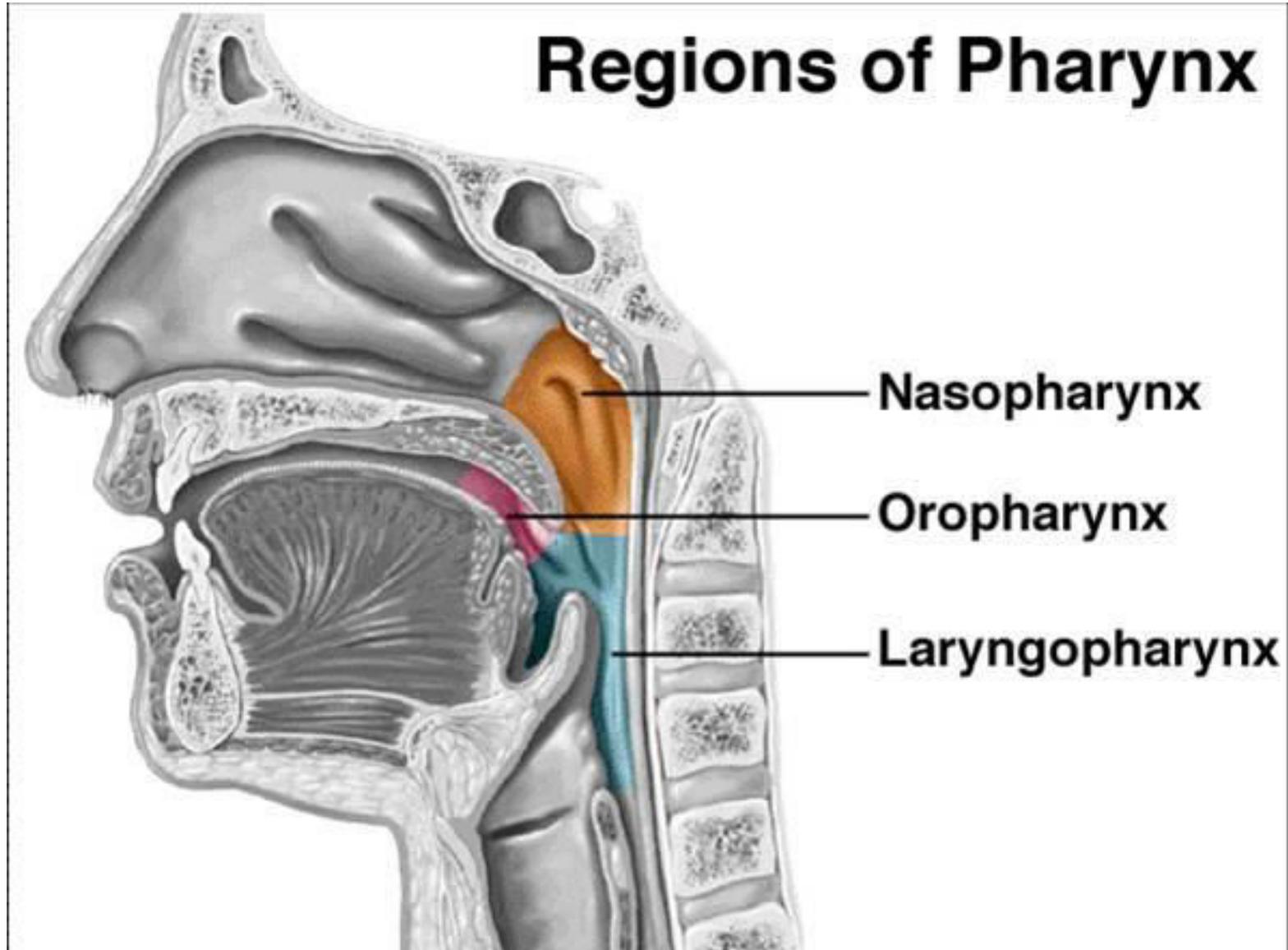
## Dc indirect

le prélèvement est simple, il s'agit de sang

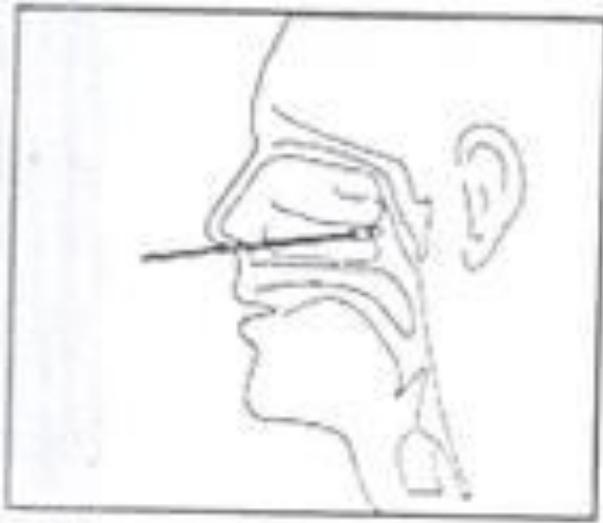
l'interprétation des résultats est plus compliquée et dépend de:

- l'état immunitaire de l'hôte
- du moment de prélèvement par rapport à la déclaration de la maladie

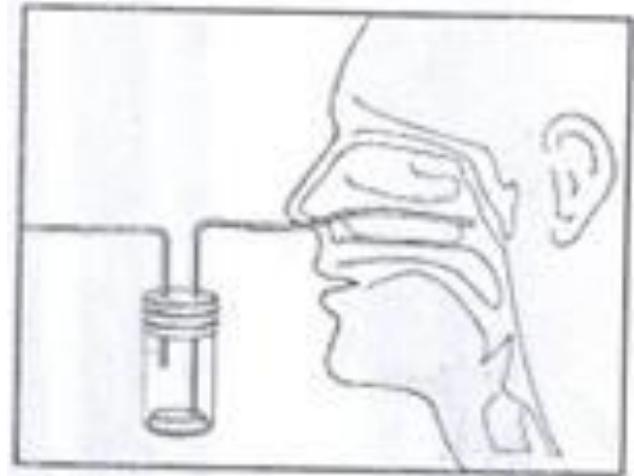
# Exemple de Site de prélèvement (IRA)



# Pvts : Écouvillonnage/Aspiration Nasopharyngés



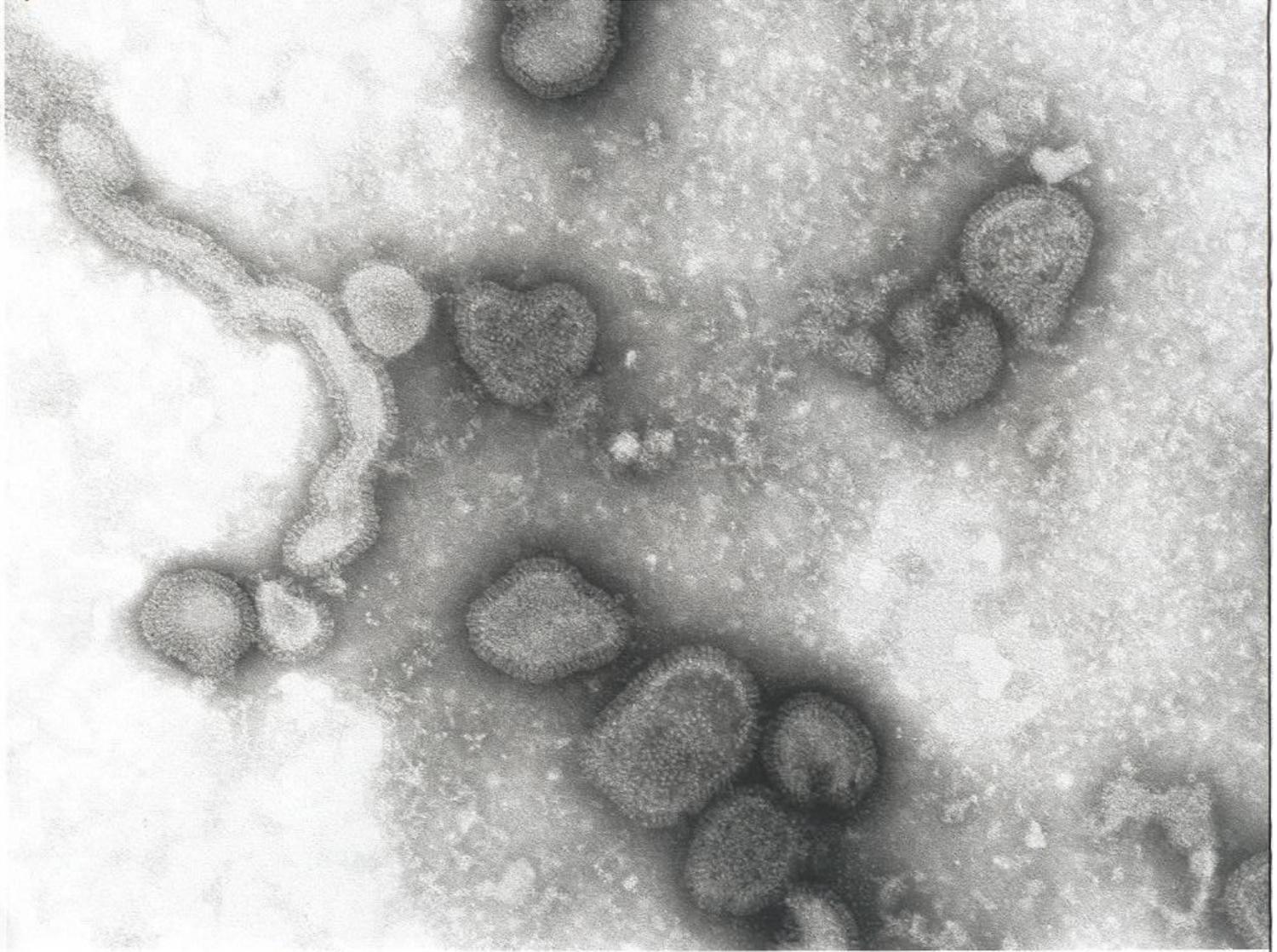
Nasopharyngeal  
swab



Nasopharyngeal  
aspirate

# Diagnostic Direct

# Microscopie électronique : virus grippal



*× 100 000*

# Microscopie électronique

- **Indications Dc rares**
- **Outil précieux pour caractériser un nouveau virus:**  
**orientation vers un nouveau coronavirus sur une**  
**image en «couronne» en ME (épidémie de SARS**  
**en 2003)**

# Isolement virale

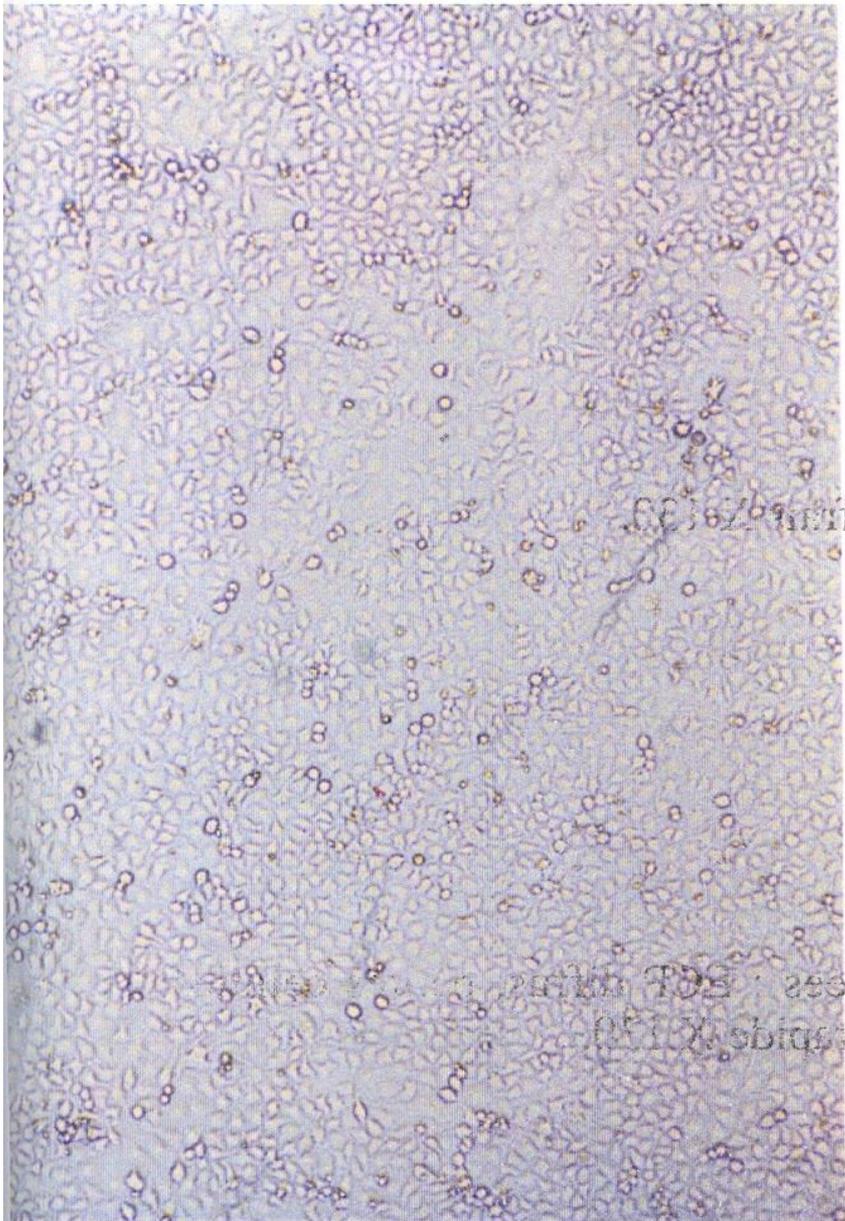
3 systèmes cellulaires:

- **Culture cellulaire +++**
- Œuf de poule embryonné (v. grippe)
- Animal (coxackies virus)

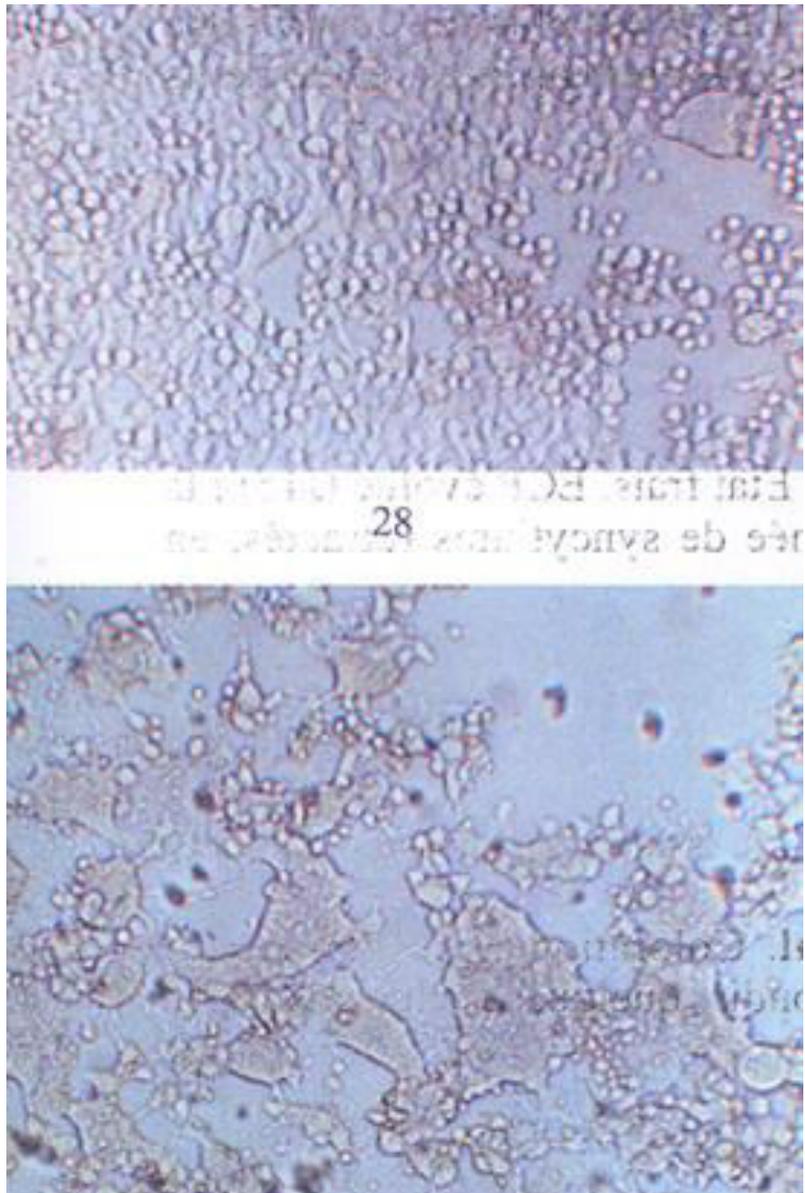
# Culture cellulaire



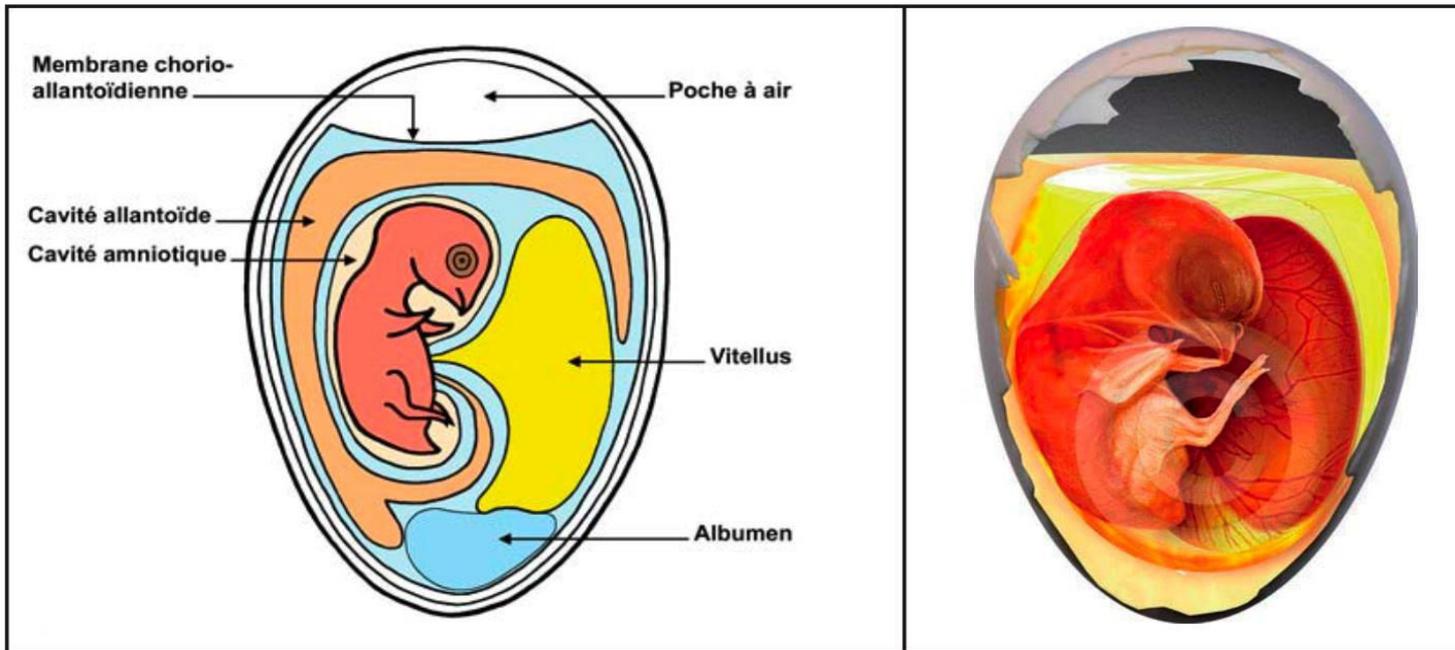
# Nappe cellulaire normale



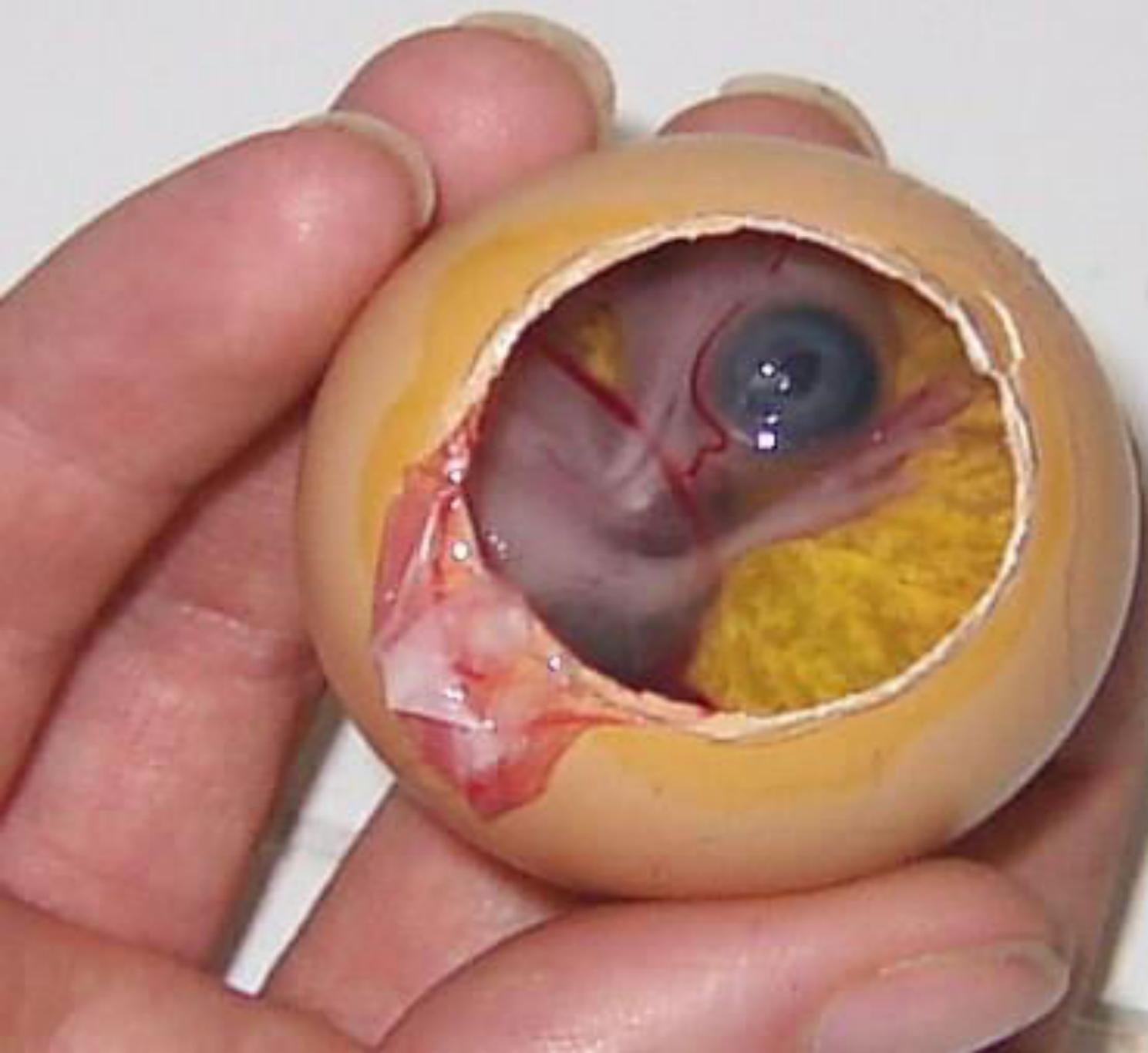
# Effet Cytopathique (ex: VRS)

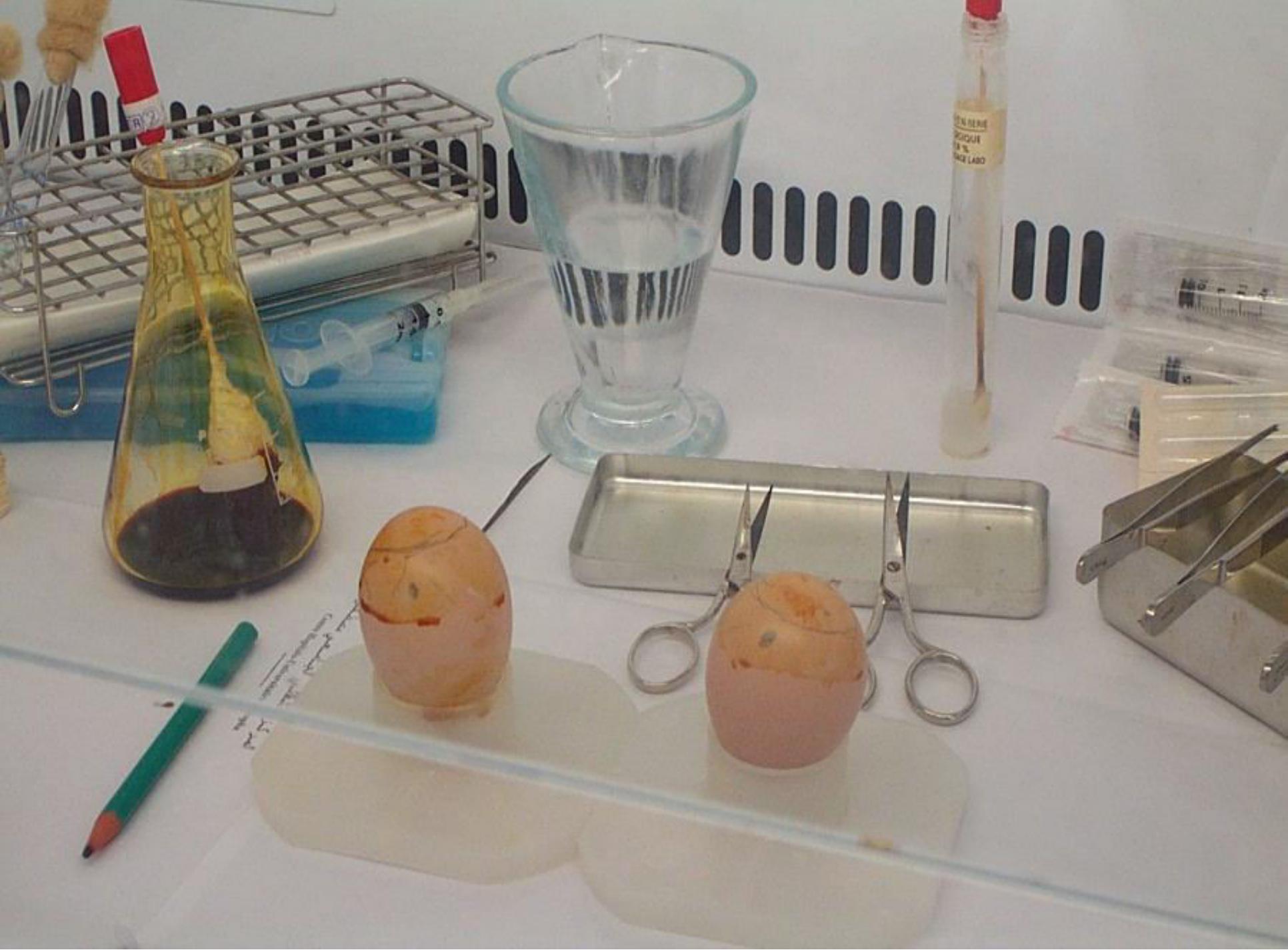


MO x 10



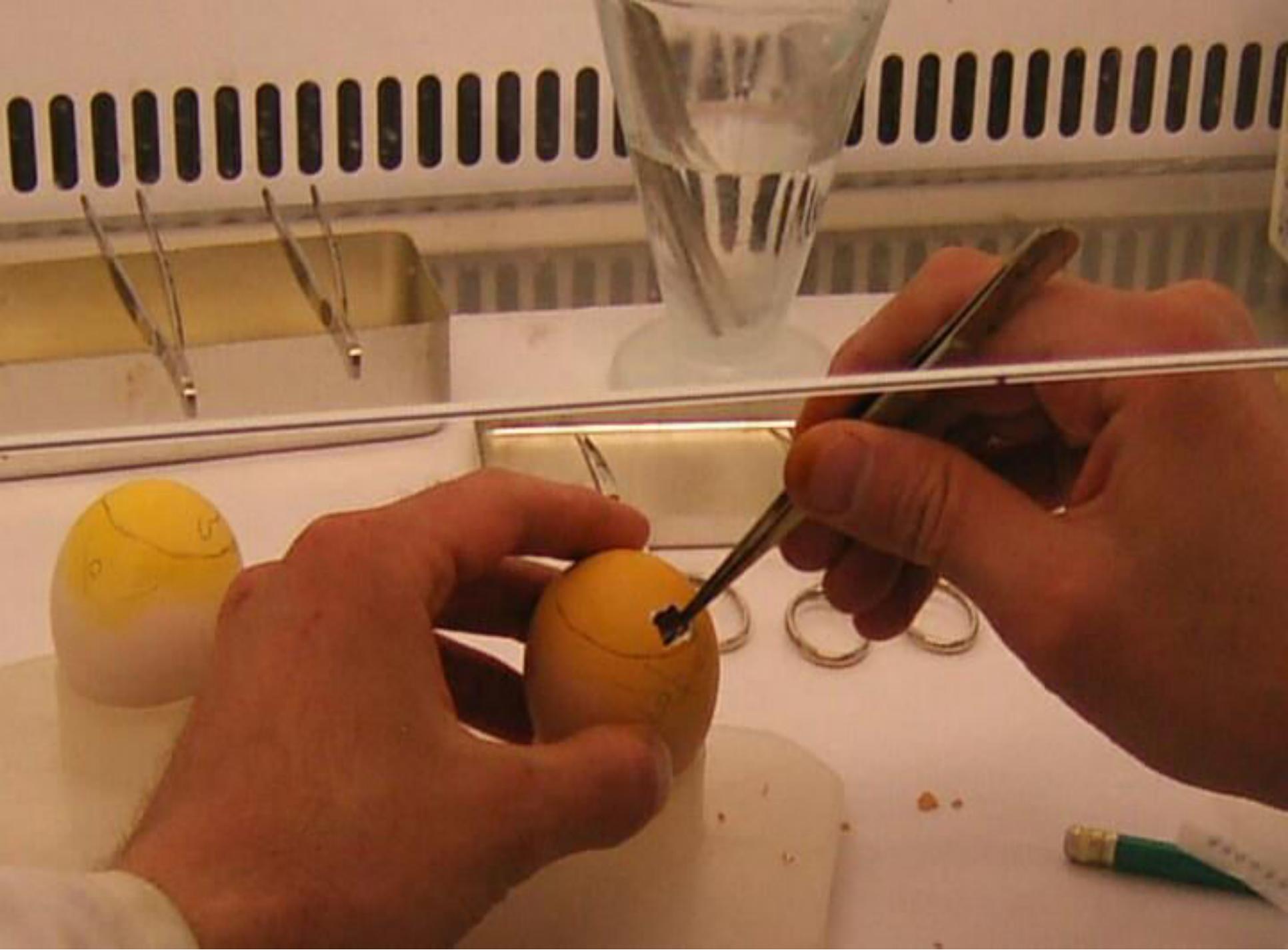
**FIGURE 5 - ŒUF DE POULE EMBRYONNÉ DE 10 JOURS**  
**A. Représentation schématique. B. Image de Science-Art (© W.G.ROTH)**

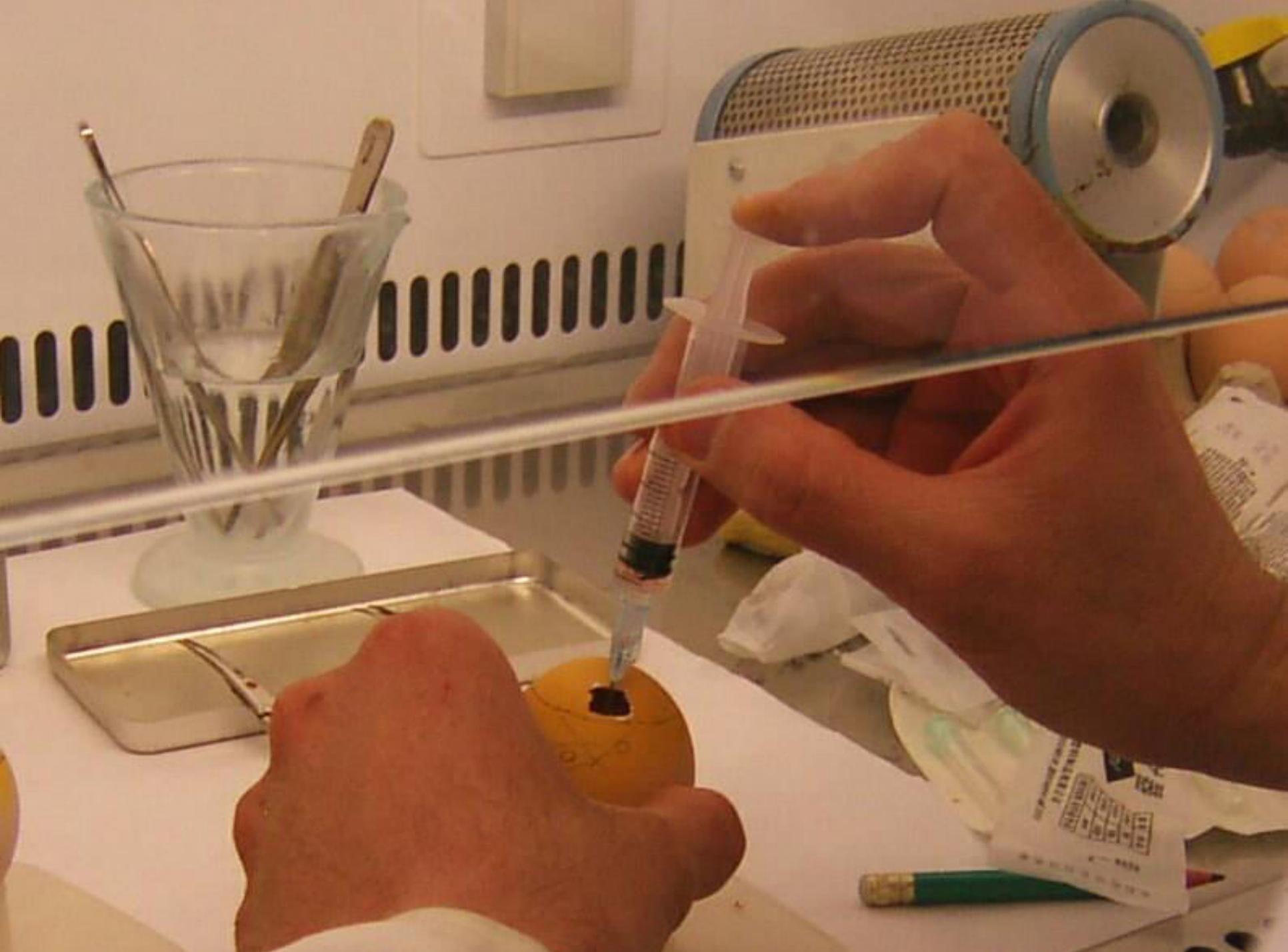




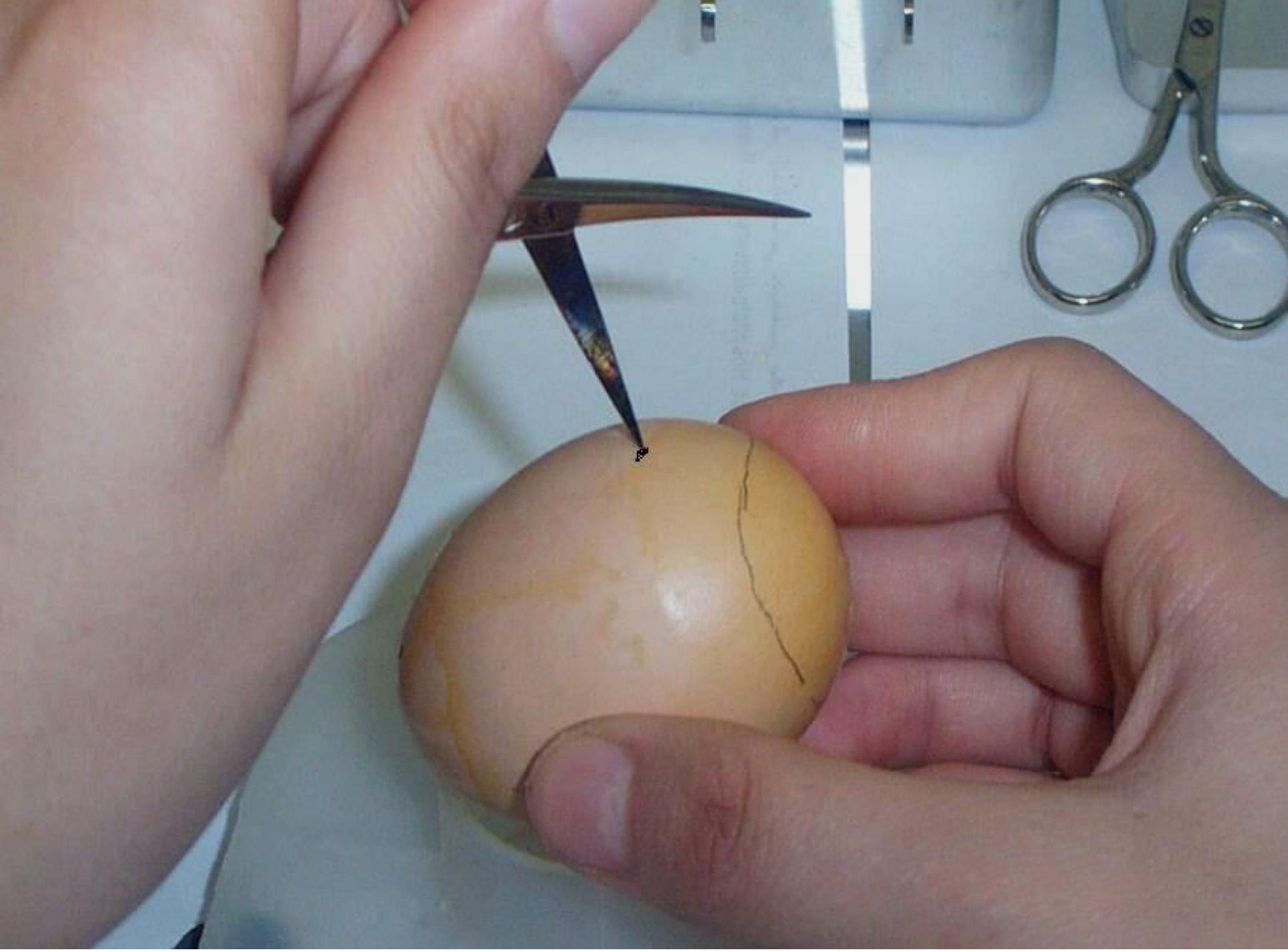
**Inoculation des Pvts au niveau des cavités amniotique et allantoïdienne**

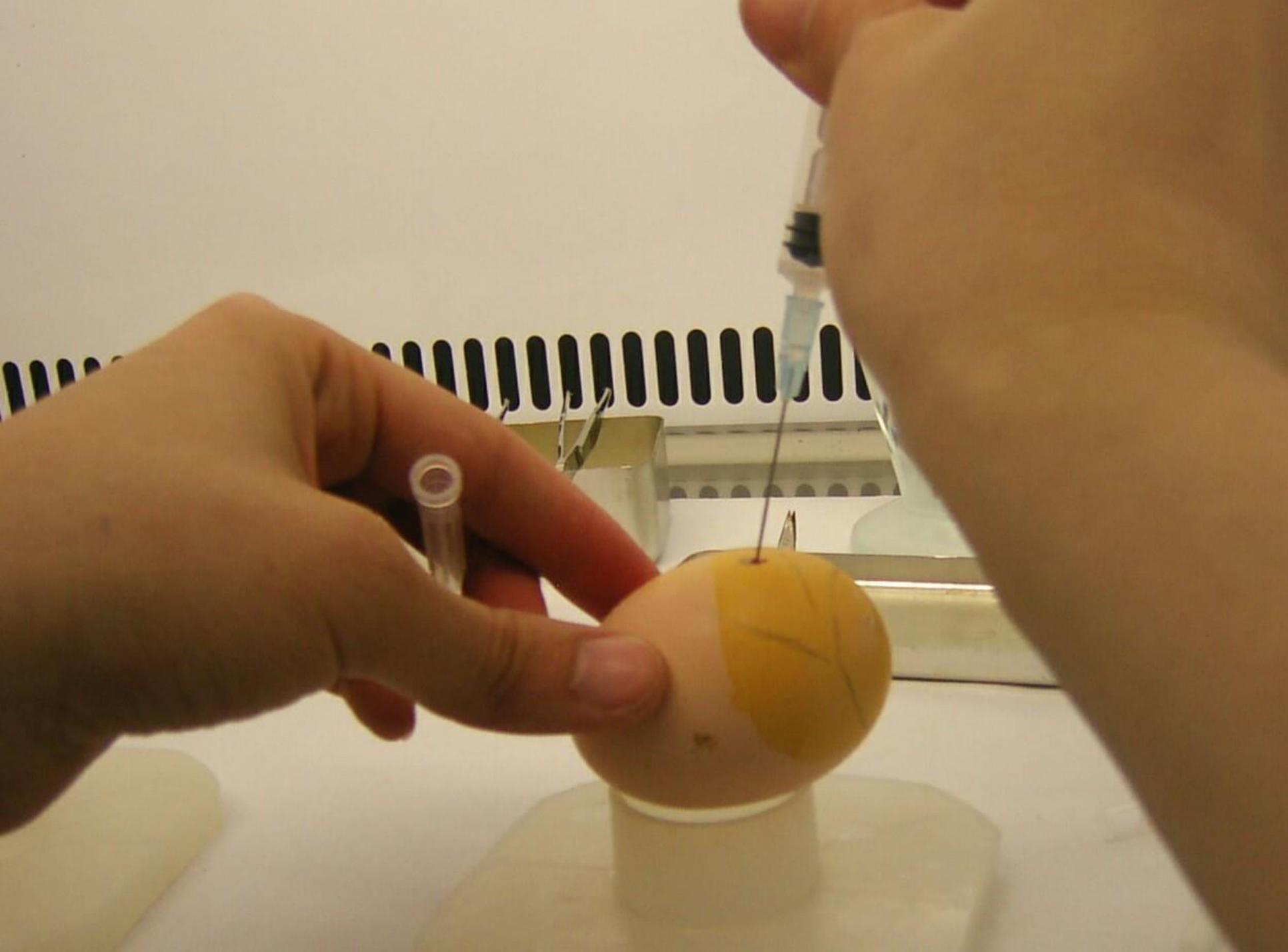










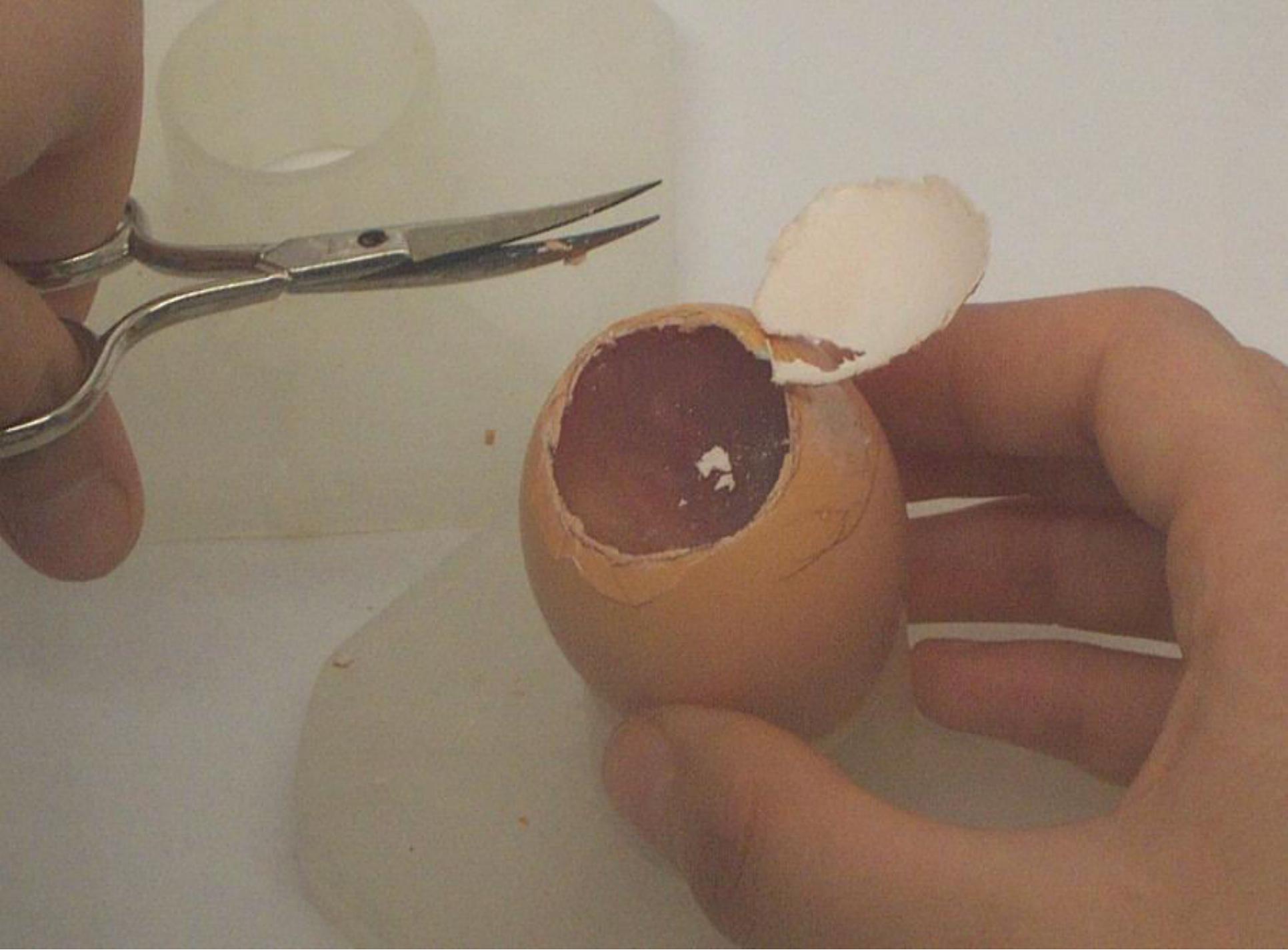




Après incubation

**Récolte** des liquides amniotique  
et allantoïdien pour rechercher  
une **activité hémagglutinante**









# Culture cellulaire: inconvénients

- Dépend de la qualité du prélèvement → garder la viabilité du virus :

*milieu de transport*

*acheminement rapide au labo (chaîne de froid)*

*conservation à  $-80^{\circ}\text{C}$  si analyse différée*

- Technique lourde et coûteuse
- Certains virus sont non cultivables

# Culture cellulaire: avantages

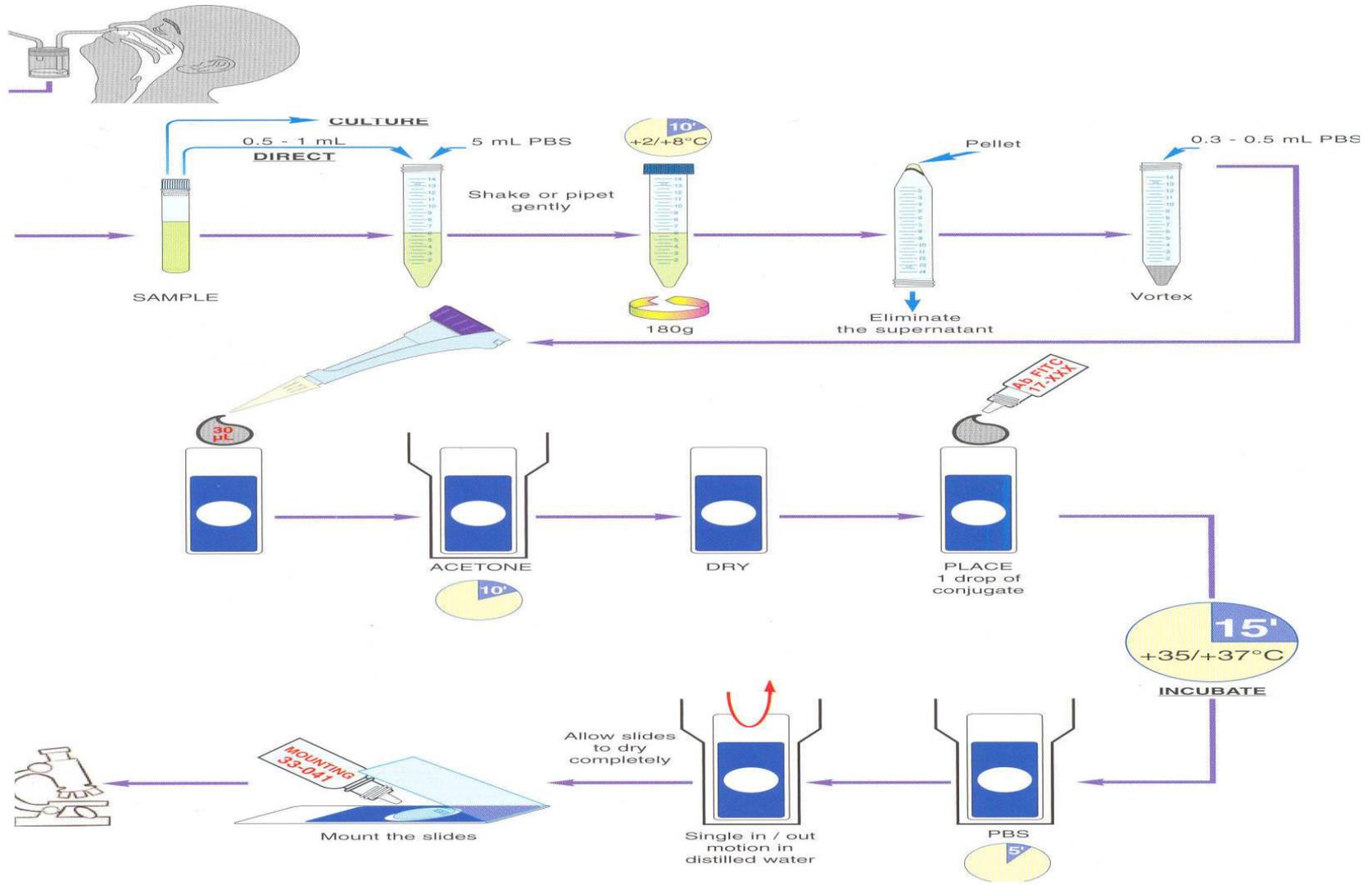
- Mise en évidence du virus infectieux
- Système ouvert
- Très sensible
- Permet l'étude de la sensibilité aux ATVs,..

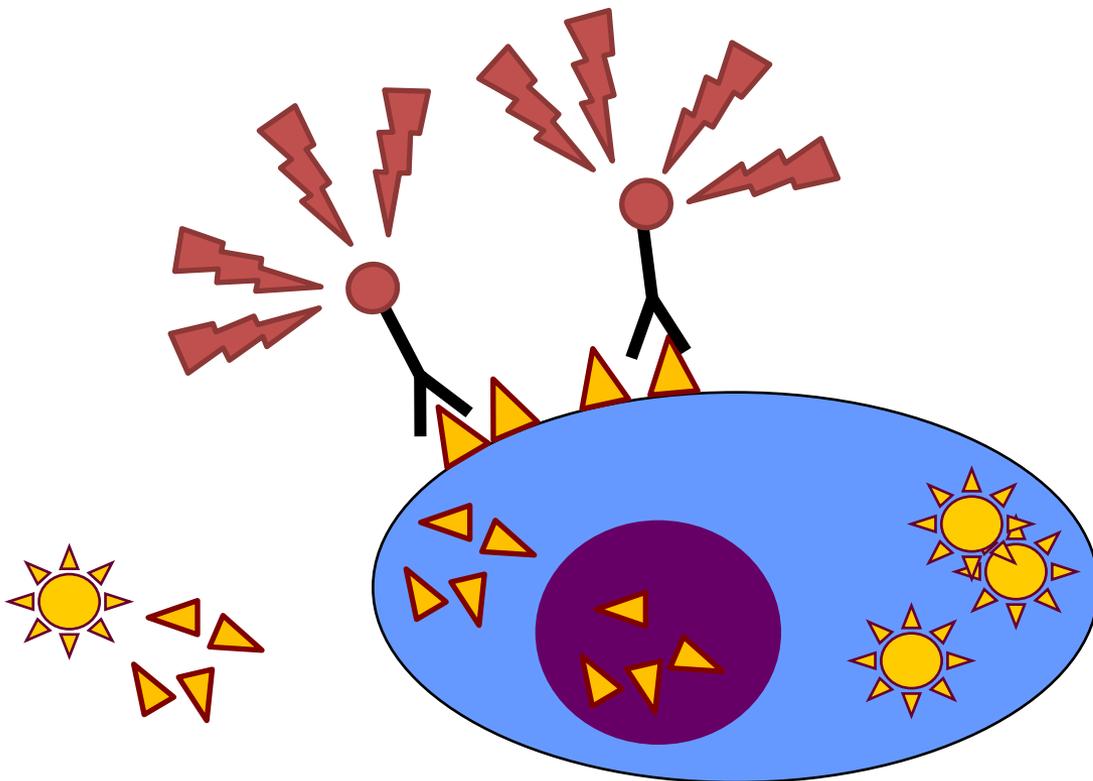
# Détection directe des Ags viraux

- Immunofluorescence
- Réaction immunoenzymatique
- Immunodiffusion ou immunochromatographie
- Agglutination de particules de latex sensibilisées

# Technique d'Immunofluorescence:

## Pvts nasopharyngés / Virus respiratoires





Cellules infectées



Ag viraux

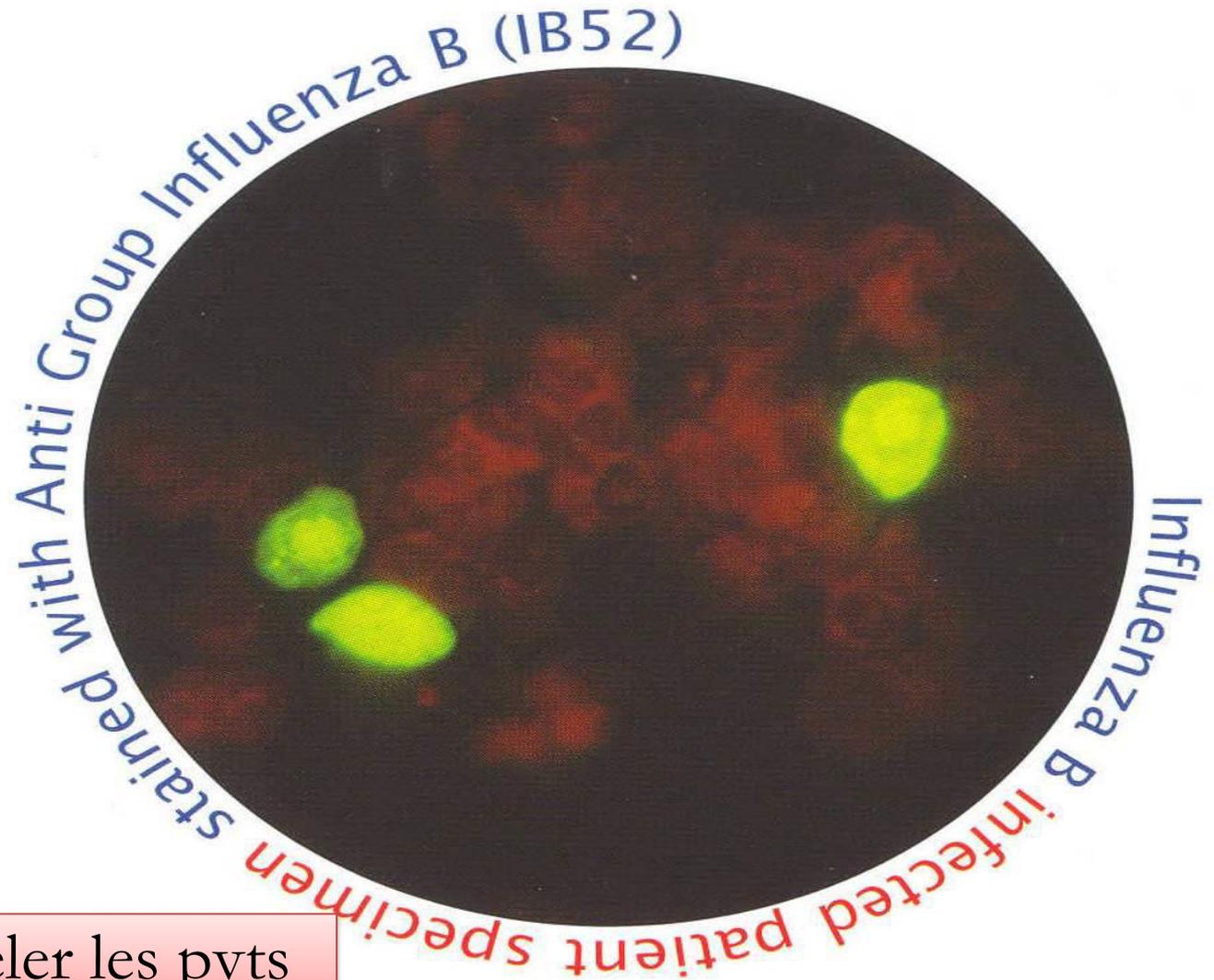


Anticorps monoclonaux  
marqués



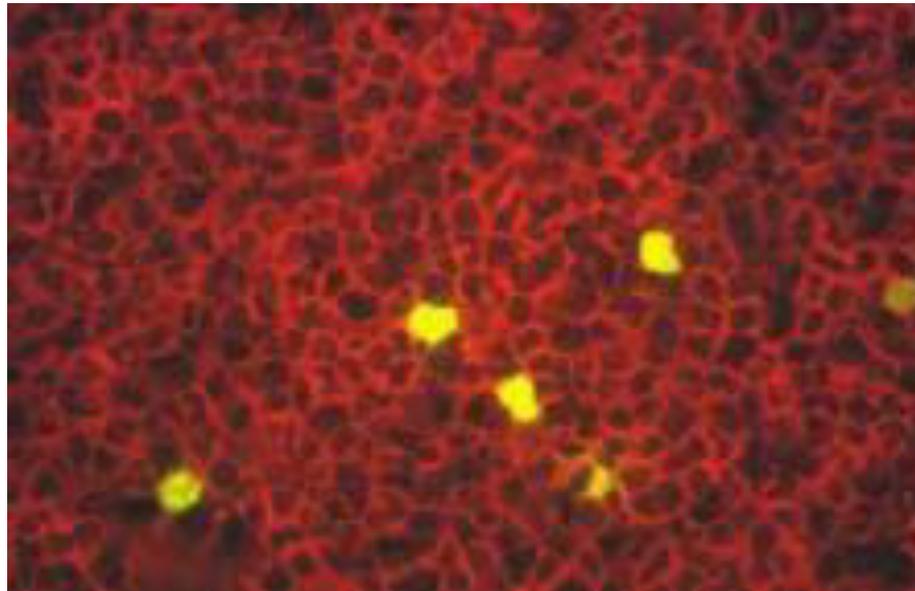
Signal

# Immunofluorescence : Lecture au microscope à UV



Ne pas congeler les pvts

# Antigénémie pp65 du CMV positive (Pvt = leucocytes circulants)

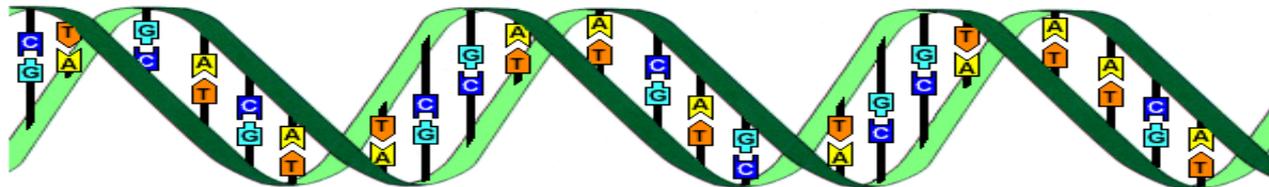


Ne pas congeler les pvts

# **BIOLOGIE MOLECULAIRE**

# Techniques d'hybridation

La complémentarité des bases est à la base de cette **technique**



# Techniques d'hybridation (cas Pos)

Prélèvement

5' ATCAGTACCTTATACGCTTCGTTAT 3'  
3' TAGTCATGGAATATGCGAAGCAATA 5'

Dénaturation

5' ATCAGTACCTTATACGCTTCGTTAT 3'

3' TAGTCATGGAATATGCGAAGCAATA 5'

Hybridation

5' ATCAGTACCTTATAC 3'

Sonde marquée

5' ATCAGTACCTTATAC 3'  
3' TAGTCATGGAATATGCGAAGCAATA 5'

Lavage

Signal +

5' ATCAGTACCTTATAC 3'  
3' TAGTCATGGAATATGCGAAGCAATA 5'

→ Pvt POSITIF

# Techniques d'hybridation (cas Neg)

Prélèvement

5' CTAAGTACCGGATACGCTTCGTTAT 3'  
3' GATTCATGGCCTATGCGAAGCAATA 5'

Dénaturation

5' CTAAGTACCGGATACGCTTCGTTAT 3'

3' GATTCATGGCCTATGCGAAGCAATA 5'



5' ATCAGTACCTTATAC 3'



5' ATCAGTACCTTATAC 3'

Sonde marquée

Pas d'Hybridation

3' GATTCATGGCCTATGCGAAGCAATA 5'

Lavage

Pas de signal

3' GATTCATGGCCTATGCGAAGCAATA 5'

→ Pvt négatif

**faible sensibilité, de l'ordre de  $10^4$  à  $10^5$  copies**

**Amplification de la cible** avant  
détection pour améliorer la sensibilité

 **PCR**

# Polymerase Chain Reaction (PCR)

Prélèvements:

Selon site de réplication

Sang total sur tube sec /EDTA, **jamais l'héparine**

Conservation longue période à  $-80^{\circ}\text{C}$  (virus à ARN++)

# PCR conventionnelle ou end point

Quatre étapes successives :

1. Extraction des acides nucléiques
2. Addition du mix (+ amorces + polymérase + dNTP )
3. Amplification (thermocycleur)
4. Détection des produits amplifiés par hybridation avec sonde spécifique

# PCR conventionnelle ou end point

Quatre étapes successives :

1. Extraction des acides nucléiques
2. Addition du mix (+ amorces + polymérase + dNTP)
3. **Amplification (thermocycleur)**
4. Détection des produits amplifiés
  - migration sur gel
  - hybridation avec sonde spécifique

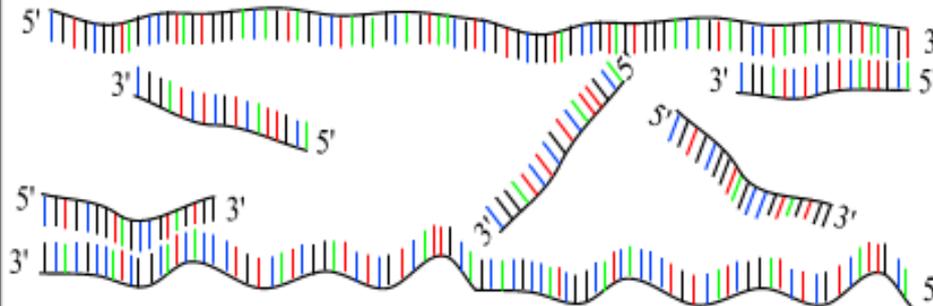
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

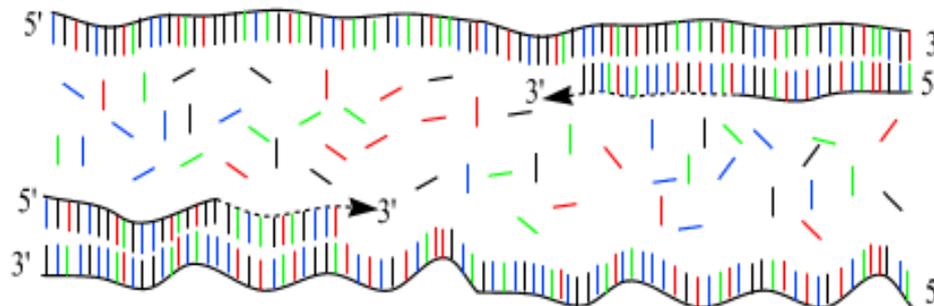
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

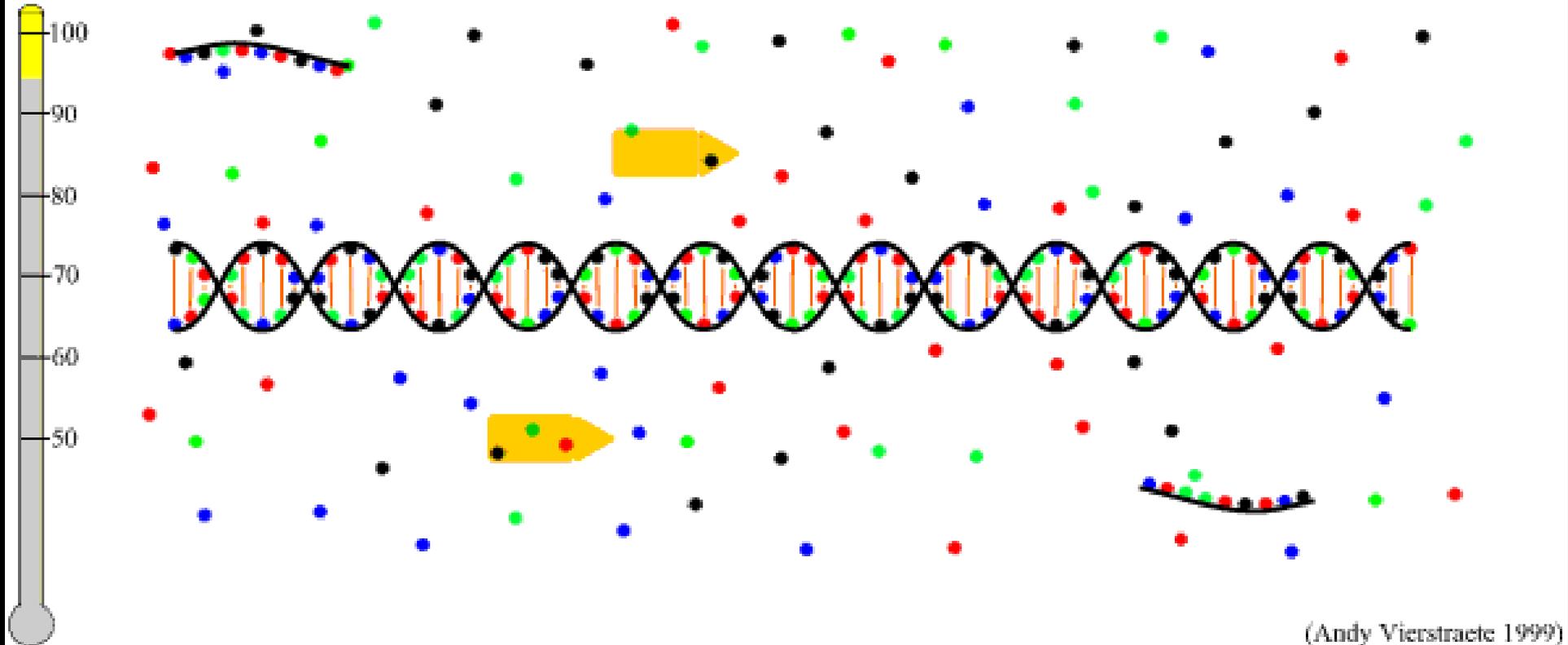
2 minutes 72 °C

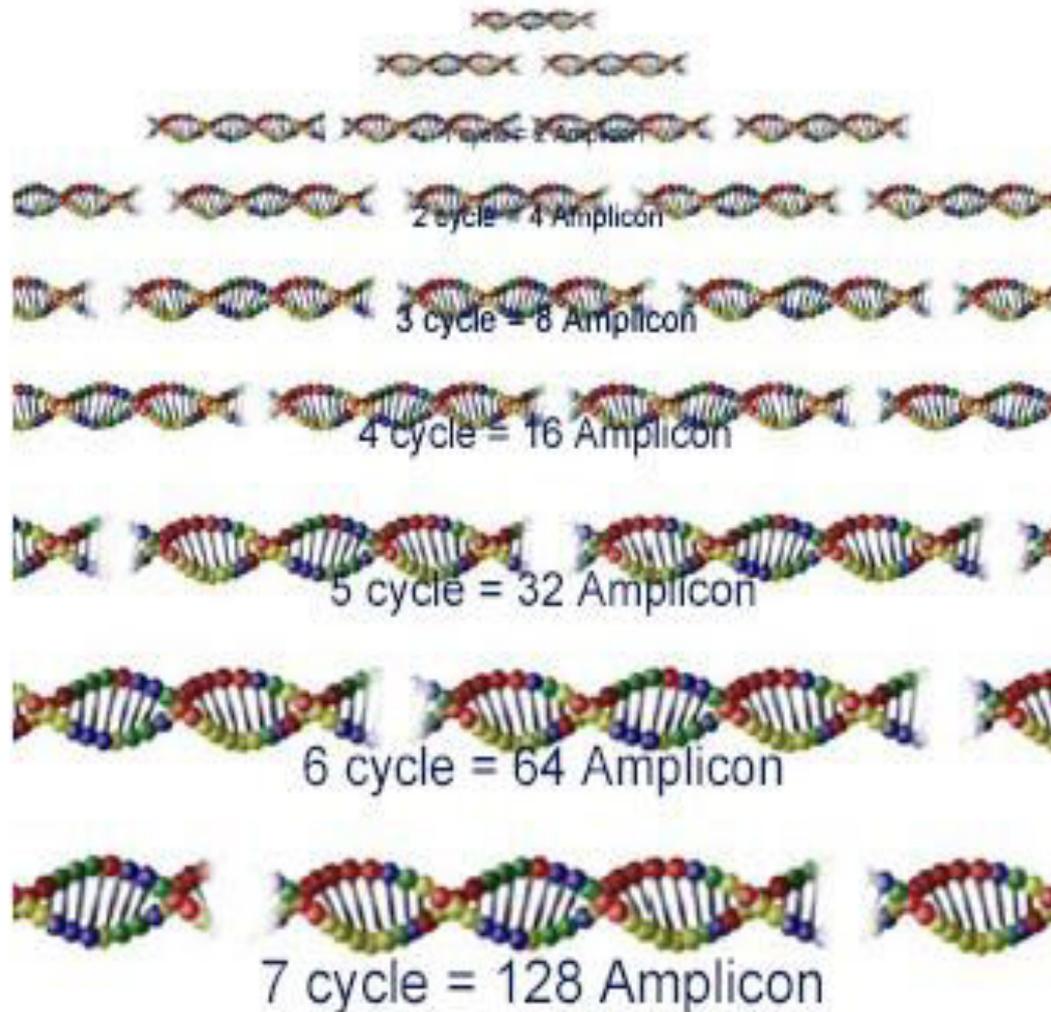
only dNTP's

# Principe de la PCR

PCR :

Denaturation 94°C





No. of Cycles	No. Amplicon Copies of Target
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

les cycles de la PCR

# PCR : Détection par hybridation avec sonde spécifique

Produits de PCR

5' ATCAGTACCTTATACGCTTCGTTAT 3'  
3' TAGTCATGGAATATGCGAAGCAATA 5'

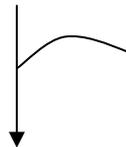
Dénaturation



5' ATCAGTACCTTATACGCTTCGTTAT 3'

3' TAGTCATGGAATATGCGAAGCAATA 5'

Hybridation



5' ATCAGTACCTTATAC 3'

Sonde marquée



5' ATCAGTACCTTATAC 3'

3' TAGTCATGGAATATGCGAAGCAATA 5'



**Sensibilité améliorée**

# PCR en temps reel

Trois étapes :

1. Extraction des acides nucléiques
2. Addition du mix (+ amorces + polymérase + dNTP + sonde)
3. Amplification et détection de la cible simultanément

# PCR conventionnelle ou end point

Quatre étapes successives :

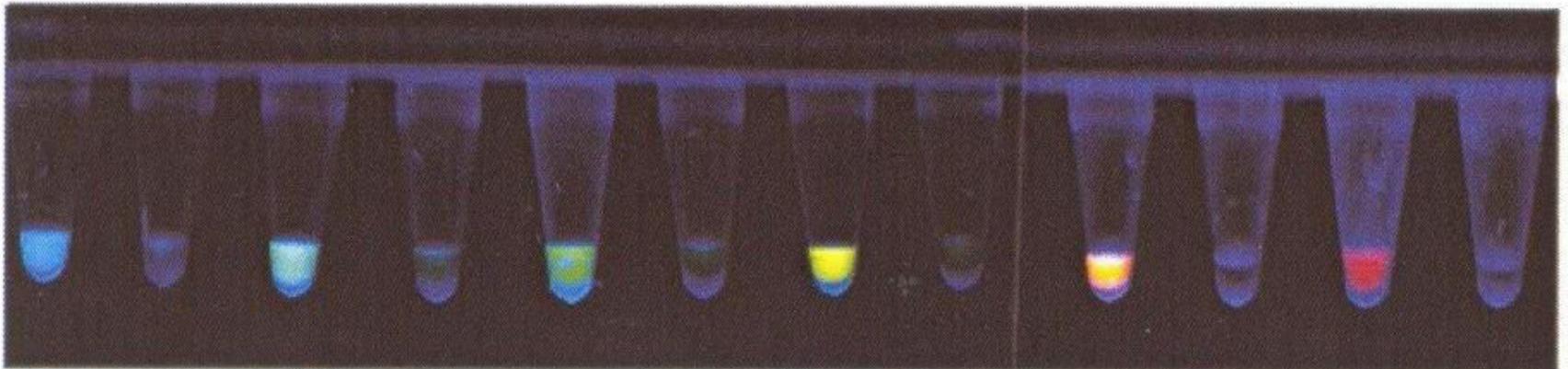
1. Extraction des acides nucléiques
2. Addition du mix (+ amorces + polymérase + dNTP )
3. Amplification (thermocycleur)
4. Détection des produits amplifiés par hybridation avec sonde spécifique

**In Real-Time PCR the detection of PCR products is dependent on fluorescent light.**

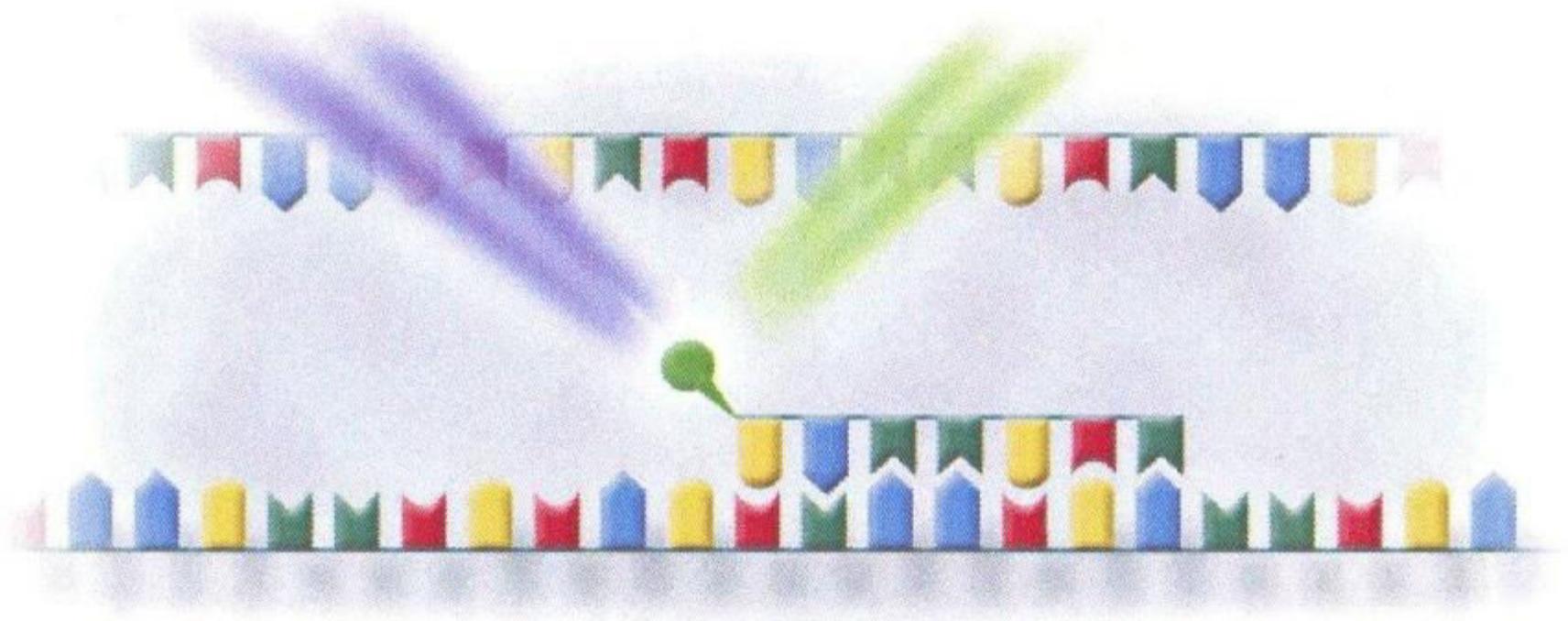
## **Fluorescence**



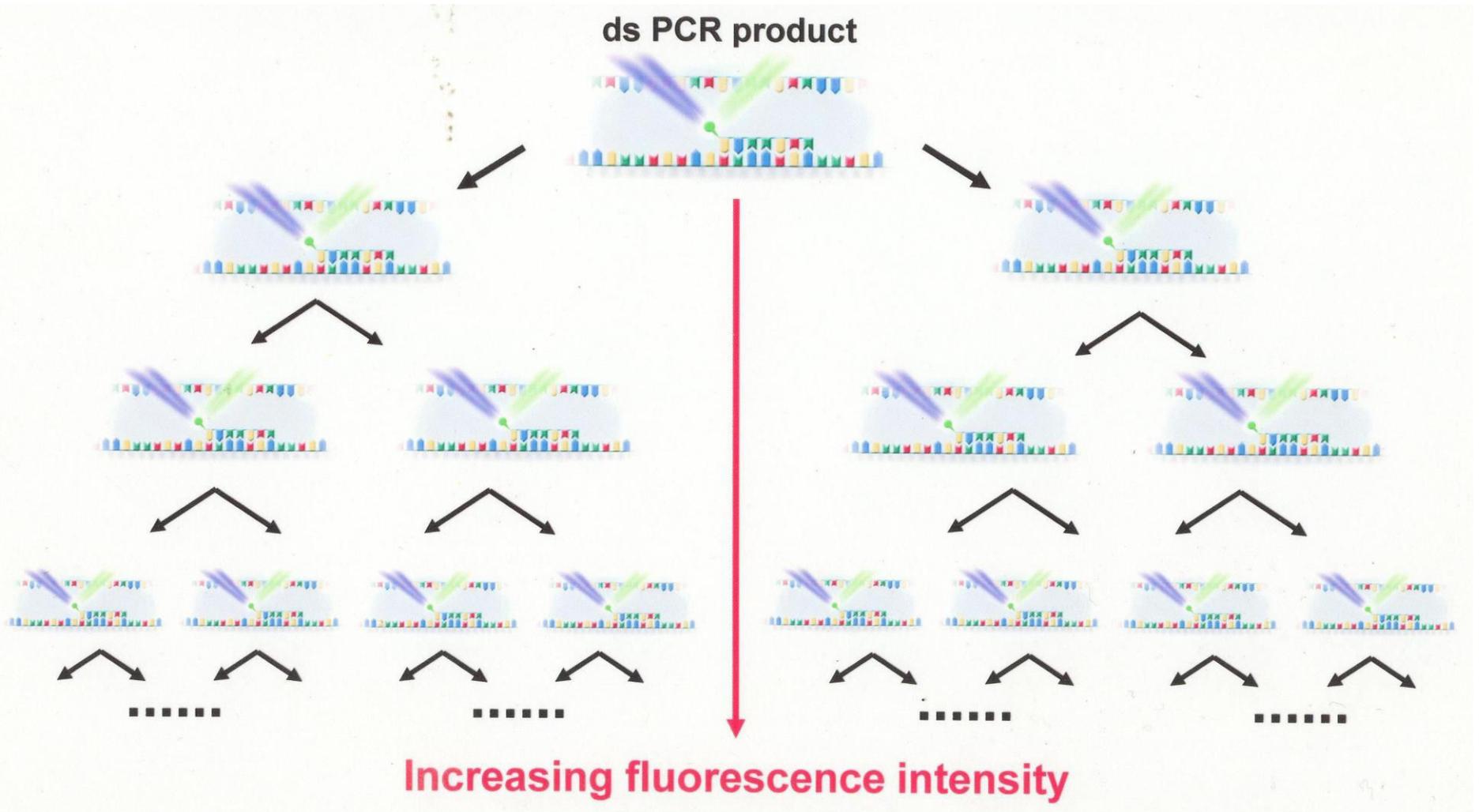
**absorption of short-wave light,  
emission of long-wave light**

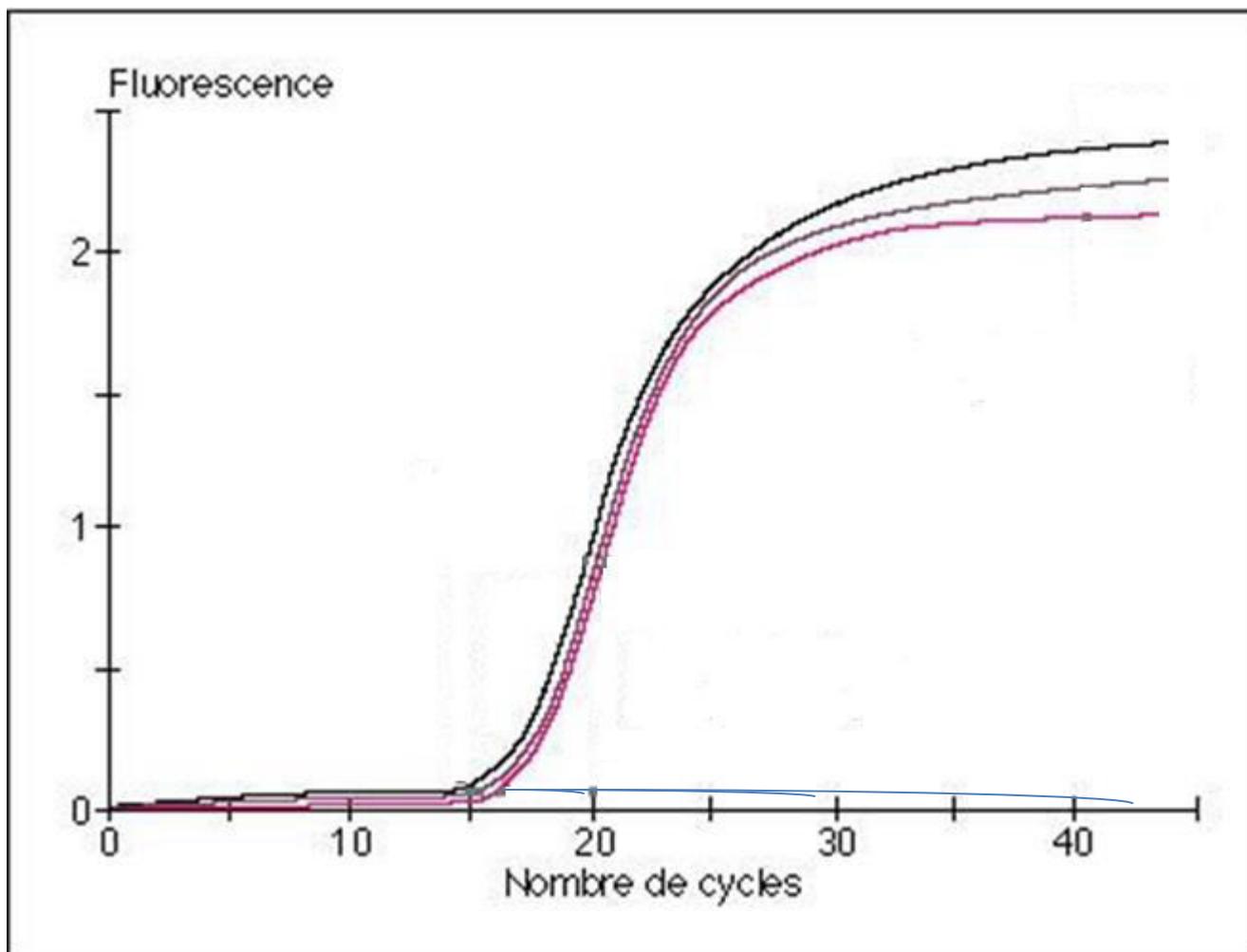


# DNA detection by fluorescent oligonucleotides



# DNA detection by fluorescent oligonucleotides

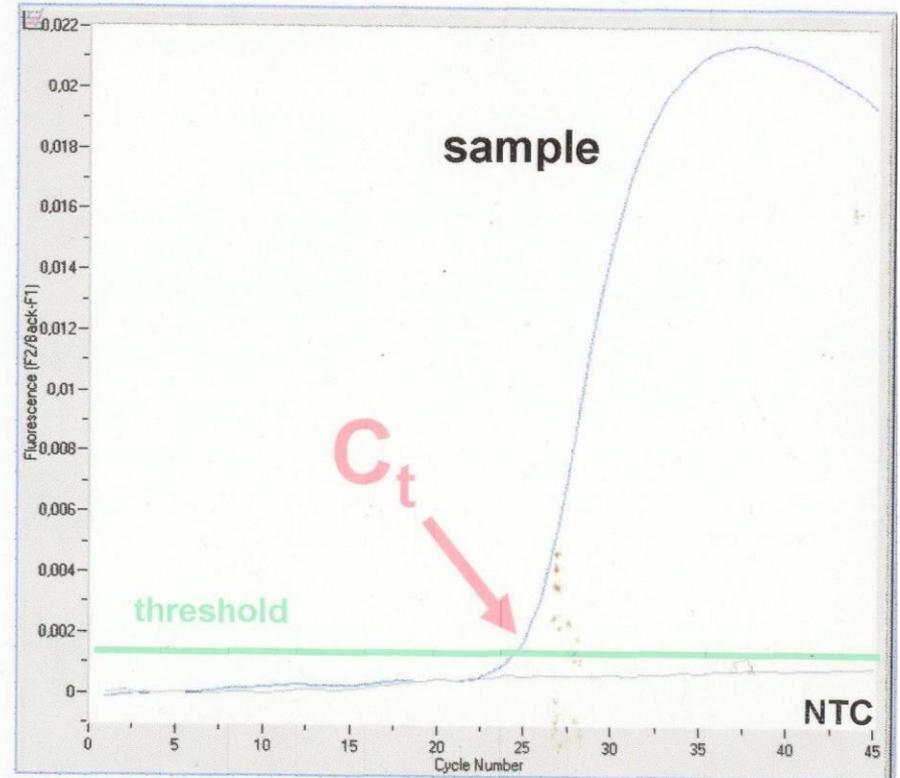




Determine the **TIME POINT** of signal generation rather than signal strength!

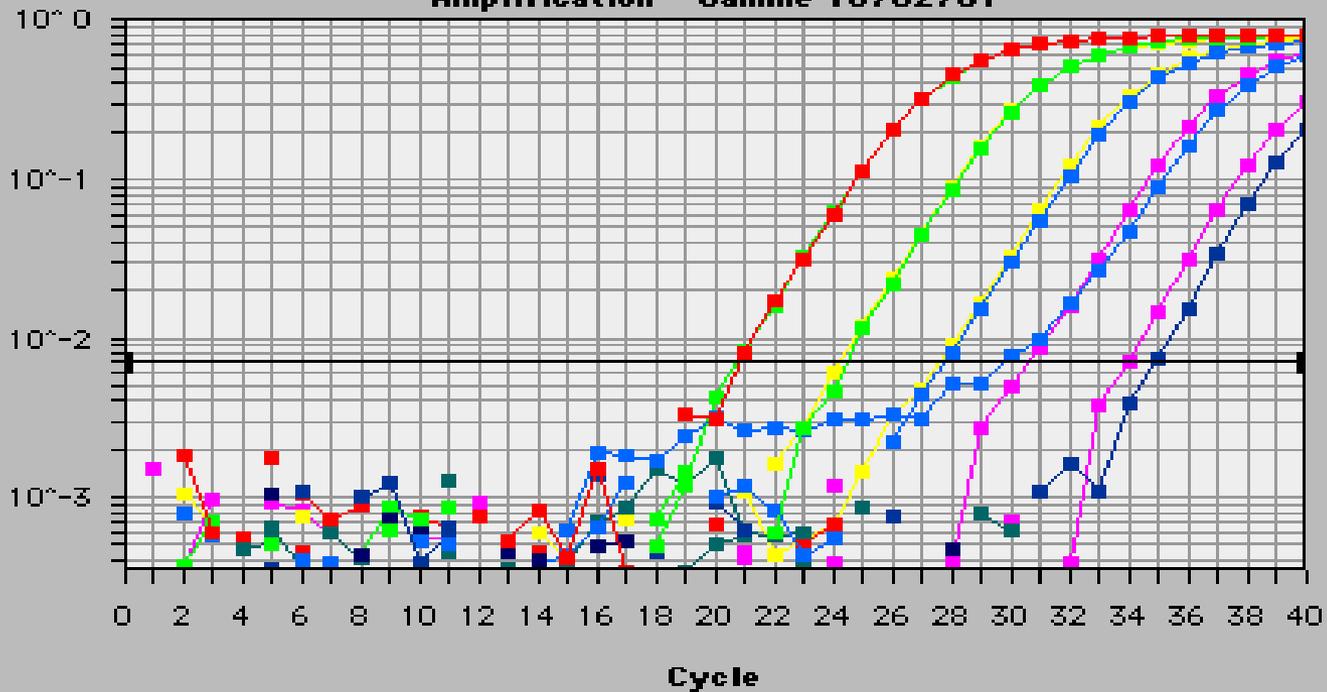
The measure of this **TIME POINT** is achieved in Real-Time PCR by determination of the

**$C_t$**



$C_t$  = threshold cycle: The calculated cycle number at which the PCR product crosses a threshold of detection (=  $C_p$ : crossing point)

### Amplification - Gamme 16/02/01



#### Samples

<input checked="" type="checkbox"/>	FAM - A1	
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM - A2	
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM - A3	
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM - A4	
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM - A5	
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM - A6	
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM - A7	
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM - A8	
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM - A9	

Viewer:

Reporter:

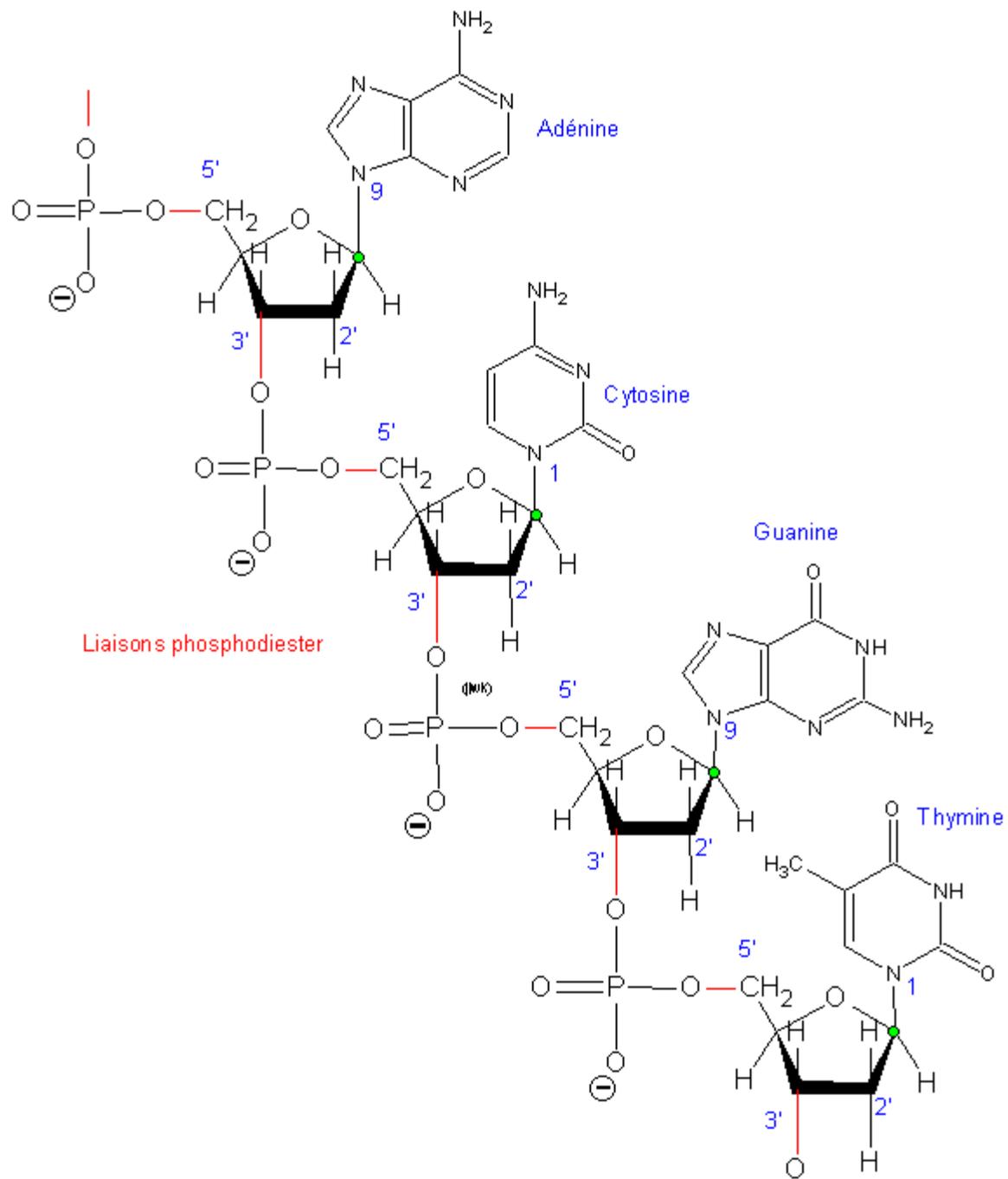
# PCR en temps reel

## Avantages

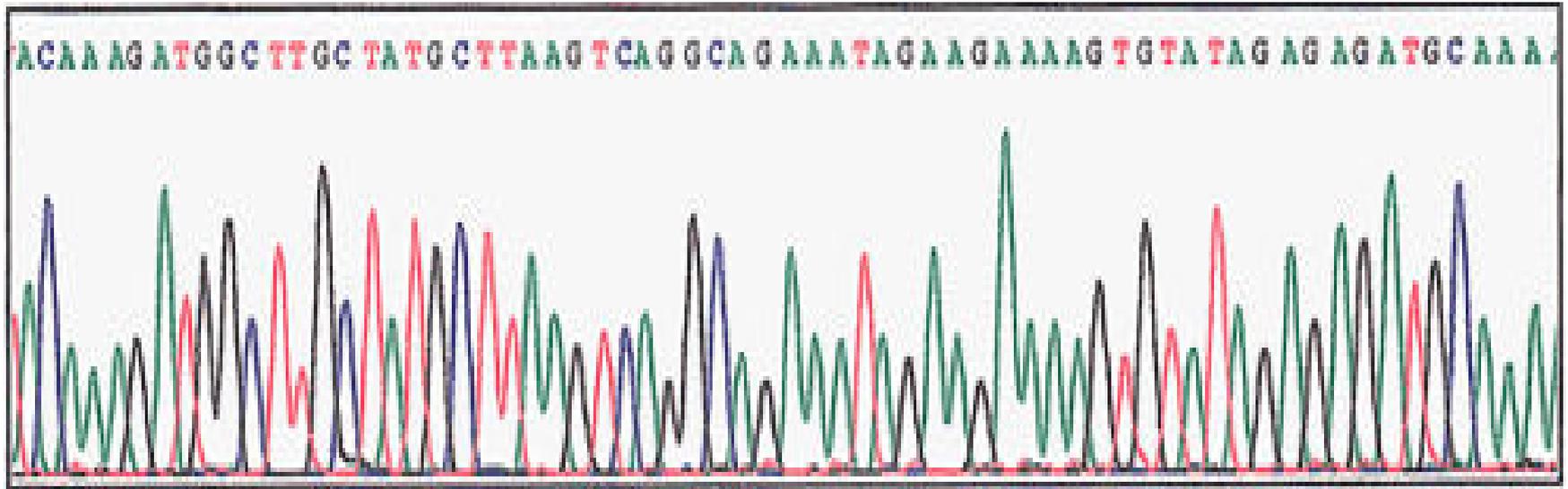
- Réduction des risques de contamination par les produits de PCR (Pas d'ouverture de tubes en post PCR)
- Amélioration de la sensibilité
- Plus large domaine de linéarité
- Quantification plus précise
- Plus rapide

# Séquençage de l'ADN (méthode enzymatique de Sanger)

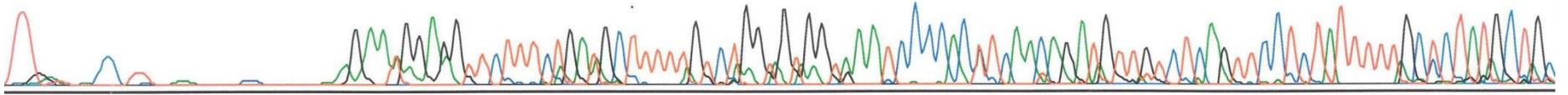
Détermination de la séquence des nucléotides (**Adénine, Guanine, Cytosine et Thymine**) composant une portion ou la totalité du génome viral



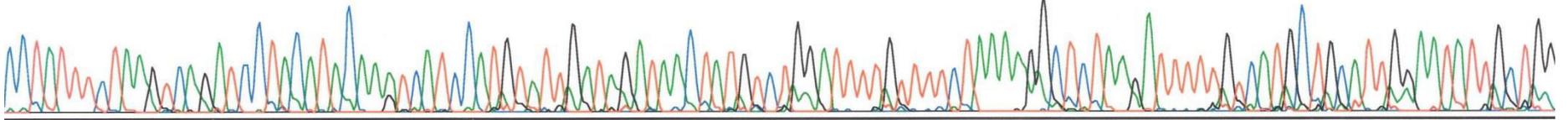
# Séquençage de l'ADN (méthode enzymatique)



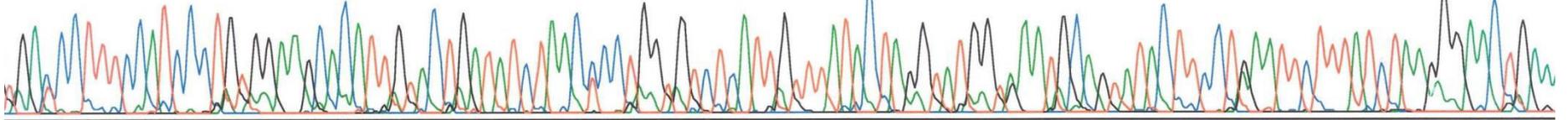
AG AANGGAGG TTCTTTCTGANGC TTTTTTGTCTGGTGTTGTTAAATCCCCACNTCAACAGATGTTGTC TCAGTTCCTCTATT TTTGCTCTATGCTGC  
10 20 30 40 50 60 70 80 90



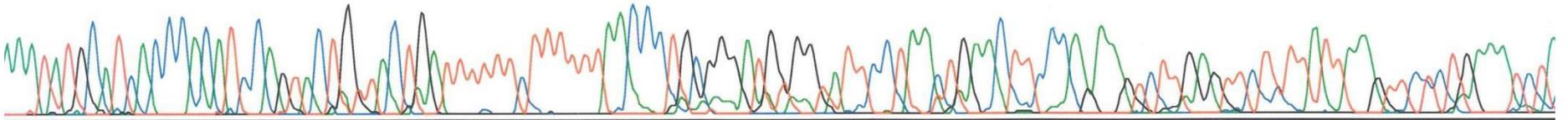
CCTATTTCTAAGTCAGATCC TACATACAAATCA TCCA TGATTGATAGATAACTATGTCTGGATTTTGTTTTC TAAAAGGCCTAAGATTTTGTTCATGC TGCATTGGAATATTGCTGG  
100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210



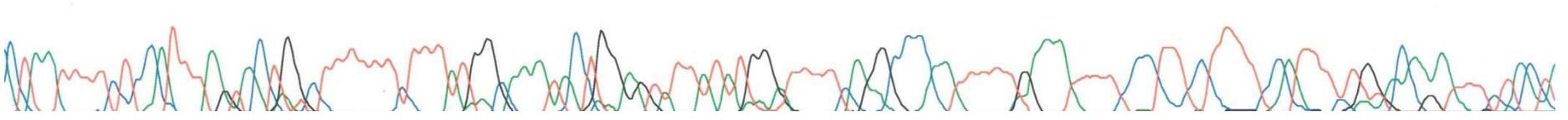
TGACCCTTTCATCCCTGTGGAAGCA CATTGTACTGATATCTAACNCCTGGTGTCTCATTTGTTTATAC TAGGTATGGTNAATGCAGTATAC TTCCTNAATTC TTTATCTAAGGGAAC TGAA.  
220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330



AAATATGCATCACCCACATCCAGTACTGTTACTGATTTTTTCTTTTTTAAC CCTGCGGGATGTGGTATTCCTAACTGAACTTCCAGAAGTCTTGAGTTC TCTTATTAA GTTCNCTGAAATCTA  
340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450



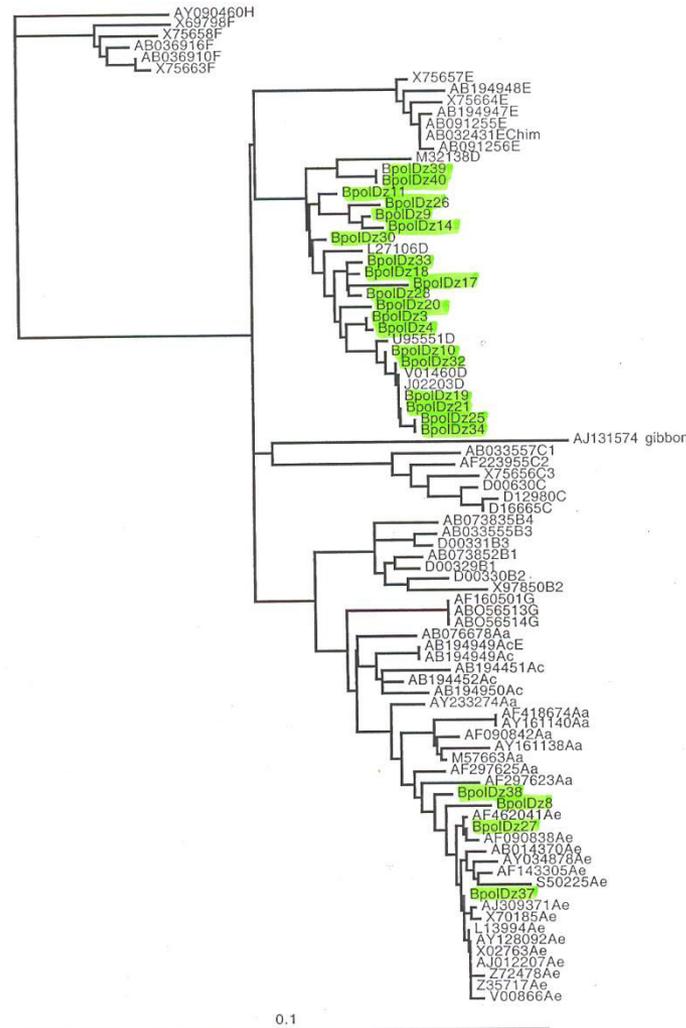
CTAATTTCTCCATTTAGTACTGNCCTTTTTCTTTATGGCAAATACTGGAGTATTAATGGATTTTCAGGCCAATTTTGAAATTTTNCCTTTCTTTNCATTCTGNACAAATTC TACTT  
460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580



# Séquençage de l'ADN

Recherche des mutations de résistance aux traitements antiviraux (HIV, HBV, CMV,..)

# Séquençage + Analyse phylogénétique



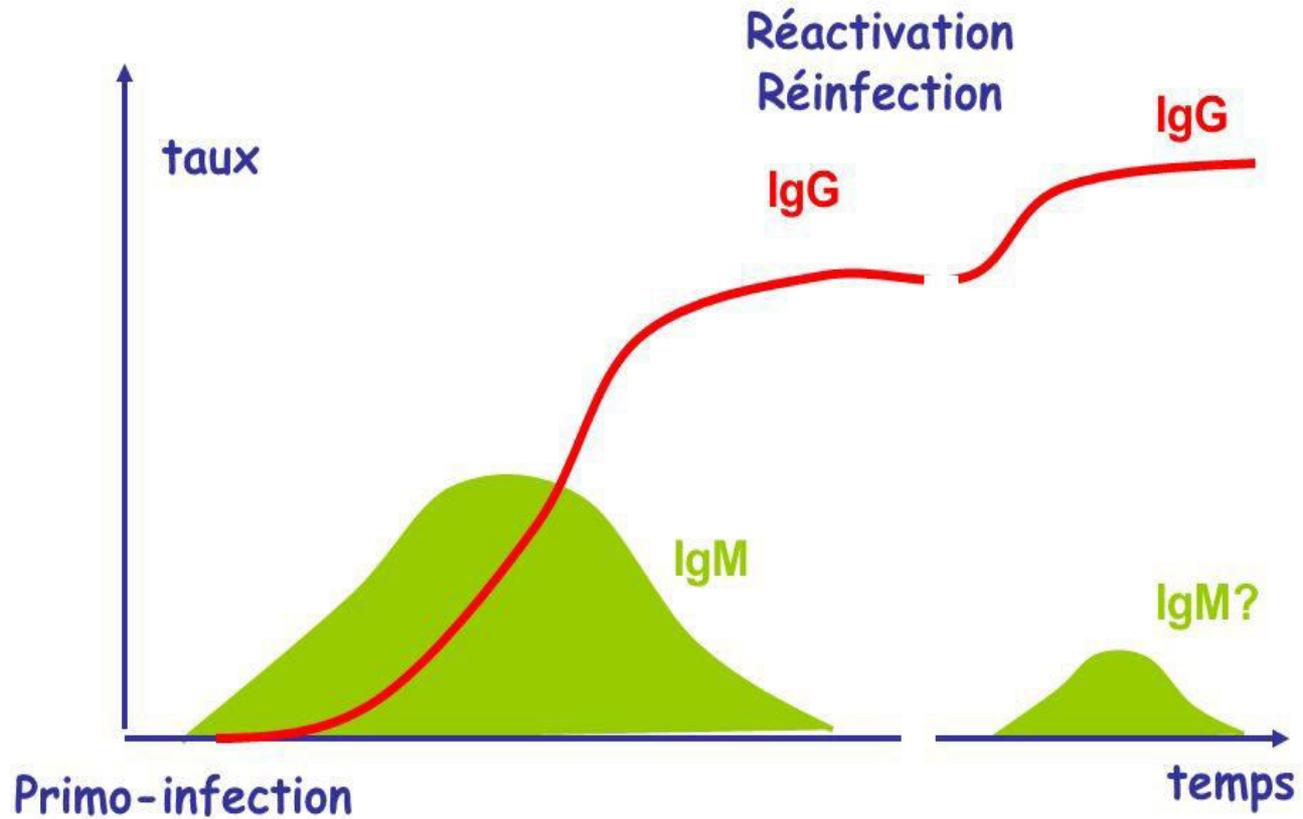
→ Génotype: HCV, HBV, HIV,...

# NGS (New Generation Sequencing) ou séquençage à haut débit

- débits de 50 à 1000 fois supérieurs.
- permettent une lecture en profondeur et détectent des variants présents en faible proportion dans une population de génomes (aux environs de 5%, alors qu'elle est de 20% pour Sanger)

# SEROLOGIE

# Cinétique des Ac



# prélèvements

- Sang total sur tube sec → sérum
- Sang total sur tube avec anticoagulant → plasma
- Si sérum/plasma était congelé → clarifier avant analyse = centrifuger

Conservation à + 4°C sinon à – 20°C

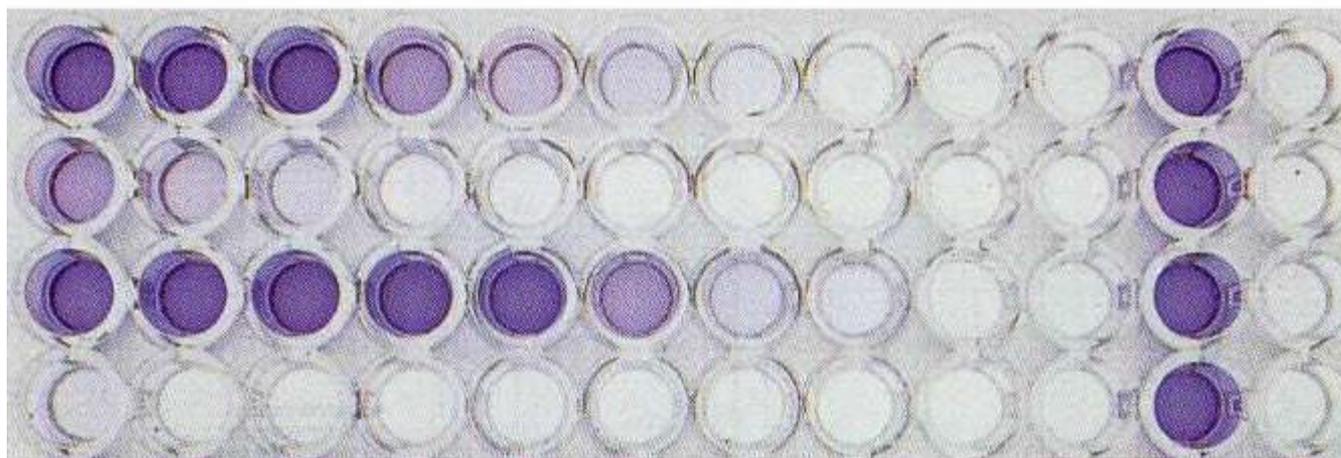
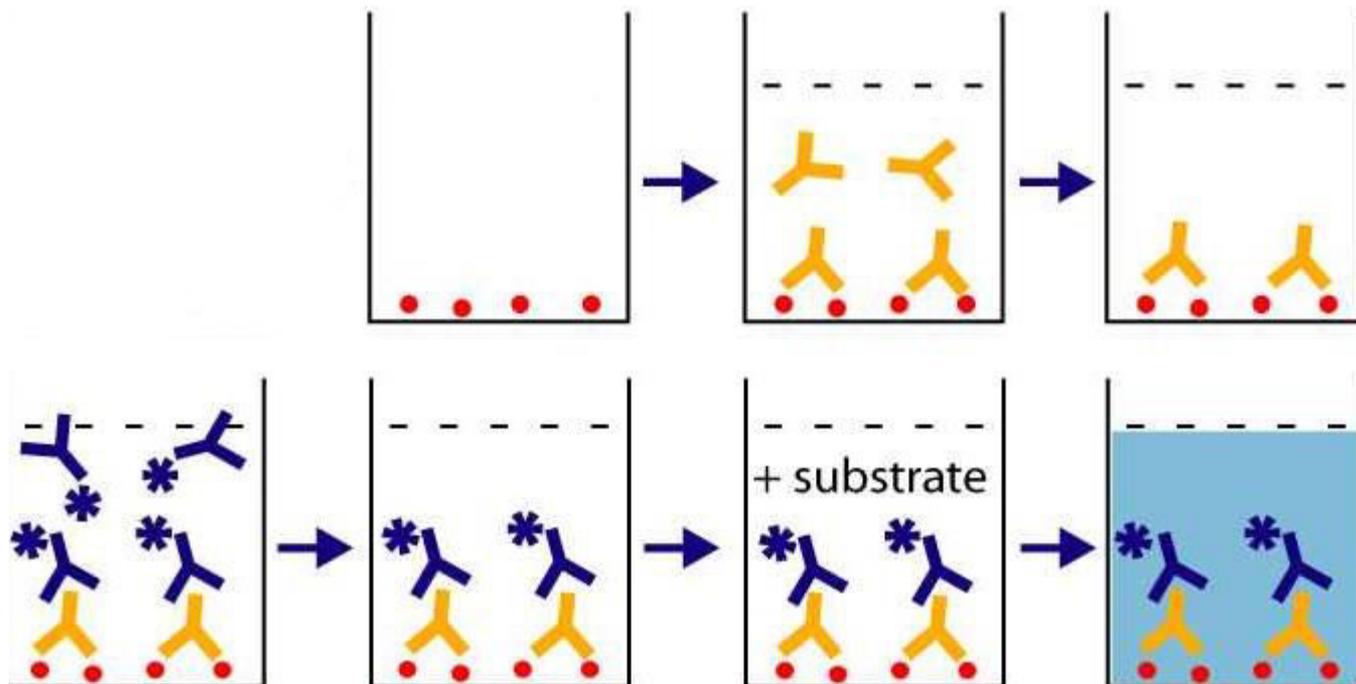
# Techniques sérologiques

- Séroneutralisation
- Réaction de déviation du complément (RFC)
- Inhibition de l'hémagglutination (IHA)
- Immunofluorescence indirecte
- **Tests immuno-enzymatiques (EIA) +++**

# Test ELISA

**Principe général** (recherche des Ac dans le sérum):

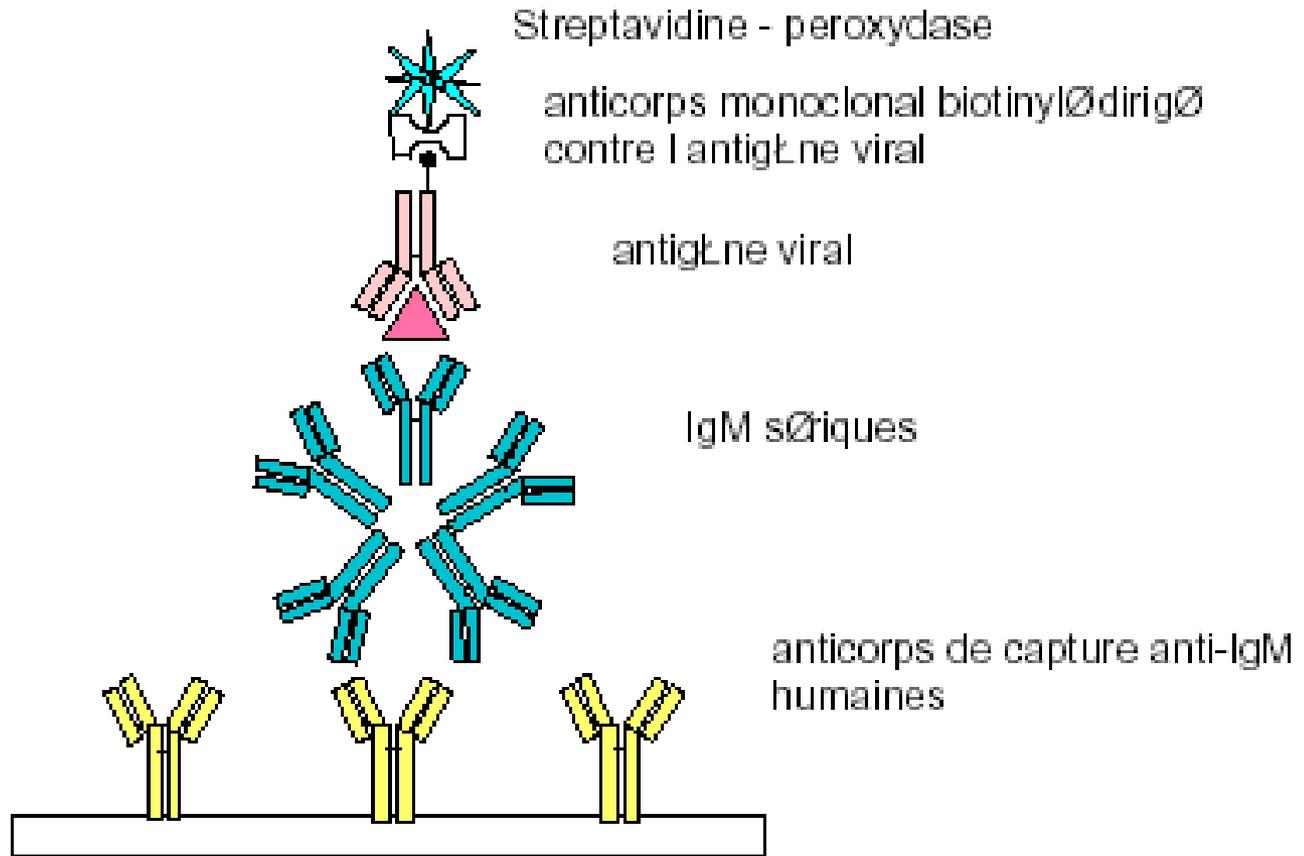
- l'antigène viral est immobilisé sur un support solide (puits de microplaque);
- le sérum à tester est mis en contact avec l'Ag ;
- étape de lavage,
- un anticorps anti-immunoglobuline humaine est ajouté;
- cet Ac est couplé à une enzyme → **réaction colorée** → **Densité Optique** (spectrophotomètre)



# Test ELISA

- Rapide
- Sensible
- Spécifique
- Permet de discriminer entre IgM et IgG

# ELISA immunocapture (IgM)



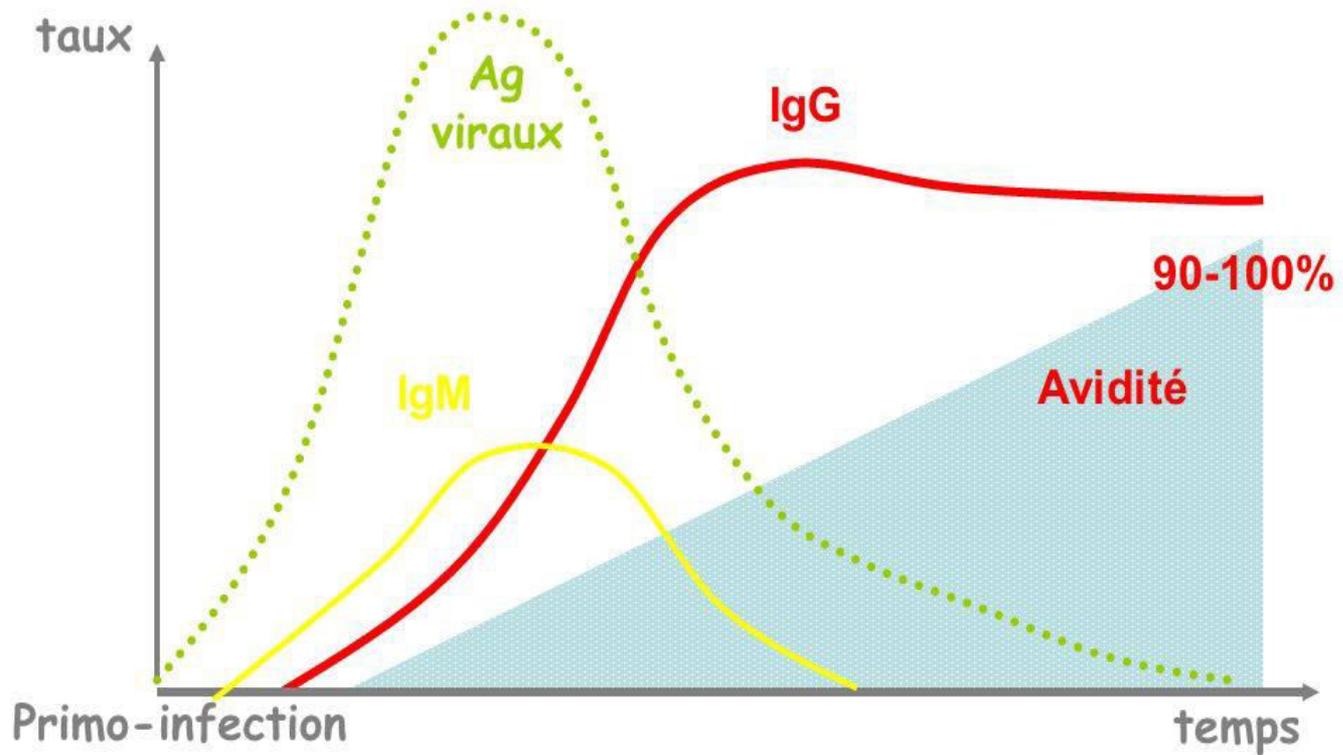
Dc de l'hépatite A, Rubéole, Rougeole,..

# Chimiluminescence

- Emission de lumière consécutif à une réaction chimique
- Automatisation ++

Quantification de l'Ag HBs pour le suivi des porteurs chroniques du VHB

# Avidité des IgG



# Avidité des IgG

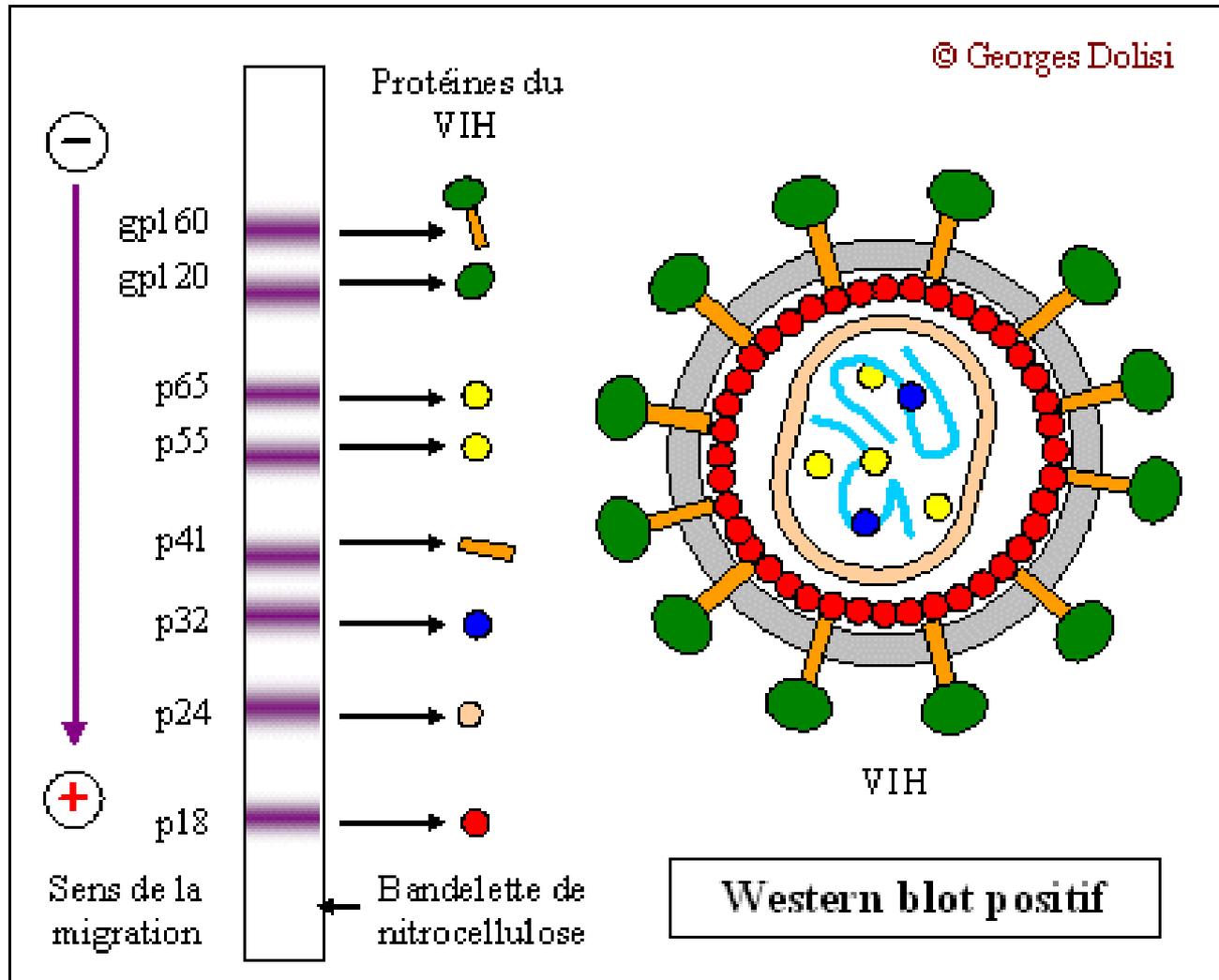
## Présence d'IgM spécifiques :

- au cours des primo-infections
- au cours des réinfections/réactivations
- stimulation polyclonale du système immunitaire
- Persistance

→ **Mesure de l'avidité des IgG (rubéole, CMV)**

**Avidité faible en faveur d'une primo-infection**

# Western blot : confirmation de l'infection HIV



# TROD (Test Rapide d'Orientation Diagnostique)

- Résultat en 30 minutes maximum
- principe d'immunochromatographie ou d'immunofiltration sur membrane
- Lecture visuelle
- dépistage de l'infection à VIH et de l'infection à VHC
- sensibilité moindre par rapport aux tests classiques au cours de la phase de séroconversion (fenêtre sérologique)

# Test rapide / Immunochromatographie (Recherche d'Anticorps : HIV, HCV)

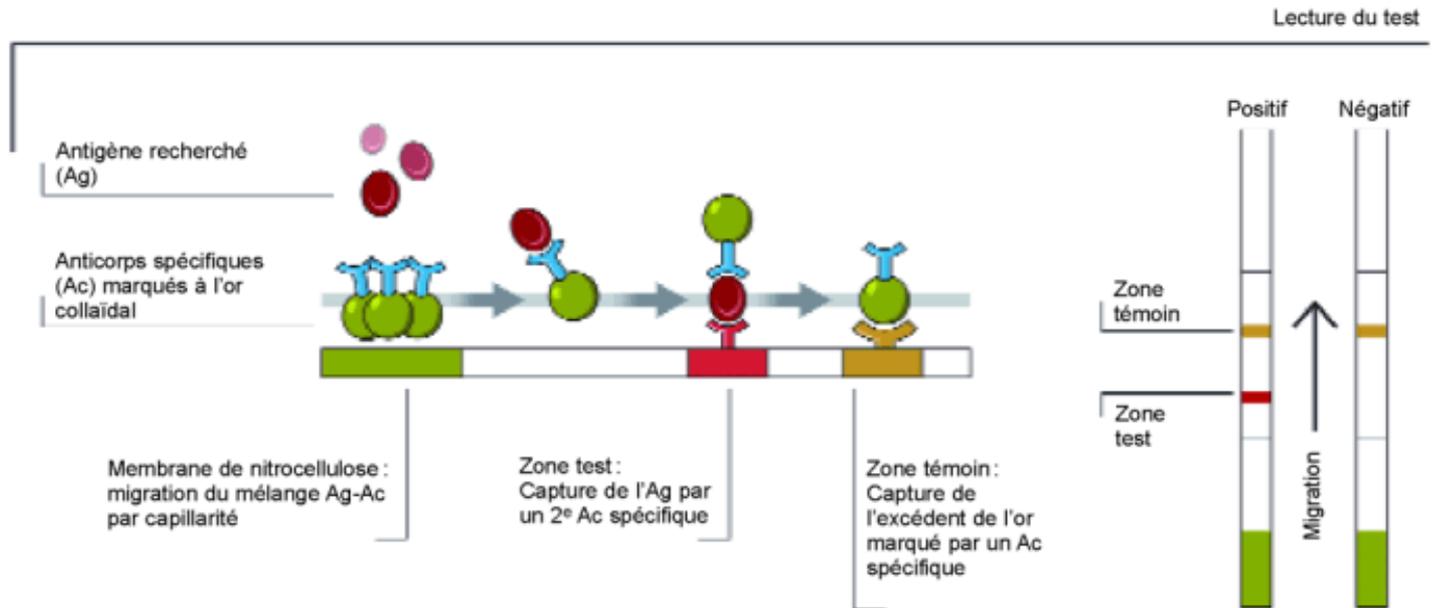


Figure 1. Schéma d'un test d'immunochromatographie



# Test rapide / Immunochromatographie (Recherche d'Antigenes)

Quelques exemples :

- Virus respiratoires (VRS, gripes...)
- Virus entériques (Rotavirus, Adénovirus...)



Simple, Rapide, Faible coût, **Sensibilité imparfaite**