

Diagnostic des infections virales et un mot sur les résistances HSV et CMV



Dr Enagnon Kazali ALIDJINOU

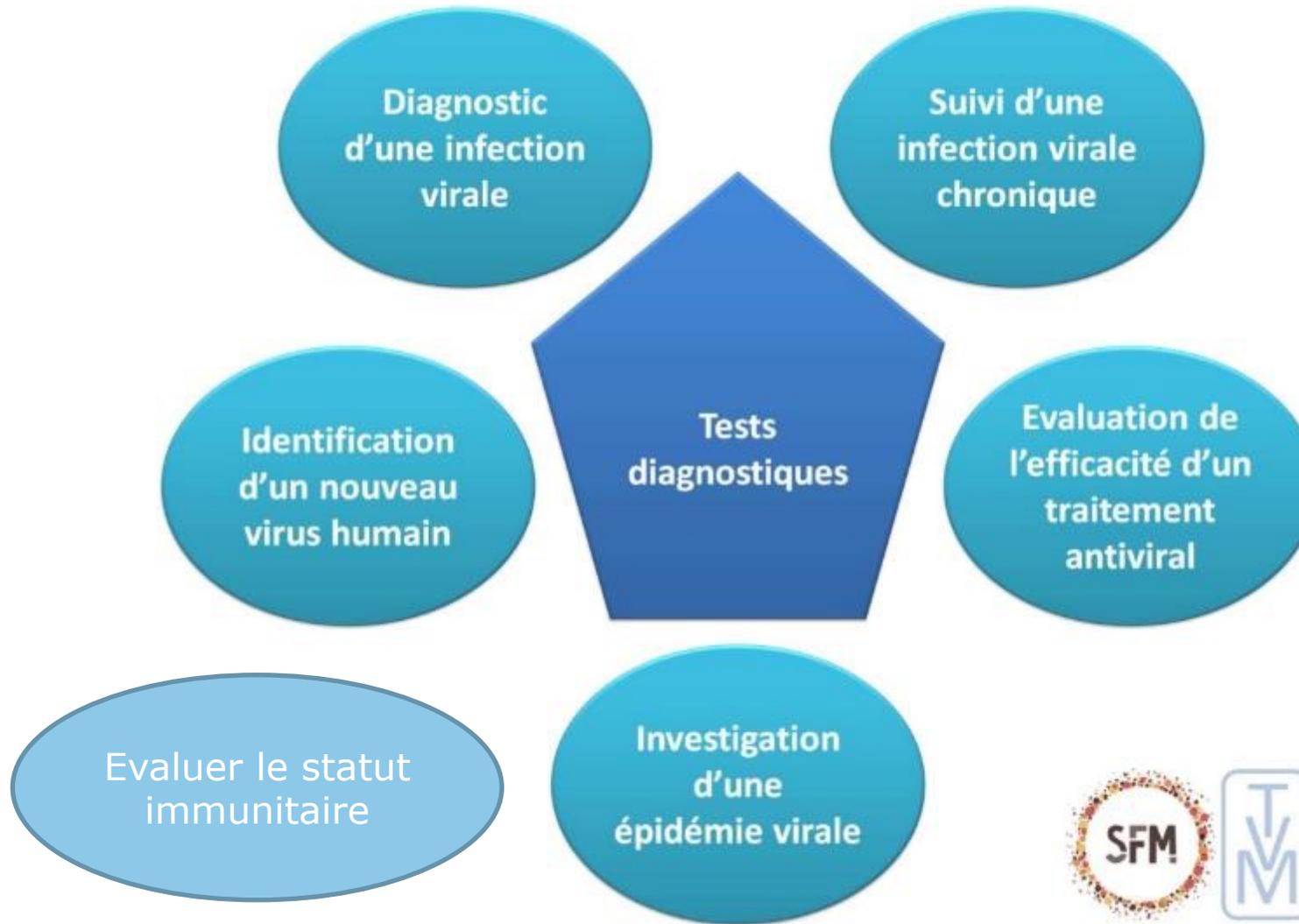
Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier

Service de Virologie

Université de Lille, UFR3S, Faculté de Médecine, CHU de Lille

Diagnostic des infections virales

OBJECTIFS DES EXAMENS VIRO



Deux stratégies

diagnostic direct → recherche directe du virus ou de ses constituants dans les prélèvements pathologiques

diagnostic indirect → mise en évidence de la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis du virus

DIAGNOSTIC DIRECT

Mettre en évidence le virus et/ou ses constituants

- Le virus entier en microscopie électronique (pas en routine diagnostique)
- Le virus infectieux en cultures cellulaires
- Les antigènes viraux (techniques d'immunomarquage)
- Le génome viral (techniques de biologie moléculaire): +++

DIAGNOSTIC DIRECT

Prélèvement: la qualité conditionne la valeur du résultat

➤ Quand?

le plus tôt possible
avant tout traitement antiviral

➤ Comment?

Prélèvement riche en **cellules**

Matériel et récipient stériles

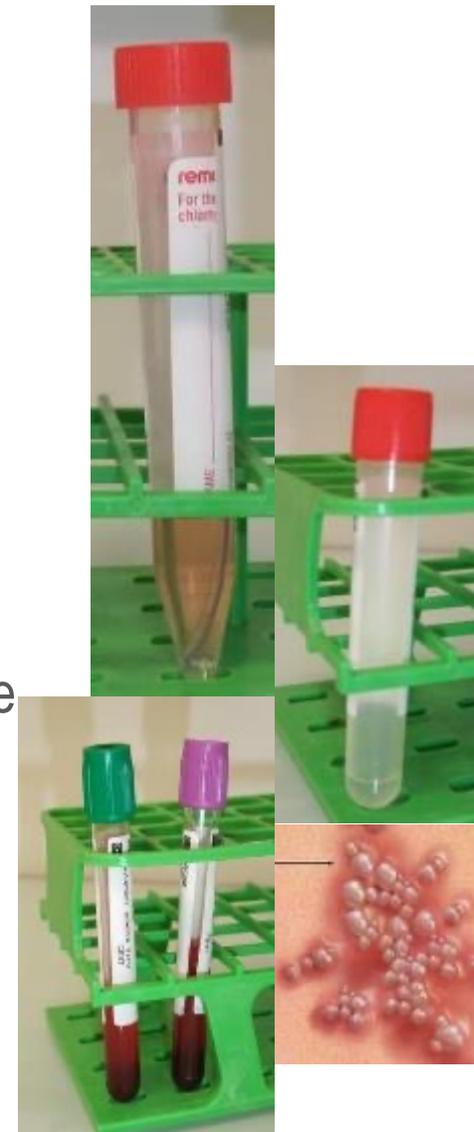
Respect des conditions de transport conservation

Renseignements cliniques...

DIAGNOSTIC DIRECT

Prélèvement ➤ Où? au niveau du **site infectieux**

- Infection respiratoire: écouvillonnage des fosses nasales,
- aspiration rhinopharyngée, LBA
- Infection neurologique: LCR
- Infection oculaire: écouvillon conjonctival, humeur aqueuse
- Infection digestive: selles, biopsie
- Infection cutanée: prélèvement de vésicules
- Mais aussi le sang.....



Quelles méthodes?

Le microscope électronique
non utilisé en routine



Trois approches en routine

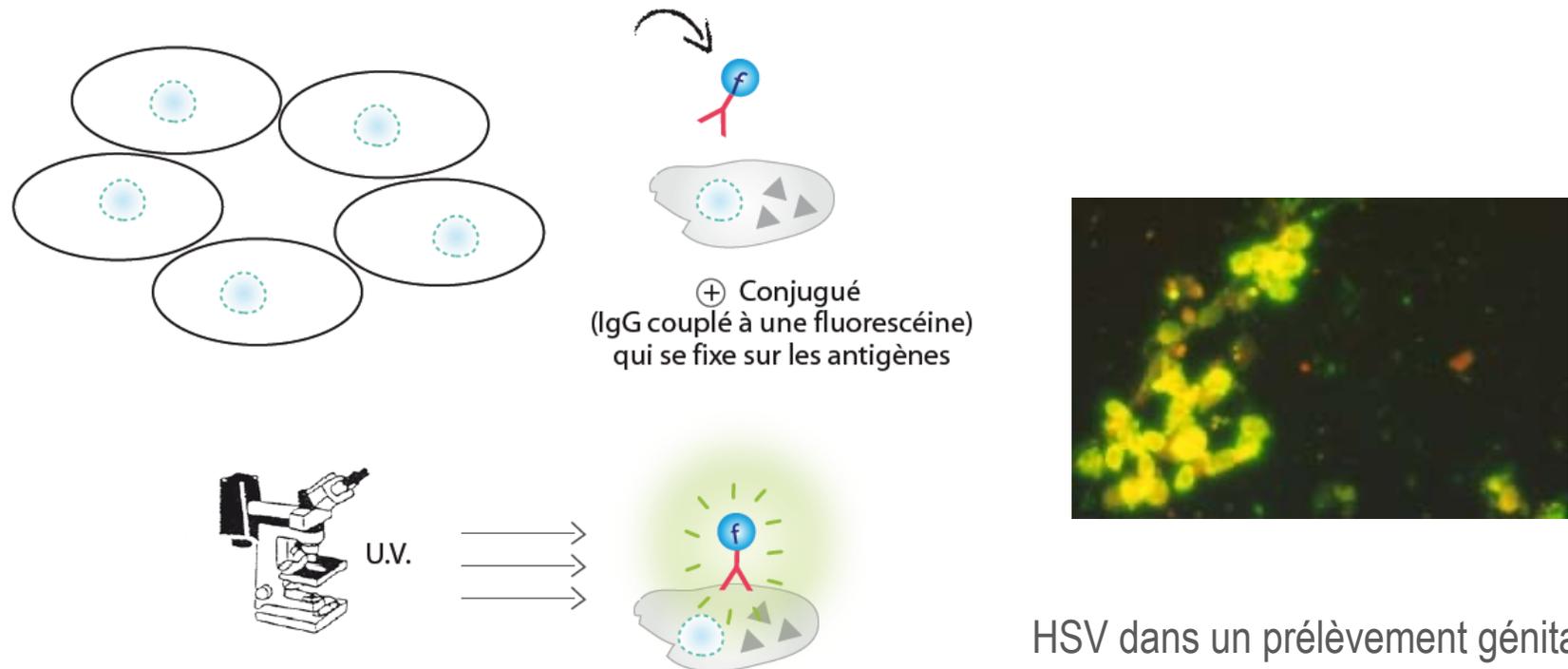
- Détection rapide du virus par immunomarquage
- Isolement du virus par culture (**devenu rare en routine**)
- Détection du génome viral par biologie moléculaire (**+++**)

DIAGNOSTIC DIRECT

- **Détection rapide du virus par immunomarquage**
 - Résultats: moins de ½ h à 3 heures...
 - Utilisation d'un anticorps spécifique marqué »»» cibler le virus
 - Manquent parfois de sensibilité
 - Plusieurs techniques (immunofluorescence, ELISA, agglutination de particules de latex, immunochromatographie)

DIAGNOSTIC DIRECT

- Détection rapide du virus par immunomarquage



Exemple: Immunofluorescence

DIAGNOSTIC DIRECT

- Détection rapide du virus par immunomarquage

1



- Collecter les selles à l'aide d'un écouvillon et les mélanger dans 1 ml de diluant.
- Vortexer et laisser les grosses particules sédimenter.

2

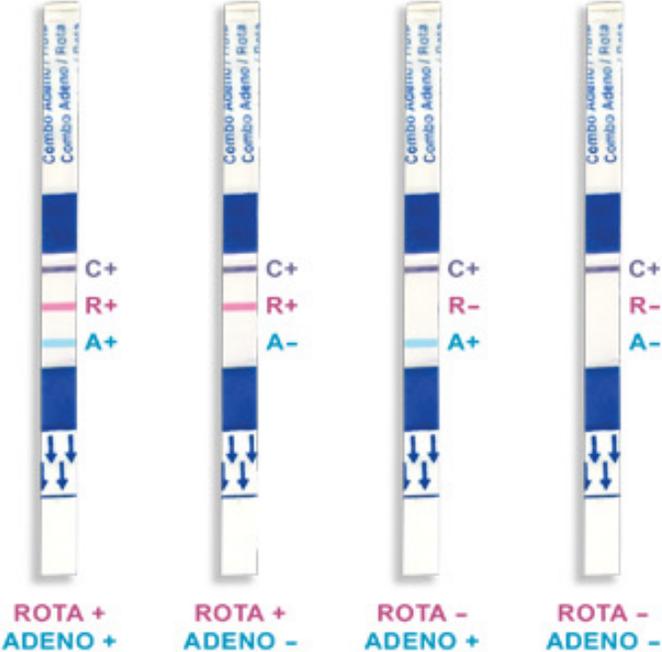


- Introduire la bandelette dans le tube d'extraction en maintenant l'extrémité des flèches au-dessus du liquide pendant 30 secondes.

3

- Déposer la bandelette sur une surface plane.

Lecture du résultat:
10 minutes



ROTA +
ADENO +

ROTA +
ADENO -

ROTA -
ADENO +

ROTA -
ADENO -

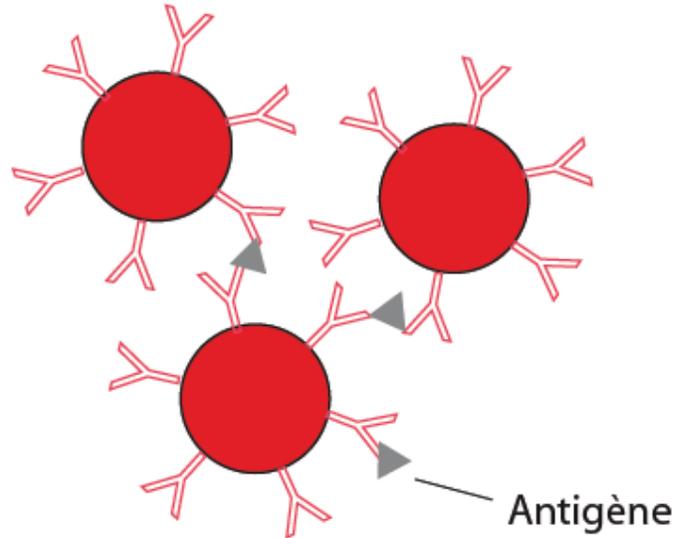
Exemple: immunochromatographie

Recherche de Rotavirus et d'Adénovirus dans les selles

DIAGNOSTIC DIRECT

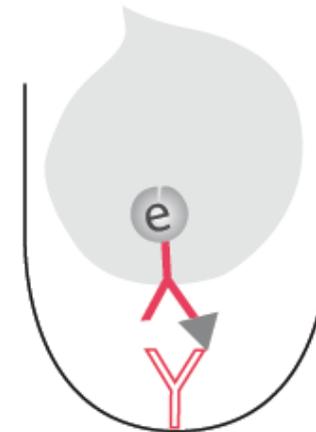
- Détection rapide du virus par immunomarquage

Agglutination



Agglutination

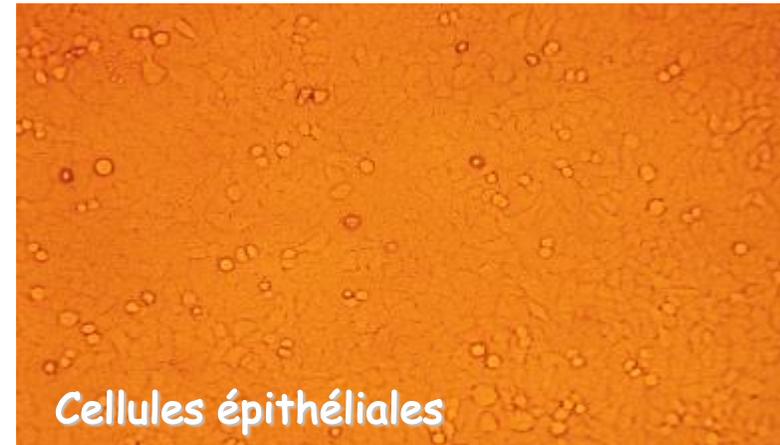
Elisa



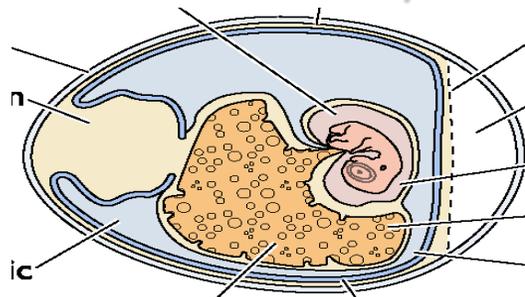
ELISA

- Isolement du virus par culture

Cellules du corps humains (in vivo, in vitro)



Cellules de l'œuf embryonné



Les virus se multiplient dans des cellules

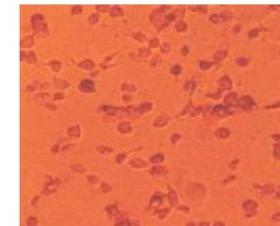
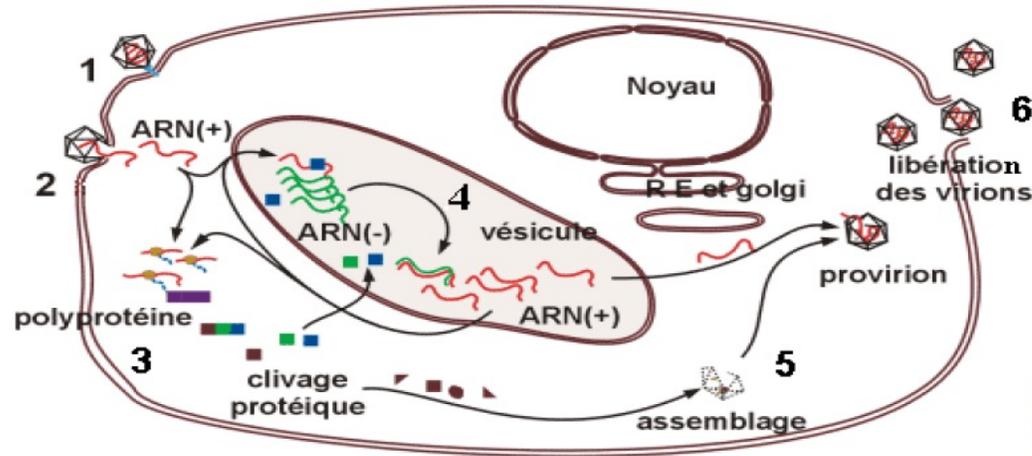
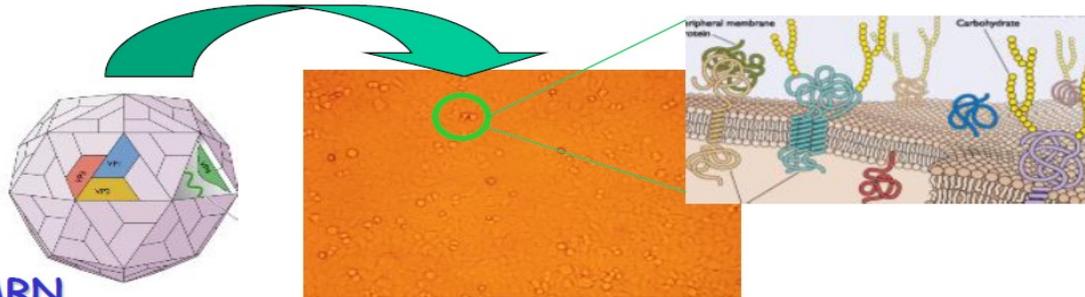
DIAGNOSTIC DIRECT

Détection d'un effet cytopathique

■ Isolement du virus par culture

✓ Enterovirus

Génome viral ARN



DIAGNOSTIC DIRECT

- Isolement du virus par culture

- Virus = parasites intracellulaires obligatoires
→ Culture sur cellules vivantes
- Nécessite des particules virales infectieuses
→ milieu de transport: Hanks, Virocult®,
M4RT ou UTM...



DIAGNOSTIC DIRECT

- Isolement du virus par culture



Niveau de confinement en fonction du virus L2, L3, L4

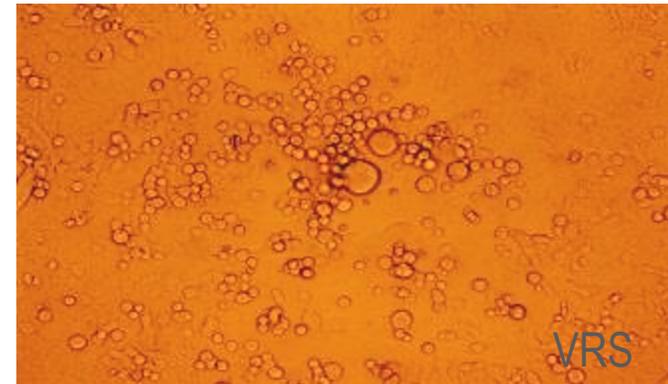
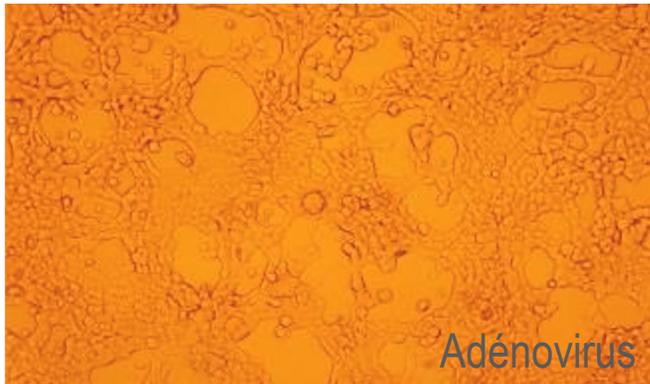
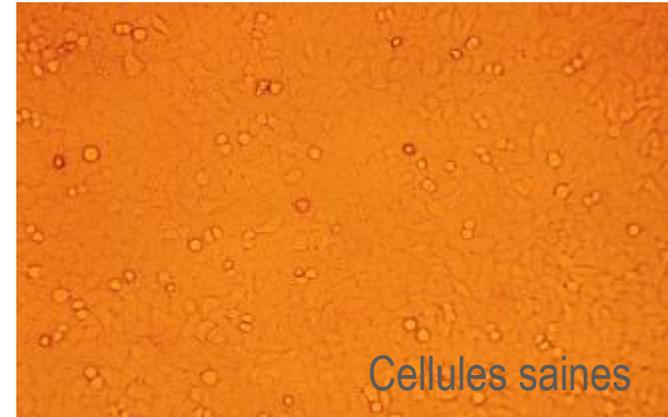
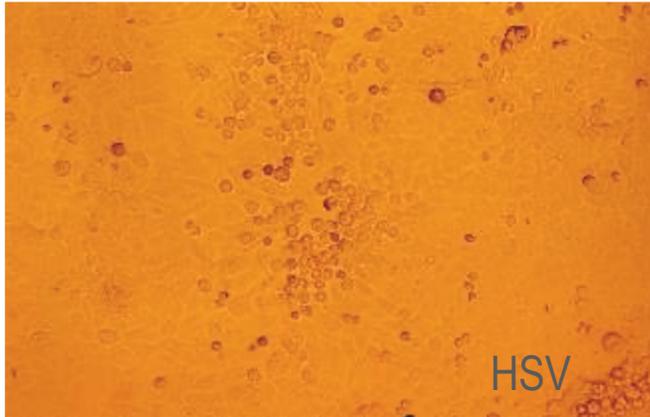
- Isolement du virus par culture



Niveau de confinement en fonction du virus L2, L3, L4

DIAGNOSTIC DIRECT

- Isolement du virus par culture



Détection d'un effet cytopathique

DIAGNOSTIC DIRECT

■ Isolement du virus par culture

• Avantages:

- Détecte des virus infectieux → détecte tout virus présent dans le prélèvement si cellules sensibles à ce virus
- Permet de disposer de la souche virale pour des études épidémiologiques ou de sensibilité aux antiviraux

• Inconvénients:

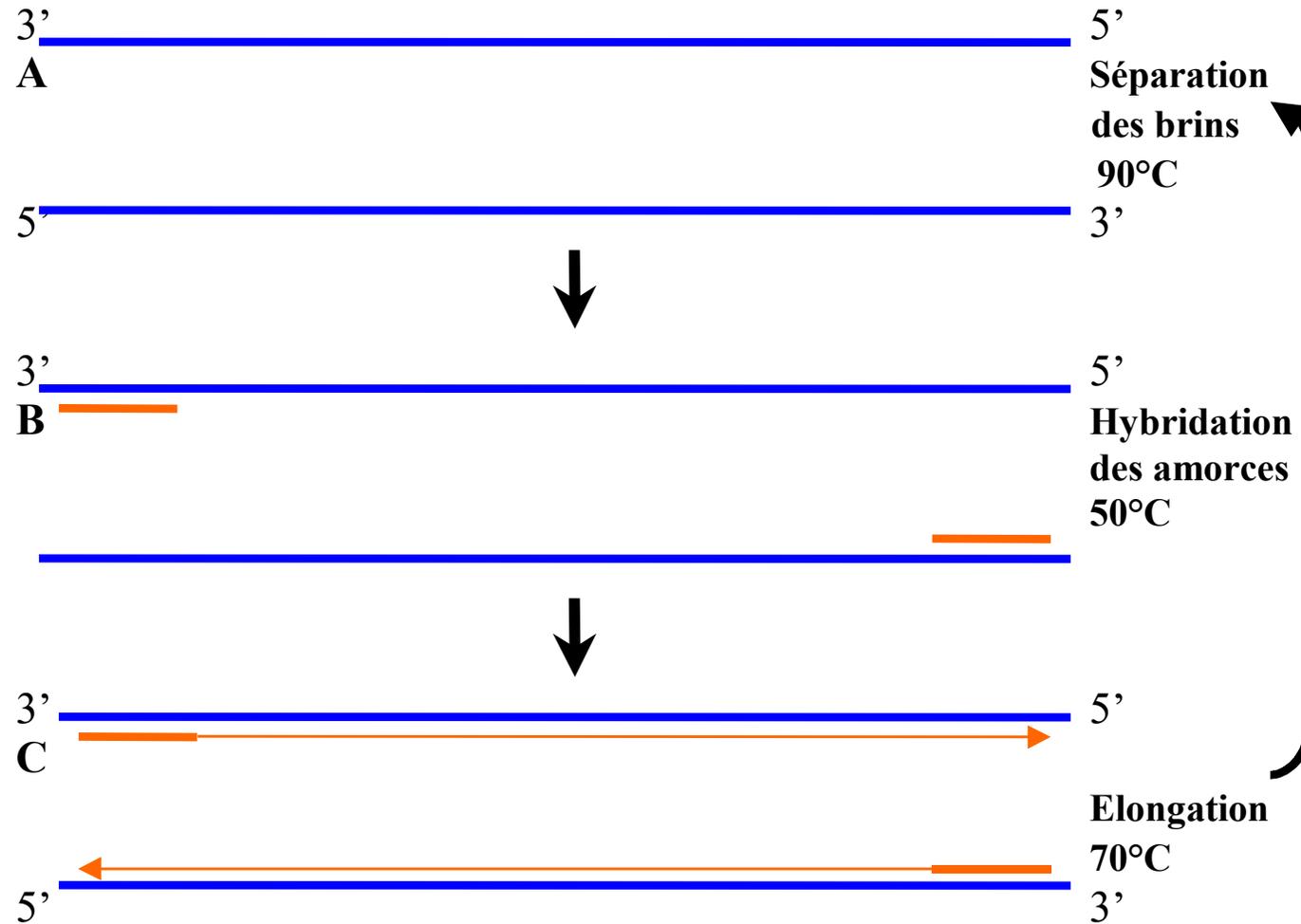
- Certains virus non cultivables *in vitro* (Ex: Papillomavirus, Parvovirus B19...)
- Délai de réponse long (non compatible avec le diagnostic urgent)
- Matériel coûteux, personnel entraîné...

DIAGNOSTIC DIRECT

- **Détection du génome viral par biologie moléculaire**
- Les techniques de biologie moléculaire ont révolutionné le diagnostic direct en virologie
- Les techniques d'amplification génique : **PCR (ou RT-PCR pour les virus à ARN)** permettent de détecter et de quantifier le virus dans les prélèvements
- Le **séquençage** permet de déterminer la composition du génome du virus, contribuant à typer ou à classer le virus, et parfois à déterminer sa sensibilité aux antiviraux

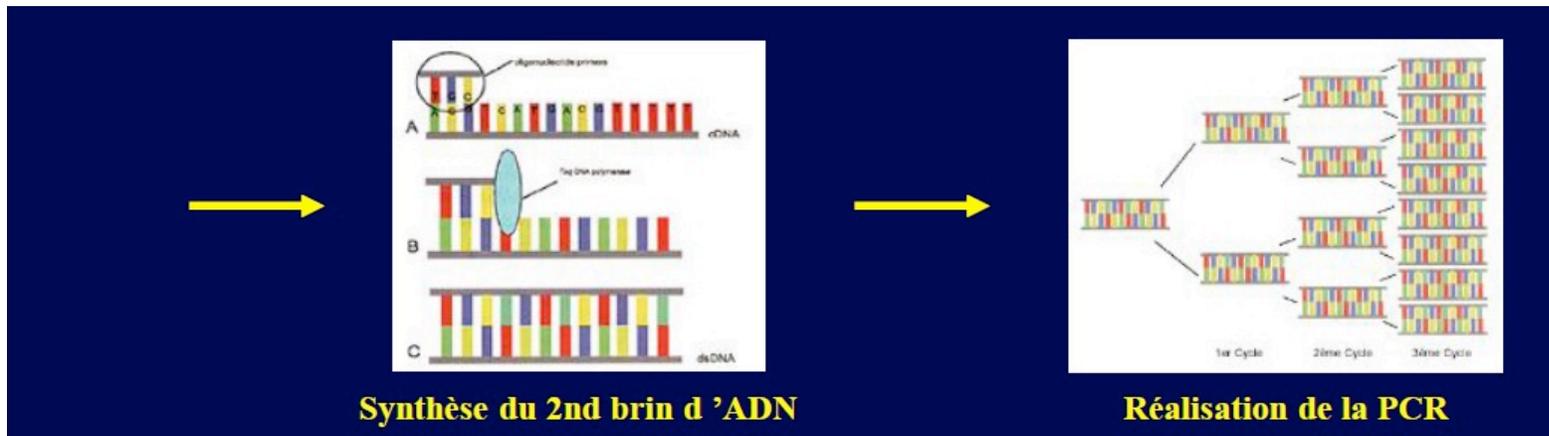
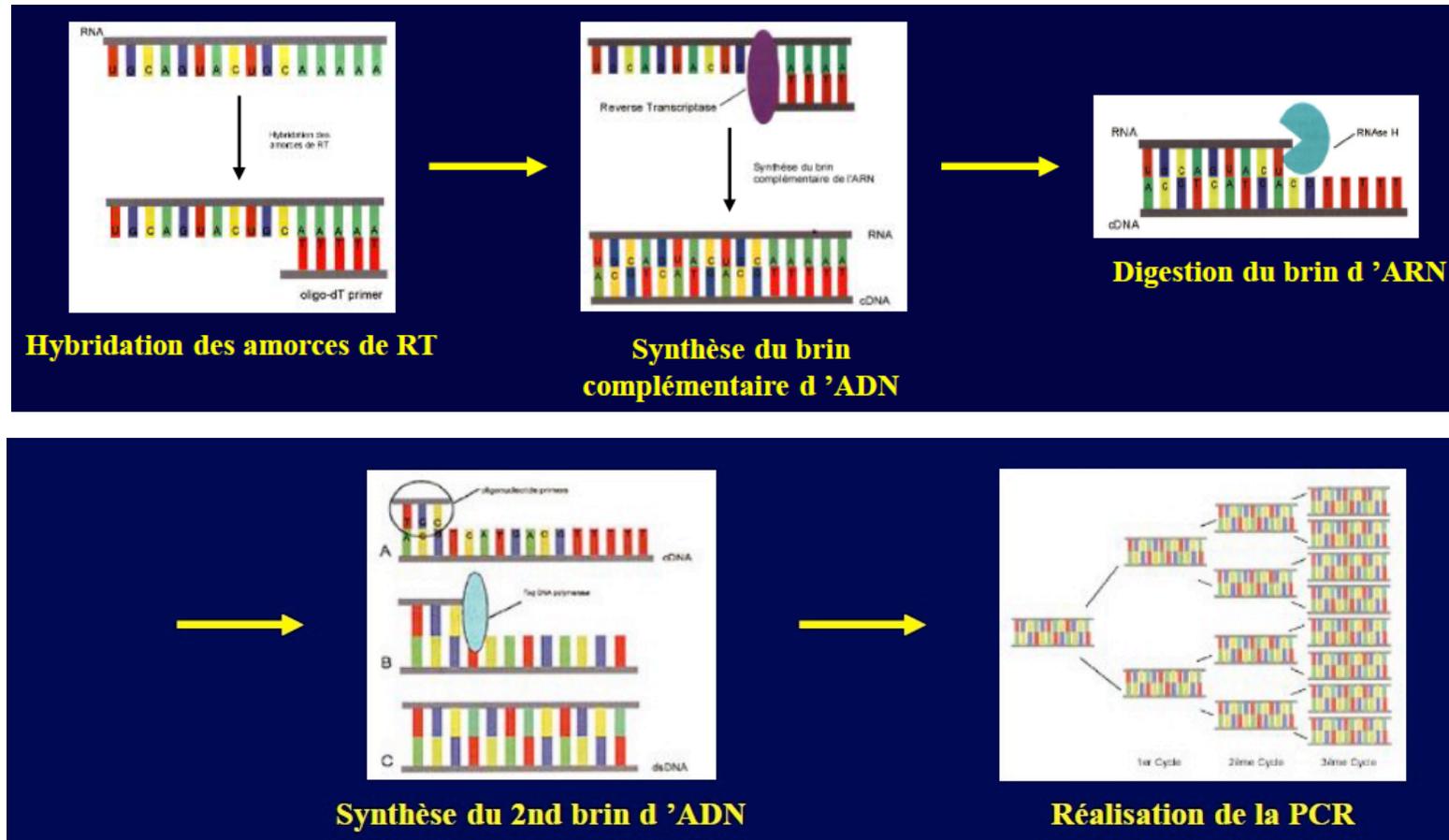
DIAGNOSTIC DIRECT

■ Principe de la PCR



DIAGNOSTIC DIRECT

- Pour le RT-PCR, il faut une étape préliminaire de rétro-transcription



DIAGNOSTIC DIRECT

■ Etapes techniques classiques de la PCR

1- Extraction des AN



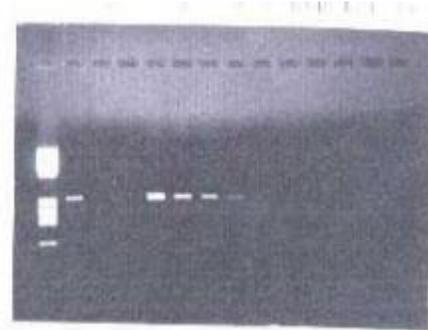
2- Préparation du « mix »



3- Amplification

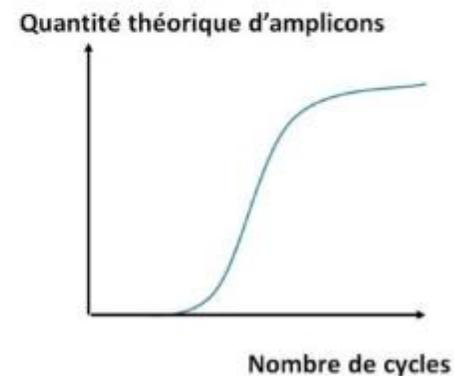
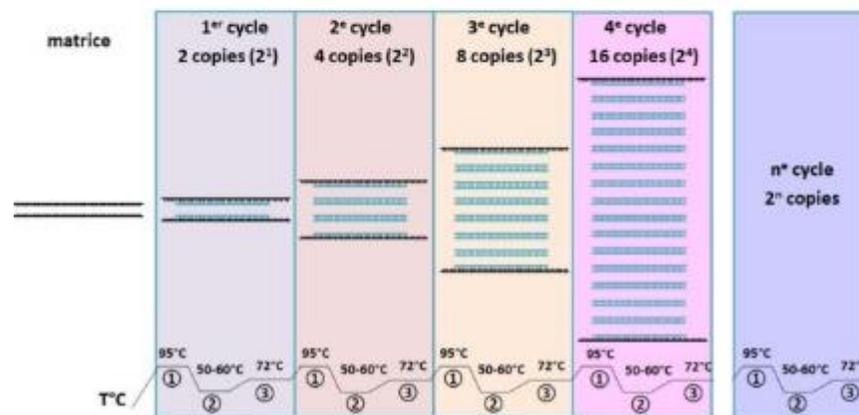
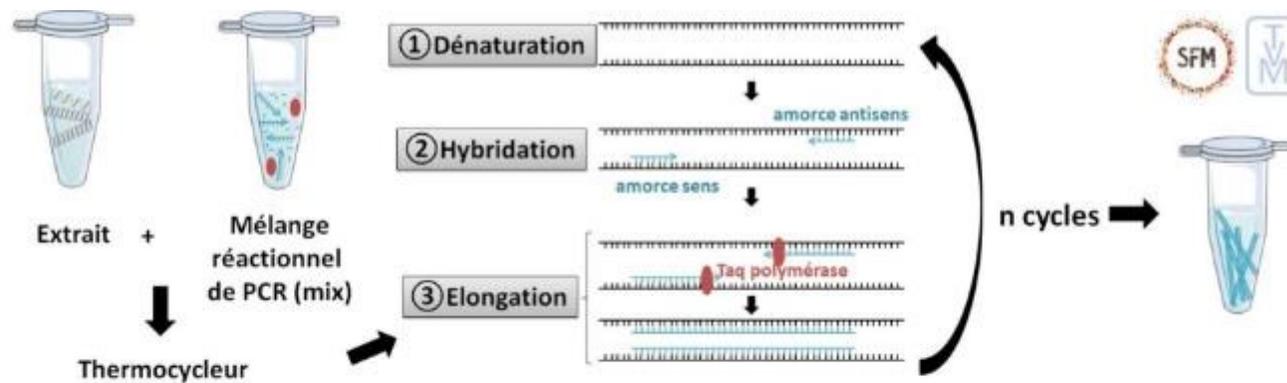


4- Révélation



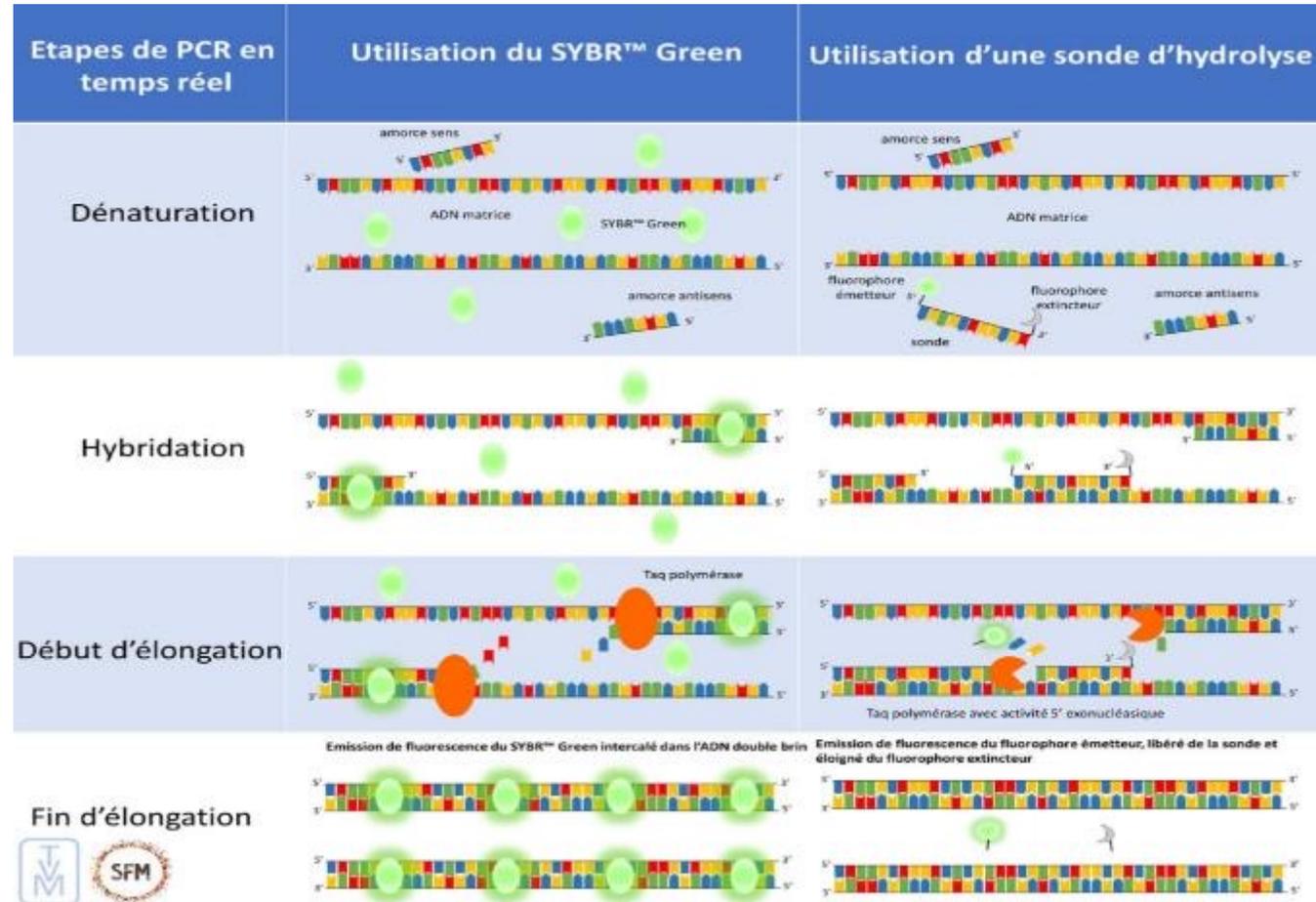
DIAGNOSTIC DIRECT

- PCR en temps réel

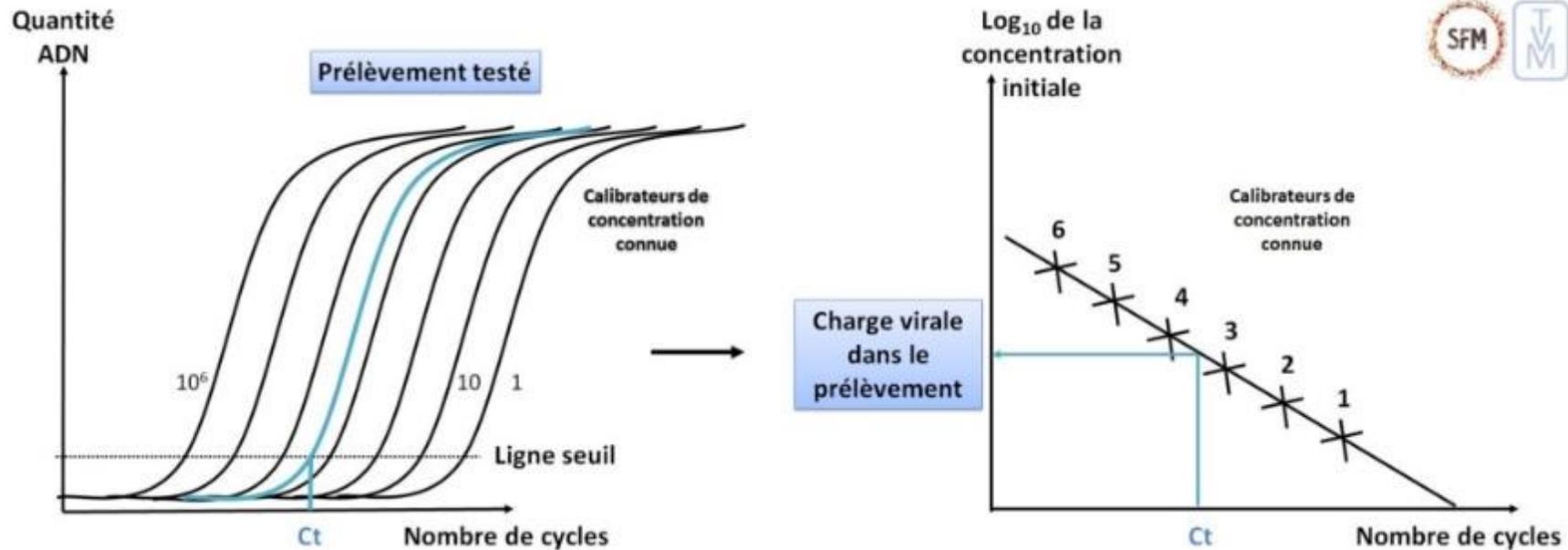


DIAGNOSTIC DIRECT

- PCR en temps réel



- PCR quantitative



Exemple: charge virale VIH, CMV

DIAGNOSTIC DIRECT

- Des systèmes automatisés



DIAGNOSTIC DIRECT

- PCR multiplex

Rechercher plusieurs cibles du même virus ou plusieurs pathogènes à la fois



DIAGNOSTIC DIRECT

- Des systèmes de PCR rapide

Résultat dans l'heure (urgence +++)
Coût élevé



Système GenXpert (CEPHEID)



Système Film Array (Biomerieux)

DIAGNOSTIC DIRECT

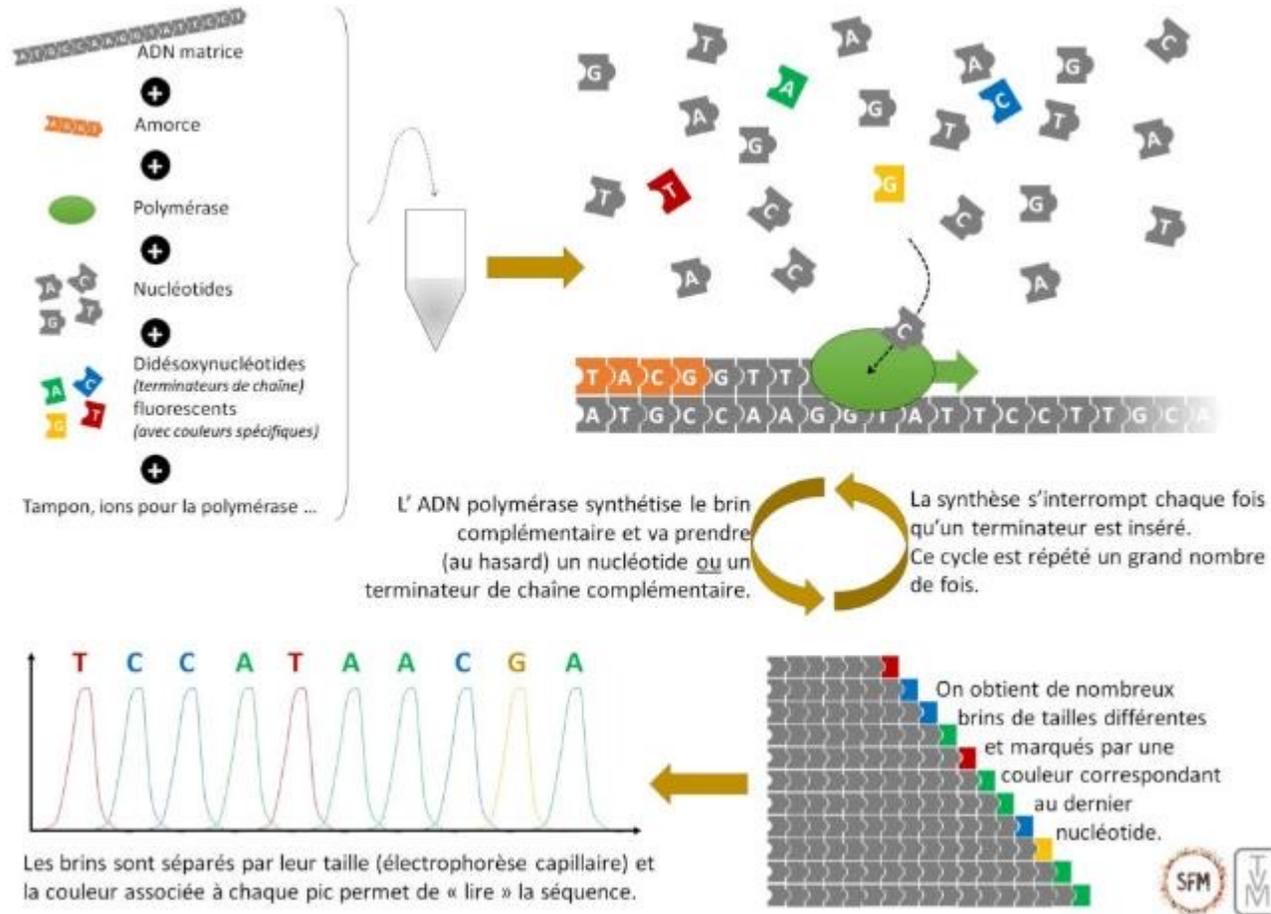
■ PCR: avantages et inconvénients

- PCR: spécifique, sensible »»» diagnostic précoce
- Technique de **choix** pour le diagnostic direct des infection virales
- Adapté à l'urgence du diagnostic

- Toutefois:
 - peut détecter des **virus latents** (interprétation +++)
 - risques de **faux positifs** (contaminations mais précautions)
 - risque de **faux négatifs** en cas de virus mutants/variants ou d'inhibiteurs de la Taq polymérase.

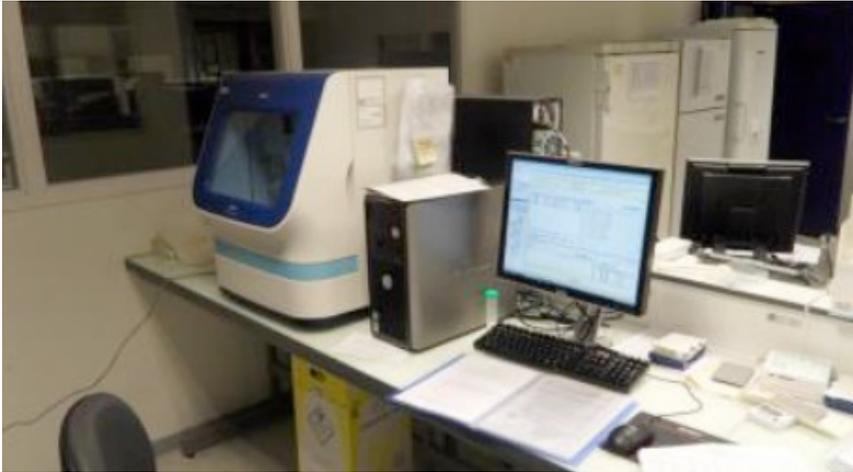
DIAGNOSTIC DIRECT

■ Séquençage



DIAGNOSTIC DIRECT

- **Séquençage** (Sanger versus NGS)



DIAGNOSTIC DIRECT

■ Séquençage (Sanger versus NGS)



■ Quel intérêt pour le séquençage

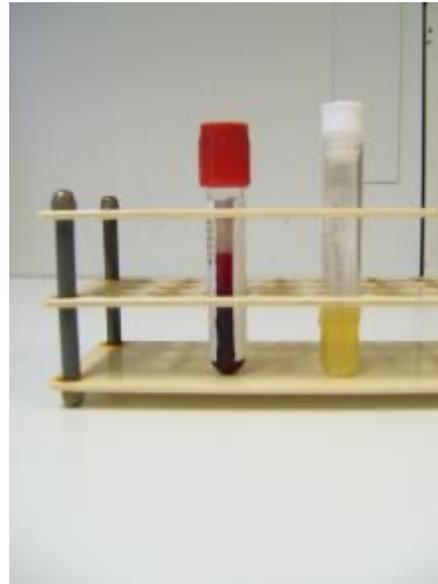
- Typage du virus
 - Hépatite C génotype 1a, 1b, 2, 3a.....
 - Enquêtes épidémiologiques
- Détermination de la résistance aux antiviraux qui ciblent une région du virus...
 - Ex du VIH, CMV...
- Recherche à l'aveugle d'un virus dans un prélèvement, découverte de virus (métagénomique)...

DIAGNOSTIC INDIRECT

- Evaluer l'immunité innée: dosage de cytokines comme l'interféron
- Evaluer la réponse adaptative: **recherche d'anticorps spécifiques** (réponse humorale) +++

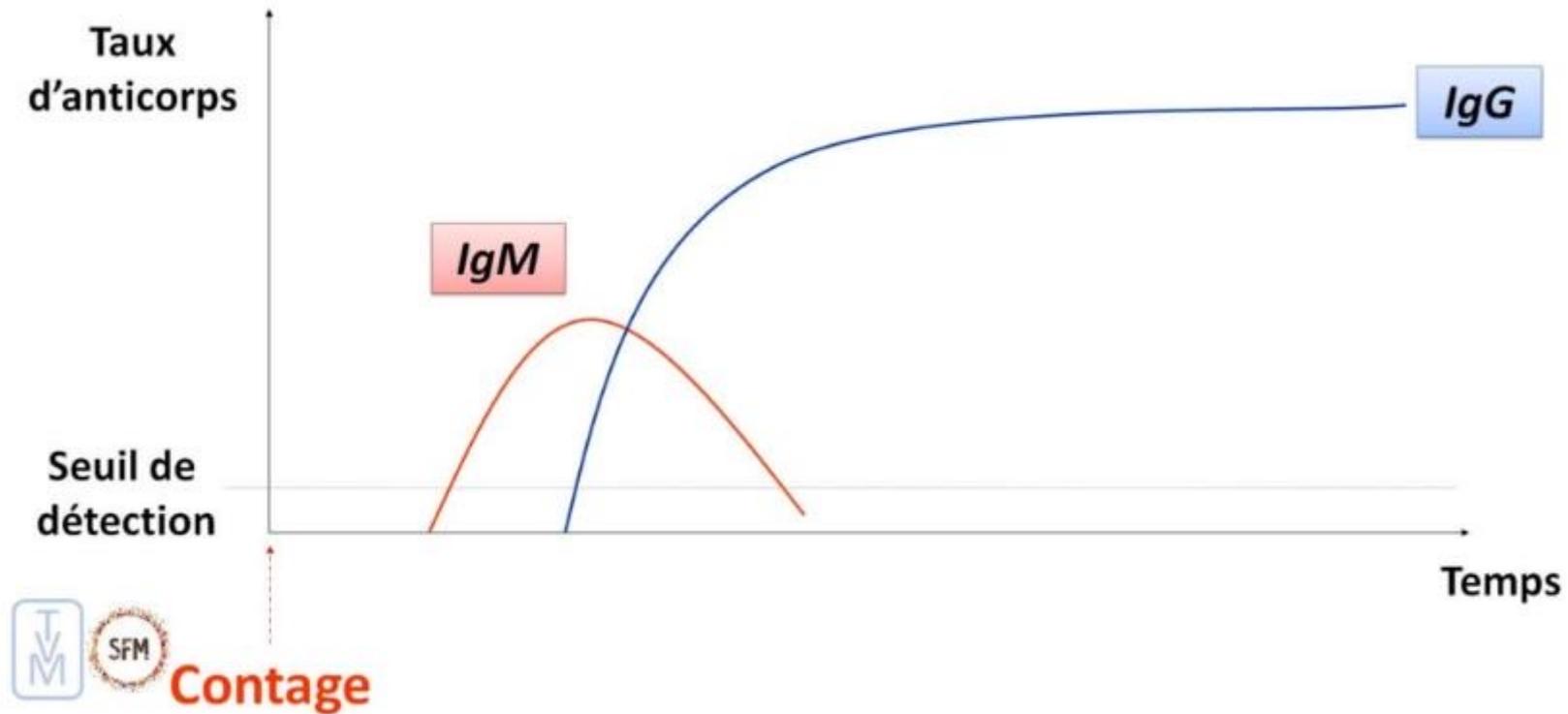
DIAGNOSTIC INDIRECT

- Anticorps = Sérologie
- Sérum ou plasma
- Autres: LCR...



DIAGNOSTIC INDIRECT

Diagnostic d'une infection en cours



DIAGNOSTIC INDIRECT

Diagnostic d'une infection en cours

- Détection d'anticorps de type IgM: Attention à la spécificité = réactions croisées; Ne signifie pas toujours primo-infection; IgM résiduelles...
- Mise en évidence d'une séroconversion IgG ou d'une séroélévation significative
 - » nécessite 2 prélèvements de sang à 15 – 21 jours d'intervalle (sérum précoce, sérum tardif)

Recherche d'une immunité

Détection des IgG

1 seul sérum

Exemples

Hépatite B

Rubéole

Rougeole

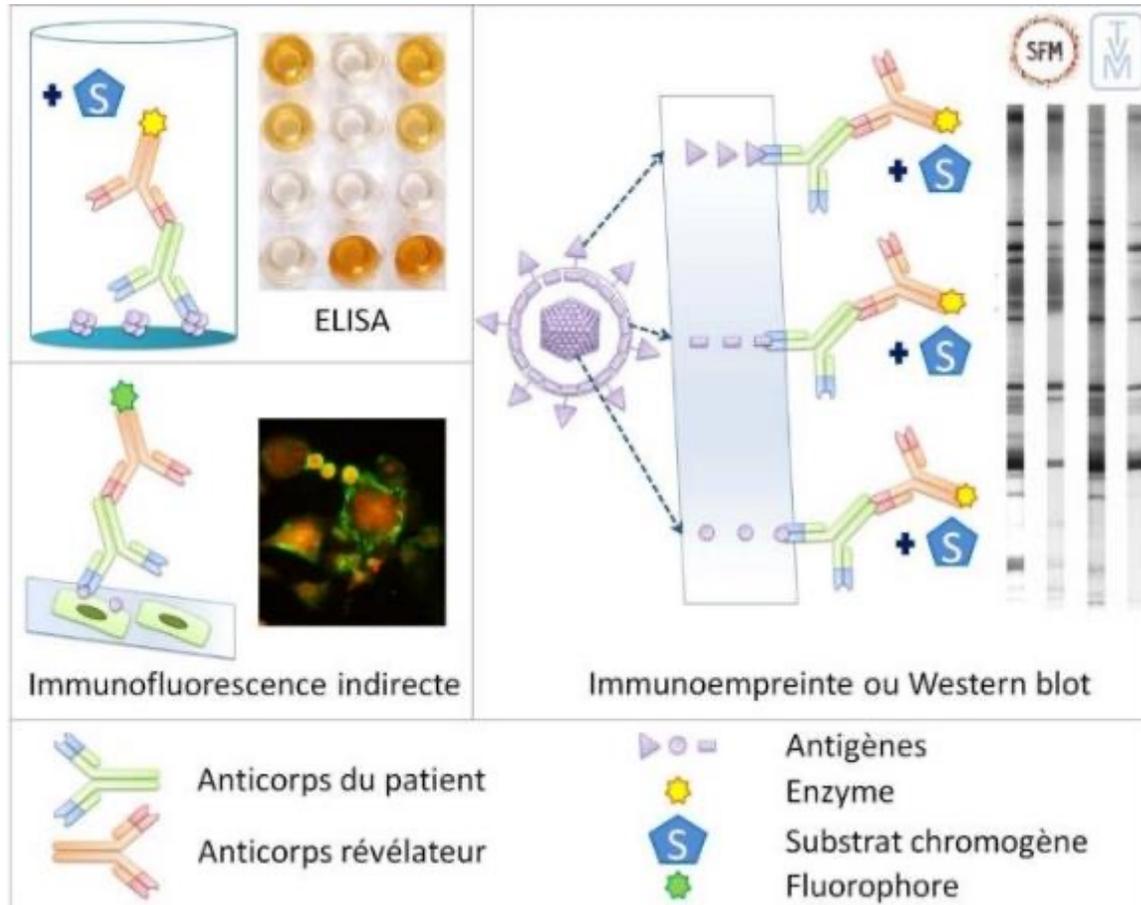
Oreillons

Poliovirus

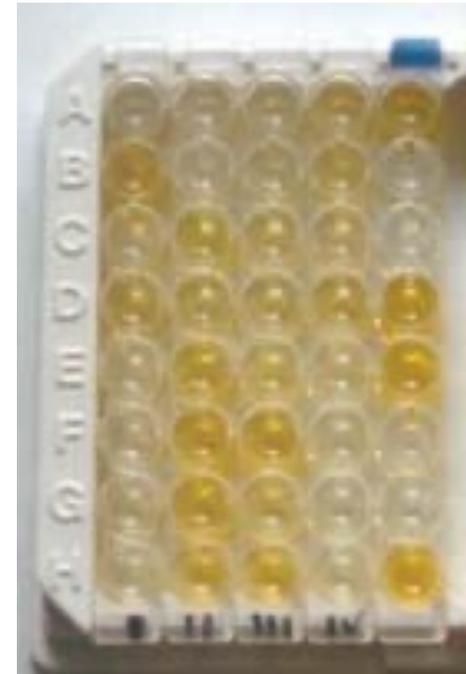
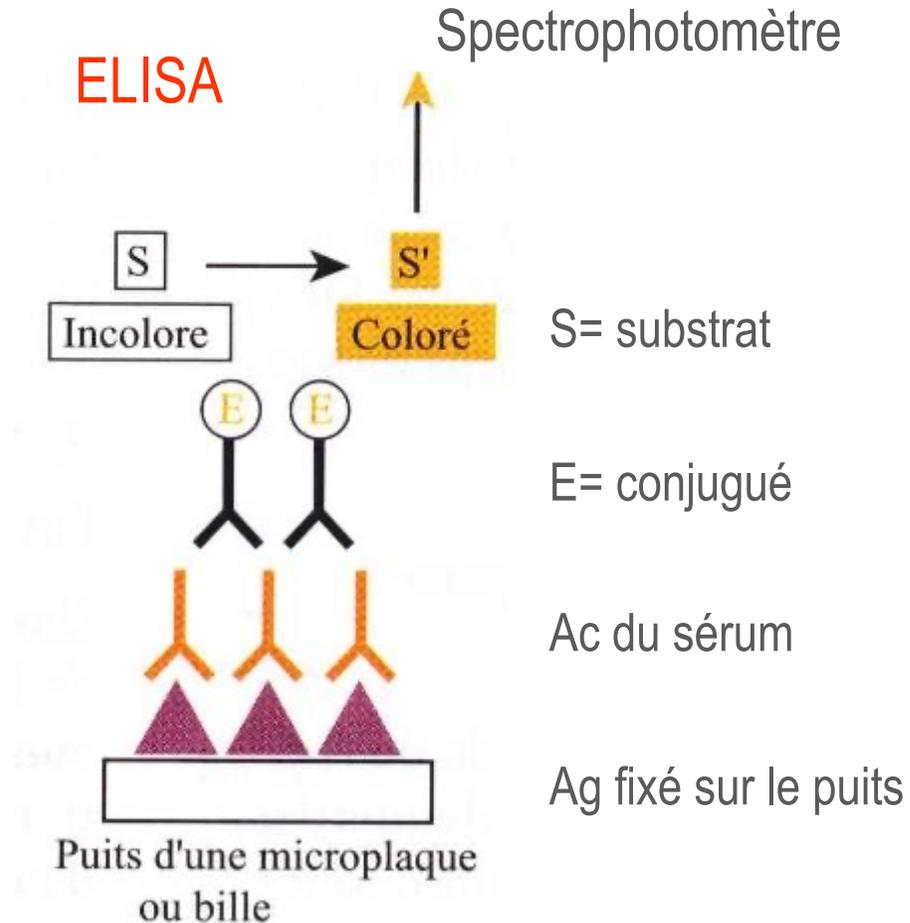
Varicelle

DIAGNOSTIC INDIRECT

Techniques



DIAGNOSTIC INDIRECT



DIAGNOSTIC INDIRECT

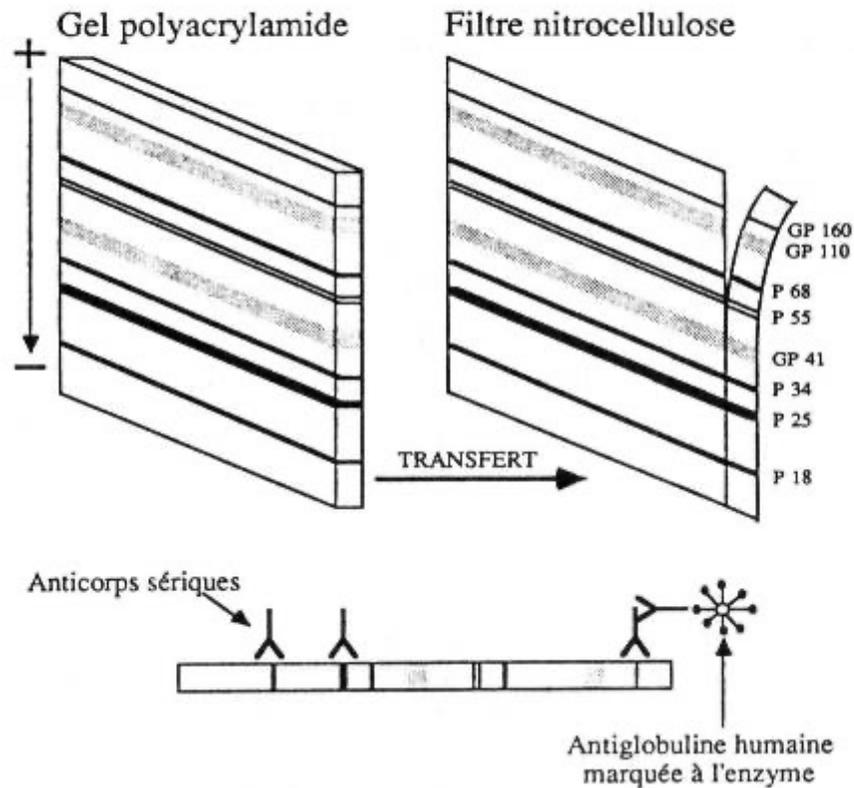
Beaucoup d'automates



DIAGNOSTIC INDIRECT

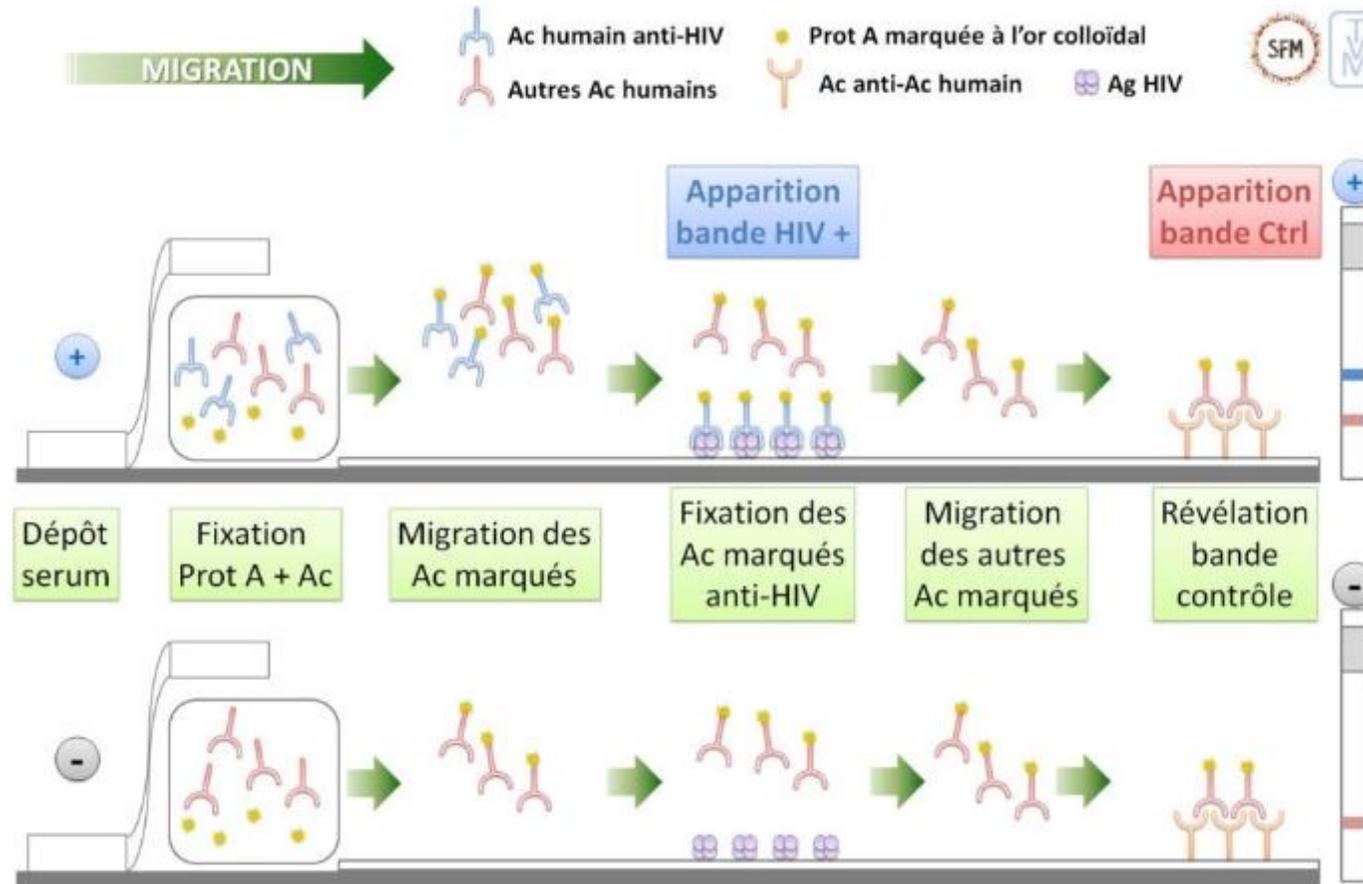
Western-blot/Immunoblot

SCHEMA DE LA METHODE DE WESTERN-BLOT



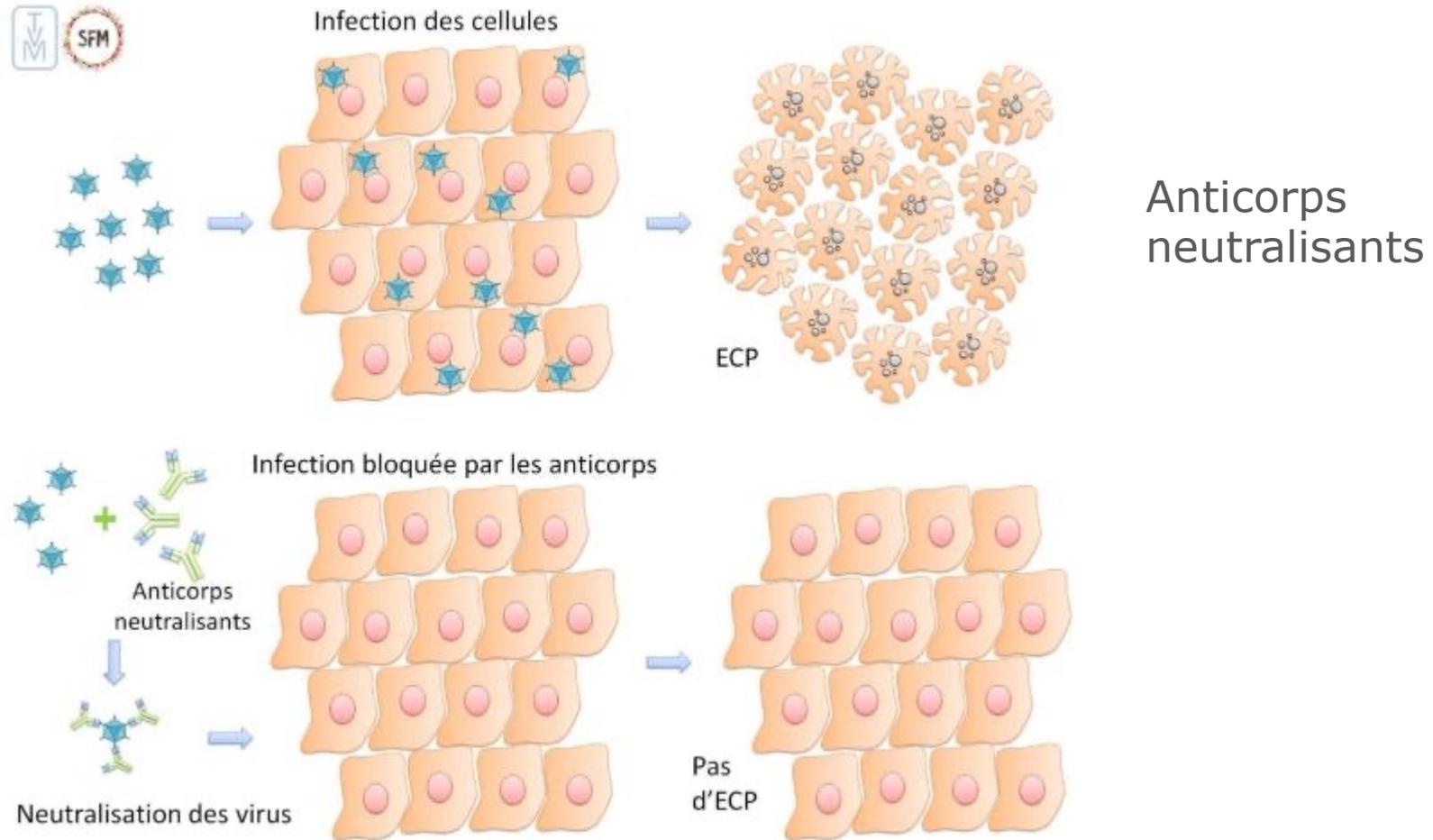
DIAGNOSTIC INDIRECT

Western-blot/Immunoblot



DIAGNOSTIC INDIRECT

Séroneutralisation



INFECTIONS RESPIRATOIRES

Pathogènes

Virus classiquement recherchés	Autres virus pouvant être incriminés
Virus influenza Virus parainfluenza humains Virus respiratoire syncytial et Métapneumovirus humain Rhinovirus, Entérovirus D-68,... Coronavirus classiques et émergents Adénovirus humains	Bocavirus humain Polyomavirus KI et WU EBV, HSV, CMV, VZV (ID) Hantavirus Virus de la rougeole

Diagnostic virologique

Diagnostic direct +++: détection d'antigènes, PCR ou RT-PCR

Diagnostic indirect: peu d'intérêt

RÉSUMÉ- GASTRO-ENTÉRITES VIRALES

Pathogènes

Virus classiquement recherchés	Autres virus pouvant être incriminés
Rotavirus Norovirus, Sapovirus Adénovirus humains Astrovirus humains	Picornavirus (genres Kobuvirus, Cosavirus et Salivirus)

Diagnostic virologique

Diagnostic direct +++: détection d'antigènes, PCR ou RT-PCR

Diagnostic indirect: Non réalisé, aucun intérêt

APPLICATION

INFECTIONS CUTANÉO- MUQUEUSES = 2 TYPES

Types d'infections cutanéomuqueuses	Lésions vésiculeuses, pustuleuses et papulo-vésiculo-pustuleuses, ulcérations.	Eruptions maculeuses ou maculopapuleuses
Pathogènes	HSV, VZV, Entérovirus, Poxvirus	Souvent: Virus de la rougeole, rubéole Parvovirus B19, HHV-6 Autres: EBV, CMV, Entérovirus HIV, Adénovirus, HBV, Arbovirus
Physiopathologie	Éruption généralisée ou localisée, multiplication virale active	Fièvres éruptives = infections généralisées; Dépôts de complexes immuns dans la paroi des vaisseaux
Diagnostic virologique	Direct++: PCR ou RT-PCR sur lésions Sérologie: peu d'intérêt	1 ^{ère} intention: Sérologie 2 ^{ème} intention: PCR ou RT-PCR

APPLICATION

Quels marqueurs sérologiques de première intention pour le diagnostic d'une hépatite aiguë?

A - Virus de l'hépatite A: IgM anti-VHA

B - Virus de l'hépatite B: Ag HBs, Ac anti-HBc (totales et IgM), Ac anti-HBs

C - Virus de l'hépatite C: Ac anti-VHC

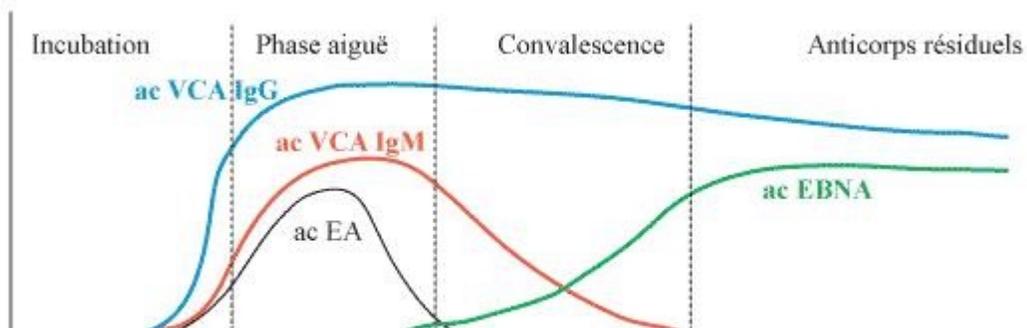
D - Virus de l'hépatite Delta: Ac de type IgM et IgG
(diagnostic seulement en cas d'infection à VHB connue)

E - Virus de l'hépatite E (VHE): Ac de type IgM et IgG

APPLICATION

Marqueurs primo-infection EBV?

Evolution des anticorps viraux dans le sérum au cours de la mononucléose infectieuse



IgM anti-VCA
 IgG anti-VCA
 IgG anti-EBNA

Interprétation	Anticorps hétérophiles	VCA IgM	VCA IgG	ENBAI IgG
Séronégatif (non infecté)	-	-	-	-
Primo-infection : MNI aiguë	+/-	+++	+/-	-
Infection ancienne	-	-	+ /+++	+ /+++

En fonction du contexte clinique, on peut ajouter une PCR EBV

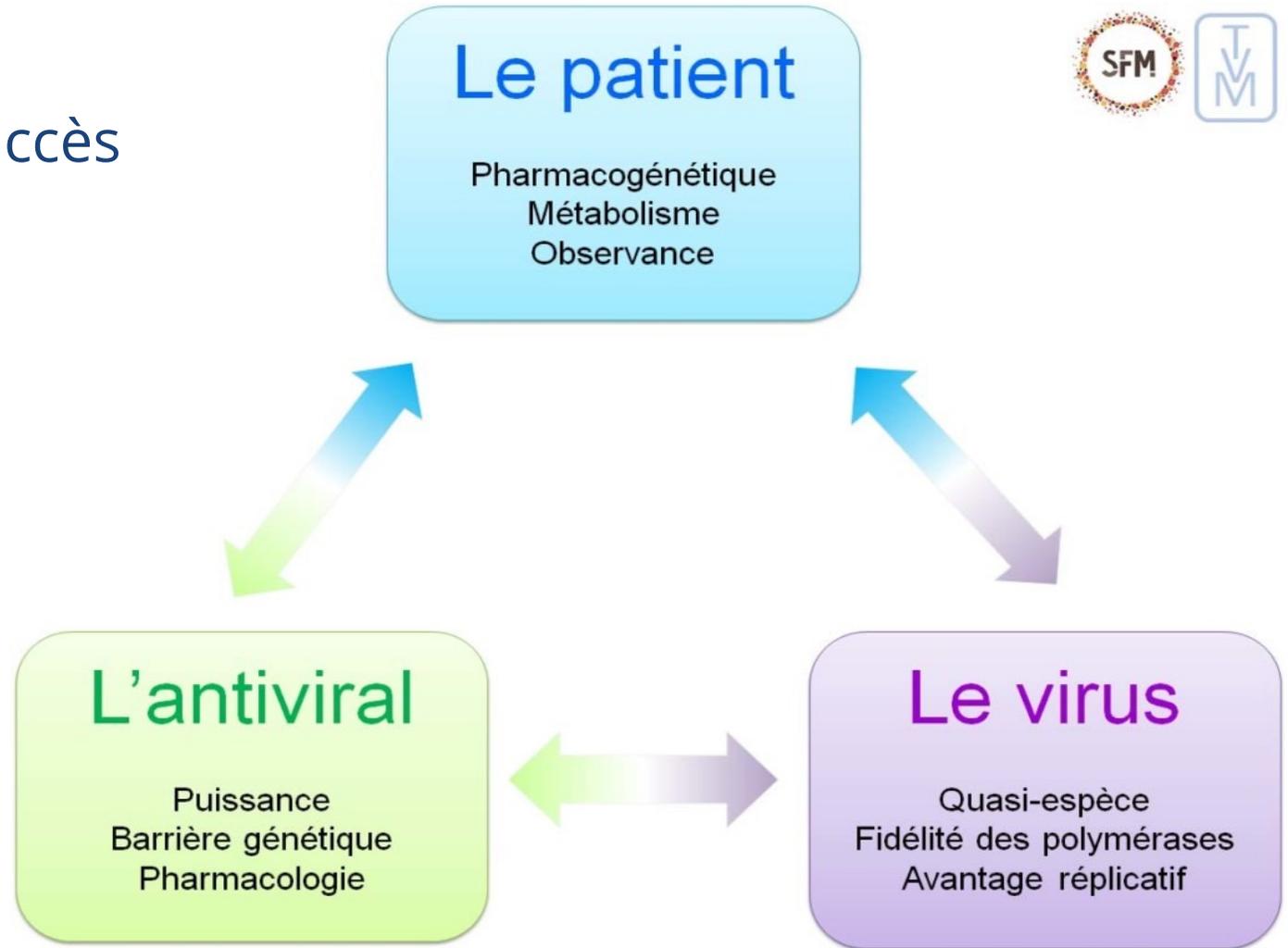
Diagnostic direct : détection du virus ou de ses composants (antigènes, génome)					
Type de prélèvement	Variable : adapté au site et à la chronologie de l'infection				
Techniques	Observation des particules virales Microscopie électronique	Isolement du virus Sur animal Sur œuf embryonné Sur cultures cellulaires	Détection des cellules infectées <i>in vivo</i> Coloration HE* Immunohistochimie* Immunofluorescence	Détection d'antigènes viraux Immuno-chromatographie ELISA Agglutination de latex	Détection et analyse du génome viral Amplification génique qualitative ou quantitative (charge virale) Séquençage Hybridation <i>in situ</i> *

Diagnostic indirect : mise en évidence de la réponse immune				
Type de prélèvement	En général sérum ou plasma pour les dosages d'Ig et de cytokines ; sang total pour la réponse cellulaire ; des dosages sur liquide, en particulier sur LCS, peuvent être plus rarement effectués			
Techniques	<p>Mise en évidence de la réponse humorale : techniques sérologiques pour la détection/quantification d'anticorps spécifiques (IgM et IgG)</p> <p>Techniques immunoenzymatiques (ELISA et dérivés) Immuno-chromatographie Immunodiffusion Immunoempreinte (Western blot) Séroneutralisation Immunofluorescence Fixation du complément Inhibition de l'hémagglutination Agglutination passive ou conditionnée</p> <p>Diagnostic d'une infection récente Présence d'IgM</p> <p>Appréciation de l'immunité sur 1 seul sérum Séroconversion entre un sérum précoce et un tardif Augmentation du titre d'anticorps entre 2 sérums</p>	<p>Mise en évidence de la réponse cellulaire</p> <p>Techniques basées sur le dosage d'IFN après stimulation des cellules cytotoxiques <i>in vitro</i> (type quantiFERON®) Tétramères</p>	<p>Dosage de cytokines</p> <p>IFN IL</p>	<p>Autres</p> <p>Détection de miRNA</p>  

**... Et un mot sur les résistances HSV et
CMV**

La résistance aux antiviraux — Les facteurs impliqués dans le succès

Facteurs impliqués dans le succès thérapeutique



La résistance aux antiviraux – Mécanismes

Notion de variabilité et d'évolution virale

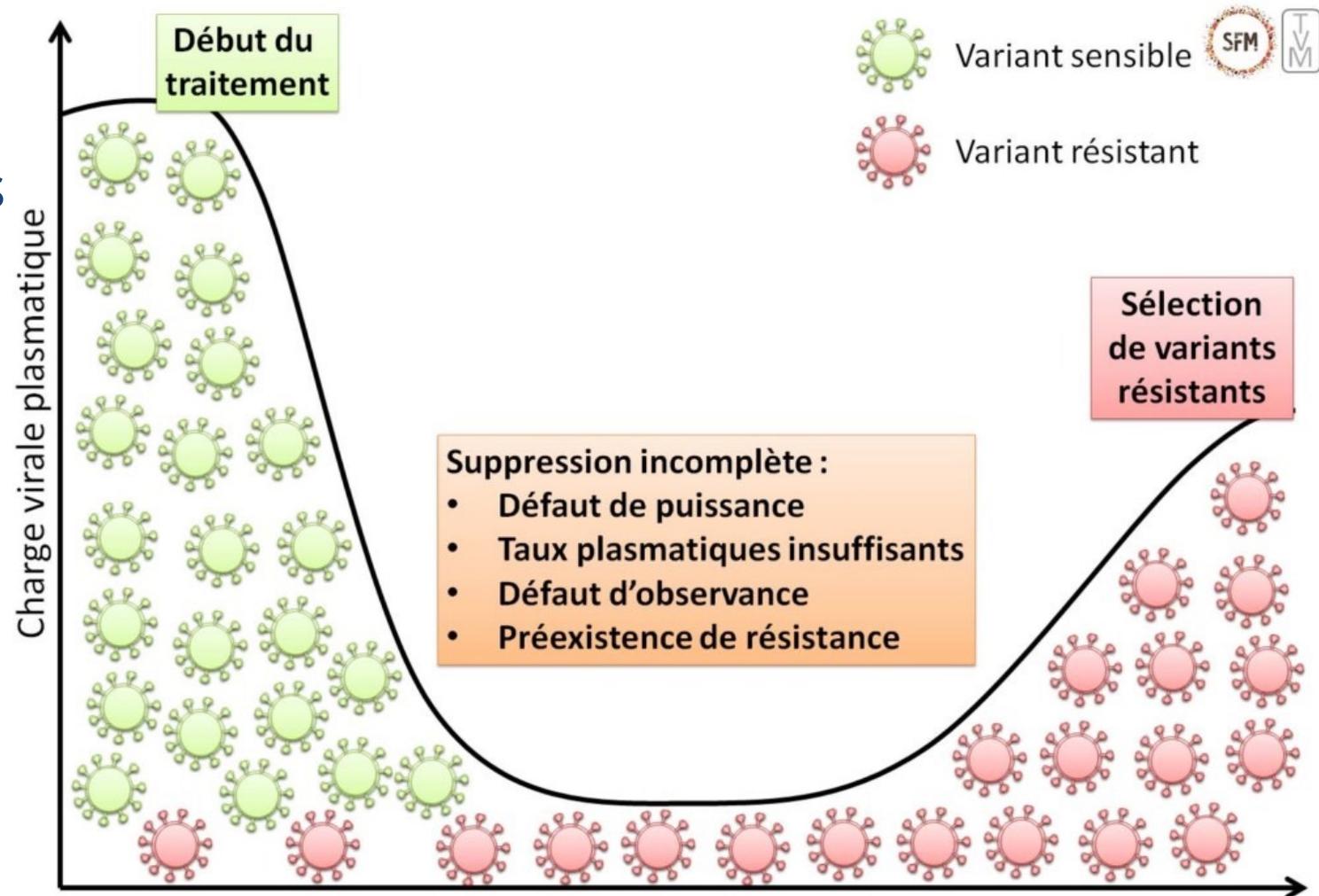
- Mutations +++
- Insertions/délétions
- Recombinaisons/réassortiments

	Taux de mutation	Taux de recombinaison
HCV (9.7 kb)	1.2×10^{-4}	Recombination rare
IAV (13.5 kb)	$2 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-4}$	homologous recombination debated ^g
HSV (152 kb)	1.8×10^{-8}	2.5×10^{-5h}
HCMV (236 kb)	2×10^{-7}	9.8×10^{-7f}
HIV (9.8 kb)	$1.1 \times 10^{-5} - 3.4 \times 10^{-5}$	1×10^{-5i}
HBV (3.3 kb)	$1.4 \times 10^{-5} - 3.2 \times 10^{-5}$	2.19×10^{-2f}

Irwin KK et al., Virus Evolution 2016

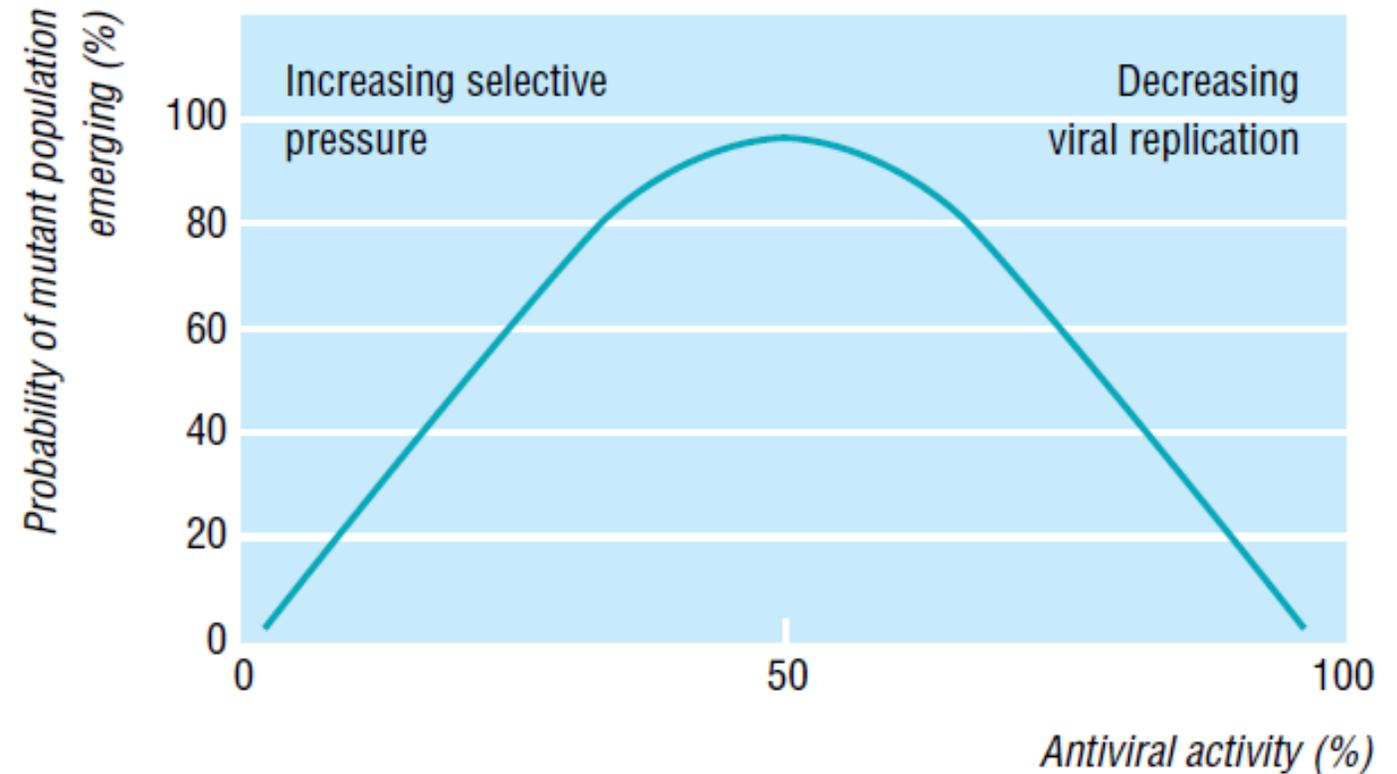
La résistance aux antiviraux – Mécanismes

Sélection des variants résistants



La résistance aux antiviraux – Mécanismes

Sélection des variants résistants



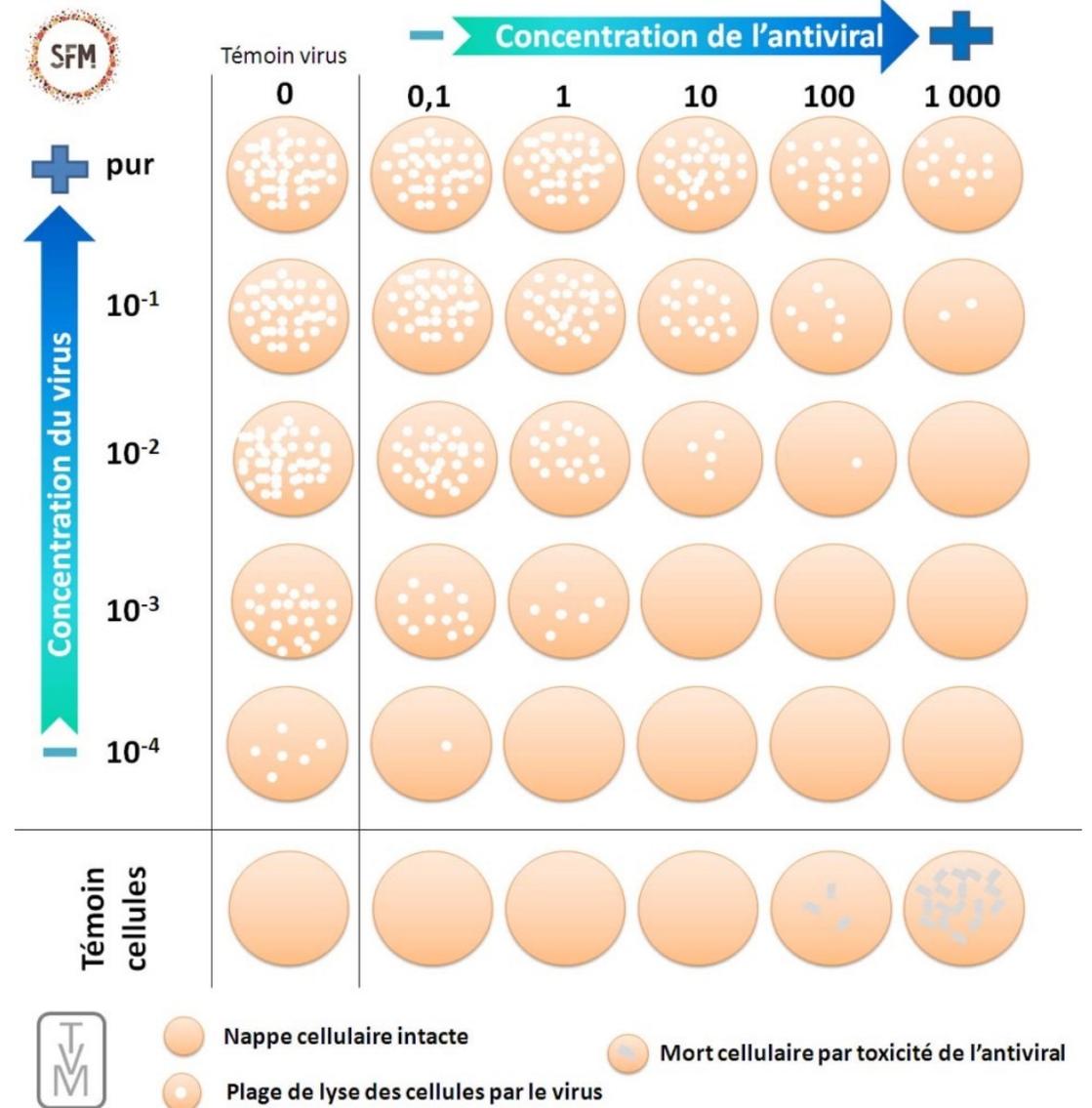
Relation between antiviral drug activity and emergence of resistance³

Pillay and Zambon, BMJ 1998

La résistance aux antiviraux — Méthodes d'évaluation

Méthodes
phénotypiques

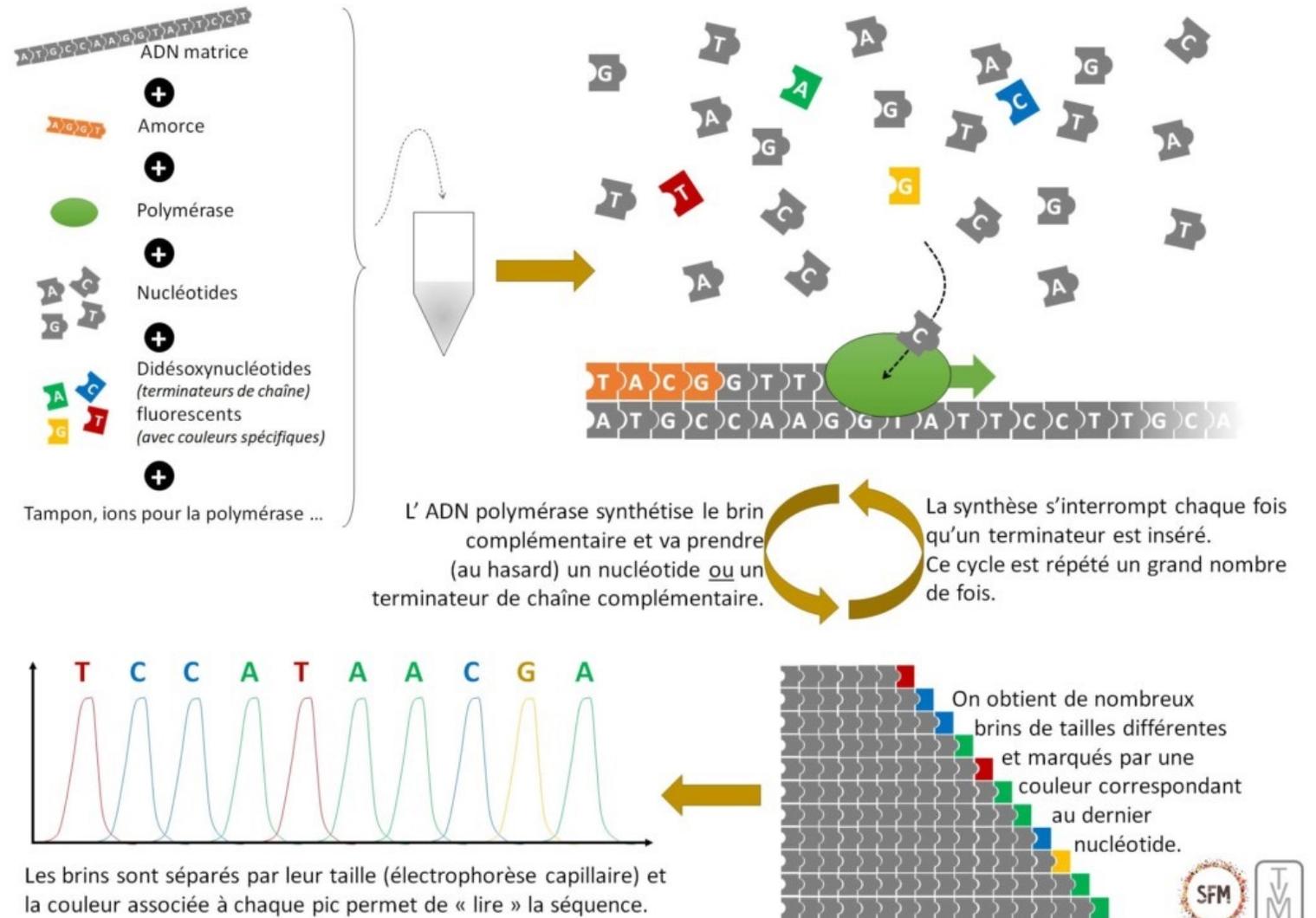
Peu utilisées en routine...



La résistance aux antiviraux – Méthodes d'évaluation

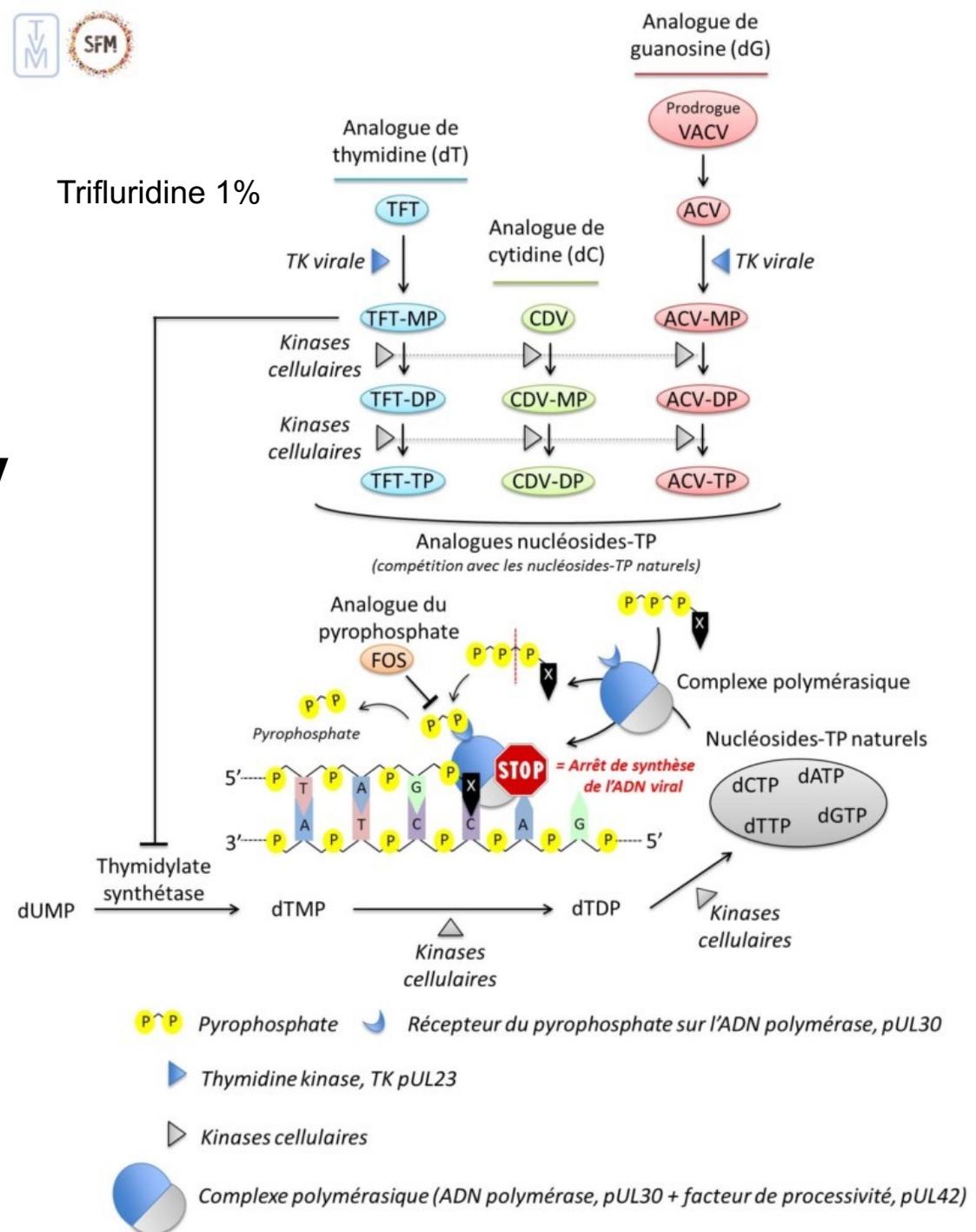
Méthodes génotypiques

= Séquençage génome viral +++



La résistance aux antiviraux – HSV

Antiviraux actifs sur le HSV et mécanismes d'action



La résistance aux antiviraux – HSV

Quand suspecter une résistance ?

Lésions herpétiques persistantes et/ou une absence de régression de la charge virale alors qu'un traitement antiviral est correctement suivi depuis au moins 10j: résistance clinique évoquée

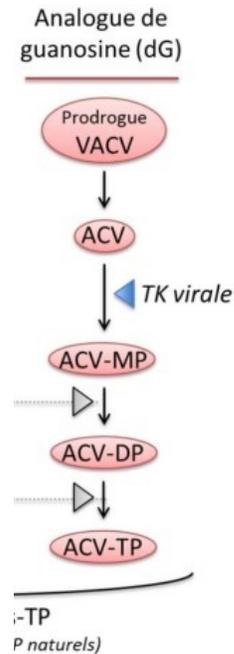
Quelle prévalence?

- Immunocompétents: Prévalence résistance ACV <1% sauf patients kératites herpétiques récurrentes (7%)
- Immunodéprimés: entre 2,5 et 11%

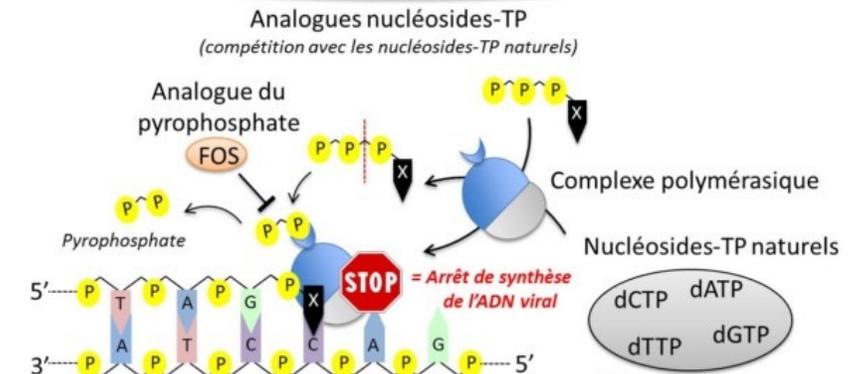
La résistance aux antiviraux – HSV

Quels mécanismes?

95% des cas – mutations sur le gène TK → résistance ACV

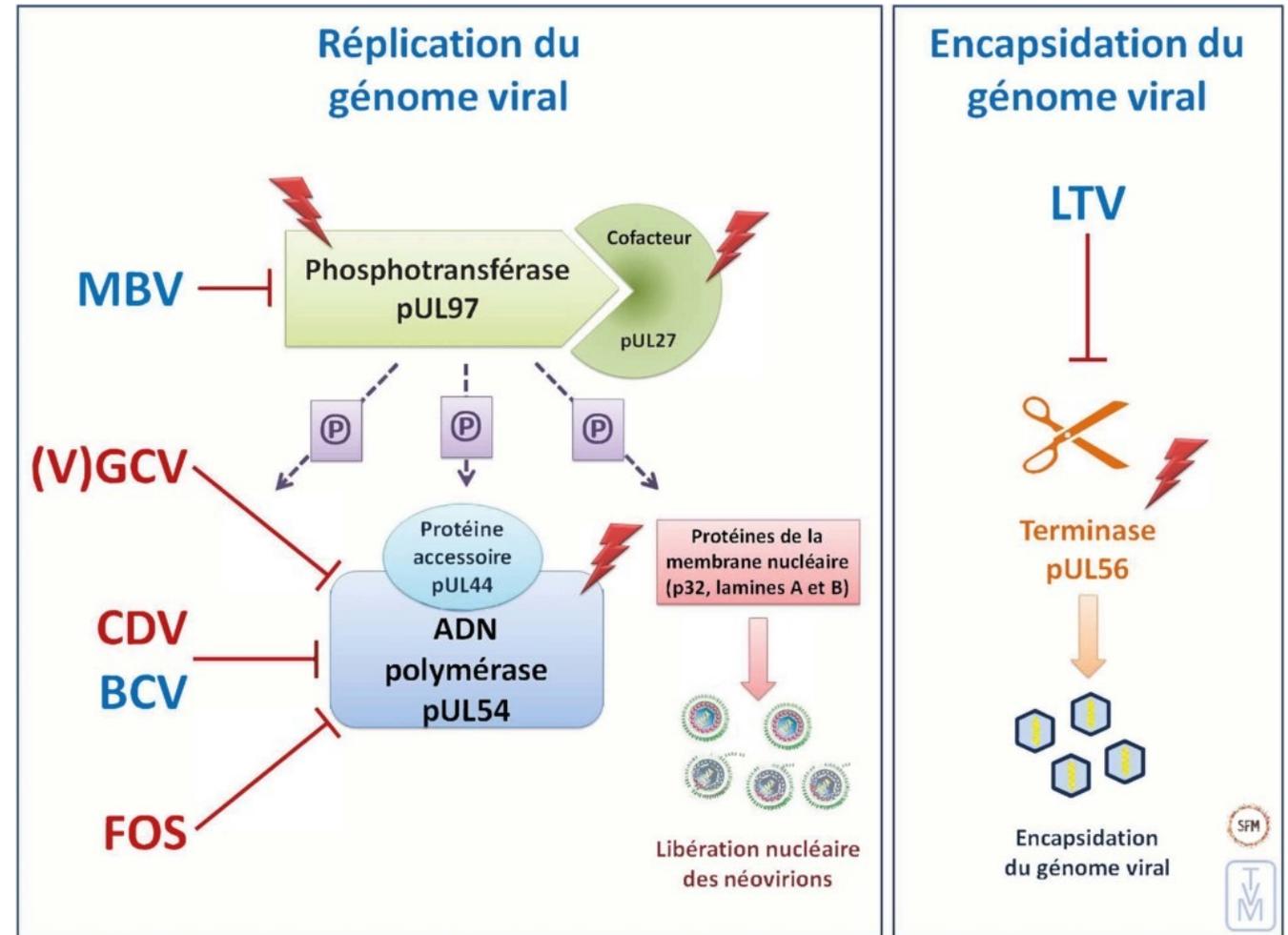


5% des cas – mutations ADN pol → résistance ACV, FOS, CDV



La résistance aux antiviraux – CMV

Antiviraux actifs sur le CMV et mécanismes d'action



La résistance aux antiviraux – CMV

Quand suspecter une résistance ?

Efficacité → Clinique et charge virale

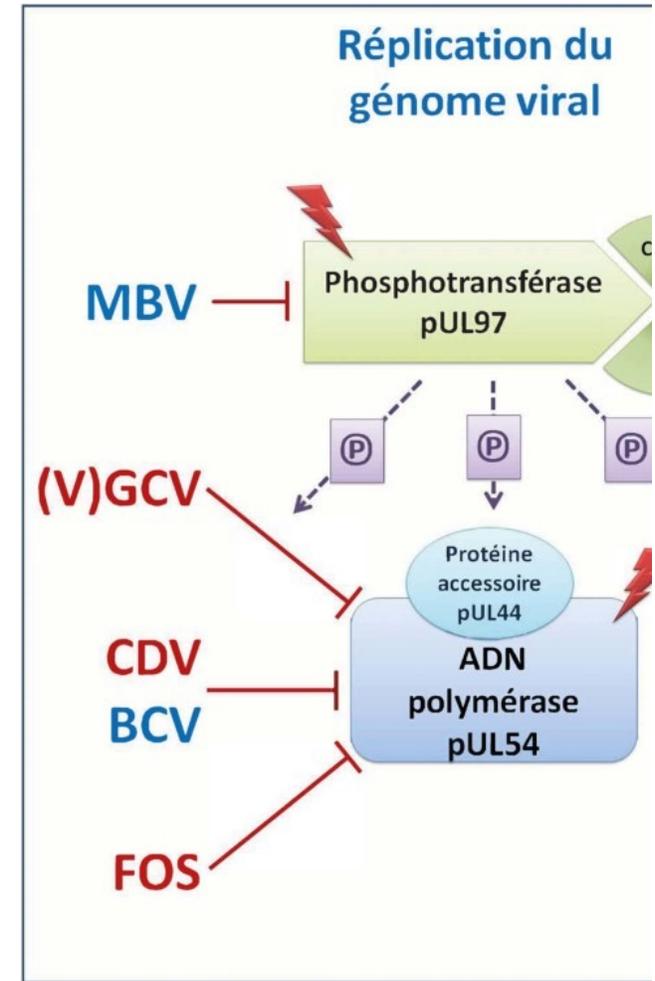
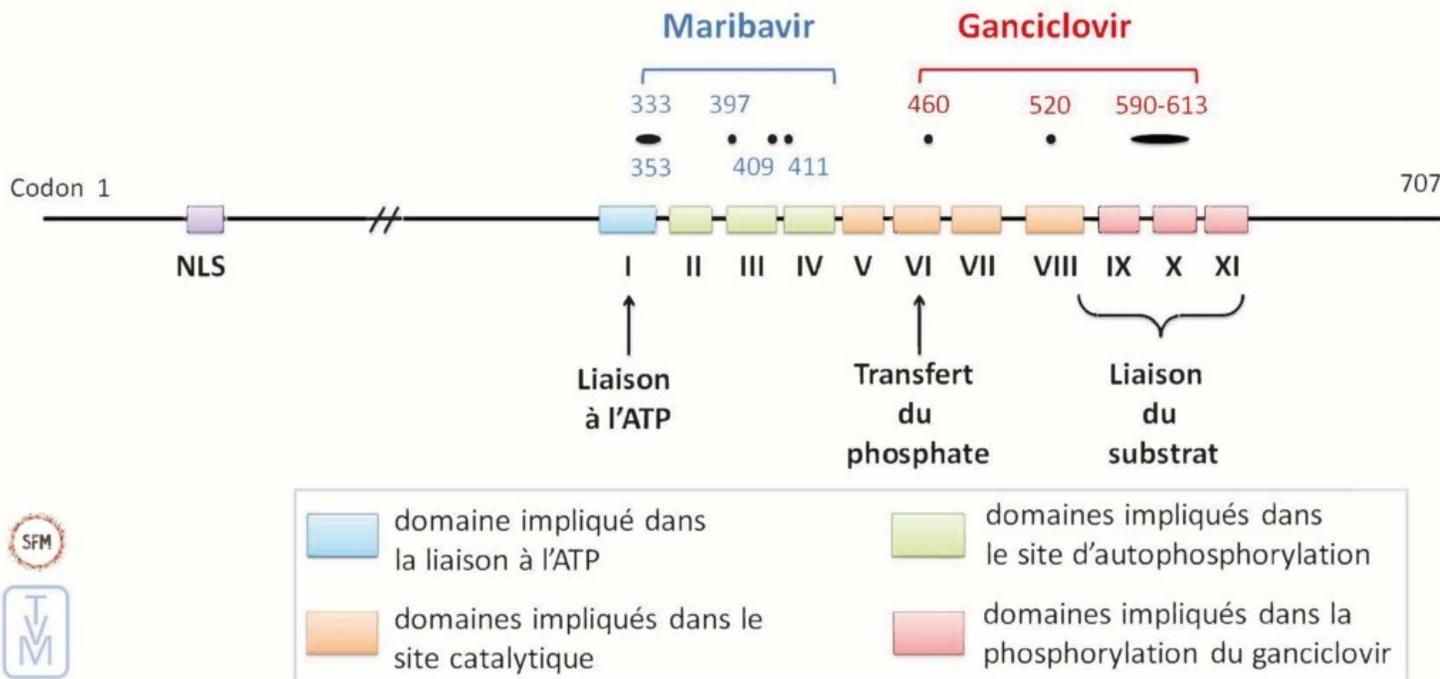
- Absence de réponse clinique
- Persistance de la multiplication pendant plus de 3 semaines
- Augmentation de la CV ou diminution insuffisante de la CV ($< 0,5$ log/semaine)

Quelle prévalence?

Patients allogreffés: 10-15% de non réponse clinique au GCV et résistance virologique dans 50% des cas environ

La résistance aux antiviraux – CMV

Quels mécanismes?



GCV: mutations pUL97

Merci

enagnon-kazali.alidjinou@univ-lille.fr

