

ENSEIGNEMENT POST UNIVERSITAIRE MICROBIOLOGIE



Diagnostic des infections respiratoires d'origine virale

Dr Salma MHALLA
Laboratoire de Microbiologie
CHU F. Bourguiba Monastir

Pourquoi documenter les infections respiratoires virales?

- **Fréquence:** 80% des infections respiratoires aiguës
- **Gravité:** Parmi les hospitalisations pour infection respiratoire basse: 90% chez les < 5 ans
39% chez les 5-18 ans
- **Diminuer** la consommation inutile des antibiotiques
- **TT** Prescription d'antibiotique IV significativement plus courte si tests rapides positifs 2.4 versus 4 jours (p=0.04)
- **Me** les
inf
- **Surveillance épidémiologique** (grippe)

Byington CL, Arch Pediatr Adolesc Med 2002

Physiopathologie

- PE: tractus respiratoire supérieur (pharynx, larynx)
- Propagation de proche en proche des **VAS** (rhinite, laryngite, trachéite) vers les **VAI** et les **bronchioles**
→ bronchite, bronchiolite ou pneumopathie
- Multiplication dans les C épithéliales ciliées → destruction de l'épithélium → hypersécrétion et œdème → rhinorrhée et obstruction des VA avec risque ++ de sur-I° bactérienne

Virus à l'origine d'Infections Respiratoires

Virus du groupe 1: **Tropisme respiratoire exclusif**

•Influenza A, B, C

Orthomyxoviridae

120 nm, enveloppé,
RNA (-, 8SS, 14kb)



•RSV A & B
•hMPV
•Parainfluenza (1 à 4)

Paramyxoviridae

150-160 nm, enveloppé,
RNA (-, SS, 15kb)



•Rhinovirus A et B

Picornaviridae

30 nm, non-enveloppé,
RNA (+, SS, 7kb)



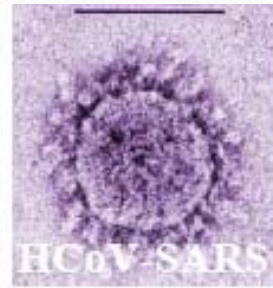
Virus du groupe 1:

Tropisme respiratoire exclusif

- HCoV-229E
- HCoV-OC43
- HCoV-SARS
- HCoV-NL63
- HCoV-HKU1

Coronaviridae

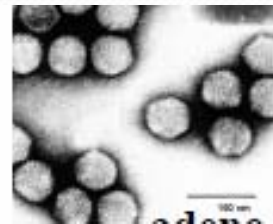
100-120 nm, enveloppé,
RNA (+, SS, 30kb)



- Adenovirus
- Sérotypes ++ 2,3,7,5

Adenoviridae

70-90 nm, non-enveloppé,
DNA (DS, 36kb)



Virus du groupe 2:

Tropisme pour nb ϕ dont les ϕ ciliées resp

Groupe 2

Virus herpès simplex (HSV)

Virus varicelle-zona (VZV)

Cytomégalovirus (CMV)

Virus Epstein Barr (EBV)

Virus de la rougeole, Virus des oreillons

Entérovirus

Coxsackievirus, echovirus

III- Diagnostic étiologique

Doit tenir compte de différents facteurs :

- L'âge
- État immunitaire du malade
- Saison: ++ automne/hiver
- Expression clinique
- Transmission nosocomiale ? (VRS en pédiatrie)

Orientation diagnostic: Selon l'âge

| | Virus fréquents | Virus plus rares |
|----------------------------|--|--|
| Nourrissons | RSV PIV-3 | PIV-1, -2 V. Influenza A/B AdV RV |
| Enfants | PIV-1 et -2 V. Influenza A/B AdV (Rougeole) | RSV RV PIV-3 |
| Adolescents/Adultes | V. Influenza A et B AdV | VZV Rougeole |
| Personnes âgées | RSV (V. Influenza A et B) | AdV RV PIV |

Orientation diagnostic:

Selon l'état immunitaire

- Aux virus respiratoires classiques se rajoutent:
- Les virus opportunistes: CMV, VZV, Adv (sérotypes rares), HSV...

CMV

VHSV

VZV

AdV

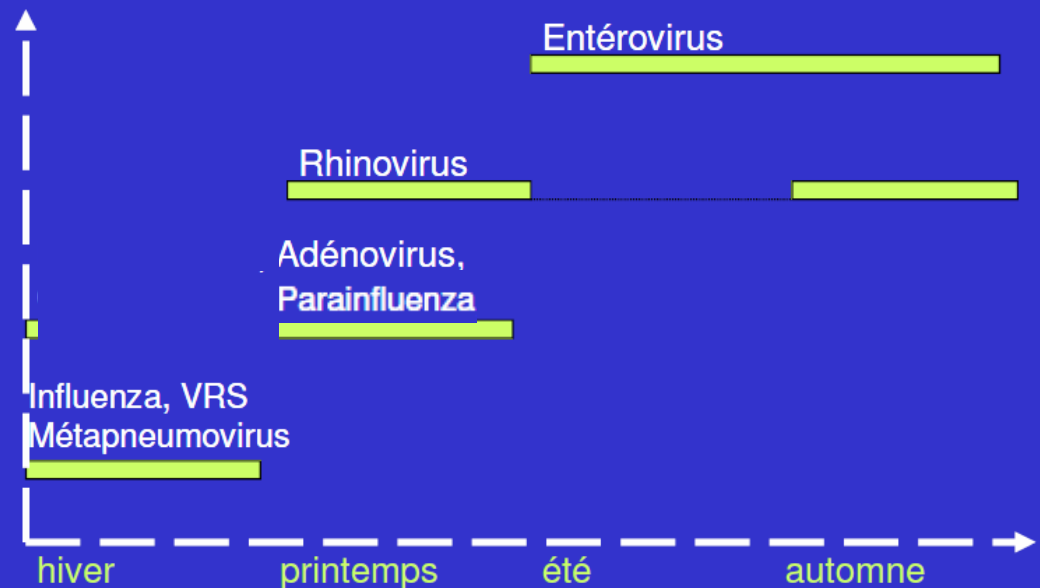
V. Rougeole

**Coxsackievirus,
echovirus**

Orientation diagnostic: Selon la répartition saisonnière

- VRS, Grippe, hMPV, VPI-1,2: en hiver
- VPI-3 et Adv: au printemps et en été
- Rhinovirus, coronavirus: pas de saison marquée
- Entérovirus: été et automne

INFECTIONS EPIDEMIQUES (importance variable selon les virus)



Orientation diagnostic: Selon l'expression clinique

| Syndrome | Virus respiratoires |
|-------------------|--|
| rhinite | RV, coronavirus, RSV, PIV, AdV |
| rhino-pharyngite | AdV, v. influenza |
| angine | HSV, coxsackievirus, EBV, echovirus |
| grippe | v. influenza |
| laryngo-trachéite | PIV-1,-2, v. Influenza, RSV, AdV |
| bronchite aiguë | RV, RSV, v. Influenza, PIV, AdV |
| bronchiolite | RSV, PIV-3, v. influenza, AdV, RV |
| pneumonie | v. influenza, AdV, RSV, PIV, hMPV |

Ne pas oublier:

Le métapneumovirus: Répartition recouvre celle du VRS, qui peut expliquer jusqu'à **20%** des infections respiratoires basses d'étiologie inconnue

Henrickson et al. Pediatr Infect Dis J 2004;23

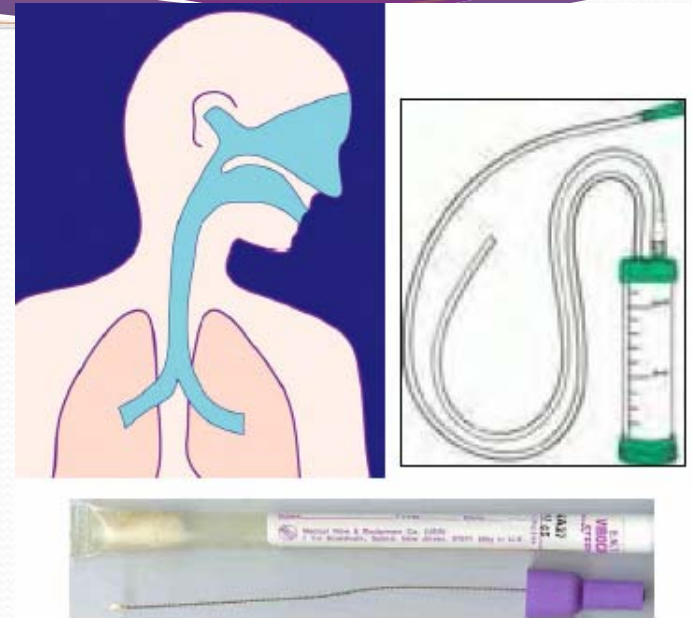
IV- Diagnostic virologique

Prélèvements

De préférence dans les 4j cliniques

- Types de prélèvement:

- Lavage-aspiration nasale (prélèvement de choix)
- Écouvillonnage nasal (et non pharyngé): recueil de ϕ épithéliales, milieu de transport et acheminement rapide à $+4^{\circ}\text{C}$ (moins sensible)



Types de prélèvement

Prélèvement nasal+++

- Adapté même pour les infections basses/bronchiolite à VRS

pas de différence significative entre un prélèvement nasal et bronchique

| % de positifs | Nez | Trachée |
|---------------|------|---------|
| IF | 69.4 | 66.1 |
| RT/PCR | 76.2 | 71.1 |

(Bronchiolites à VRS. Caen)

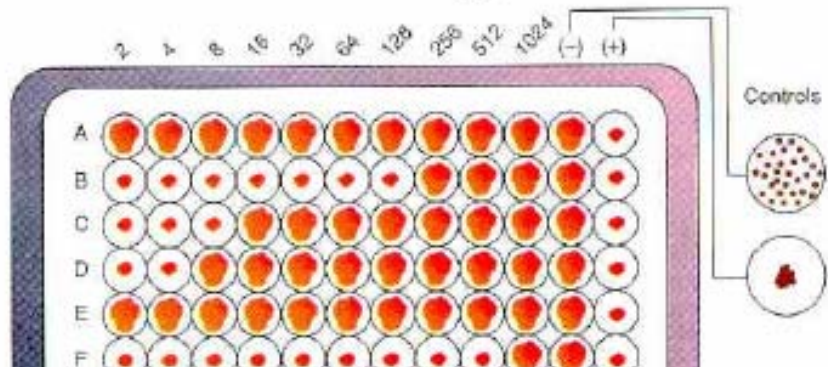
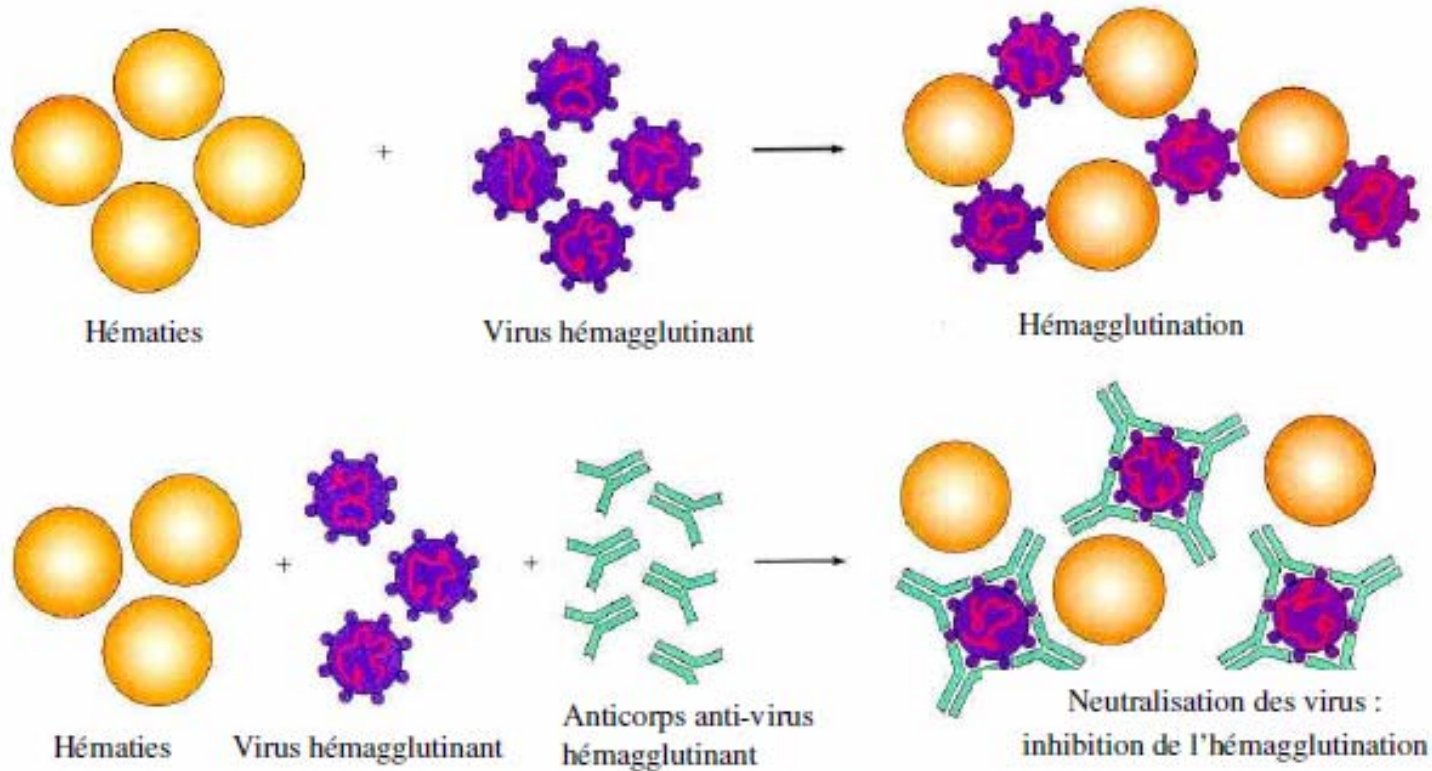
- **Autres:** liquide de LBA, prlvtrachéal (intubés)
fragments de biopsie, sang (virus virémiques)

IV- Diagnostic virologique

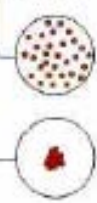
IV-1 Diagnostic indirect

- Nécessité de 2 sérums à 15j-21j d'intervalle:
 - soit séroconversion
 - soit ascension d'au moins un facteur 4
- Plusieurs test: IHA, RFC, ELISA...

Inhibition de l'hémagglutination (IHA)



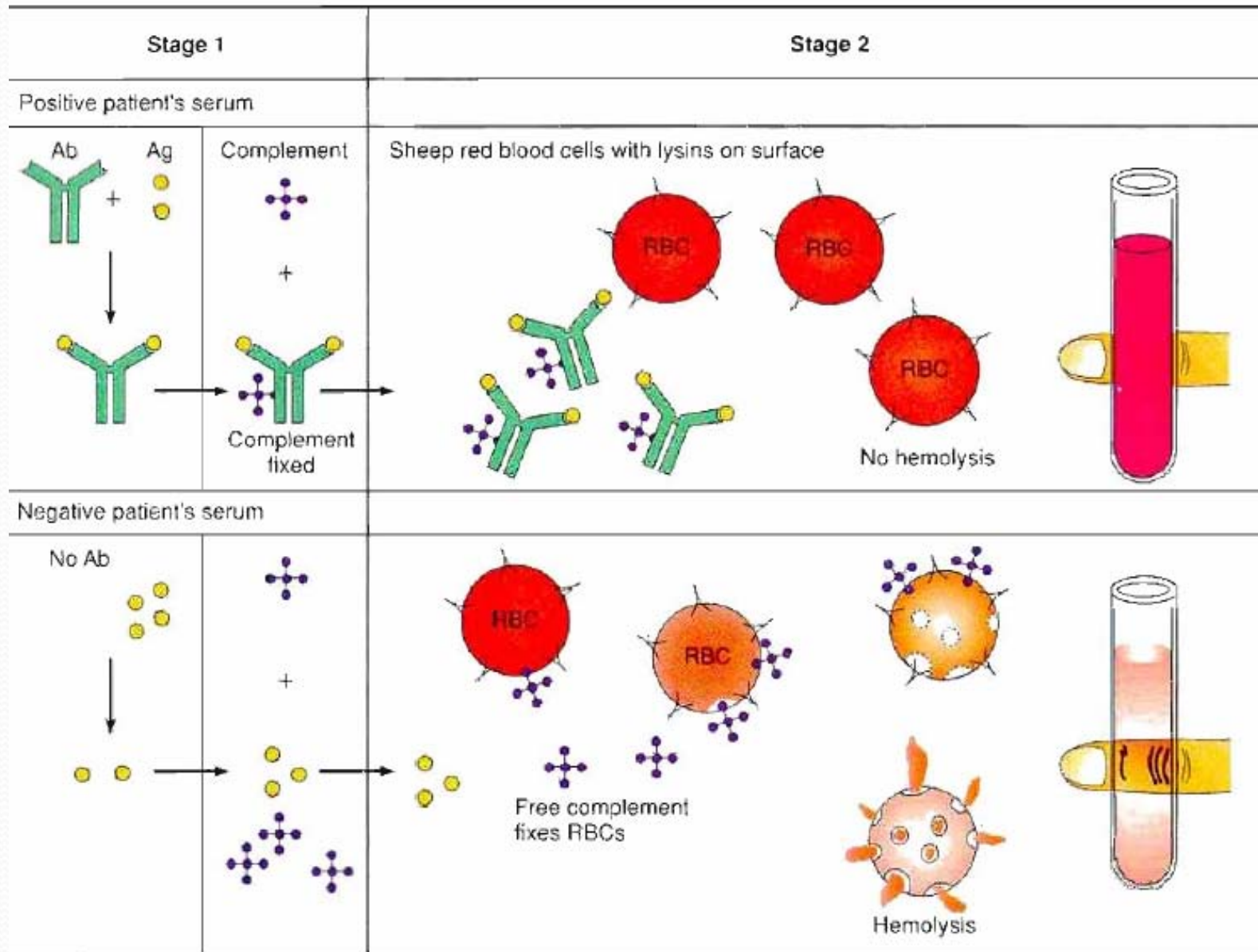
Controls



Contrôle négatif :
hémagglutination

Contrôle positif :
inhibition de
l'hémagglutination
(sédimentation)

Réaction de fixation du complément



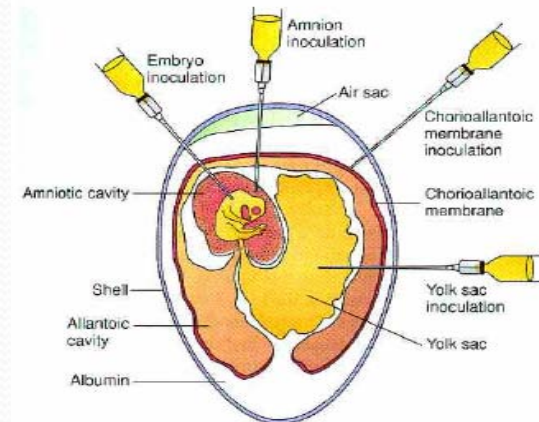
IV-1 Diagnostic indirect

- **Nombreuses limites:**
 - Sans intérêt chez les enfants < 1 an
 - Absence d'Ac en cas d'infection localisé au tractus respiratoire
 - Négatif à la phase aigue
- ➔ **Pas d'intérêt pour le dg positif**
- ➔ **Intérêt surtout épidémiologique rétrospectif**

IV-2 Diagnostic direct

1) Culture cellulaire

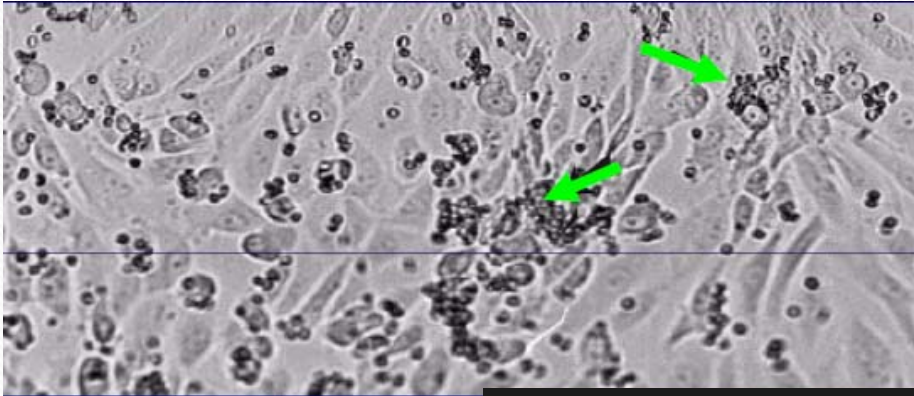
- **Virus de la grippe** (réservée aux labo spécialisés)
- **Inoculation du virus sur œuf de poule embryonné**
- ❖ Incubation (48h-4j) à 33-35°C
- ❖ Recherche d'une hémagglutination sur LA ou sur liquide allantoïque
- ❖ Si HA+: identification par IHA (Ac Spécifiques du types et du variants) / IF



Culture cellulaire

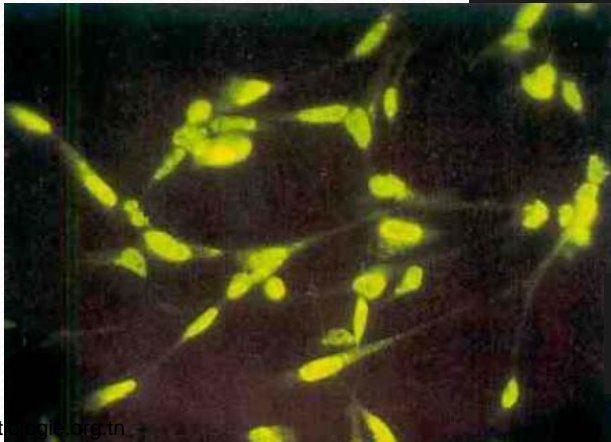
Virus de la grippe

- Culture sur Φ rénales de chien (MDCK):
- ❖ Révélation: ECP, hémadsorption, IF, IHA

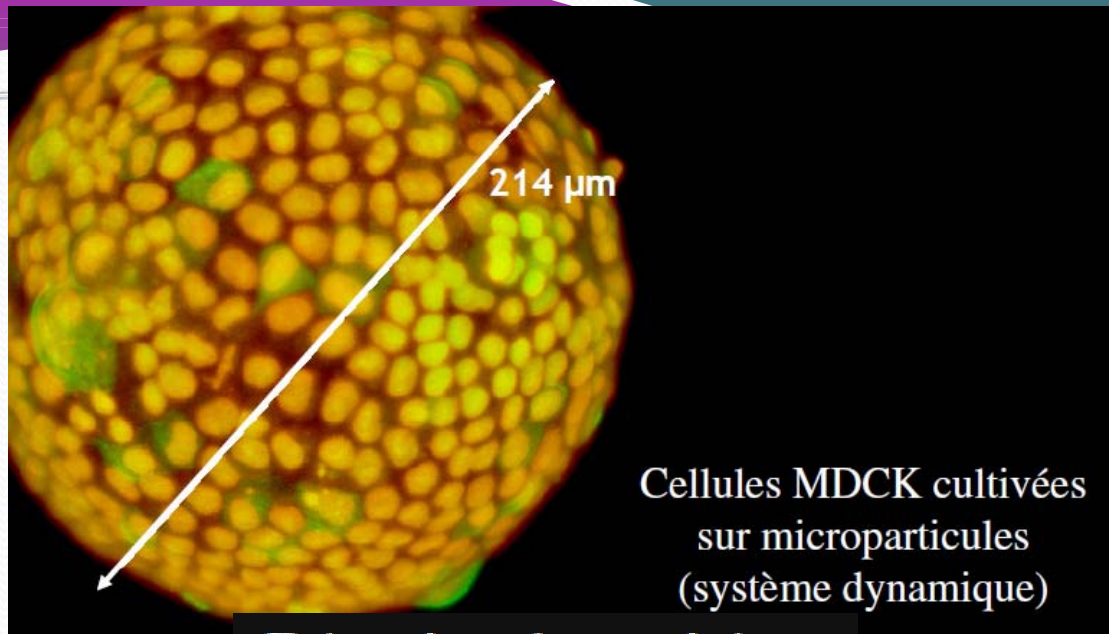


Hématies
adhérant à la
monocouche
cellulaire

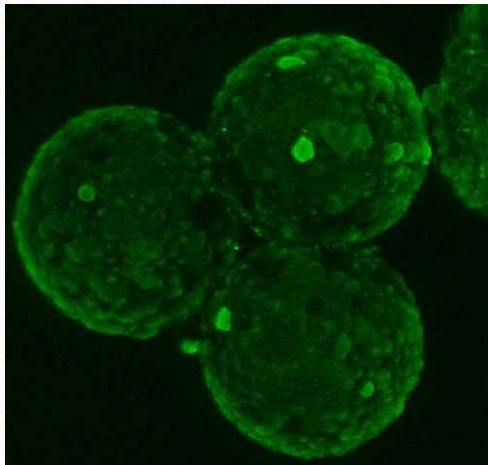
Culture de virus grippal sur cellules rénales de singe Rhésus.
Révélation par hémadsorption



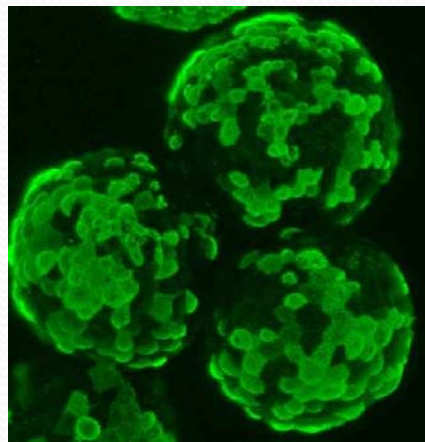
Culture de virus grippal sur cellules MDCK
Révélation par immunofluorescence



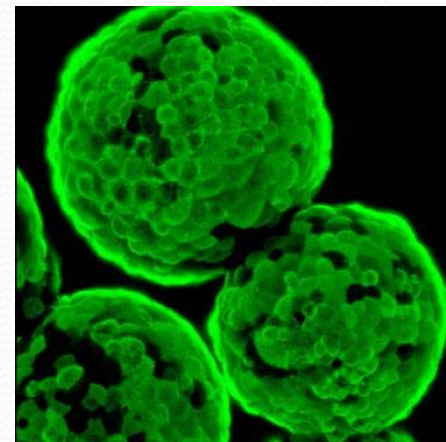
Détection des antigènes par Ac monoclonaux



Aspect à 5h



Aspect à 10h



Aspect à 22h

Culture cellulaire

Virus de la grippe

- ❖ Sensibilité > 60%
- ❖ Spécificité ~100%
- ❖ **Avantage:** sous-typage, virothèque, sensibilité aux antiviraux, composition vaccinale
- ❖ **Inconvénient:** délai (4-6 j : O/N ; sérotype > 1 sem)
infrastructures, biosécurité (P3)

Culture cellulaire

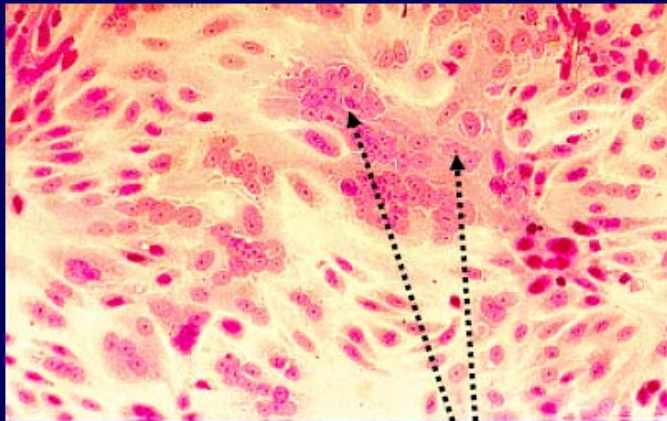
Lignées cellulaires

| virus | cellules | | | | | | | |
|------------------|-----------|---------------|-----|----------|---------|------|--------|-------|
| | Humaines | | | animales | | | | |
| | diploïdes | hétéroploïdes | | singe | | | | chien |
| | MRC5 | Hep-2 | KB | BGM | LLC-MK2 | VERO | Ma 104 | MDCK |
| ADV | + | +++ | +++ | | | | | |
| herpès | +++ | +++ | | | | +++ | | |
| varicelle (AVZ) | +++ | | | | | +++ | | |
| CMV | +++ | | | | | | | |
| poliovirus | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | |
| Coxsackievirus A | +++ | | | +++ | | | | |
| coxsackievirus B | | | | | | | | |
| (rhinovirus) | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | |
| Echovirus | | | | | | | | |
| (entérovirus) | +++ | +++ | | +++ | | | | |
| rubéole | +++ | | | | | +++ | | |
| Influenza | | | | | +++ | | | +++ |
| VRS | +++ | +++ | | | | + | | |
| ParaInfluenza | | +++ | +++ | | +++ | | +++ | |
| rougeole | +++ | | | | | +++ | | |

Culture cellulaire

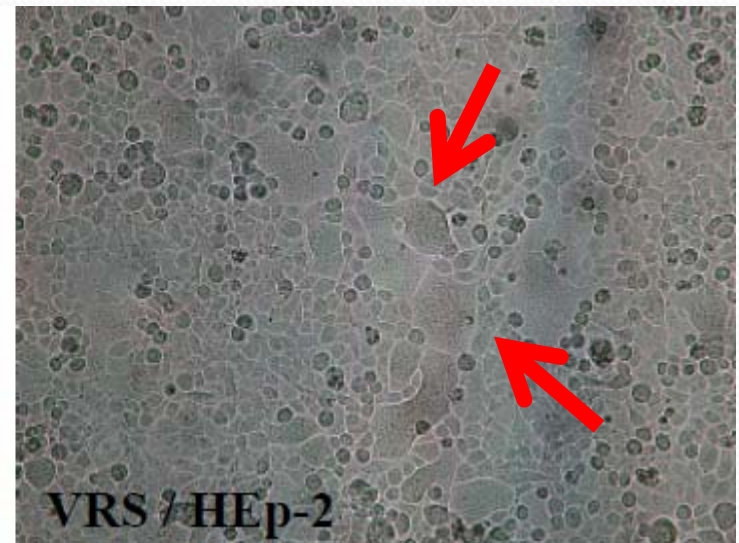
Autres Virus

- Lignées cellulaires adaptées au virus recherché
- Rechercher un ECP ou les Ag viraux



Formation de syncytia

Culture de virus respiratoire syncytial



Culture cellulaire

Autres Virus: Inconvénients

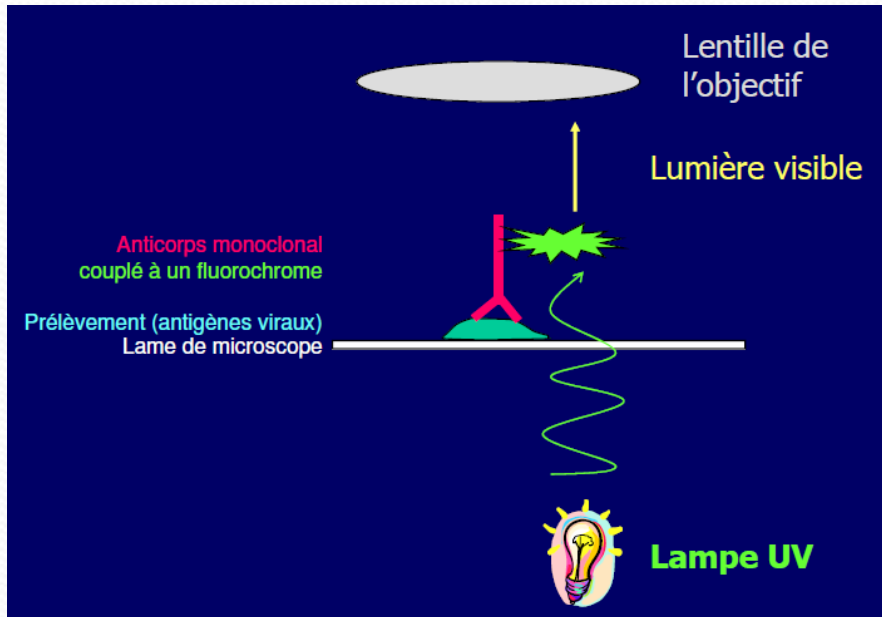
- Nombreux virus → efficacité limitée & utilisation non systématique
- Pour une bonne sensibilité: acheminement rapide ou utilisation d'un milieu de transport pour éviter que les virus ne soient inactivés
- Toxicité des sécrétions respiratoires :
 - Inhibiteurs de la croissance virale : INF, anticorps ...
 - Contamination bactérienne
- Délai de réponse : (VRS : 5-10j)

IV-2 Diagnostic direct

2) Détection directe des antigènes viraux

- Techniques:
 - Immunofluorescence directe ou indirecte (IFD/IFI)
 - Tests immunoenzymatiques (ELISA)
 - Immunochromatographie sur membrane

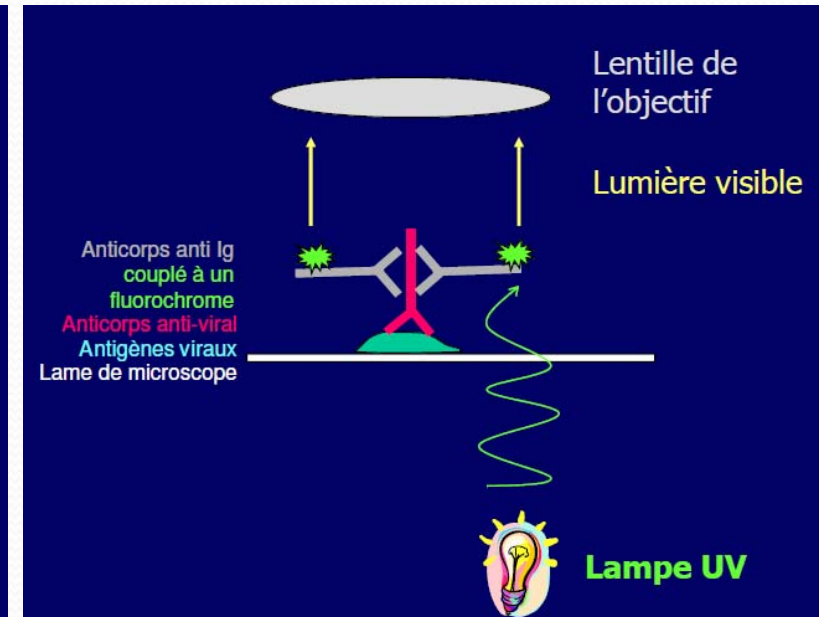
IFD ou IFI



Virus détectables

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

- Virus de la Rougeole
- Virus Varicelle-Zona



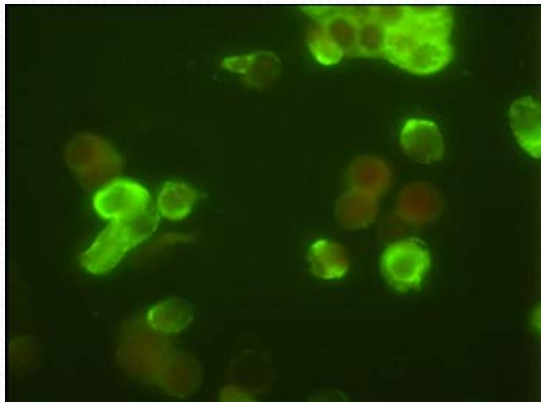
Virus non détectables

- Rhinovirus : nombreux sérotypes
- Enterovirus : nombreux sérotypes

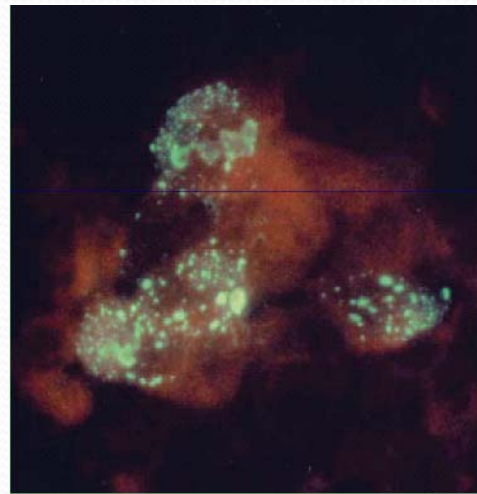
- EBV : pas de prélèvement adéquat
- Oreillons : //

Mise en évidence du VRS sur sécrétions nasopharyngées

Coronavirus IFI



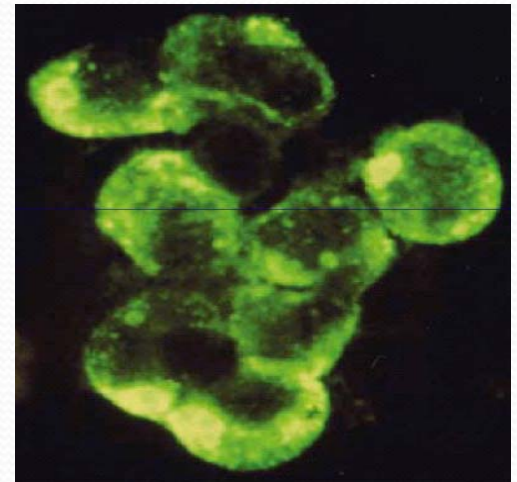
IFD



**Mélange de 3 anticorps
monoclonaux**

**Fluorescence
particulaire localisée**

IFI



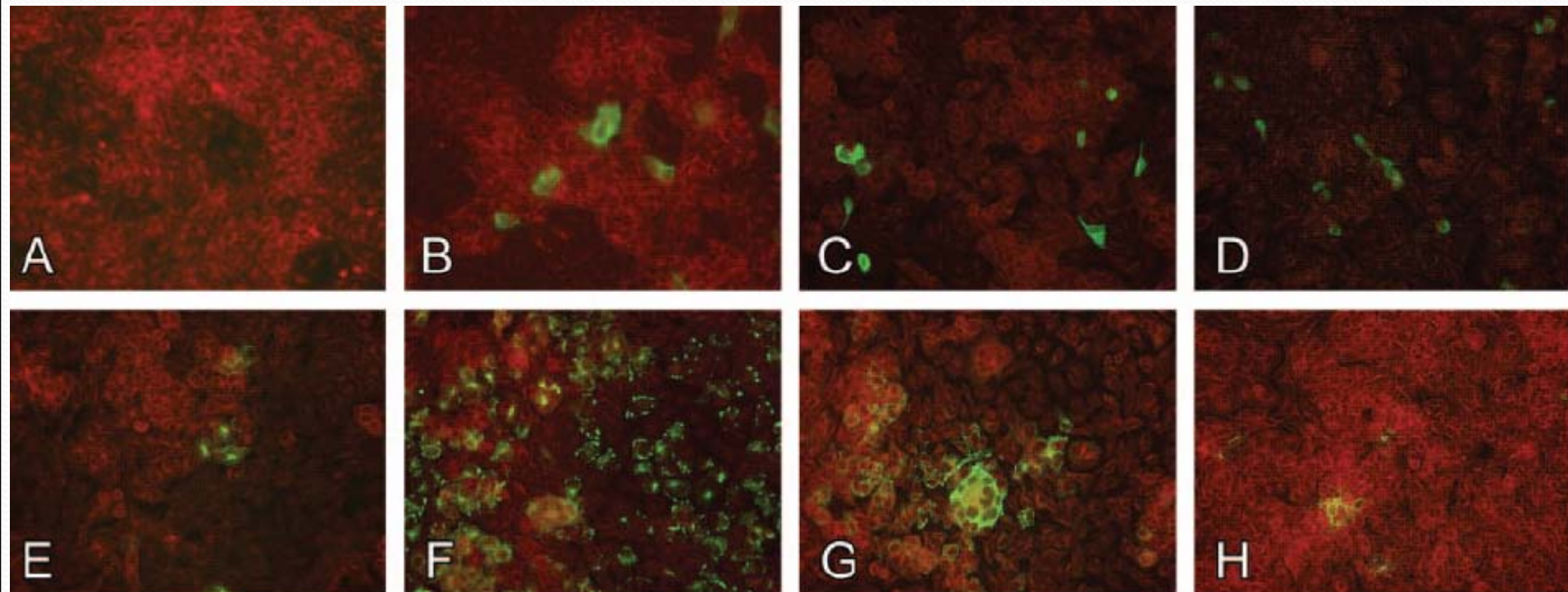
Ac I^{re} : Ac de lapin
polyclonal anti-VRS

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

**Fluorescence
cytoplasmique
intense**

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

Screening: ciblant plusieurs virus



- (A) Contrôle (-)
- (B) Adenovirus
- (C) Influenza A (D) Influenza B virus
- (E) VPI-1; (F) VPI-2; (G) VPI-3
- (H) RSV

Avantages et inconvénients de l'immunofluorescence

- **Avantages**

- Rapidité: 1h-3h
- Les virus peuvent être inactivés → moins de contraintes dans les délais d'acheminement
- Appréciation de la qualité du prélèvement (observation des ϕ infectées): éviter les faux (-) → bonne spécificité
- Détection simultanée de plusieurs virus sur une même lame
- Appréciation qualitative et quantitative
- Bonne sensibilité, cout peu élevé

- **Inconvénients**

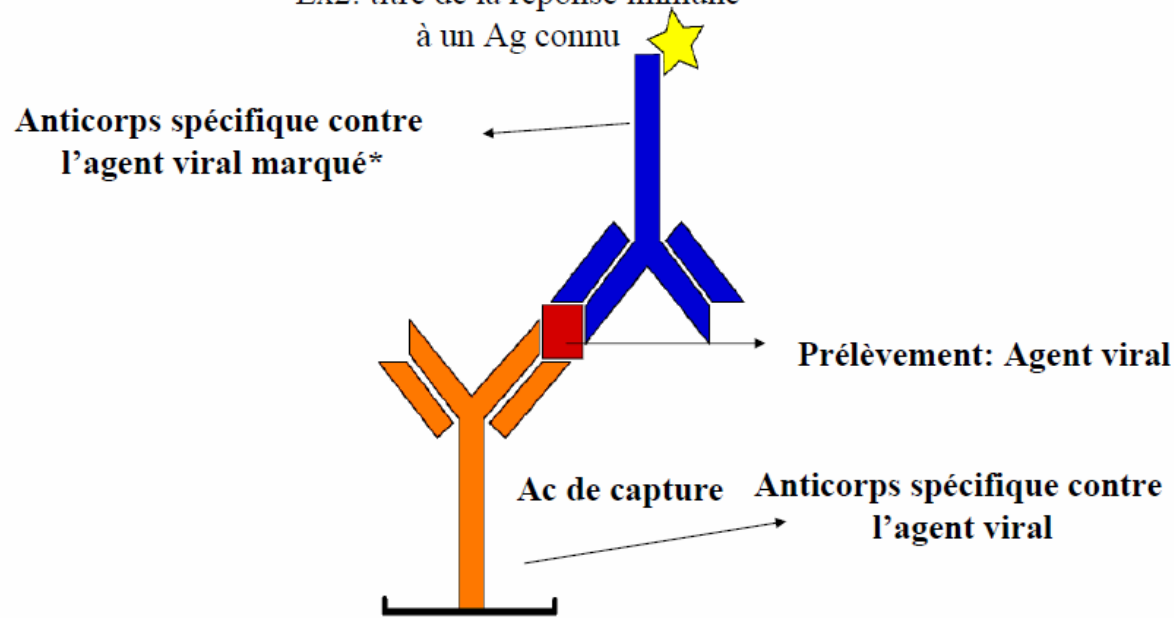
- Lecture par manipulateur expérimenté
- Nécessité de prélèvements < 48h

Détection des Ag viraux par technique ELISA

ELISA capture d'Ag

Ex1: Présence d'un Ag dans un Prélèvement

Ex2: titre de la réponse immunitaire à un Ag connu



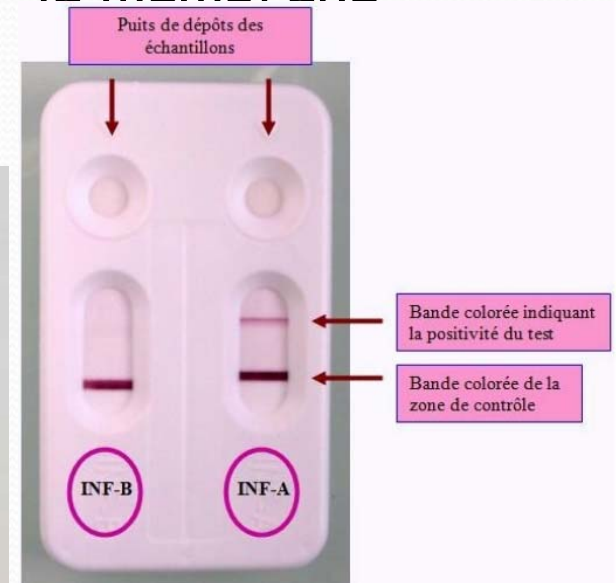
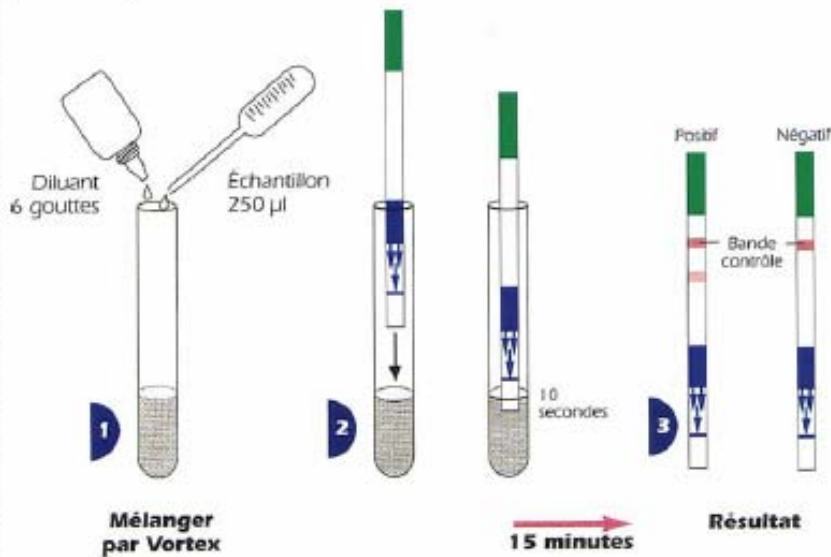
- Pas de contrôle de qualité des prélèvements
- 1 coating / antigène viral (plusieurs manips / pvmt)

IV-2 Diagnostic direct

3) L'immunochromatographie sur membrane: Tests rapides

- Détecter la présence d'Ag viraux à l'aide d'Ac spécifiques (anti-VRS ou antigrippaux) adsorbés sur la membrane

Mode opératoire



Sensibilité des Tests rapides

- Sensibilité < culture (75 à 95 %) et < PCR (45 à 75 %)
- Spécificité 100%

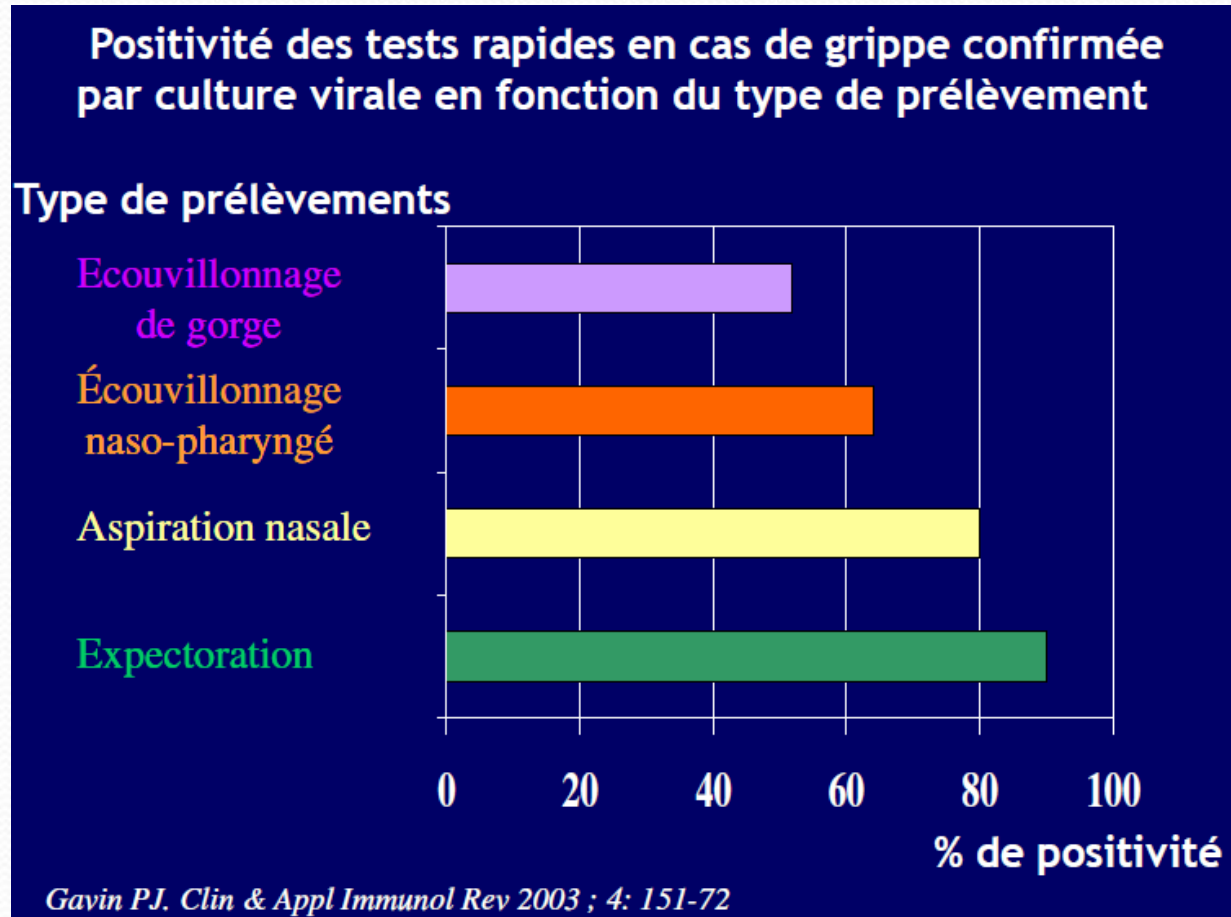
Les tests de détection rapide du VRS

| Tests | Industriels | Sensibilité/ immunofluorescence (%) | Sensibilité/culture (%) | Sensibilité/PCR (%) | Spécificité (%) |
|--|------------------|--|----------------------------|------------------------|--------------------|
| Directigen RSV [2,3] | Becton-Dickinson | | 80,8 | 69,6 | 100 |
| Now RSV [1] | Binax Oxoid | | 89 | | 100 |
| RSV Stick (Freymuth, communication personnelle) | BMD | 87,5 | | | 100 |
| RSV Respi-Strip (Freymuth, communication personnelle) | Elitech | 96 | 90 | | 93-100 |

Les tests de détection rapide des virus grippaux

| Tests | Industriel | Lieu du test | Sensibilité/culture (%) | Sensibilité/PCR (%) | Spécificité (%) |
|------------------------------|------------------|--------------|----------------------------|------------------------|--------------------|
| Directigen Flu A + B [4,7,8] | Becton-Dickinson | | 43-95 | 55-85 | 76-83 |
| Now FluA – FluB | Binax-Oxoid | | 82 | | 94 |
| Quick Vue [4,5] | Quidel Argène | Labo | 74-95 | 55-80 | 7-83 |
| | | Cabinet Lit | | 36-44 74 | 97 |

- Performance liée à la **qualité et type** du prélèvement

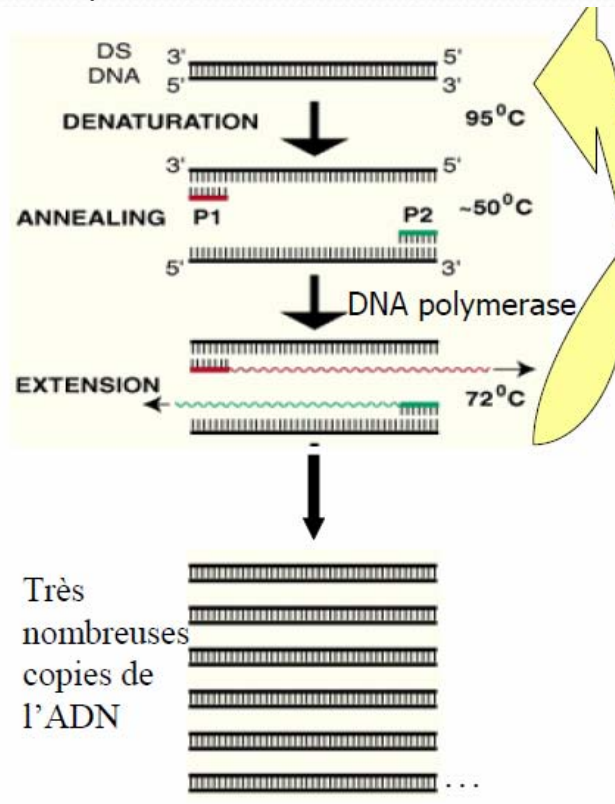


- A l'âge du patient: VPP enfants >>> VPP adultes
Titre viral moins élevé en cas de réinfection

IV-2 Diagnostic direct

4) Détection du génome viral par PCR

- Amplification de séquences génétiques d'ADN/d'ARN caractéristiques d'un virus.



The diagram illustrates the PCR process in three stages:


- DENATURATION:** A double-stranded DNA (DS DNA) molecule is heated to 95°C, causing the two strands to separate.
- ANNEALING:** The separated strands are cooled to approximately 50°C. Two primers, P1 and P2, bind to the single strands.
- EXTENSION:** DNA polymerase is added, and the temperature is raised to 72°C. The polymerase synthesizes new DNA strands, extending the primers.

After several cycles, the process results in "Très nombreuses copies de l'ADN" (Very many copies of the DNA).

PCR = polymerase chain reaction

1989

30 x



PCR (ADN) / RT-PCR (ARN)

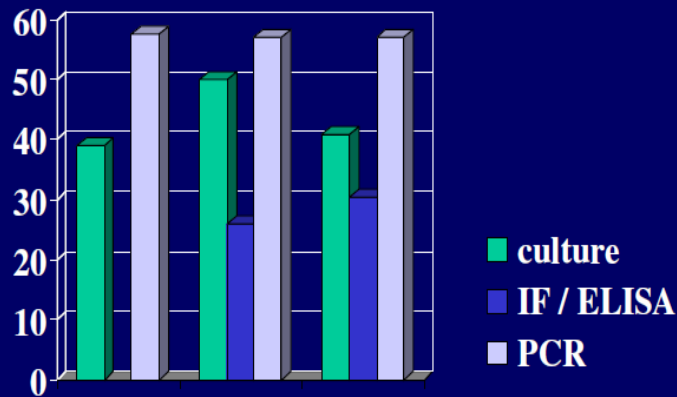
Tests Moléculaires pour les virus respiratoires

| Virus | Amplification | Région du génome |
|----------------------|--------------------------------|--------------------|
| <i>VRS</i> | NASBA | F |
| <i>Influenza A/B</i> | NASBA | M / NS |
| <i>hMPV</i> | Light Cycler/NASBA | N/ M |
| SARS | NASBA | <i>pol</i> / N |
| <i>PIV 1-4</i> | Multiplex-amplification | HA |
| Coronaviruses | Multiplex-PCR | <i>pol</i> |
| <i>NL-63</i> | Light Cycler | N |
| <i>ADV</i> | PCR | Hexon |
| <i>Rhino/Entero</i> | Multiplex PCR | VP-4 and -2 / 5'NC |

PCR: Avantages et inconvénients

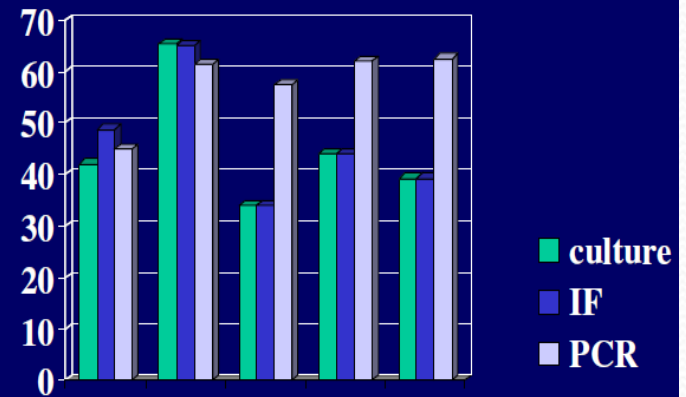
- Sensibilité de la PCR >> culture cellulaire (~ 2 fois plus) surtout pour la PCR en temps réel

Apport de la PCR dans le diagnostic de la grippe



Ellis, 1997
Magnard, 1999
Freymuth, 1999

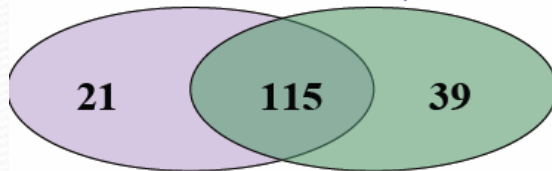
Apport de la PCR dans le diagnostic des infections à VRS



Cubie, 1992
Paton, 1992
Freymuth, 1995
Henkel, 1997
Freymuth, 1997

Comparaison Sensibilité entre Culture cellulaire versus Biologie Moléculaire (bronchiolites année 2003/2004 et 2004/2005)

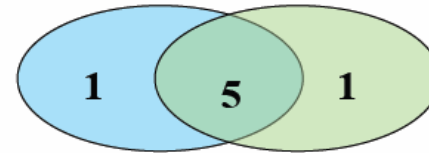
Détection RSV (bioMérieux)



Culture Cellulaire

Biologie moléculaire

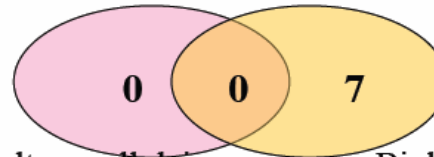
Détection Influenza (bMx)



Culture cellulaire

Biologie moléculaire

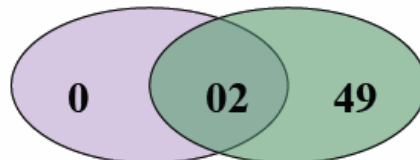
Détection Adénovirus



Culture cellulaire

Biologie moléculaire

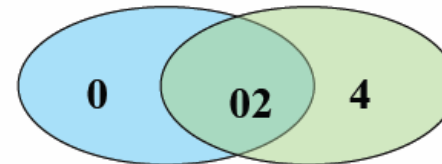
Détection Rhinovirus



Culture Cellulaire

Biologie moléculaire

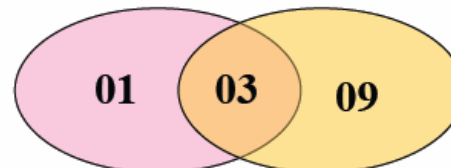
Détection Entérovirus



Culture Cellulaire

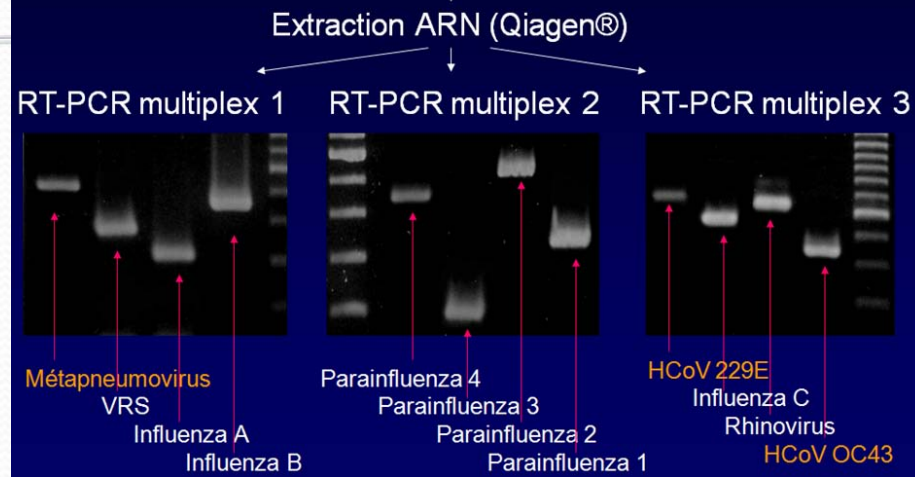
Biologie moléculaire

Détection ParaInfluenza



Culture Cellulaire

Biologie moléculaire



- **PCR Multiplex:** Possibilité de cibler plusieurs virus mais (-) sensible
- Délai court de réponse, Automatisable, Standardisés
- **Séquençage des génomes:** Identification de nouveaux virus et variants, étude phylogénétique...
- Risque (faible) de faux (+) (portage du virus dans les VAS chez les sujets asymptomatiques en période d'épidémie)

- **Intérêt++ phase aigue:** Délais de positivité de la PCR dans les sécrétions respiratoires:

~ **10 j** (grippe) et ~ **5 semaines** (rhinovirus)

Négative en dehors de la phase aigue (> 1mois)

- **Performances variables selon:**

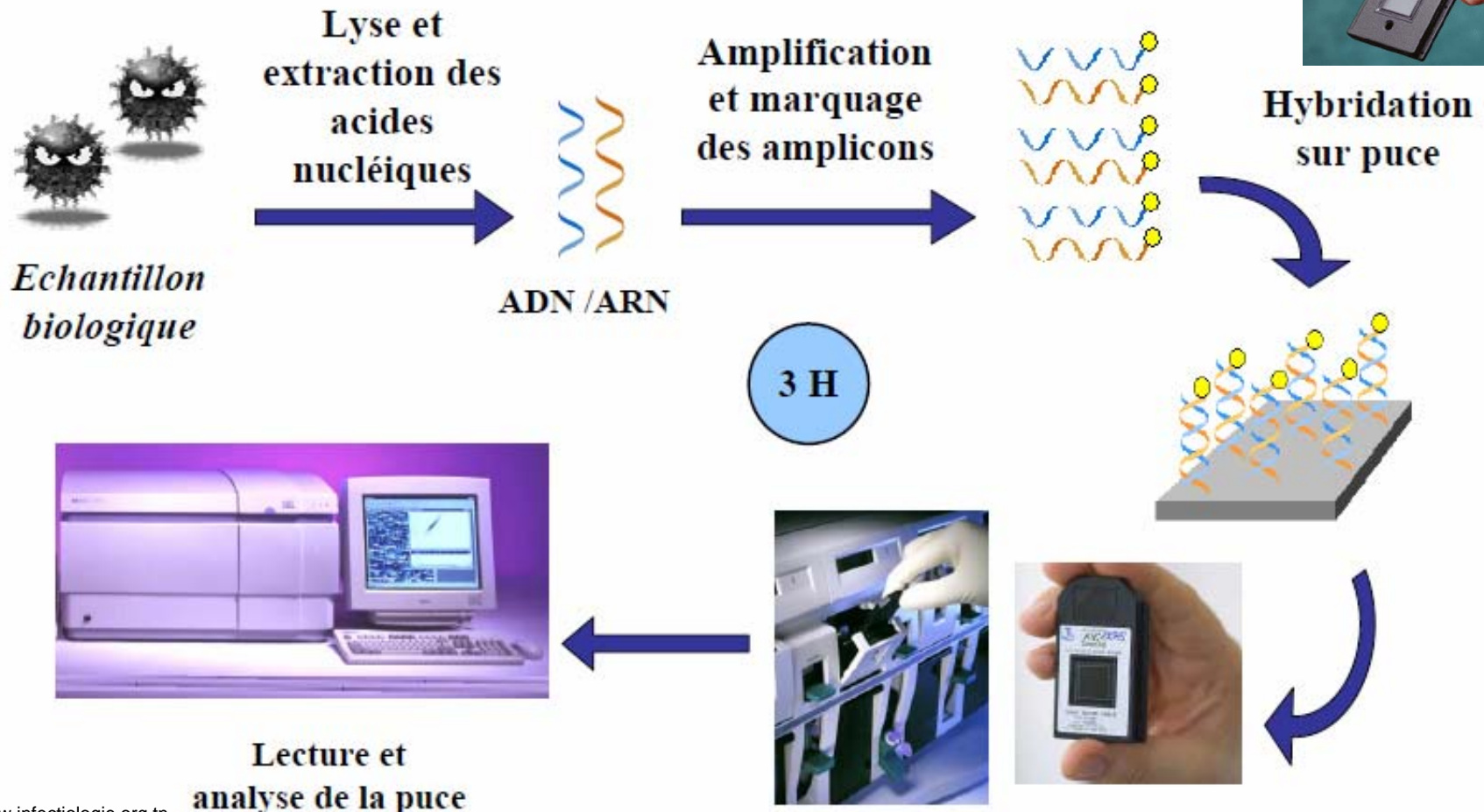
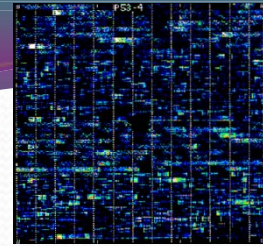
- Nature et qualité du prélèvement
- Type d'extraction
- PCR simple, PCR nichée, PCR multiplex
- Localisation des amorces : choix du gène à amplifier
- Type de révélation

- **Dispositif couteux**

➔ **La PCR tend à devenir la nouvelle technique de référence (surtout la PCR en temps réel)**

IV-2 Diagnostic direct: perspectives

Détection des génomes viraux par la technique des puces à ADN



Le sujet DNA chip panel respiratoire

Bactéries

Mycoplasma pneumoniae
Légionella pneumophila
Bordetella pertussis
tuberculosis

Chlamydia pneumoniae
Coxiella burnetti
Mycobactérium

Virus

Para influenza 1,2,3, 4
RSV A et B
HSV
Rhinovirus
(hMPV)

Influenza A, B, C
CMV
Adenovirus respiratoires
Coronavirus OC43 et 229 E

Parasite

Pneumocystis carinii

Conclusion

| | Détection des Ag viraux | | | Culture cellulaire | PCR | Sérologie | | |
|----------------------|-------------------------|-------|-------------|--------------------|-----|-----------|-----|-------|
| | IF | ELISA | Test rapide | | | RFC | IHA | ELISA |
| Grippe A et B | + | + | + | ++ | +++ | +/- | + | |
| VRS | ++ | ++ | + | + | +++ | +/- | | |
| PIV-1, -2, -3 | ++ | | | +/- | ++ | +/- | + | |
| Adv | +/- | +/- | | + | +++ | + | | |
| RV | | | | + | ++ | | | |
| Coronavirus | + | | | | +++ | | | |