

Diagnostic virologique des infections à

Herpes simplex virus

Virus de la varicelle et du zona

Prof Ag Héla KARRAY-HAKIM

Laboratoire Microbiologie

CHU Habib Bourguiba de Sfax

Herpes simplex virus

Indications du diagnostic virologique

Herpès orofacial chez l'enfant et l'adulte sain



diagnostic virologique NON justifié

Lésions suffisamment évocatrices
Récurrences bénignes

Indications du diagnostic virologique

Ulcérations chez l'enfant → diagnostic différentiel avec *Coxsackievirus*

Formes invalidantes → traitement antiviral

Formes graves

Formes oculaires: Kératoconjonctivite, rétinite nécrosante, uvéite

Encéphalite

Herpès de l'immunodéprimé

ulcérations nécrotiques

lésions atypiques

Herpes génital: lésions, excrétion asymptomatique

Herpès néonatal



Herpès étendu chez un patient porteur d'une leucémie à tricholeucocytes



Prélèvements virologiques

Selon situation clinique

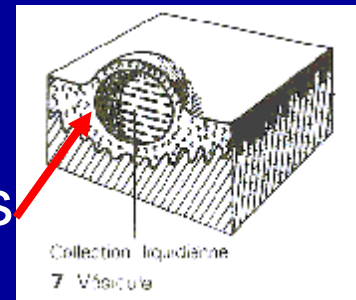
Le diagnostic de l'infection à HSV au laboratoire

	Prélèvement	Technique de détection directe du virus				
		Isolement en culture de cellules	PCR	Immuno-cytophysiologie	ELISA	Microscopie électronique
Herpès oral ou génital	Lésions	++	+	+	+	+
Kératoconjonctivite	Lésions	++	+	+	+	+
Uvéite, iridocyclite, nécrose rétinienne aiguë	Humeur aqueuse	+	++	0	0	0
Encéphalite aiguë postnatale	LCR	±	++	0	+	0
Herpès néonatal	Lésions	++	+	+	+	+
	Sécrétions pharyngées	++	+	0	0	0
	Larmes	++	++	0	0	0
	LCR	++	++	0	+	0
	Sang	+	+	0	0	0
	Urines	+	+	0	0	0
Excrétion asymptomatique	Salive	++	+	0	0	0
	Sécrétions génitales	++	+	0	0	0
Herpès cutanéomuqueux progressif	Lésions	++	+	+	+	+
Eczéma herpétisé	Lésions	++	+	+	+	+
Hépatite herpétique	Sang	++	+	0	0	0
	Urines	++	+	0	0	0
	Salive	++	+	0	0	0
	Sécrétions génitales	++	+	0	0	0

Prélèvements virologiques

Lésions vésiculeuses cutanéomuqueuses

- ❖ Prélèvement le plus **précoce** possible
- ❖ Choisir des lésions **fraîches** (avant stade de croûtes)
- ❖ Avant tout traitement local
- Ecouvillonnage appuyé sur les bords des lésions
(devant faire un peu mal)
- ou Ponction à la seringue du liquide de vésicule
- ❖ **Milieu de transport** → culture cellulaire, PCR, ELISA, Microscopie électronique



Prélèvements virologiques

Sécrétions génitales

Avant toute application de désinfectant

- ❖ 1^{er} écouvillon → passer sur face interne et externe des petites lèvres
- ❖ 2^{ème} écouvillon → éliminer le mucus du canal cervical et jeter l'écouvillon
- ❖ 3^{ème} écouvillon → introduire dans le canal cervical sur 1cm et le faire tourner
- ❖ 4^{ème} écouvillon → passer sur la surface externe du col utérin

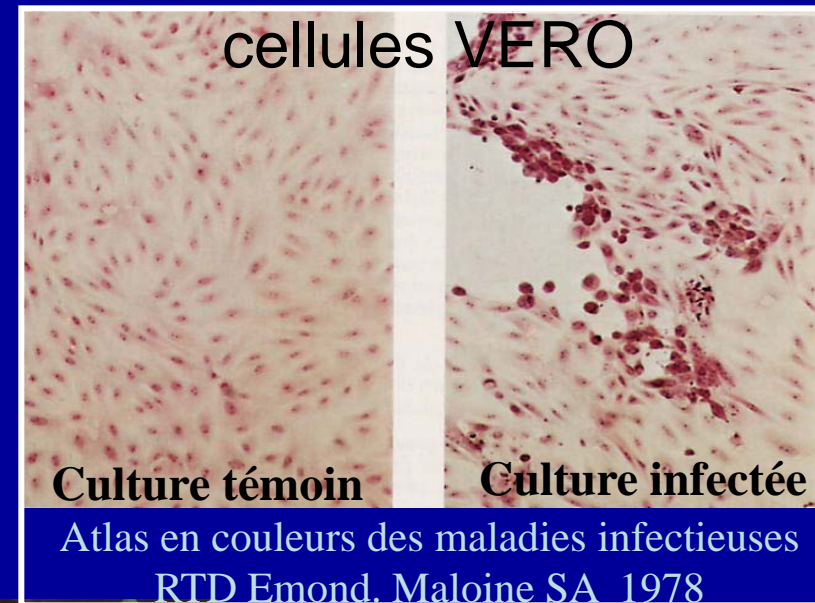
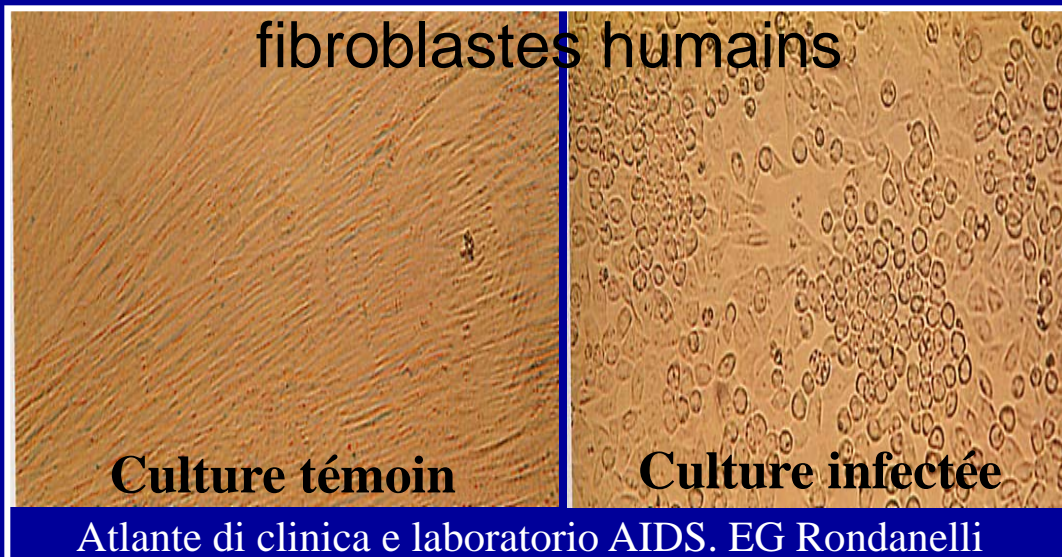
Exprimer les 1^{er}, 3^{ème} et 4^{ème} écouvillons dans un même tube de milieu de transport

Techniques de diagnostic

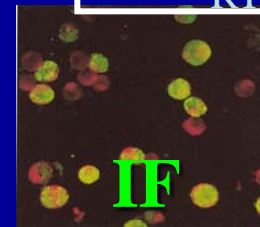
1- Culture cellulaire Tous types de prélèvements

Technique de référence car ECP en 1 à 2 jours si lésions fraîches

Inoculation sur Cellules VERO, fibroblastes humains, KB



ECP très évocateur
Cellules rondes en foyer
(grappe de raisin)



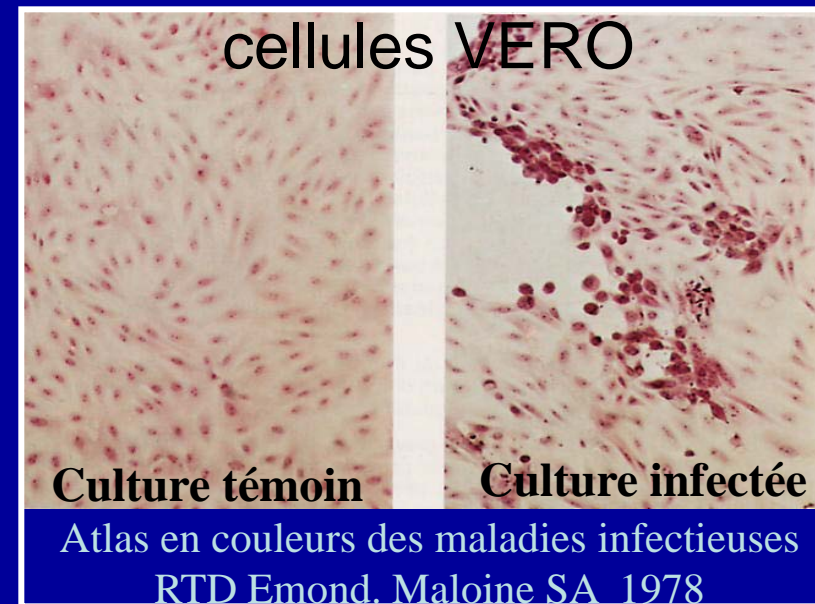
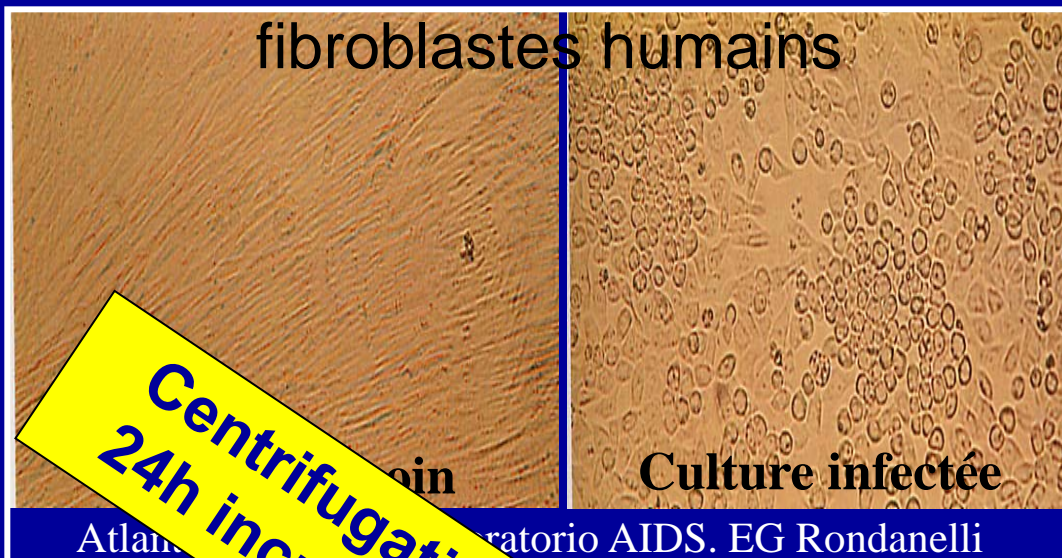
Immunoperoxydase

Typage HSV 1 ou 2

Techniques de diagnostic

1- Culture cellulaire Tous types de prélèvements

Technique de référence car ECP en 1 à 2 jours si lésions fraîches
Inoculation sur Cellules VERO, fibroblastes humains, KB



Si Excrétion asymptomatique salivaire ou génitale ⇒ ECP en 4 à 5 jours

Détection des
antigènes précoces ou très précoces par
immunomarquage des cellules inoculées

Techniques de diagnostic

1- Culture cellulaire

Avantages de la culture

- ➡ Culture + \Rightarrow **Virions infectieux**
- ➡ Détermination de CI50 des antiviraux en cas de résistance au traitement

Techniques de diagnostic

2- Détection de l'ADN viral par PCR

Sensibilité +++ > culture

ATTENTION

Risque de **faux positifs** liés à une contamination externe par :

- Amplicons
 - Particules virales excrétées par le manipulateur / préleveur
- ⇒ Si PCR (+) alors que contexte clinique n'est pas en faveur (exemple d'une MEH), refaire PCR sur un 2^{ème} prélèvement

PCR (+) ne signifie pas que le prélèvement contient du virus infectieux

Techniques de diagnostic

2- Détection de l'ADN viral par PCR

Intérêt +++ pour le **diagnostic** « d'urgence » de la méningoencéphalite à partir du **LCR**

PCR + dans > 90% des cas

● Importance du moment du prélèvement par rapport au début des signes cliniques: PCR peut être négative dans les 48 premières heures



si PCR (-), doit être répétée sur un deuxième prélèvement

Importance de la PCR pour le **suivi** des malades sous traitement antiviral

Techniques de diagnostic

2- Détection de l'ADN viral par PCR

LCR +++

Humeur aqueuse

Si immunodéprimés  Lésions atypiques, LBA, Sang

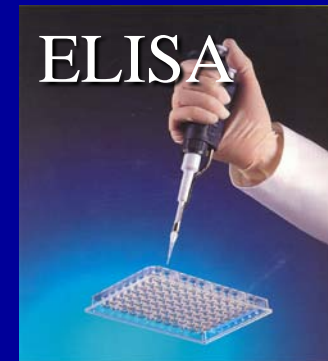
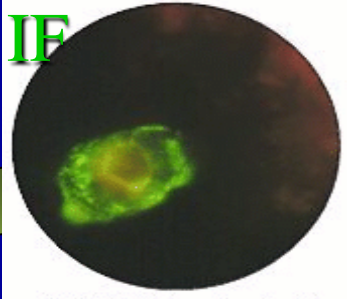
Si herpès néonatal  LCR, Sang

Techniques de diagnostic

3- Immunocytodiagnostic

Prélèvements cellulaires
Vésicules, Conjonctival, LBA..

Prélèvements liquidiens
Liq. Vésiculaire, LCR



Source: Virology Laboratory
(Yale-New Haven Hospital)

Fluorescence

nucléaire au stade précoce de l'infection

diffuse dans toute la cellule à un stade plus tardif

Bonne spécificité de l'IF

Mais sensibilité meilleure lorsque les vésicules prélevées sont jeunes
et nombre de cellules suffisant

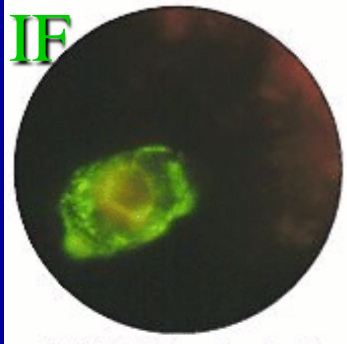
Cellules intactes ⇒ **PAS de congélation** du prélèvement

Techniques de diagnostic

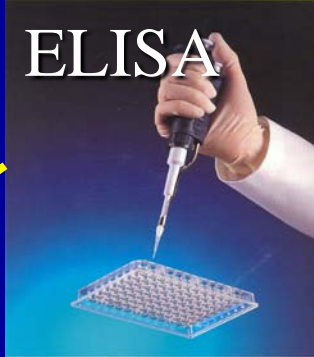
3- Immunocytodiagnostic

Prélèvements cellulaires
Vésicules, Conjonctival, LBA..

Prélèvements liquidiens
Liq. Vésiculaire, LCR



IP



Source: Virology Laboratory
Yale-New Haven Hospital)

Non pour recherche d'une
excrétion asymptomatique
orale ou génitale

Techniques de diagnostic

4- Microscopie électronique

Liquide de vésicule

Diagnostic rapide

Sans distinction entre
HSV et VZV

Techniques de diagnostic

5- Sérologie

Ac anti-HSV 1+2

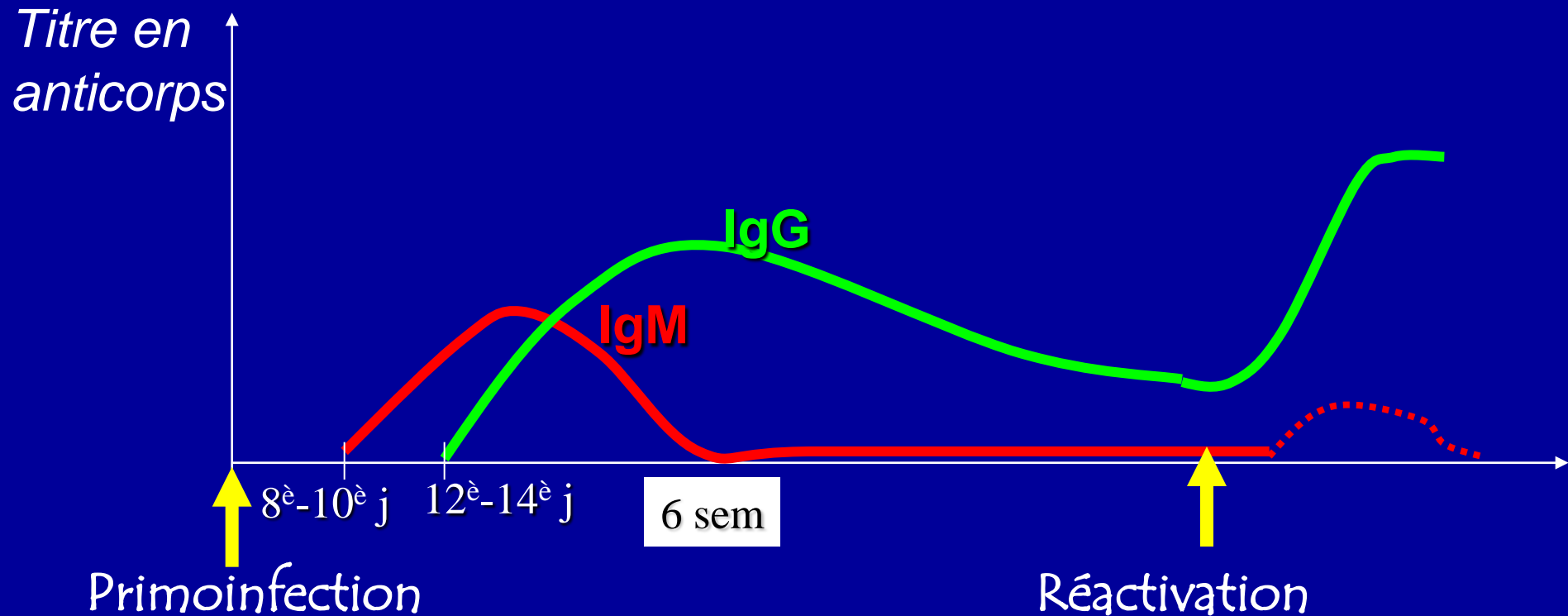
Ac anti-HSV 2

Techniques de diagnostic

5- Sérologie

Ac anti-HSV 1+2

Intérêt limité

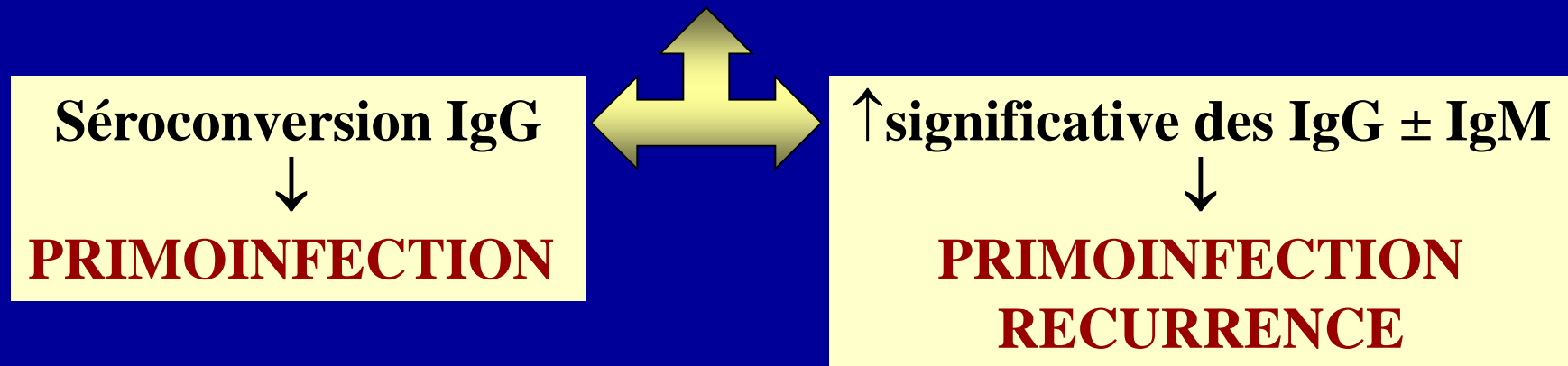


Techniques de diagnostic

5- Sérologie

Ac anti-HSV 1+2

- Une sérologie négative précoce ne doit pas éliminer le diagnostic
- Vu que **IgM inconstantes** au cours de la primo-infection **peuvent réapparaître** au cours de la récurrence



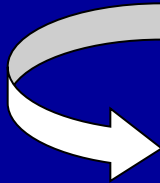
Or, Important de faire la différence dans l'Herpès génital pour apprécier le risque d'herpès néonatal

Techniques de diagnostic

5- Sérologie

Ac anti-HSV 1+2

Sécrétion **intrathécale** d'anticorps anti-HSV → Méningoencéphalite



IgG sérum / IgG LCR ≤ 20

MAIS
Diagnostic tardif

Ac détectés dans le LCR à partir
de la 2^{ème} semaine de la maladie

Techniques de diagnostic

5- Sérologie

Ac anti-HSV 1+2

Sensibilité	1 ^{ère} semaine d'évolution	2 ^{ème} semaine d'évolution	3 ^{ème} semaine d'évolution
PCR	95-100%	47-50%	0-21%
Sécrétion intrathécale d'Ac	16-23%	63-80%%	90-100%

Mise en évidence d'une sécrétion intrathécale intéressante

- Si PCR n'a pu être faite
- Si PCR négative car LCR tardif fait sous traitement antiviral

Techniques de diagnostic

5- Sérologie

Ac anti-HSV 1+2

Sécrétion **intraoculaire** d'anticorps anti-HSV → uvéite
rétinite nécrosante

MAIS
Diagnostic tardif

Ac détectés dans l'humeur aqueuse tardifs

Techniques de diagnostic

5- Sérologie

Ac anti-HSV 1+2

Ac anti-HSV 2

Apparaissent entre 6 et 8 semaines

Ac anti-gG de HSV2

Herpès génital ± grossesse

Démarche diagnostique

Selon situation clinique

Le diagnostic de l'infection à HSV au laboratoire

	Prélèvement	Technique de détection directe du virus				
		Isolement en culture de cellules	PCR	Immuno-cytophysiologie	ELISA	Microscopie électronique
Herpès oral ou génital	Lésions	++	+	+	+	+
Kératoconjonctivite	Lésions	++	+	+	+	+
Uvéite, iridocyclite, nécrose rétinienne aiguë	Humeur aqueuse	+	++	0	0	0
Encéphalite aiguë postnatale	LCR	±	++	0	+	0
Herpès néonatal	Lésions	++	+	+	+	+
	Sécrétions pharyngées	++	+	0	0	0
	Larmes	++	++	0	0	0
	LCR	++	++	0	+	0
	Sang	+	+	0	0	0
	Urines	+	+	0	0	0
Excrétion asymptomatique	Salive	++	+	0	0	0
	Sécrétions génitales	++	+	0	0	0
Herpès cutanéomuqueux progressif	Lésions	++	+	+	+	+
Eczéma herpétisé	Lésions	++	+	+	+	+
Hépatite herpétique	Sang	++	+	0	0	0
	Urines	++	+	0	0	0
	Salive	++	+	0	0	0
	Sécrétions génitales	++	+	0	0	0

Virus de la Varicelle et du Zona

Indications du diagnostic virologique



Lésions suffisamment évocatrices ⇒
Diagnostic uniquement clinique

Indications du diagnostic virologique

- Formes graves de varicelle (adulte, femme enceinte)
- Clinique atypique ou non concluante surtout dans l'entourage d'un immunodéprimé
- Détermination du statut immunitaire (IgG)
 - avant traitement immunosuppresseur
 - Chez adulte ou femme enceinte sans ATCD connus de varicelle et exposés à un contage



afin de prévenir une varicelle grave si IgG -

Prélèvements virologiques

Lésions vésiculeuses +++



- ❖ Choisir des lésions **fraîches** (avant stade de croûtes)
- ❖ Avant tout traitement local
 - Ecouvillonnage appuyé sur les bords des lésions (devant faire un peu mal)
 - ou Ponction à la seringue du liquide de vésicule
 - voire biopsie après retrait de la croûte
- ❖ **Milieu de transport** → culture cellulaire, PCR, ELISA, Microscopie électronique

Inoculation au lit du malade
Virus fragile, culture difficile



Flacon bijou

Prélèvements virologiques

Lésions vésiculeuses +++

Autres prélèvements

Pharynx: les 3 premiers jours de la varicelle

LCR

Sang : chez l'immunodéprimé

Liquide amniotique : si varicelle maternelle

Prélèvements oculaires

Techniques de diagnostic

1- Culture cellulaire

Inoculation sur fibroblastes humains, Cellules VERO, KB

Cellules irrégulières toujours disposées en foyer sous forme de plage granuleuse

Idem mais cellules plus arrondies

Culture lente, difficile
Délai de \approx 3 à 7 jours voire 12 j
Si titre viral faible
↓ infectiosité lors transport

Détection des Ag précoces du VZV dans les cellules en culture 48 h après l'inoculation par Immunoperoxydase

Techniques de diagnostic

2- Immunocytodiagnostic

Immunofluorescence
ou
Immunoperoxydase

Diagnostic rapide simple spécifique

Nécessitent un prélèvement riche en cellules intactes
donc non congelées

Techniques de diagnostic

3- Détection de l'ADN viral par PCR

Diagnostic

Des formes compliquées : neurologiques, oculaires, viscérales

Des formes atypiques cutanéomuqueuses

Prélèvement rapidement transmis
ou stocké à -20°C (à défaut à $+4^{\circ}\text{C}$)

Techniques de diagnostic

4- Microscopie électronique

Liquide de vésicule

Diagnostic rapide

Sans distinction entre
HSV et VZV

Techniques de diagnostic

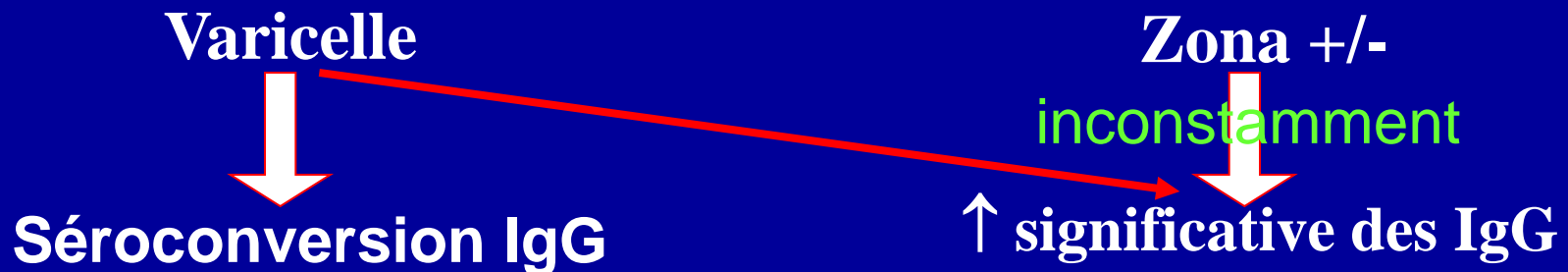
5- Sérologie ELISA +++

➔ Diagnostic : intérêt de la sérologie \pm

IgG

- Une sérologie négative n'élimine pas le diagnostic car Ac apparaissent 3 à 5j après début de la varicelle
- Un seul titre d'IgG+ n'a pas de valeur car forte séroprévalence du VZV

Nécessité de 2 sérums \Rightarrow diagnostic retardé



IgM

- Faux + devant des titres élevés en IgG
- Peuvent réapparaître au cours des réactivations

Techniques de diagnostic

5- Sérologie ELISA +++

➡ Diagnostic : intérêt de la sérologie \pm

➡ Statut immunitaire +++

Démarche diagnostique

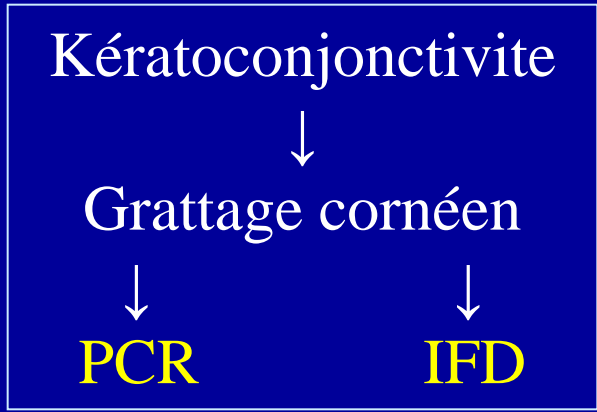
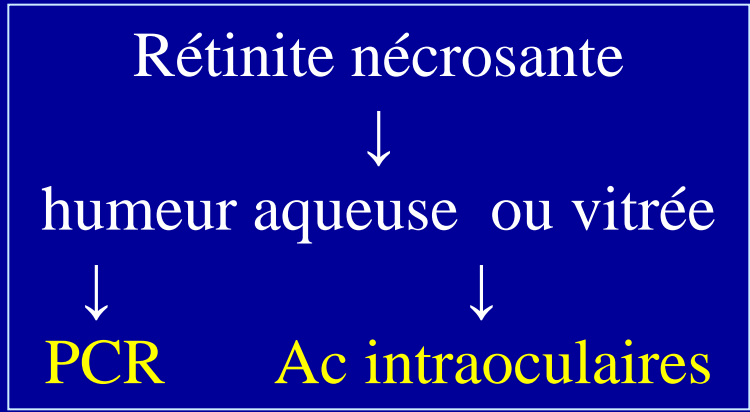
Eruptions vésiculeuses

Culture « au lit du malade »
IF IP

Complications neurologiques

PCR → LCR
Ac sérum/LCR ⇒ diagnostic tardif car
Ac LCR positifs 1 à 2 semaines après
signes cliniques

Manif oculaires



Contage chez femme enceinte

IgG moins de 9 jours après contage
(avant toute séroconversion)

Démarche diagnostique

Varicelle femme enceinte au cours de la grossesse

Chez la mère **Diagnostic virologique** indiqué si doute clinique

Diagnostic prénatal

Liquide amniotique

prélevé après cicatrisation des
lésions cutanées maternelles



PCR

Mais positive ne signifie pas
systématiquement l'existence
d'anomalies foetales

Sang foetal



IgM

Manque de sensibilité

Varicelle maternelle dans les 5 jours avant date prévue de l'accouchement

Essayer de retarder l'accouchement pour laisser le temps aux Ac maternels d'apparaître

CONCLUSION

▶ Le diagnostic virologique des infections à HSV et VZV est surtout **direct**.

Le choix de la ou des technique(s) à utiliser dépend de la situation clinique (et des moyens disponibles au laboratoire).

C'est essentiellement la **culture cellulaire** et la **PCR** qui constituent les techniques de choix.

▶ La sensibilité des techniques dépend étroitement de la **qualité du prélèvement**.

▶ **La sérologie a un intérêt limité** pour le diagnostic de ces Infections. Son intérêt réside dans la détermination du **statut immunitaire** d'un sujet donné devant un risque d'infection grave.