

**Université BADJI-MOKHTAR
Faculté de médecine
Département de Médecine dentaire**

**Pr Amiri Sabrina
Laboratoire de microbiologie
Faculté de médecine
Annaba**

Le diagnostic virologique

Introduction

Le diagnostic virologique définit un ensemble de principes, méthodes et stratégies visant à détecter, quantifier, suivre et identifier précisément les infections virales humaines. Le choix entre le diagnostic direct (détection d'un composant viral) et le diagnostic indirect (détection des anticorps dirigés contre le virus) dépend du virus recherché et de la question médicale posée. Les techniques moléculaires ayant pour cible les acides nucléiques viraux ont connu un essor sans précédent au cours des dernières années, notamment l'amplification génique. Cependant, les méthodes plus classiques comme la microscopie électronique, la multiplication virale en culture de cellules, la détection des antigènes et la sérologie conservent leur intérêt et leurs indications. Le recours au diagnostic virologique s'impose en particulier en situation d'immunodépression, lors d'une grossesse et chaque fois qu'un traitement antiviral spécifique est envisagé. Le diagnostic virologique est en permanente évolution du fait des progrès des connaissances, des techniques et des thérapeutiques, ce qui impose une veille scientifique et médicale continue.

Structure virale détectée	Méthode	Quelques applications courantes
Diagnostic « indirect » Anticorps anti-viraux	sérologies virales	presque tous les virus
Diagnostic « direct » Particules virales complètes Protéines virales	culture virale diagnostic direct « rapide »	HHV, VZV, Entérovirus Rotavirus, Adenovirus, RSV, Grippe, Virus Parainfluenza, HHV, VZV, CMV
Acides nucléiques viraux	biologie moléculaire	virus neurotropes (HHV-1...) HIV, HCV, HBV

1. Recherche de Virus et de ses constituants

1-1. les prélèvements

Différents types de prélèvements peuvent être utilisés pour la recherche de virus :

- ✓ le sang (virémie),
- ✓ les selles,
- ✓ les sécrétions nasales,
- ✓ les urines,
- ✓ les prélèvements cutanés (vésicules, ulcérations),
- ✓ les prélèvements génitaux, les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA), les liquides céphalo-rachidien (LCR).

Conditions des prélèvements :

- Le prélèvement doit être bien fait (quantité suffisante, bonnes conditions de transport, transfert rapide vers le laboratoire),
- Le choix du site de prélèvement doit être fait selon les signes cliniques, selon les virus recherchés et en fonction de la physiopathologie de l'infection virale,
- L'identification du nom, prénom date de prélèvement et lieu de prélèvement sont indispensables; les principaux signes cliniques peuvent aider et orienter la recherche des virus (feuille de prescription systématiquement associée aux tubes).

1-2. Les techniques de détection de virus et des constituants

A. La recherche de virus par cultures cellulaires

Pendant longtemps les techniques d'isolements de virus en cultures cellulaires étaient les plus utilisées, elles sont de plus en plus abandonnées au profit des techniques de détection des antigènes viraux et surtout de celles d'acides nucléiques (PCR). Cependant, il peut être utile de faire des isolements de virus pour préparer des stocks importants de virus complets vivants et infectieux (caractérisation des types de souches virales : épidémies, recherche de mutations de résistance au traitement : HIV, CMV, HBV). Les cultures cellulaires utilisent des lignées de cellules d'origine humaine ou animale. On citera les cellules épithélioïdes humaines en lignée continue (Hela, Hep, KB) ou les cellules fibroblastiques humaines (MRC5 : pour les CMV). Les signes de multiplication virale induisent l'apparition de l'effet cytopathogène (ECP) défini par un changement de l'aspect des cellules, visible en microscopie optique (accumulation des virus produits ou des antigènes dans le noyau, ou dans le cytoplasme des cellules infectées). On peut observer des modifications de la nappe cellulaire par examen au microscope. On peut aussi colorer les cellules pour identifier les inclusions. Les techniques de culture de virus sont indispensables pour effectuer des titrages de virus et quantifier le nombre de virus infectieux. Elles restent à la base des techniques de recherche de molécules antivirales (screening d'antiviraux).

B. La recherche des génomes viraux

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

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

C. La recherche des antigènes viraux

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

2. Recherche des anticorps, Sérologies Virales

2-1. Objectifs

L'infection virale est le plus souvent suivie par une réponse immunitaire humorale traduite par la production d'anticorps spécifiques des antigènes du virus (immunoglobulines IgG et IgM). La

connaissance d'un statut sérologique présente différents intérêts : elle permet de connaître l'état immunitaire du sujet : un titre positif permet d'affirmer que le sujet est immunisé et a rencontré une fois le virus dans sa vie (CMV, HIV, Rubéole) ou bien qu'il est vacciné (hépatite B). Elle permet aussi de suivre l'évolution de l'infection virale (anticorps anti HBc et HBs).

2-2. Prélèvements

Les anticorps sont présents dans les différents liquides biologiques de l'organisme et notamment dans le sang périphérique (plasma ou sérum selon que le sang est prélevé avec ou sans anticoagulant). Cinq à dix millilitres de sang veineux suffisent pour effectuer la recherche de plusieurs marqueurs ou faire plusieurs sérologies. Les échantillons de plasmas ou de sérums se conservent au congélateur et doivent être gardés un an par le laboratoire (sérologie rubéole).

2-3. Techniques

Différentes techniques sont utilisées : ELISA, agglutination, Western blot et immunoblot. L'ELISA est devenue la technique la plus utilisée car elle est rapide simple spécifique et adaptable sur automate. Elle permet d'utiliser différents types d'antigènes : lysats de virus, protéines virales natives, protéines de recombinaison génétique ou peptides de synthèse. Ceci permet des sérologies analytiques selon les antigènes utilisés (exemple suivi de l'infection par le virus de l'hépatite B).

Conclusions

Les examens virologiques deviennent particulièrement contributifs grâce au développement de nouvelles techniques rapides sensibles et spécifiques pour la détection des virus. Elles permettent le diagnostic et le suivi thérapeutique d'infections chroniques (HIV, HBV) ou d'infections sévères chez les sujets immuno-déprimés. Il faut souligner la nécessité de contacts entre cliniciens et biologistes pour orienter le choix des examens, cibler les recherches selon chaque pathologie observée et adapter les traitements.