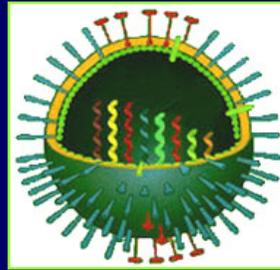


Séminaire-Atelier

“LES INFECTIONS RESPIRATOIRES VIRALES AIGUES”

18 – 20 avril 2005, Tunis



**Diagnostic virologique
des infections respiratoires virales aiguës**

Myriam Ben Mamou

*Laboratoire de Microbiologie
Hôpital Charles Nicolle - Tunis*

PLAN

1- Diagnostic virologique direct

- ◆ Prélèvements
- ◆ Isolement viral
- ◆ Détection des antigènes grippaux
- ◆ Virologie moléculaire

2- Diagnostic sérologique

- ◆ Inhibition de l'hémagglutination
- ◆ Réaction de fixation du complément
- ◆ Titrage des anticorps inhibant la neuraminidase
- ◆ ELISA

1- Diagnostic virologique direct

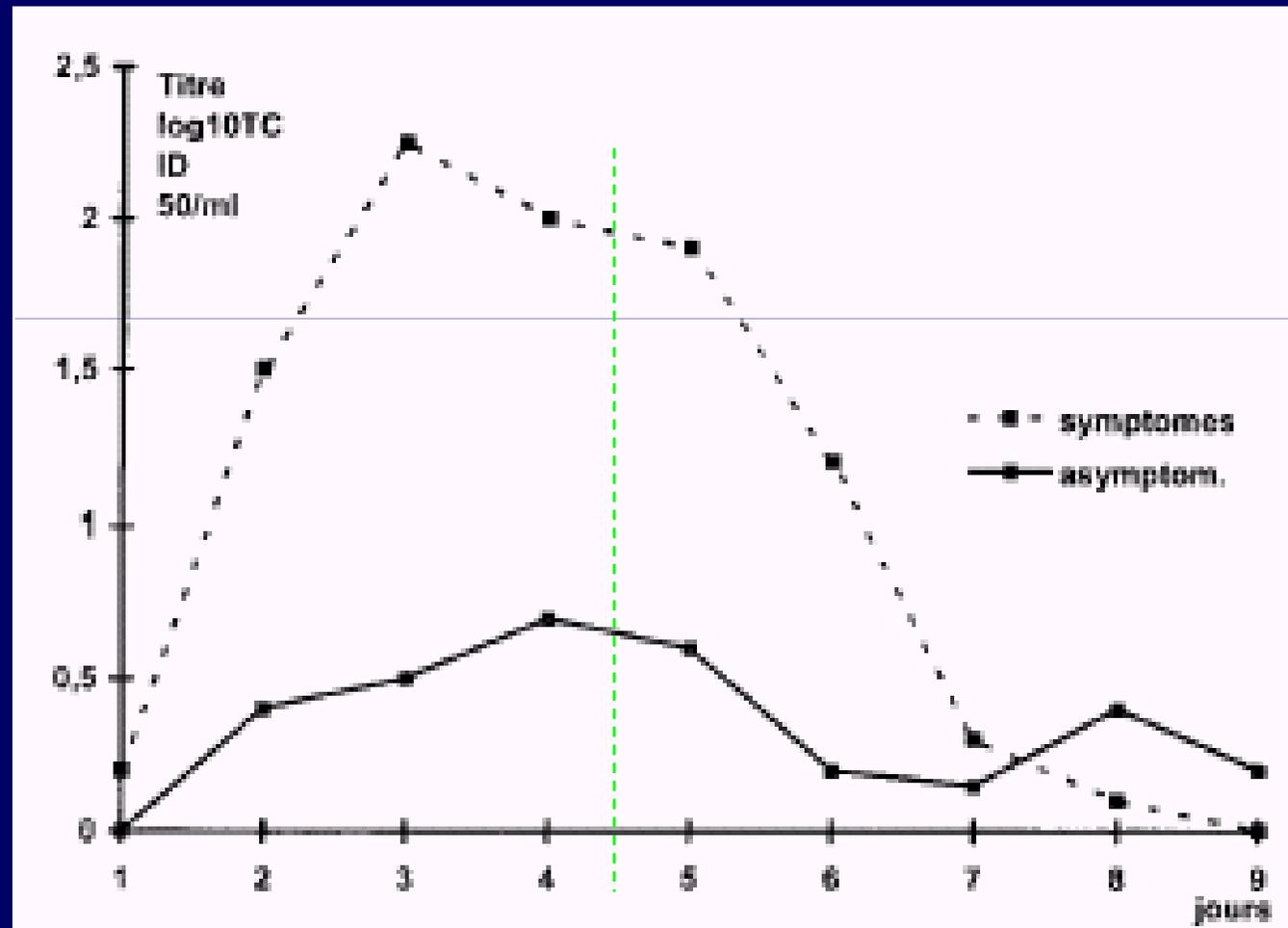
- ◆ Prélèvements
- ◆ Isolement viral
- ◆ Détection des antigènes grippaux
- ◆ Virologie moléculaire

2- Diagnostic sérologique

- ◆ Inhibition de l'hémagglutination
- ◆ Réaction de fixation du complément
- ◆ Titrage des anticorps inhibant la neuraminidase
- ◆ ELISA

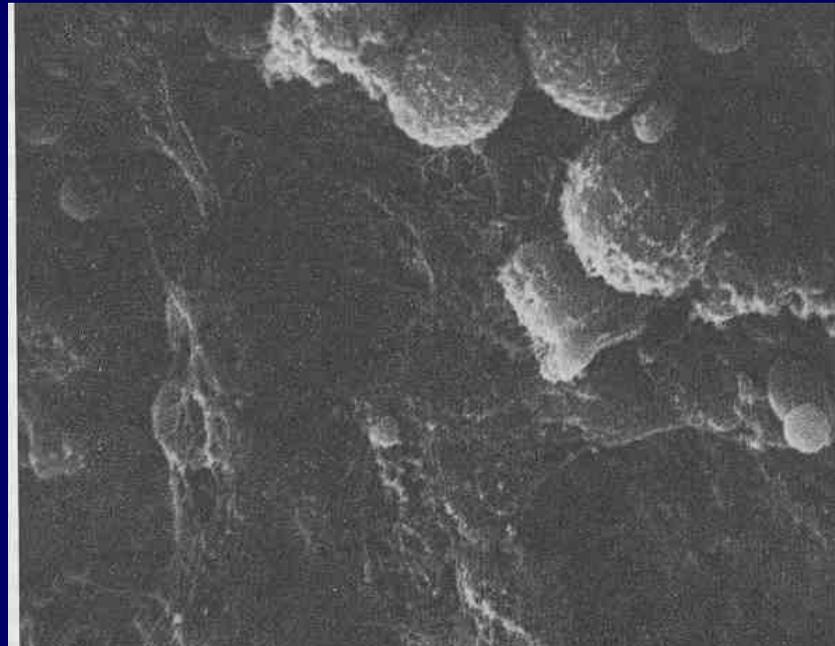
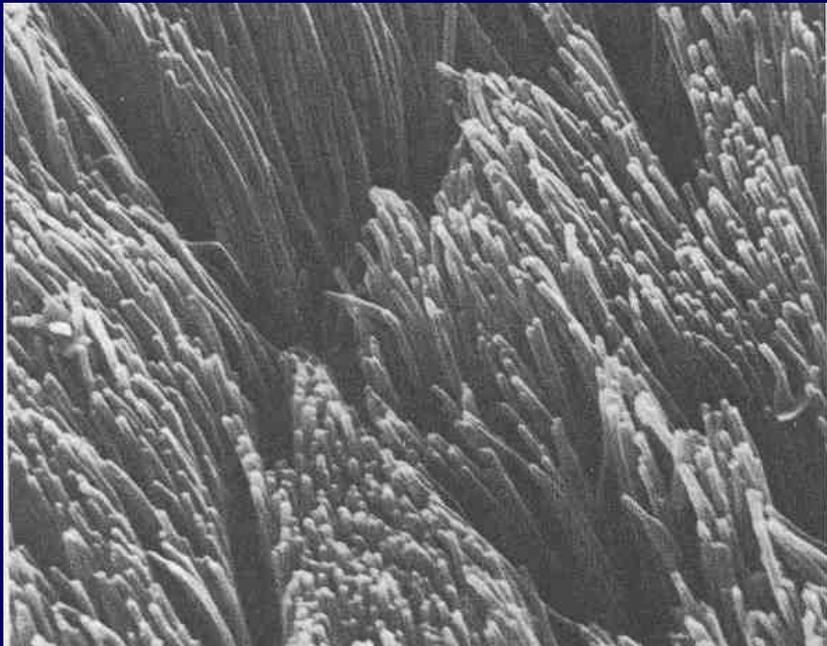
PRELEVEMENTS

◆ Précoces



PRELEVEMENTS (2)

- ◆ **Site de multiplication** : Cellules cylindriques ciliées de l'arbre respiratoire
 - Prélèvements **nasaux** >> pharyngés (gorge)
 - Aspirations bronchique, lavage broncho-alvéolaire



PRELEVEMENTS (3)

◆ Richesse en cellules

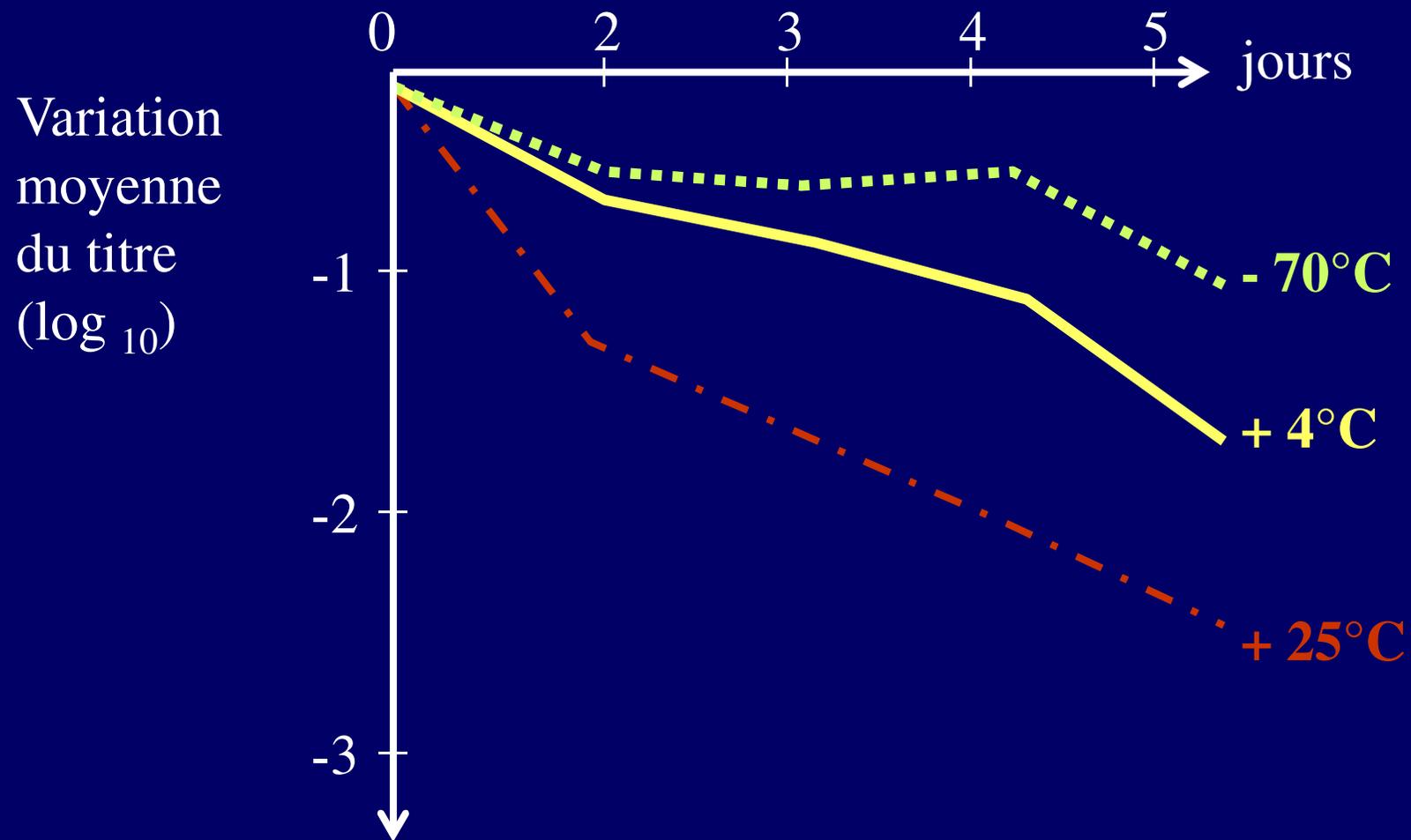
Aspiration : minimum 100 μ l de sécrétions

Ecouvillonnage : Appuyer sur parois des fosses nasales → détacher les cellules épithéliales

Appréciation de la densité cellulaire : turbidité milieu de transport, vérification sur lame

PRELEVEMENTS (4)

◆ Milieu de transport, température



1- Diagnostic virologique direct

- ◆ Prélèvements
- ◆ Isolement viral
- ◆ Détection des antigènes grippaux
- ◆ Virologie moléculaire

2- Diagnostic sérologique

- ◆ Inhibition de l'hémagglutination
- ◆ Réaction de fixation du complément
- ◆ Titrage des anticorps inhibant la neuraminidase
- ◆ ELISA

Isolement des virus grippaux sur oeuf de poule embryonné

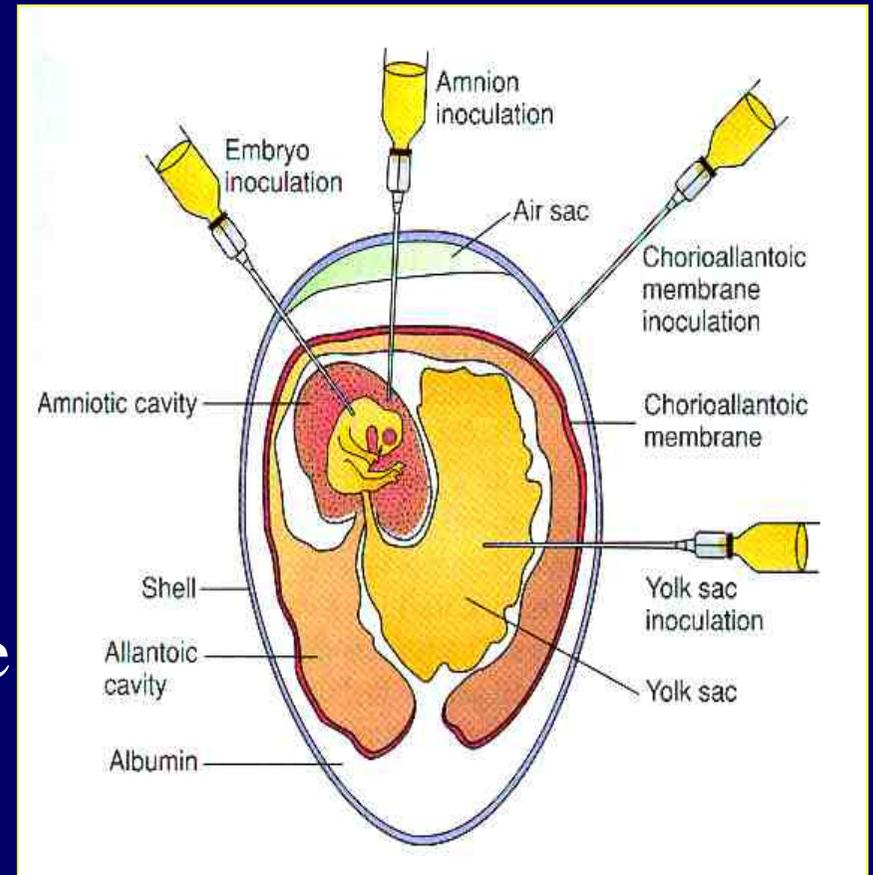
Historique (1935)

Nombreux avantages vs animaux

- ◆ Système clos stérile autosuffisant
- ◆ Grande sensibilité
- ◆ Peu coûteux
- ◆ Grandes quantités

Voies d'inoculation

- ◆ à partir du prélèvement : intra-amniotique
- ◆ 2ème passage : allantoïque



Isolement des virus grippaux en culture cellulaire

Méthode de référence pour le diagnostic de la grippe

Cellules rénales de chien :

Madin-Darby canine kidney (MDCK)

Lignée continue : cellules épithéliales polarisées

Récepteurs spécifiques des virus Influenza A, B, C

Efficacité conditionnée par :

- 1- Trypsine : clivage enzymatique HA → activation
→ particules infectieuses
- 2- Centrifugation du prélèvement à l'inoculation :
↗ rendement culture

Identification des virus grippaux en culture

Effet cytopathogène, hémadsorption : laborieux, long

Immunofluorescence

Détection des antigènes de grippe A et B
par Ac monoclonaux

Inhibition de l'hémagglutination

Titrage HA dans le surnageant

Sérums de référence animaux

Détermination type / sous type / variant

Intérêt de la culture des virus grippaux

- Sensibilité +++
- Production de quantités importantes de virus
→ étude variabilité antigénique & génétique
- Possibilité de conservation : études ultérieures
- Etude de la sensibilité aux antiviraux
- Composition vaccinale

Culture des autres virus respiratoires

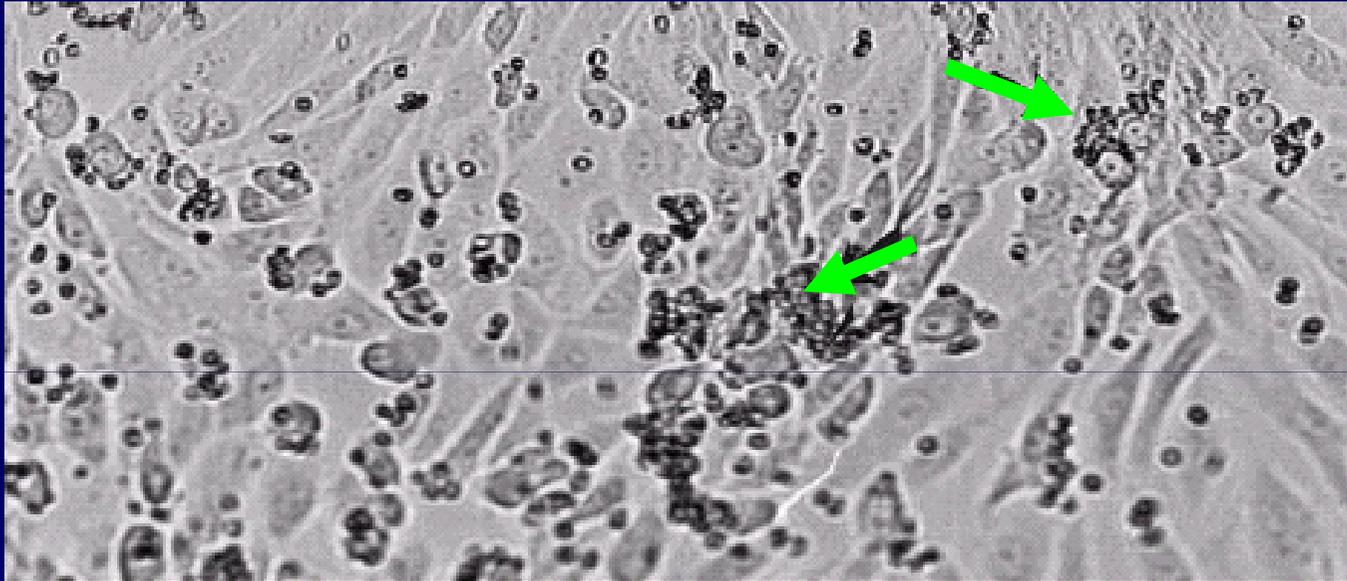
- lignées : MRC5, Hep2, NCI-H292....
- Peu d'intérêt pour le diagnostic positif :
détection directe des antigènes plus performante, sauf rhinovirus

Inconvénients des cultures cellulaires

Nombreux → efficacité limitée & utilisation non systématique

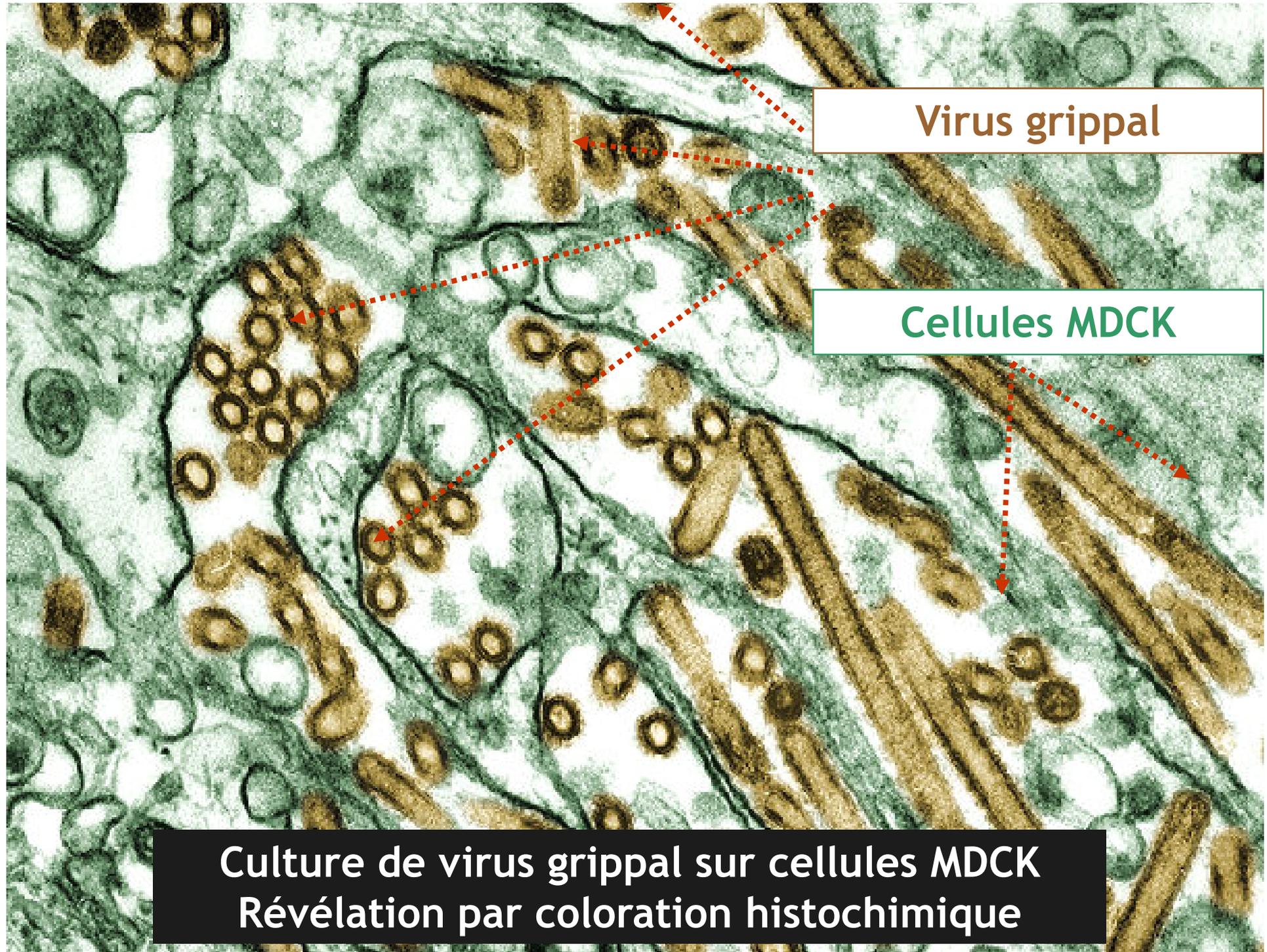
- **Contraintes** : **Structure de laboratoire, logistique, compétences** propres à la culture cellulaire
- **Thermolabilité** virale : transport adéquat
- **Toxicité** des sécrétions respiratoires :
 - contamination bactérienne
 - inhibiteurs **de la croissance virale** : interférons, anticorps, mucines
- **Délai de réponse** :
 - grippe : 4-6 j : O/N ; sérotype > 1 sem
 - VRS : 5-10j

ISOLEMENT VIRAL : Cultures cellulaires



Hématies
adhérant à la
monocouche
cellulaire

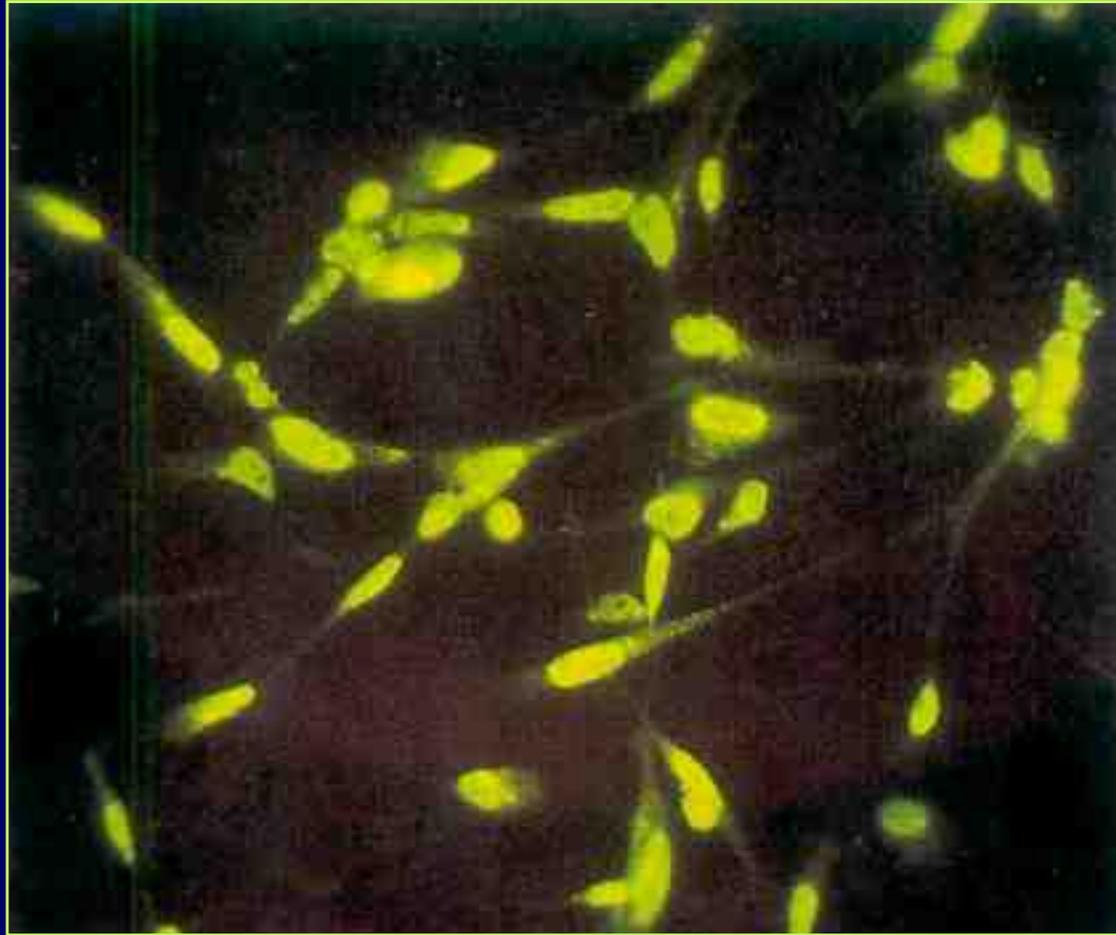
Culture de virus grippal sur cellules rénales de singe Rhésus.
Révélation par hémadsorption



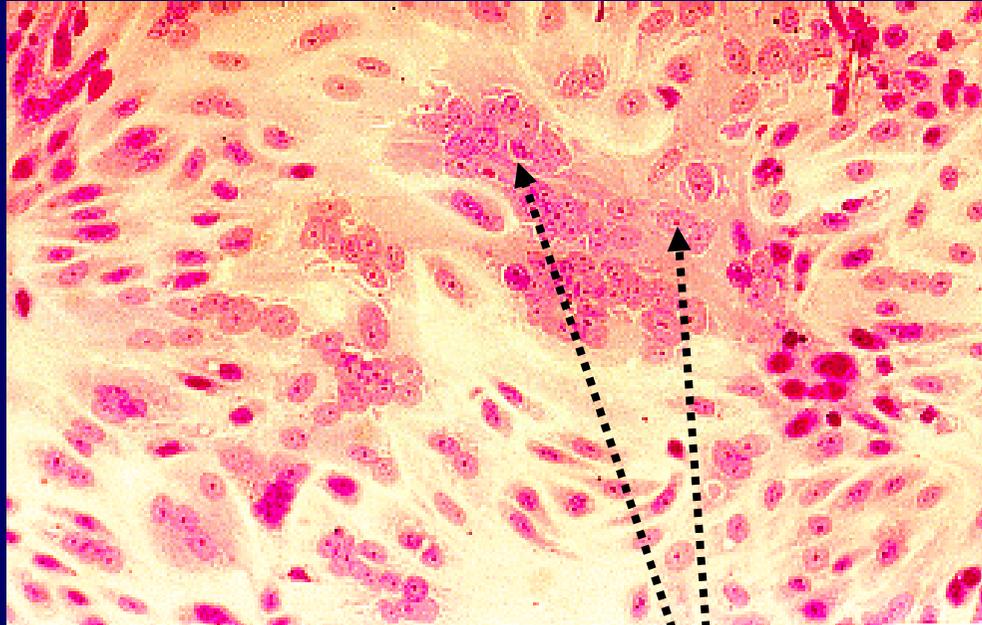
Virus grippal

Cellules MDCK

Culture de virus grippal sur cellules MDCK
Révélation par coloration histochimique

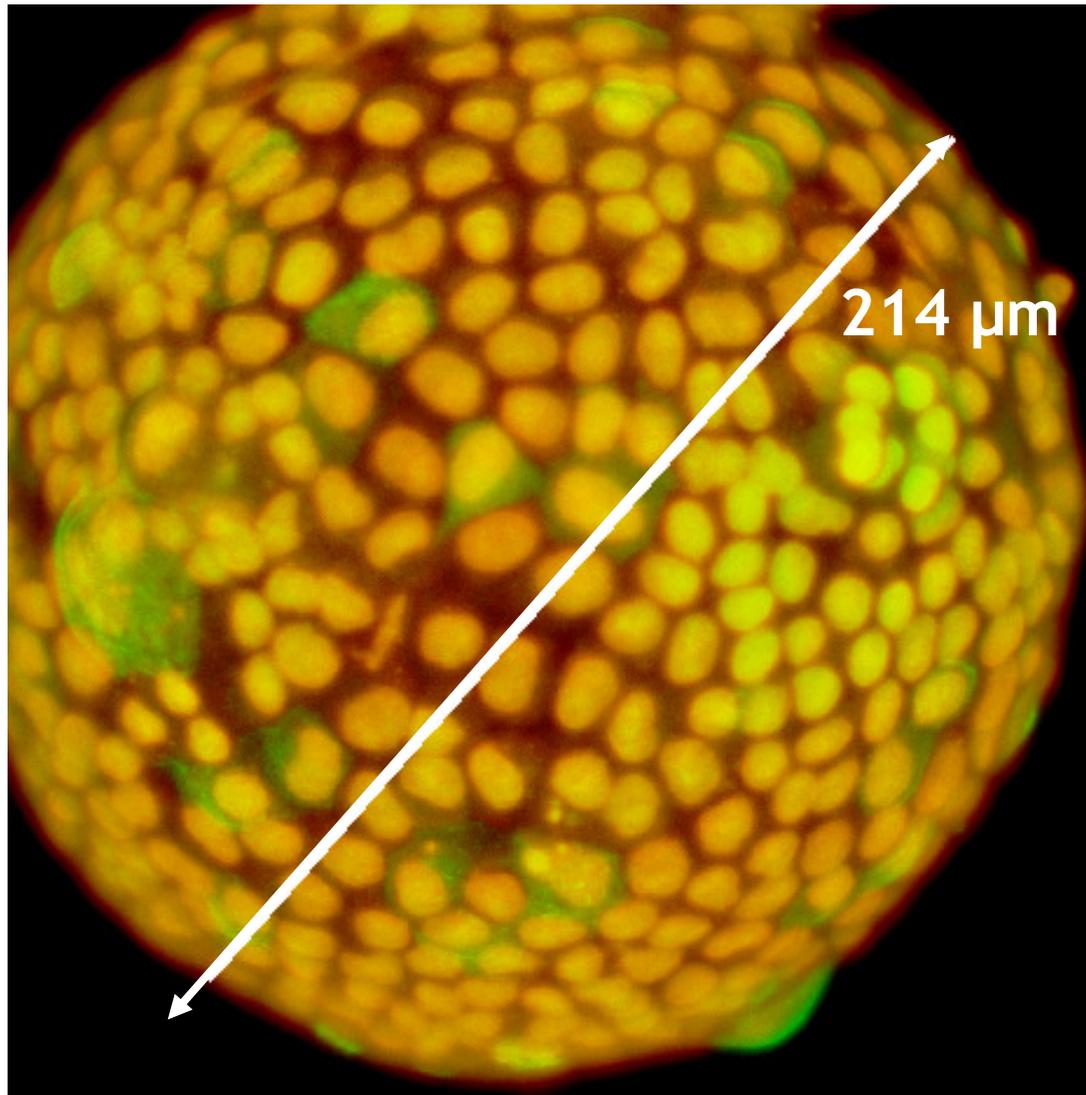


Culture de virus grippal sur cellules MDCK
Révélation par immunofluorescence



Formation de syncytia

Culture de virus respiratoire syncytial



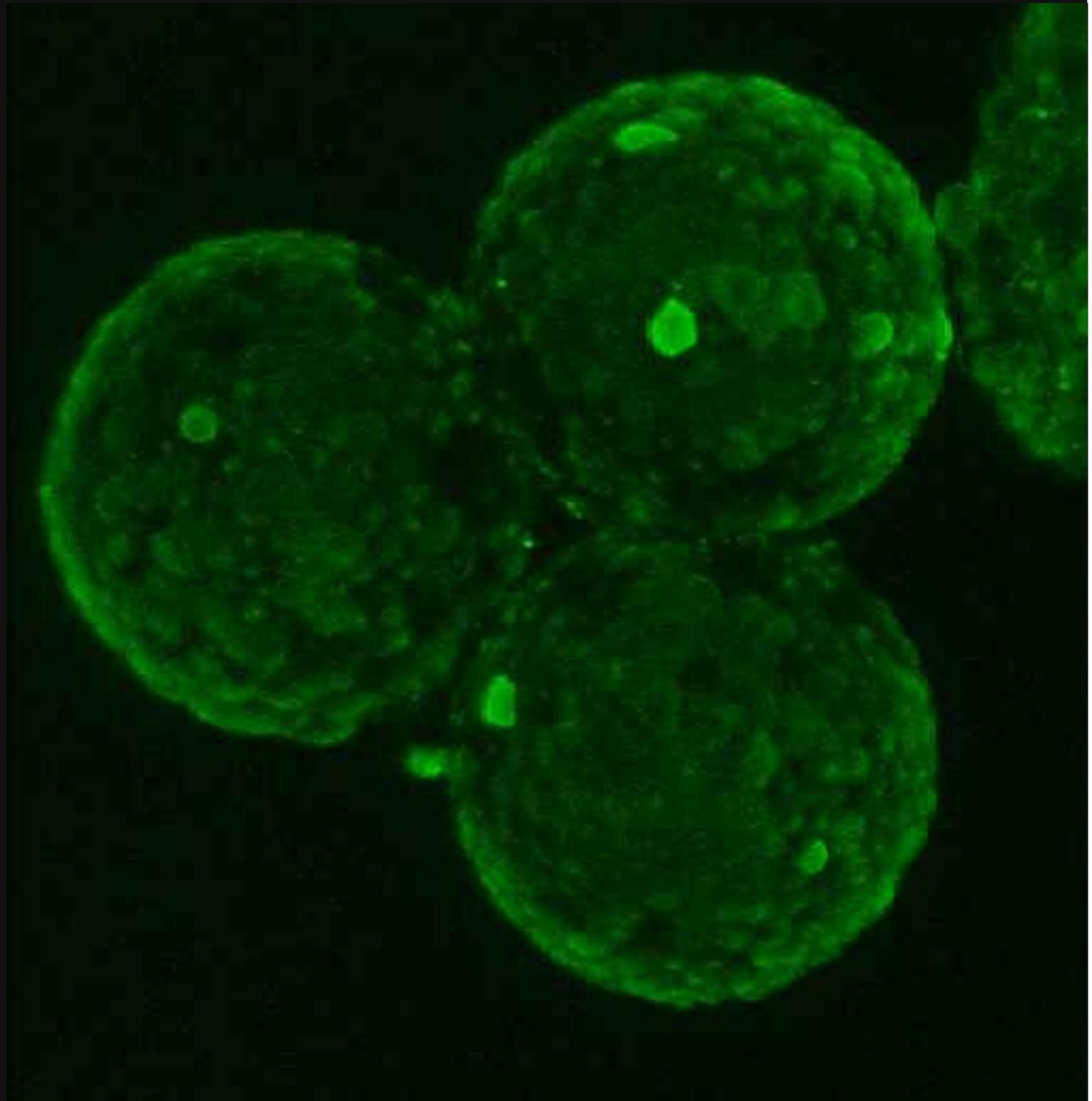
Cellules MDCK cultivées
sur microparticules
(système dynamique)

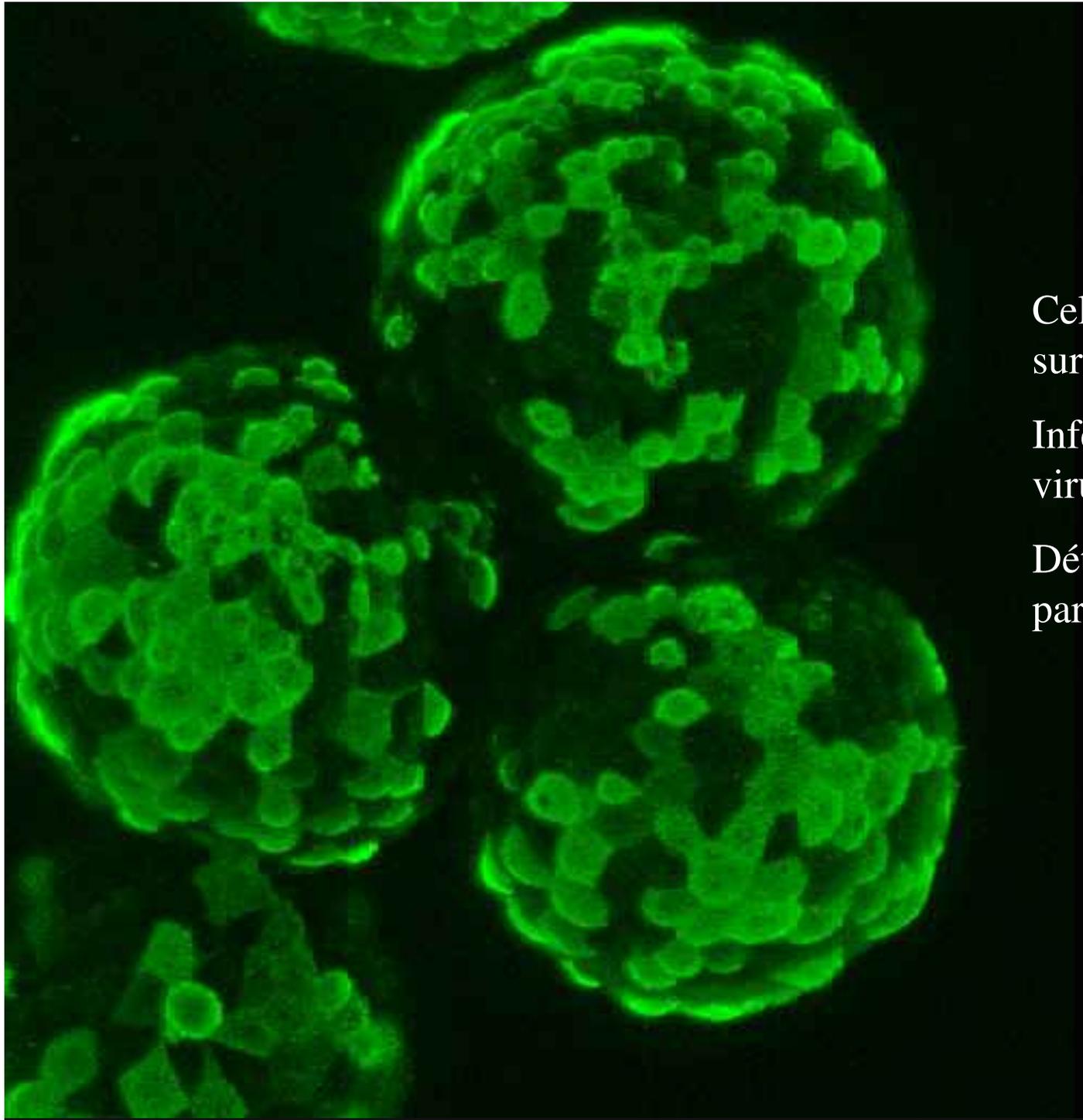
Cellules MDCK cultivées
sur microparticules

Infection par influenza
virus

Détection des antigènes
par Ac monoclonaux

Aspect à 5h



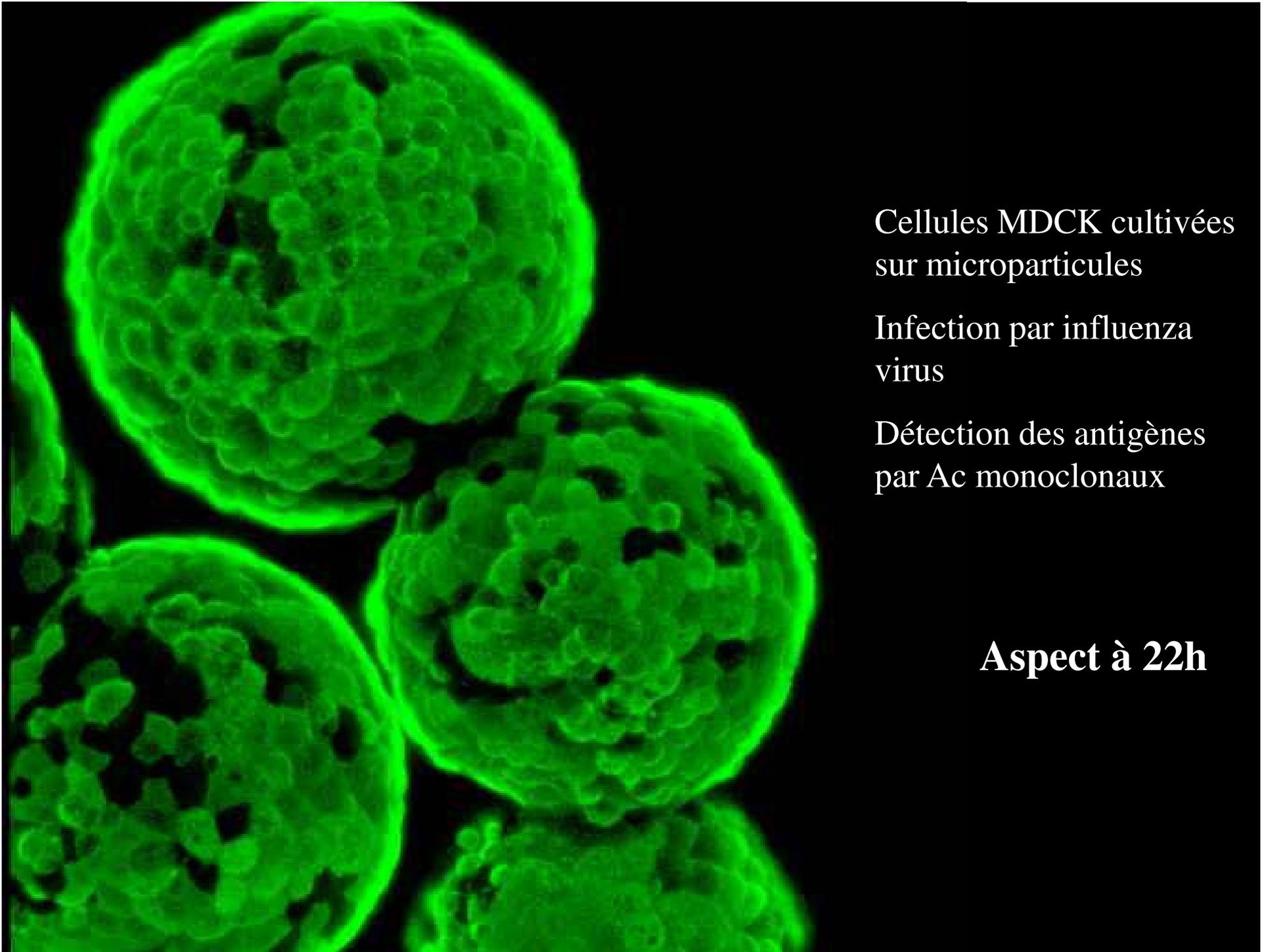


Cellules MDCK cultivées
sur microparticules

Infection par influenza
virus

Détection des antigènes
par Ac monoclonaux

Aspect à 10h



Cellules MDCK cultivées
sur microparticules

Infection par influenza
virus

Détection des antigènes
par Ac monoclonaux

Aspect à 22h

PLAN

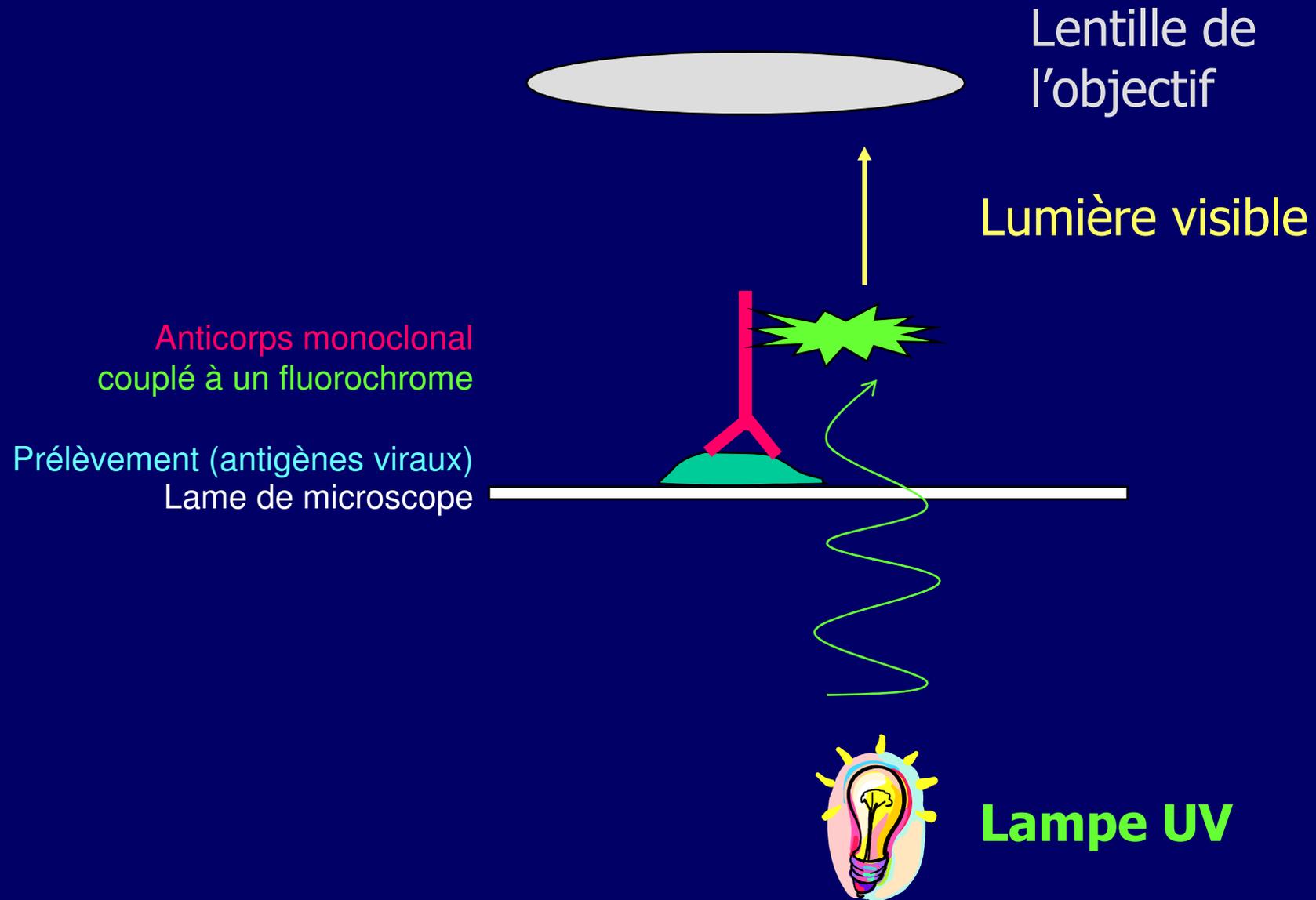
1- Diagnostic virologique direct

- ◆ Prélèvements
- ◆ Isolement viral
- ◆ Détection des antigènes grippaux
- ◆ Virologie moléculaire

2- Diagnostic sérologique

- ◆ Inhibition de l'hémagglutination
- ◆ Réaction de fixation du complément
- ◆ Titrage des anticorps inhibant la neuraminidase
- ◆ ELISA

IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE (IFD)

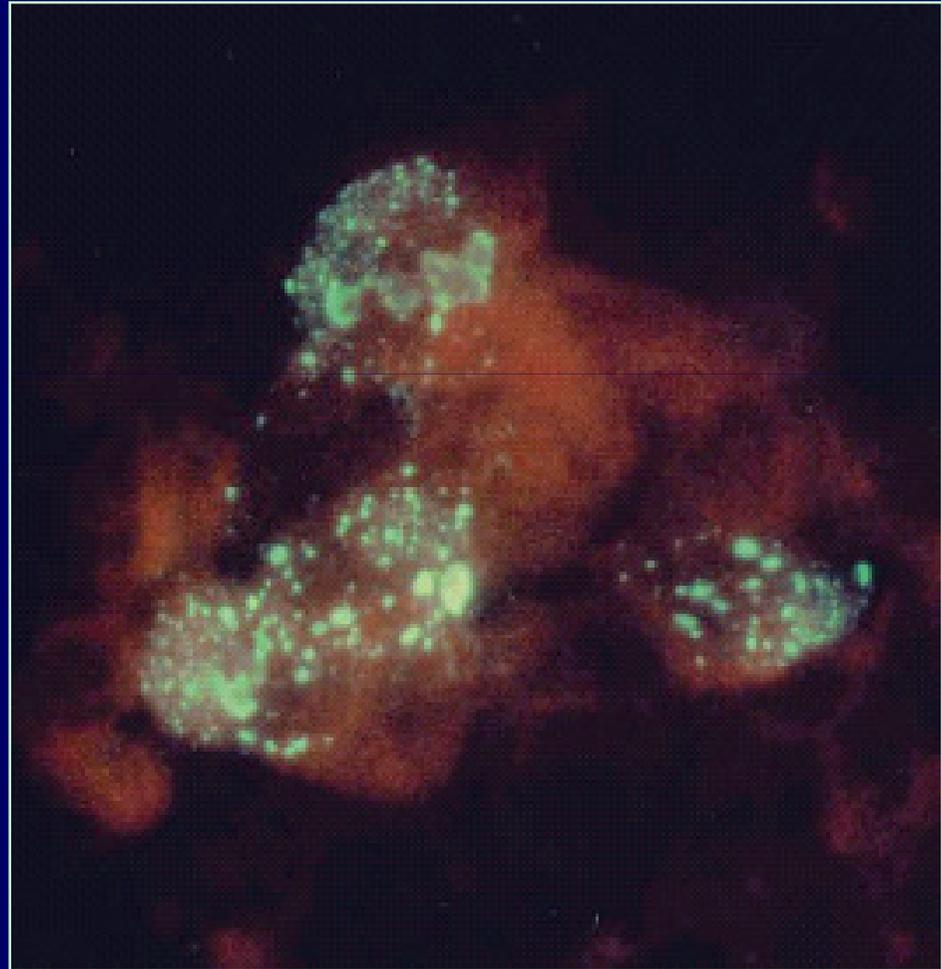


IFD : Mise en évidence du VRS sur sécrétions nasopharyngées

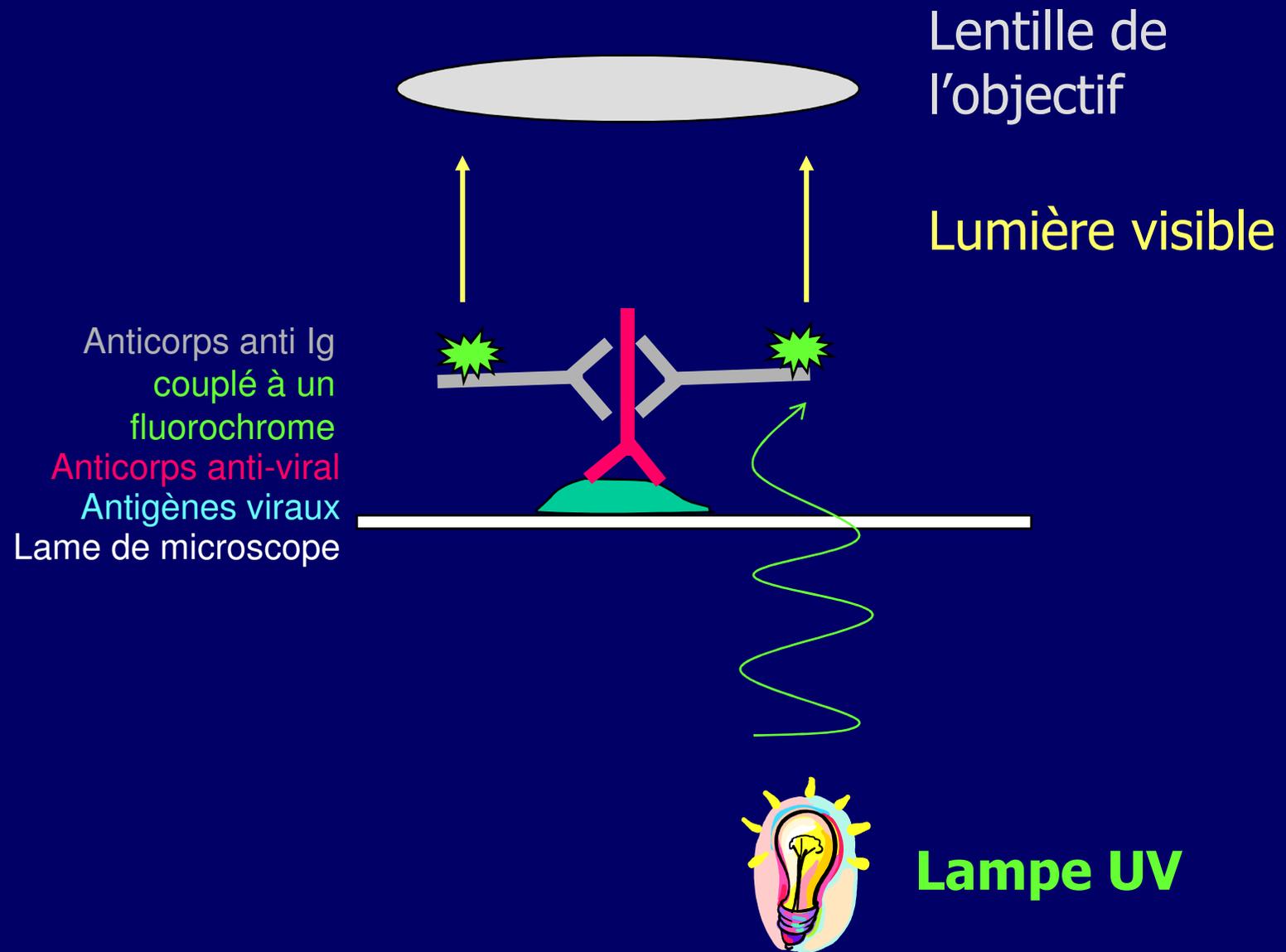
Mélange de 3 anticorps
monoclonaux

**Fluorescence
particulaire localisée**

Madeley & al.
J Clin Virol 2002 ; 25 : 121-134



IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI)



IFI : Mise en évidence du VRS sur sécrétions nasopharyngées

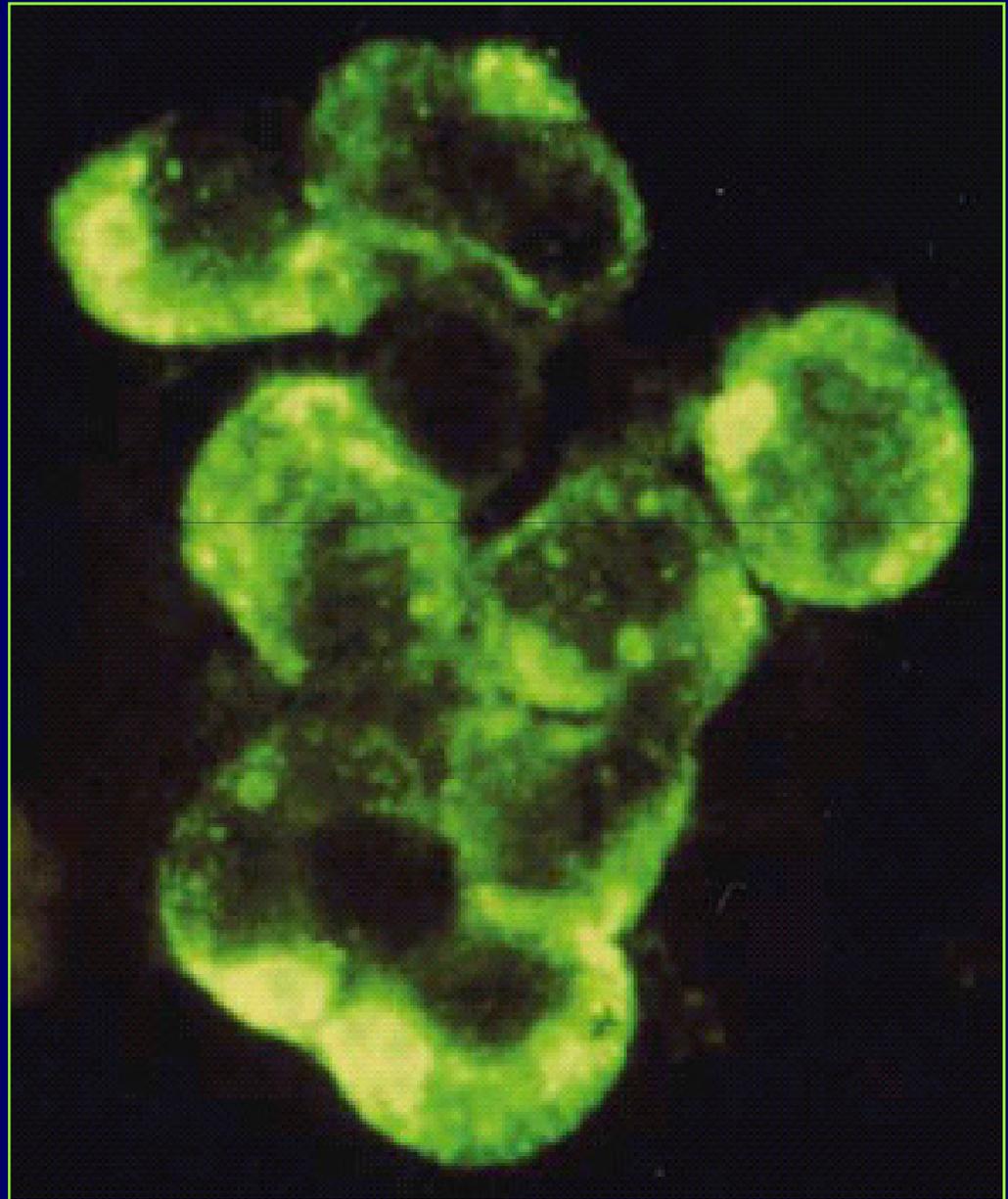
Ac I^{re} : Ac de lapin
polyclonal anti-VRS

Ac II^{re} : Ac de mouton anti-
lapin

**Fluorescence
cytoplasmique
intense**

Madeley & al.

J Clin Virol 2002 ; 25 : 121-134



Applications pratiques de l'immunofluorescence au diagnostic des viroses respiratoires

Virus détectables

- Virus respiratoire syncytial
- Virus Influenza A
- Virus Influenza B
- Adénovirus
- Virus Parainfluenza 1-4

- Virus de la Rougeole
- Virus Varicelle-Zona

Virus non détectables

- Rhinovirus : nombreux sérotypes
- Enterovirus : nombreux sérotypes

- EBV : pas de prélèvement adéquat
- Oreillons : //

Avantages de la technique d'immunofluorescence

1- Rapidité

Ac monoclonaux : 1h-1h 30

Ac polyclonaux : 2h30

→ Prise en compte du résultat dans la CAT clinique

2- Détection simultanée de plusieurs virus

1 prélèvement → plusieurs étalements → plusieurs Ac anti-viraux

Coût non additif

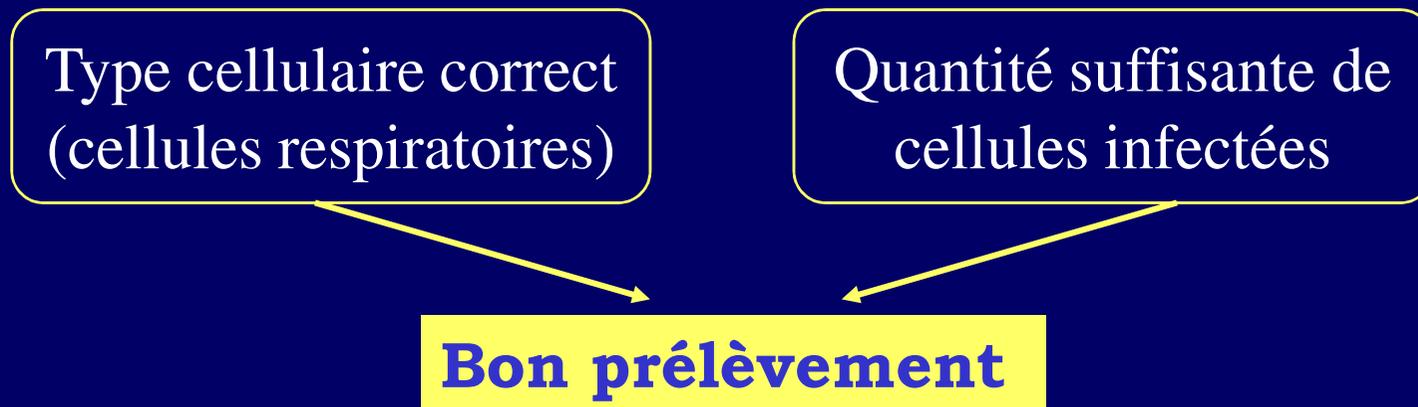
3- Robustesse (vs culture)

Meilleurs résultats sur des prélèvements mal conservés

Avantages de la technique d'immunofluorescence

4- Evaluation de la qualité du prélèvement

Avantage exclusif de l'IF



Appréciation de la qualité du prélèvement : éviter les faux-négatifs

Avantages de la technique d'immunofluorescence

5- Validité

Plus qu'une simple réaction positive

Visualisation du type de fluorescence, position, intensité :
appréciation qualitative et quantitative

6- Bon rapport coût-efficacité

Faible coût vs outils moléculaires

Peu exigeante en matériel

Avantages

Inconvénients

IF **(immunofluorescence)**

- Rapidité
- Contrôle de la qualité du prélèvement
- 1 lame : plusieurs virus
- Sensibilité
- Faible coût

- Nécessité de microscope à IF
- Lecture par manipulateur expérimenté
- Débit modérés
- Nécessité de prélèvements < 48h

ELISA **(enzyme linked immunosorbent assay)**

- Stabilité des prélèvements
- Automatisation
- Sensibilité
- Faible coût
- Lecture objective (spectro), pas de manipulateur expérimenté
- Débits élevés

- Pas de contrôle de qualité des prélèvements
- 1 coating / antigène viral (plusieurs manip / pvmt)

TESTS RAPIDES

Tests unitaires **immunoenzymatiques** +++
détection activité NA

Anticorps monoclonaux sur **support solide** : bandelette,
“savonnette”

Temps de réaction < 30 mn

Virus détectés : Grippe A ; Grippe A et B, VRS

TESTS RAPIDES

Tests unitaires **immunoenzymatiques** +++
détection activité NA

Anticorps monoclonaux sur **support solide** : bandelette,
“savonnette”

Temps de réaction < 30 mn

Virus détectés : Grippe A ; Grippe A et B, VRS

Performances fortement dépendantes du prélèvement :

Type

Transport

Cellularité

Age du patient : enfant >> adultes



	Type	Méthode	Lavage nasal / nasopharyngé				Ecouvillonnage nasal / nasopharyngé / gorge			
			SS	SP	VPP	VPN	SS	SP	VPP	VPN
Directigen Flu A	A	EIA	75-100	91-100	62-100	89-100	39-67	92		
Directigen Flu A & B	A & B	EIA	75-87	93-97	74-80	93-98				
FLU OIA	A ou B	EIA	88	69-79	73-91	56-77	25-83	51-94	73	56
Quick Vue	A & B	EIA	73	95-99			65	92		
Zstat Flu	A ou B	Activité NA	70-96	77-92	89-98	59-76	62	99		
Now Flu A & B	A & B	EIA	82	94	71	97	58-78	92-97		

Positivité des tests rapides en cas de grippe confirmée par culture virale en fonction du type de prélèvement

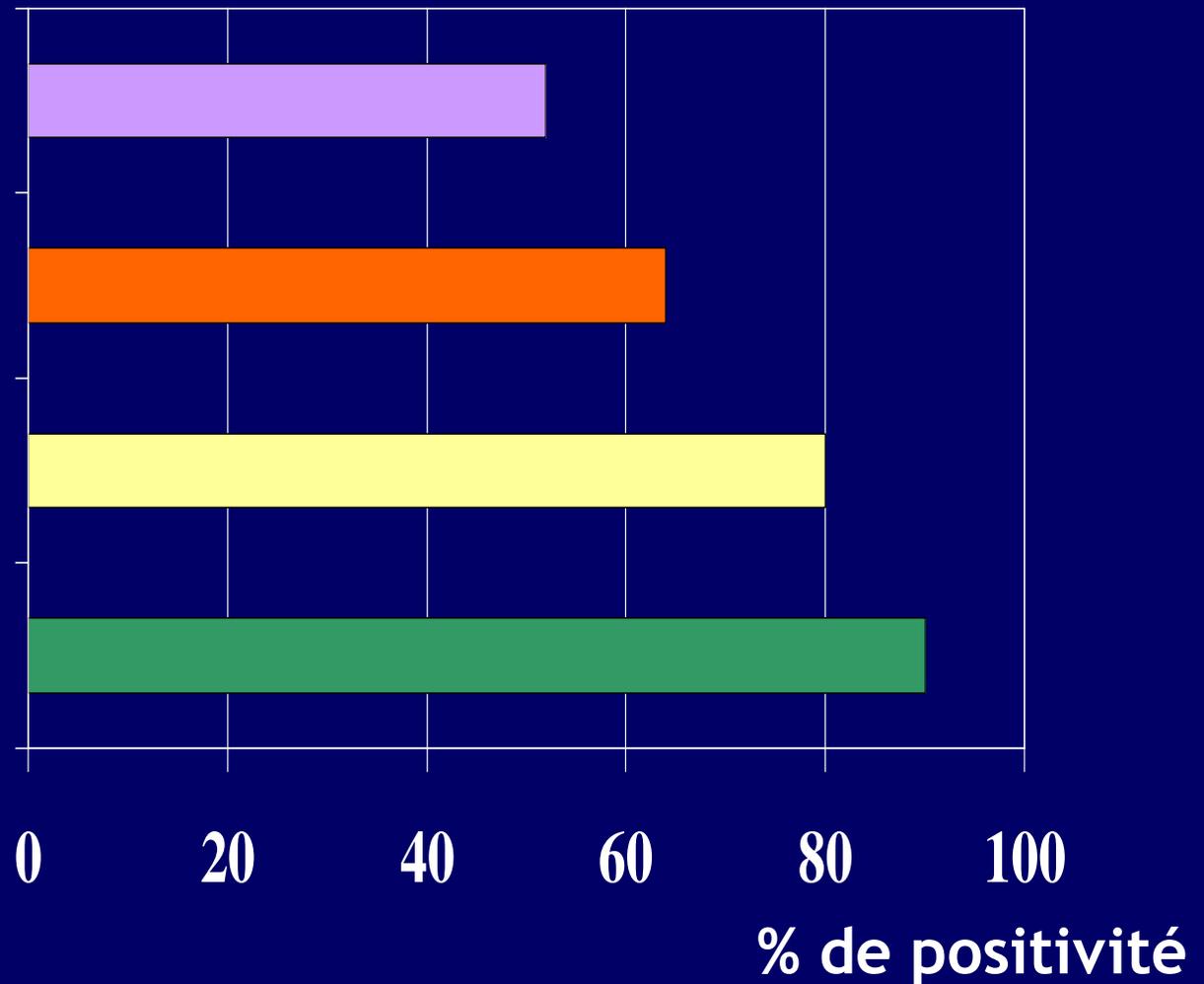
Type de prélèvements

Écouvillonnage
de gorge

Écouvillonnage
naso-pharyngé

Aspiration nasale

Expectoration



1- Diagnostic virologique direct

- ◆ Prélèvements
- ◆ Isolement viral
- ◆ Détection des antigènes grippaux
- ◆ Virologie moléculaire

2- Diagnostic sérologique

- ◆ Inhibition de l'hémagglutination
- ◆ Réaction de fixation du complément
- ◆ Titrage des anticorps inhibant la neuraminidase
- ◆ ELISA

VIROLOGIE MOLECULAIRE & VIRUS RESPIRATOIRES

Première description : Détection & identification de virus grippal par PCR (Zhang 1991)

Performances variables :

Nature du prélèvement

Type d'extraction

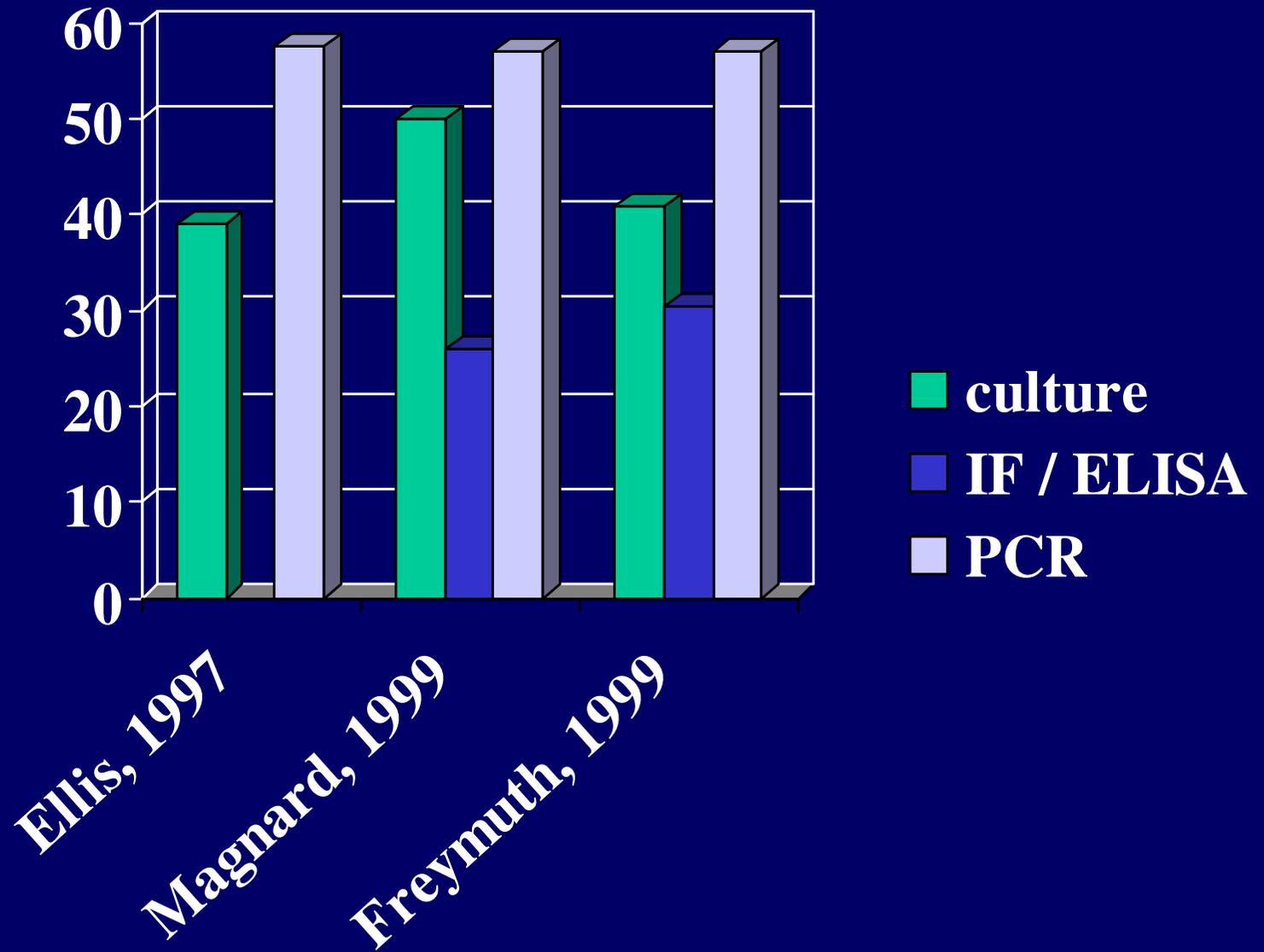
PCR simple, PCR nichée

Localisation des amorces : choix du gène à amplifier

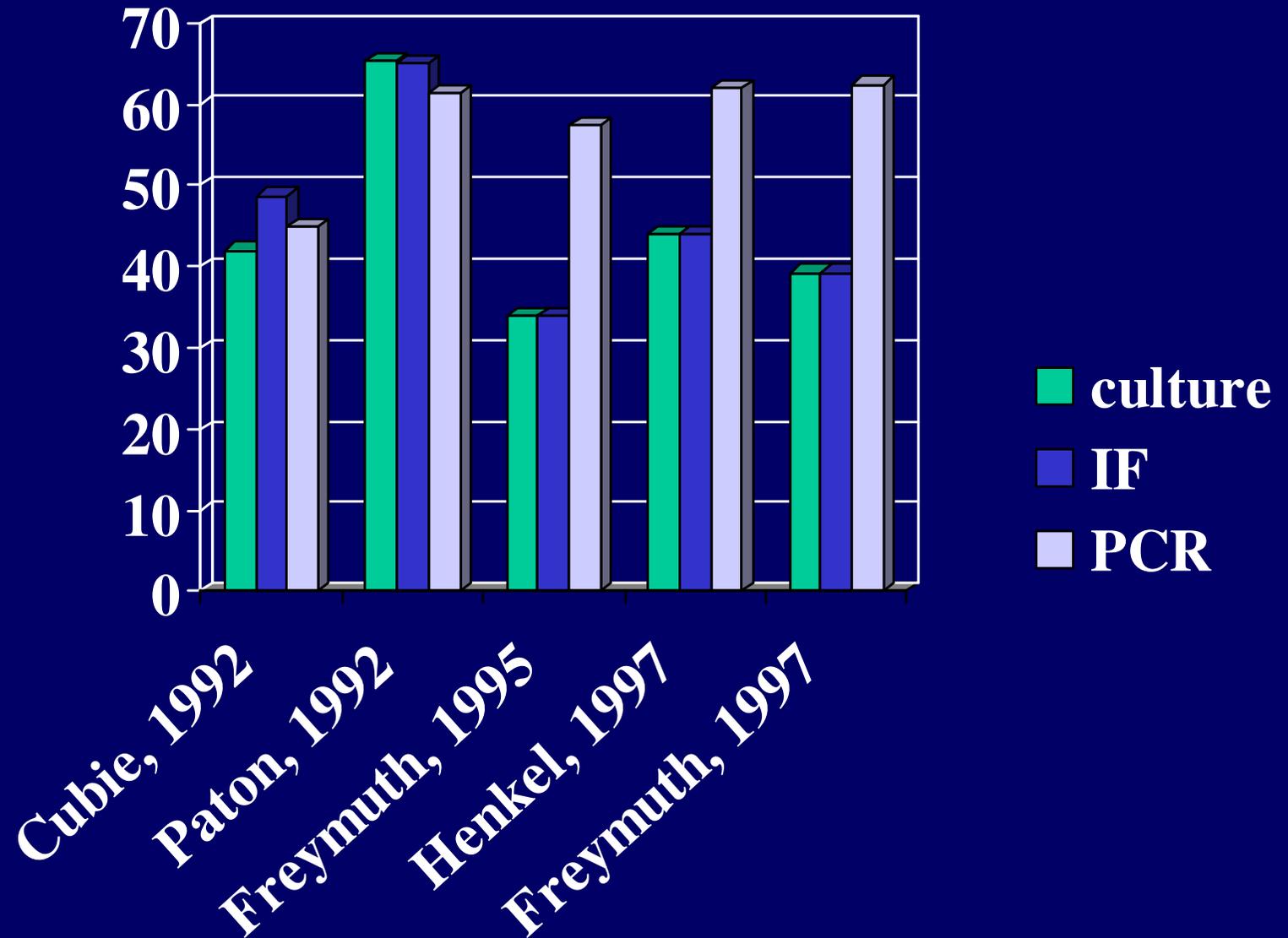
Type de révélation

Globalement : meilleure sensibilité que les tests conventionnels

Apport de la PCR dans le diagnostic de la grippe



Apport de la PCR dans le diagnostic des infections à VRS



VIROLOGIE MOLECULAIRE : NOUVELLES APPROCHES

PCR multiplex

PCR en temps réel

1- Diagnostic virologique direct

- ◆ Prélèvements
- ◆ Isolement viral
- ◆ Détection des antigènes grippaux
- ◆ Détection / quantification du génome viral

2- Diagnostic sérologique

- ◆ Inhibition de l'hémagglutination
- ◆ Réaction de fixation du complément
- ◆ Titrage des anticorps inhibant la neuraminidase
- ◆ ELISA

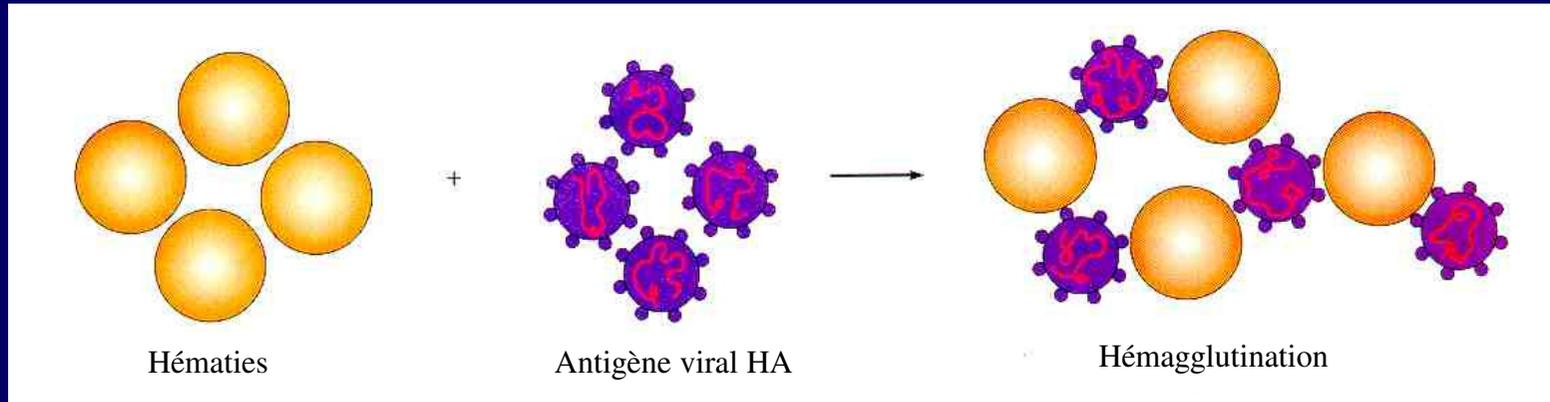
DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

Examen de **2 sérums**, précoce et tardif : Ascension du titre d'au moins un facteur 4

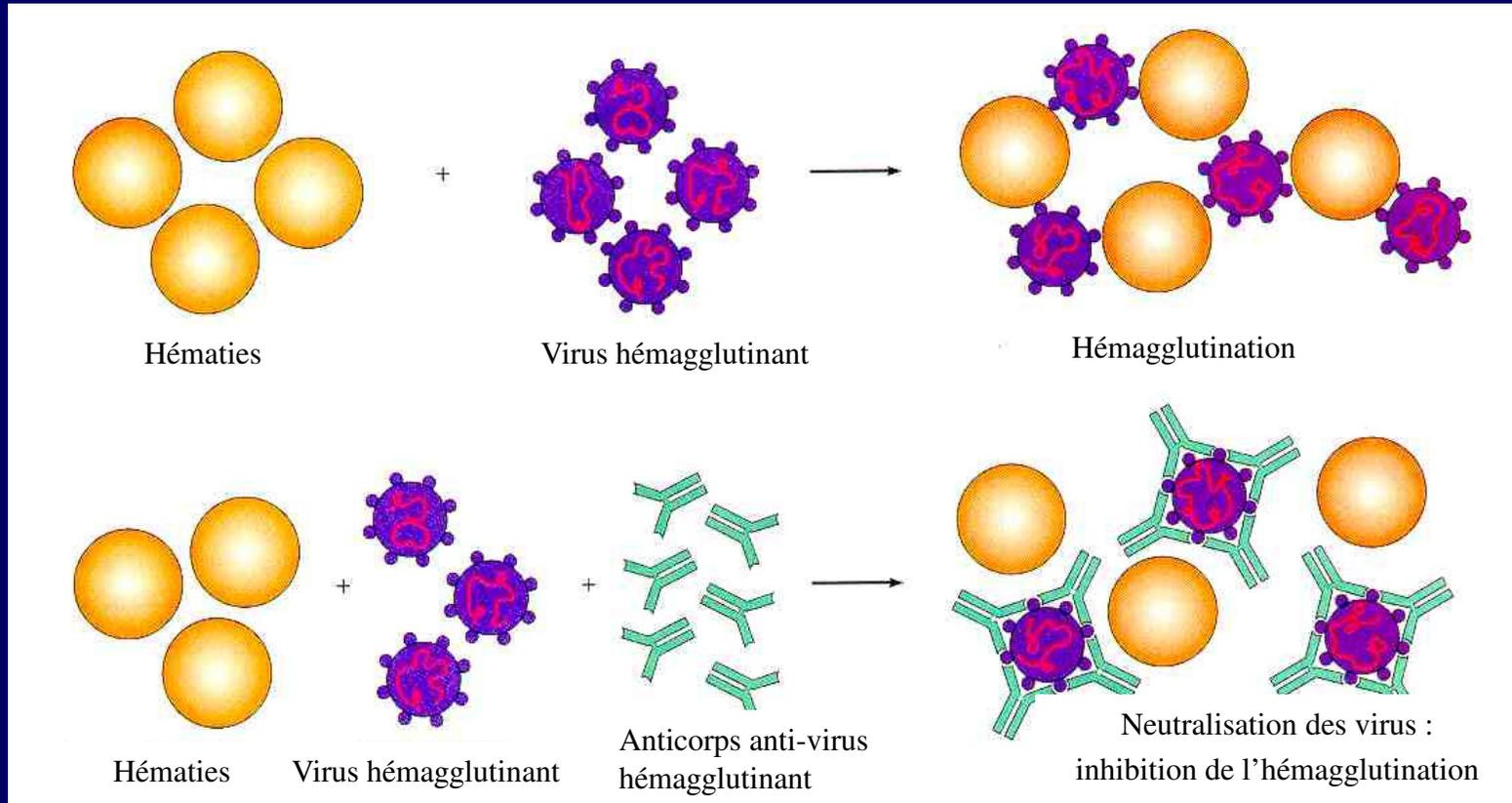
Délai de réponse → pas d'intérêt dans le diagnostic positif

Enquêtes épidémiologiques rétrospectives

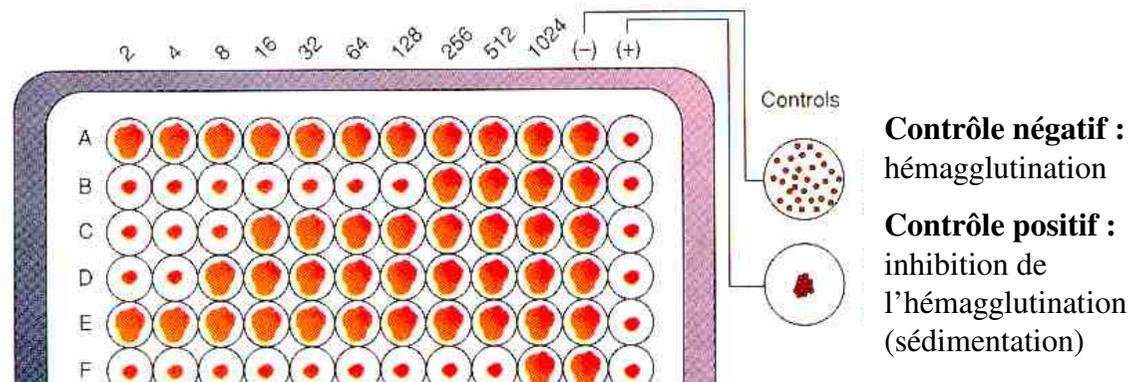
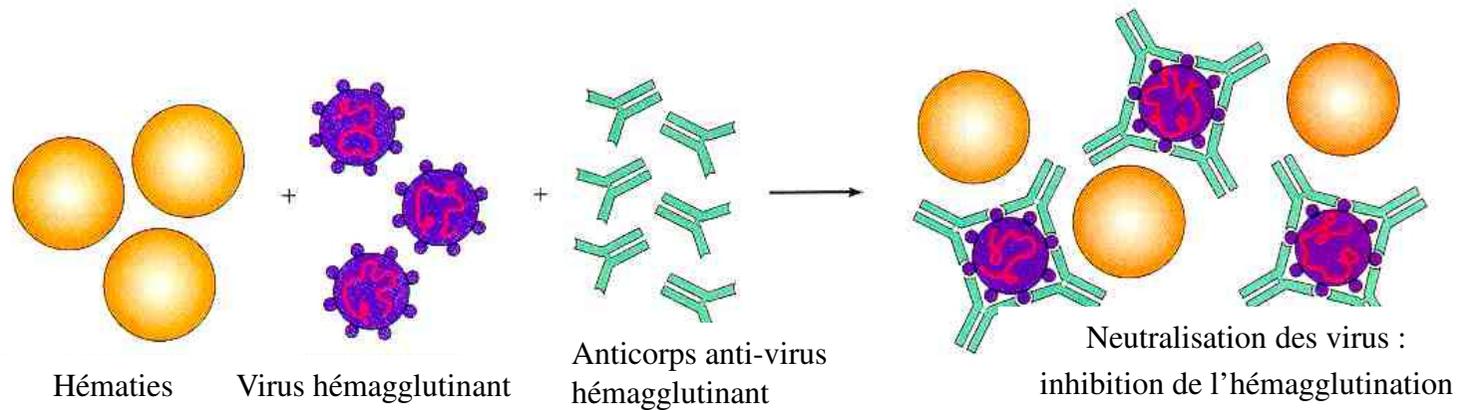
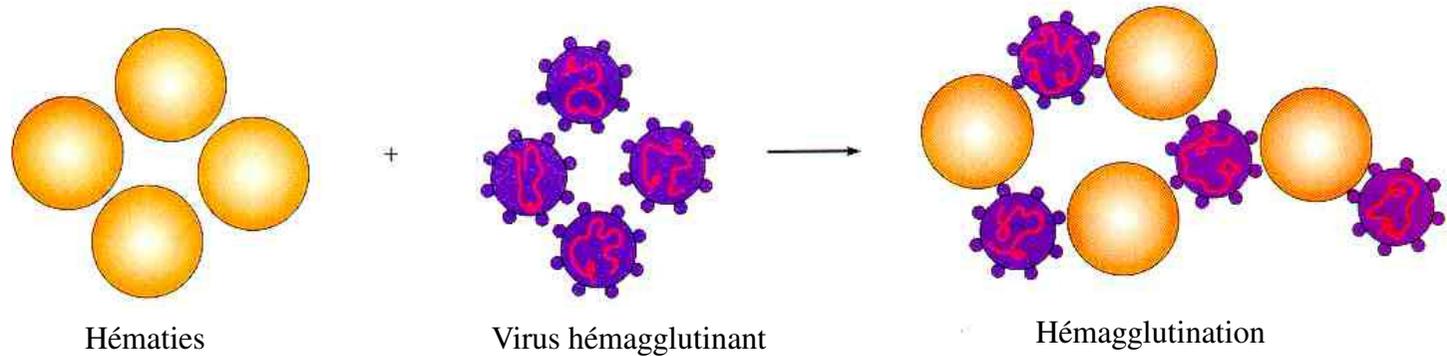
Inhibition de l'hémagglutination (IHA)



Inhibition de l'hémagglutination (IHA)



Inhibition de l'hémagglutination (IHA)

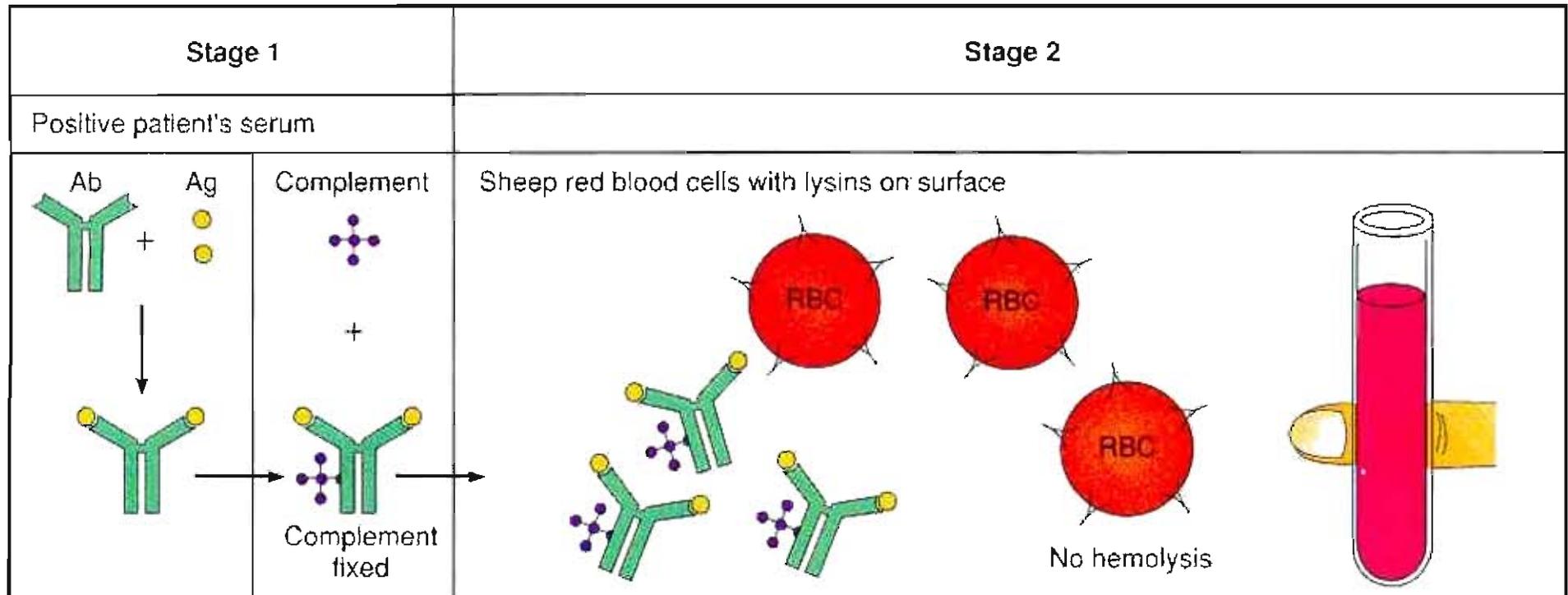


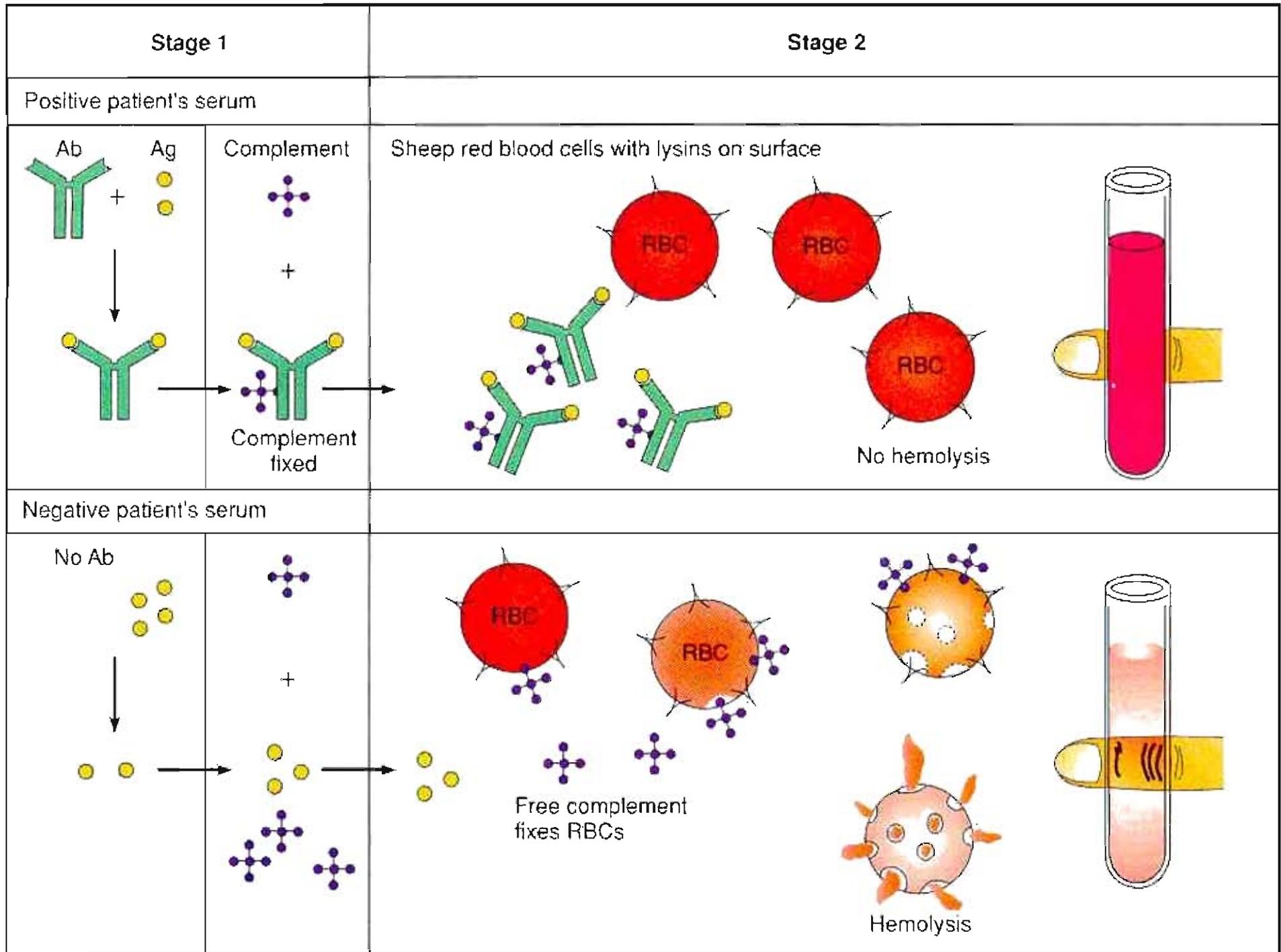
1- Diagnostic virologique direct

- ◆ Prélèvements
- ◆ Isolement viral
- ◆ Détection des antigènes grippaux
- ◆ Détection / quantification du génome viral

2- Diagnostic sérologique

- ◆ Inhibition de l'hémagglutination
- ◆ Réaction de fixation du complément
- ◆ Titrage des anticorps inhibant la neuraminidase
- ◆ ELISA





1- Diagnostic virologique direct

- ◆ Prélèvements
- ◆ Isolement viral
- ◆ Détection des antigènes grippaux
- ◆ Détection / quantification du génome viral

2- Diagnostic sérologique

- ◆ Inhibition de l'hémagglutination
- ◆ Réaction de fixation du complément
- ◆ Titrage des anticorps inhibant la neuraminidase
- ◆ ELISA

Titration of antibodies inhibiting neuraminidase

Method of OMS

Action of the virus on a substrate rich in sialic acid

Measurement of the quantity of sialic acid released (action of NA)

Method using arachidonic lectin

NA : unmasks the lectin receptors on the surface of sheep red blood cells

1st step : sheep red blood cells not agglutinated by the lectin

2nd step : action of NA

3rd step : agglutination of sheep red blood cells by the lectin

1- Diagnostic virologique direct

- ◆ Prélèvements
- ◆ Isolement viral
- ◆ Détection des antigènes grippaux
- ◆ Détection / quantification du génome viral

2- Diagnostic sérologique

- ◆ Inhibition de l'hémagglutination
- ◆ Réaction de fixation du complément
- ◆ Titrage des anticorps inhibant la neuraminidase
- ◆ ELISA

ELISA

Initialement : tests maison

Actuellement nombreux tests commercialisés

Différents virus respiratoires

Différentes classes / sous classes d'anticorps :

IgM, IgG, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4

Détermination des épitopes viraux

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Il n'existe pas de test parfait pour le diagnostic des viroses respiratoires

Outils conventionnels : toujours indiqués

Tests enzymatiques rapides : simplicité, rapidité en pratique clinique

Les outils moléculaires : intéressantes perspectives

- problèmes de standardisation et reproductibilité améliorés par les kits commerciaux
- amplification multiplex & temps réel : gain de temps, \searrow contaminations

Certaines questions / limites demeurent :

- Coût
- Significativité clinique de la détection de séquences virales

UNE CONSTANTE :
LA QUALITE DU PRELEVEMENT RESPIRATOIRE
CONDITIONNE LE RESULTAT DE N'IMPORTE QUEL TEST

