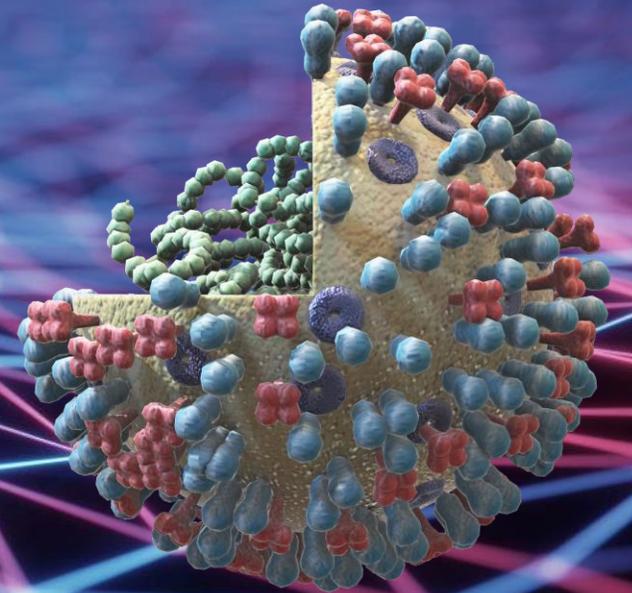


DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

LAINCER-MERDJANE F

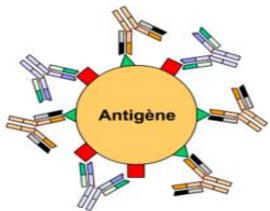


STRATÉGIE DE DIAGNOSTIC

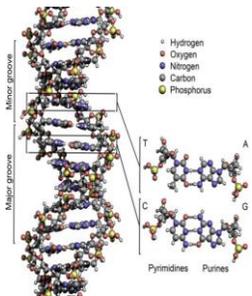
Diagnostic direct



Virus entier



Antigènes



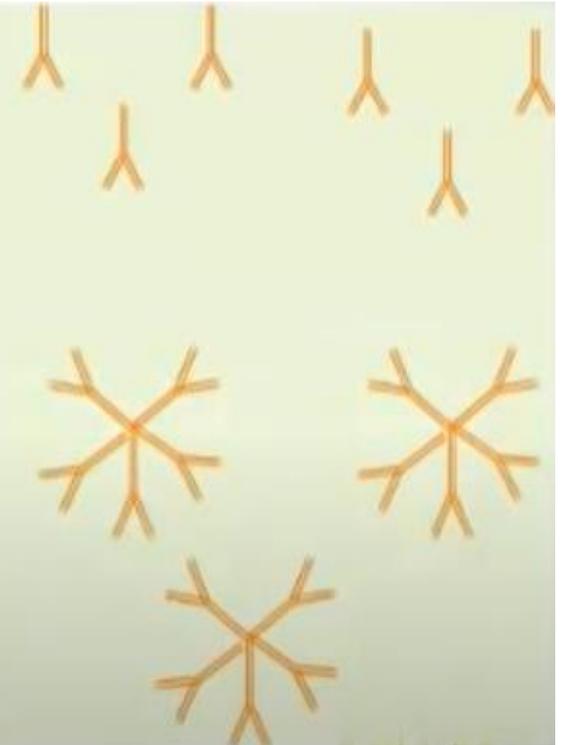
Acides nucléiques



Diagnostic indirect

IgG

IgM



STRATÉGIE DE DIAGNOSTIC

Etapes analytique

- Le bon choix du site de prélèvement
- Quantité suffisante pour l'analyse
- Bonnes conditions de transport, transfert rapide vers le laboratoire
- L'identification du nom, prénom date de prélèvement et lieu de prélèvement sont indispensables

Etapes près-analytique

Prélèvement

Transport

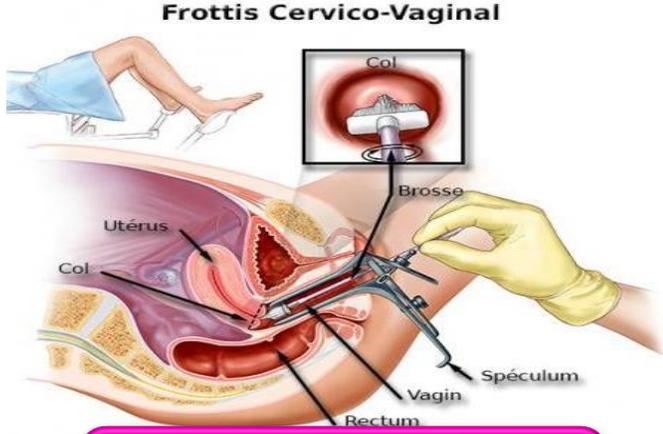
enregistrement



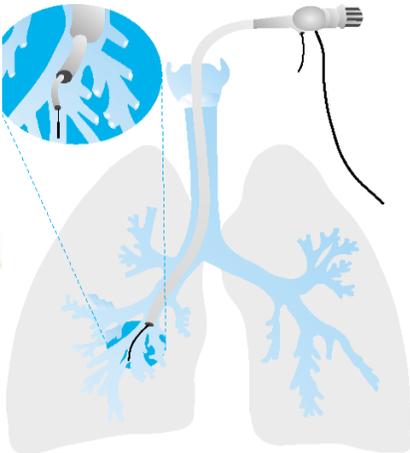
Urines



Sang



Prélèvements
génétaux



Liquide broncho-
alvéolaire

Site du
prélèvement



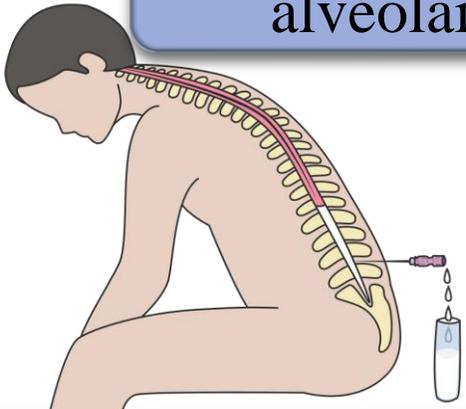
Selles



Sécrétions nasales



Prélèvement cutanés

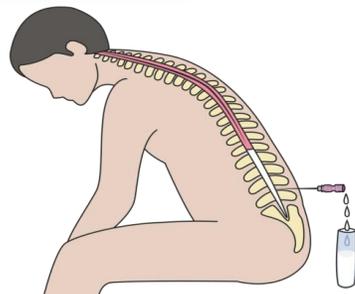


Liquide céphalo-
rachidien

TRANSPORT

Prélèvement ne nécessitant pas de milieu de culture

Tubes sec stérile



+ EDTA

Prélèvement nécessitant des milieu de culture

Gorge
Conjonctive



4 C° /4h

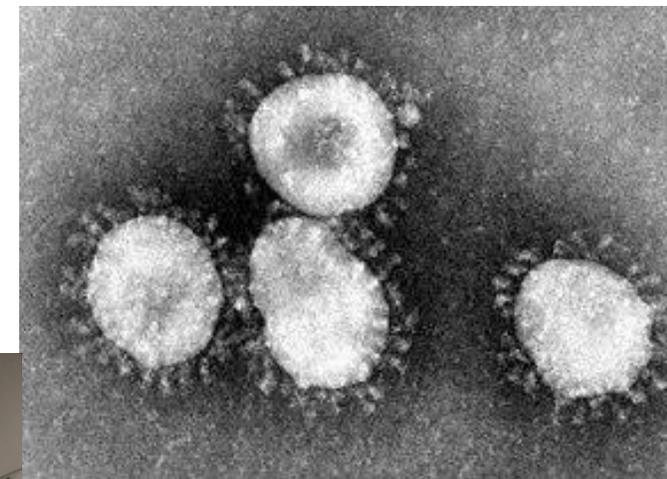
Diagnostic direct

Microscopie électronique

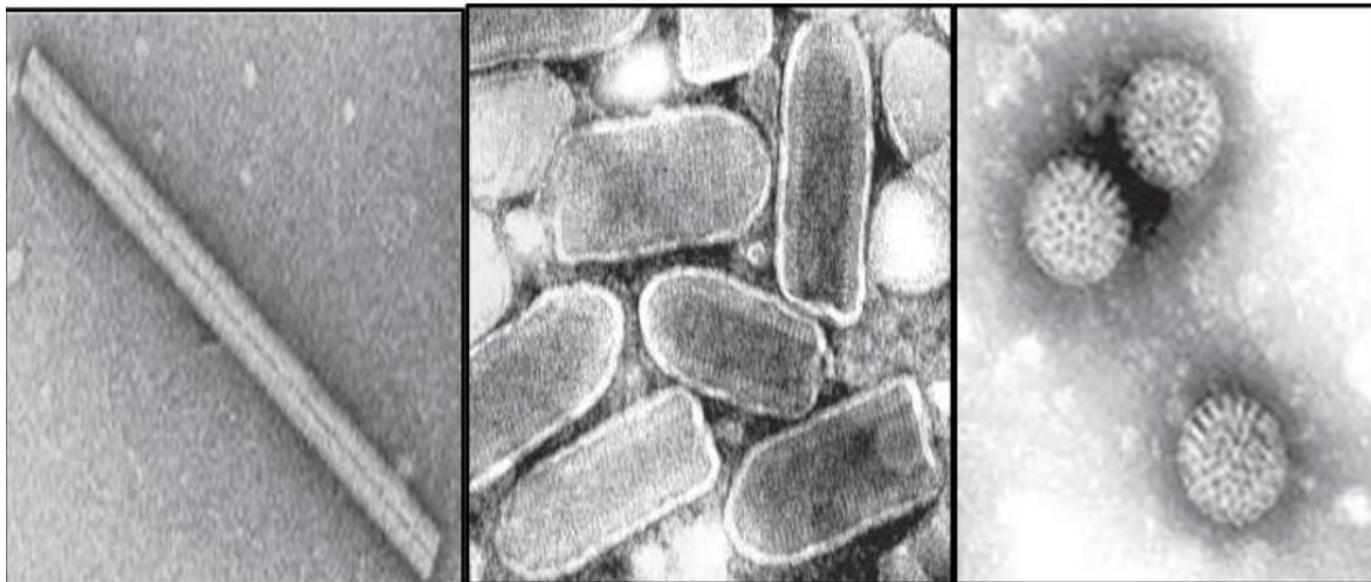
Culture des virus



Virus entier



Prélèvement $10^6/ml$



B

C

D

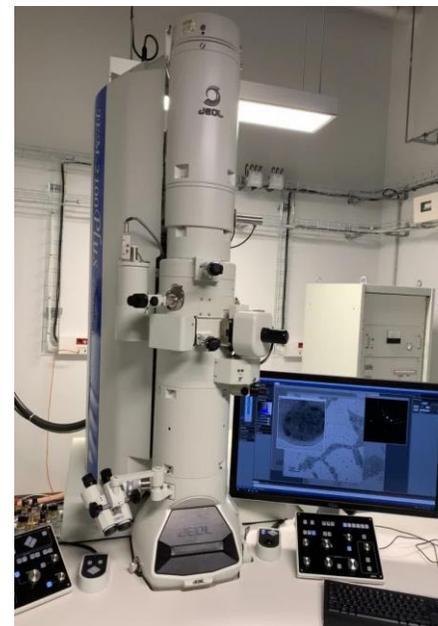


Figure . Observations au microscopie électronique, (B) virus de la mosaïque du tabac. (C) virus de la stomatite vésiculaire rhabdovirus (D) rotavirus humain.

CULTURE DES VIRUS

Culture in vivo

Inoculation d'un animal



Sur des œufs
(ovoculture)



Culture in vitro

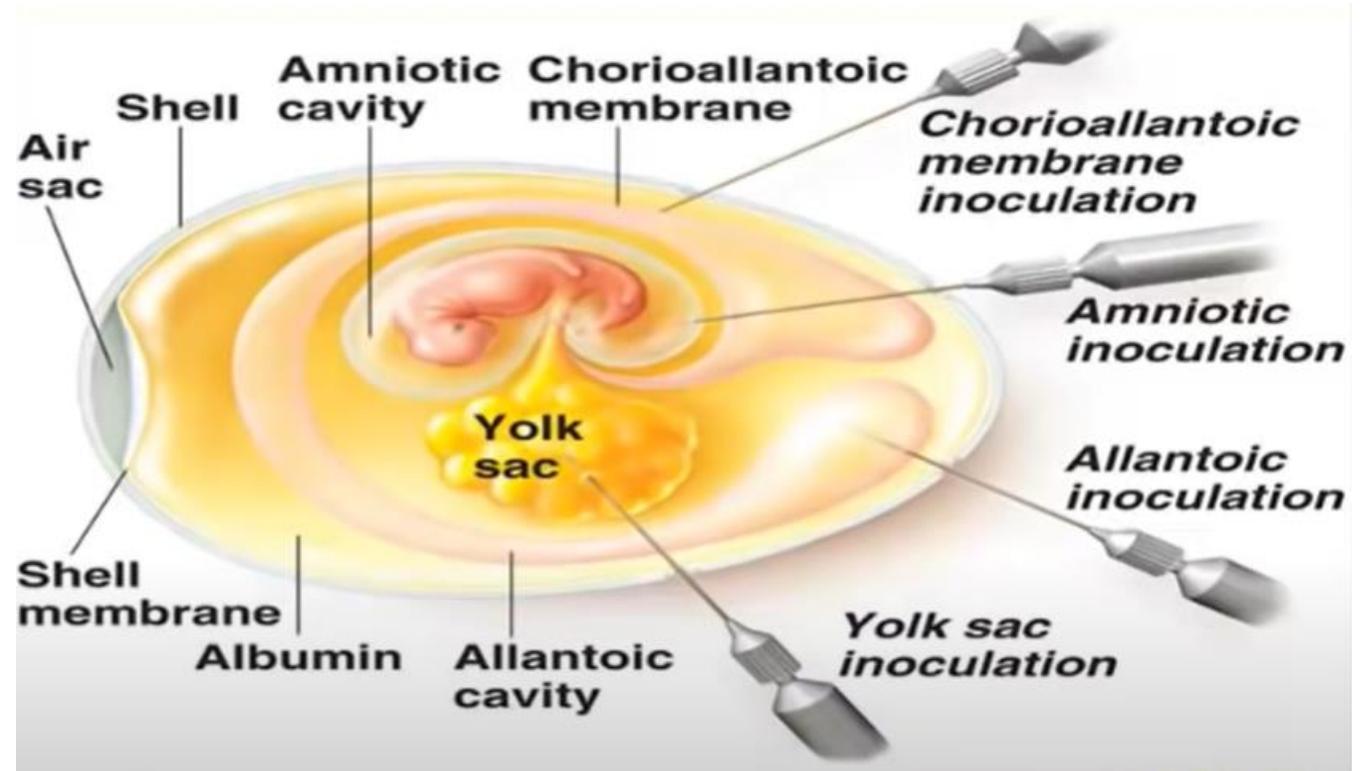
Inoculation des virus à des animaux **sensibles** si virus **incultivables** par les deux autres méthodes. Elle nécessite:

- une **animalerie**: (souriceaux, cobayes, lapins, poulets, génisse)
- une bonne connaissance des *voies d'inoculation*
- une *observation journalière* des animaux pendant 3 à 4 semaines.

CULTURE DES VIRUS

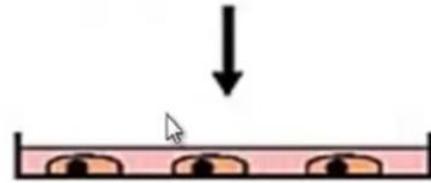
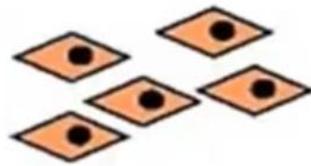
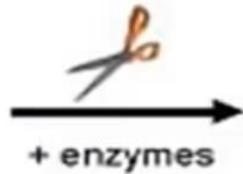
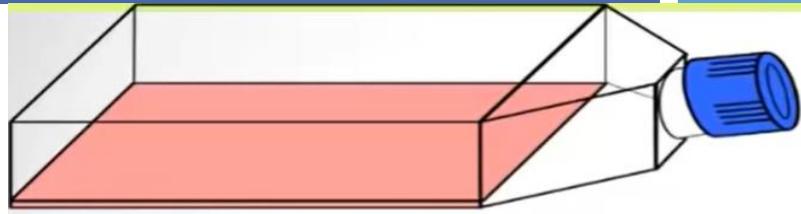
Culture in vivo

Sur des œufs
(ovoculture)



Cette technique est actuellement utilisée pour l'isolement, l'entretien et la production d'antigènes et de vaccins des **virus grippaux**





Tapis continu d'une seule couche cellulaire

Culture in vitro

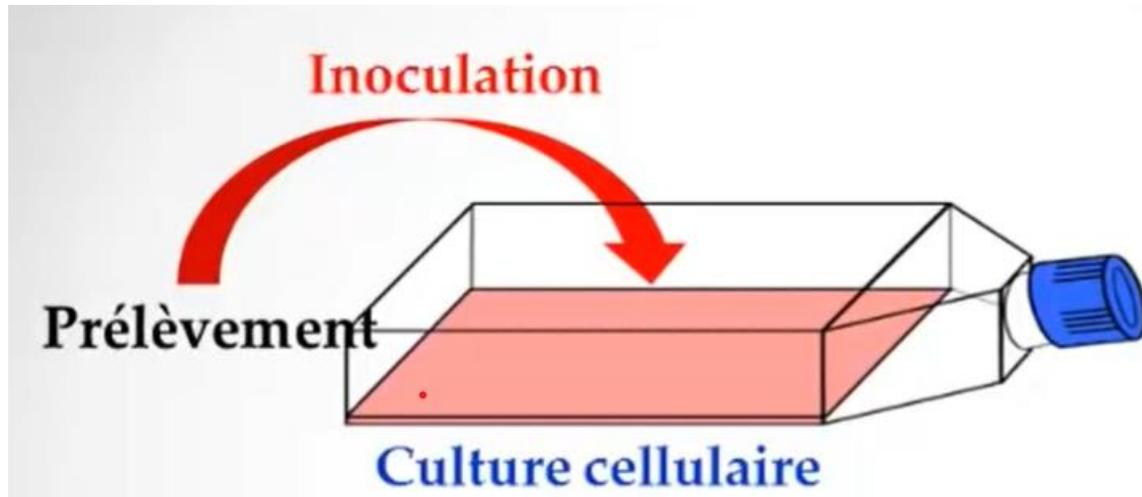
Sur culture cellulaire

Milieu synthétique

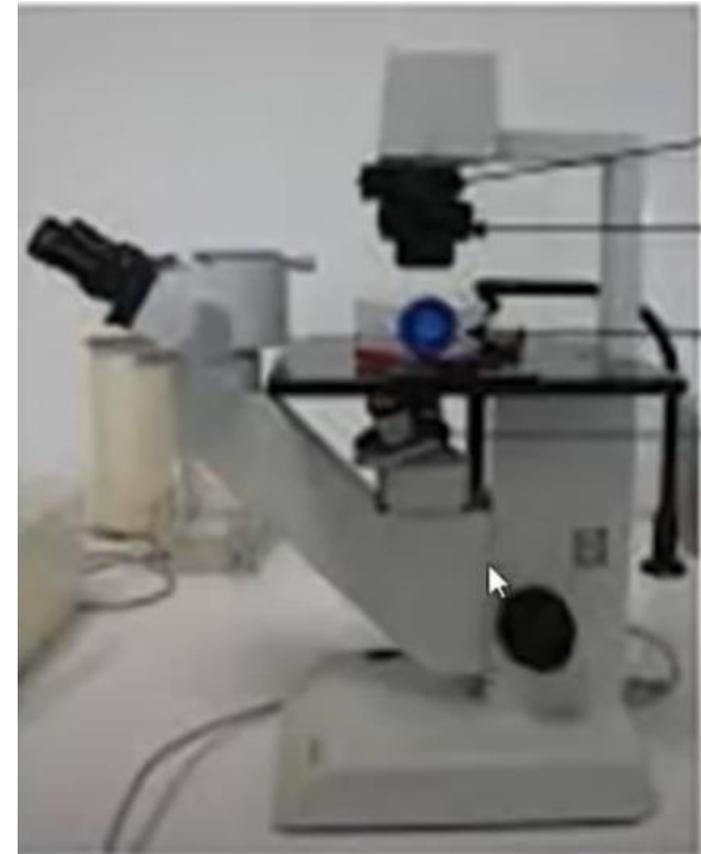
- **Sels minéraux**: ils maintiennent l'isotonicité du milieu
- **Glucose**: source de carbone et d'énergie
- **Acides aminés** : source d'azote et facteur de croissance.
- **Vitamines** : facteur de croissance
- **Bicarbonate de sodium**: tampon
- **Rouge de phénol** : indicateur de pH révélant la culture de champignons ou bactéries
- **Sérum de veau foetal (SVF)**: apporte facteurs de croissance,
- **fibrinolectine**: permet l'ancrage des cellules au flacon.

Antibiotiques : évitent la contamination bactérienne
Un antifongique : évite la contamination fongique.

CULTURE DES VIRUS



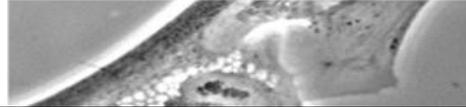
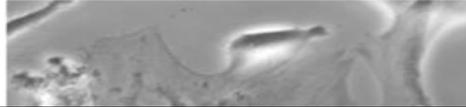
Observation au microscope optique
3 fois/semaine



A

NI

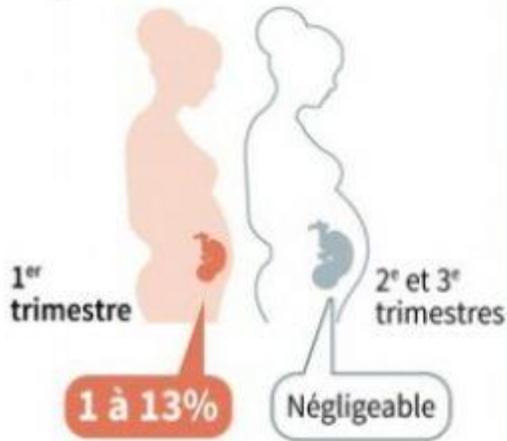
ZIKV



Zika et microcéphalie

Des «dizaines de milliers» de bébés pourraient naître avec cette malformation

► **Risque de microcéphalie**
d'un fœtus infecté
par le virus Zika



Une maladie habituellement rare
0,02 à 0,12%
de toutes les naissances aux États-Unis

Sources : New England Journal of Medicine, CDC, Cell Stem Cell

► **La microcéphalie**

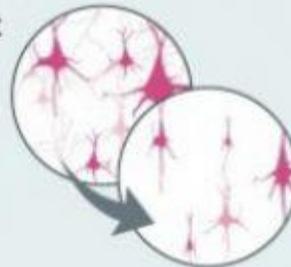
Diminution
de l'encéphale
et du périmètre
crânien

Taille normale
de la tête

Les cellules progénitrices neurales
sont affectées par le Zika

90% meurent
ou n'arrivent
plus à se
développer

La formation
des neurones
est entravée



Virus propagé
par le moustique
Aedes

► **Conséquences**

In utero

Si atteinte
cérébrale
sévère

Mort

Nouveau-né

Infirmité
cérébrale
plus ou moins
intense

Déficit
moteur

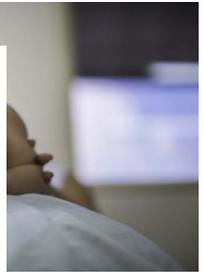
Déficit
cognitif

1 695

Cas de microcéphalie
recensés en Amérique latine
et aux États-Unis,
au 7 juillet 2016

© AFP

cyto
(E
mic
c
E



Typical Head Size



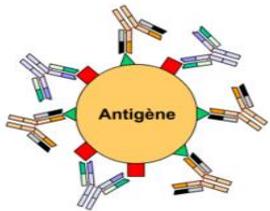
A. Des astrocytes ont été infectés par le virus Zika et observés au microscope 24 h plus tard. NI : cellules non infectées ; ZIKV : cellules infectées par le virus Zika. B. Des fibroblastes de peau ont été infectés avec le virus Zika et filmés pendant une quarantaine d'heures. Une fois morte, la cellule devient rouge.

STRATÉGIE DE DIAGNOSTIC

Diagnostic direct



Virus entier



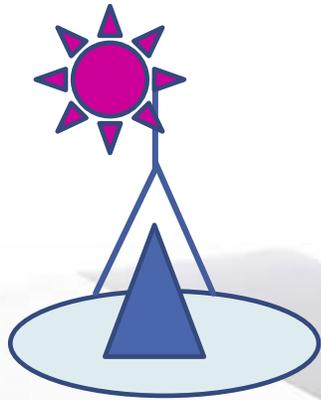
Antigènes

Immunofluorescence ou immun peroxydase

Technique ELISA

Immunofluorescence ou immunoperoxydase

Fluorochrome



Protéines virales

Echantillons



Emission de fluorescence

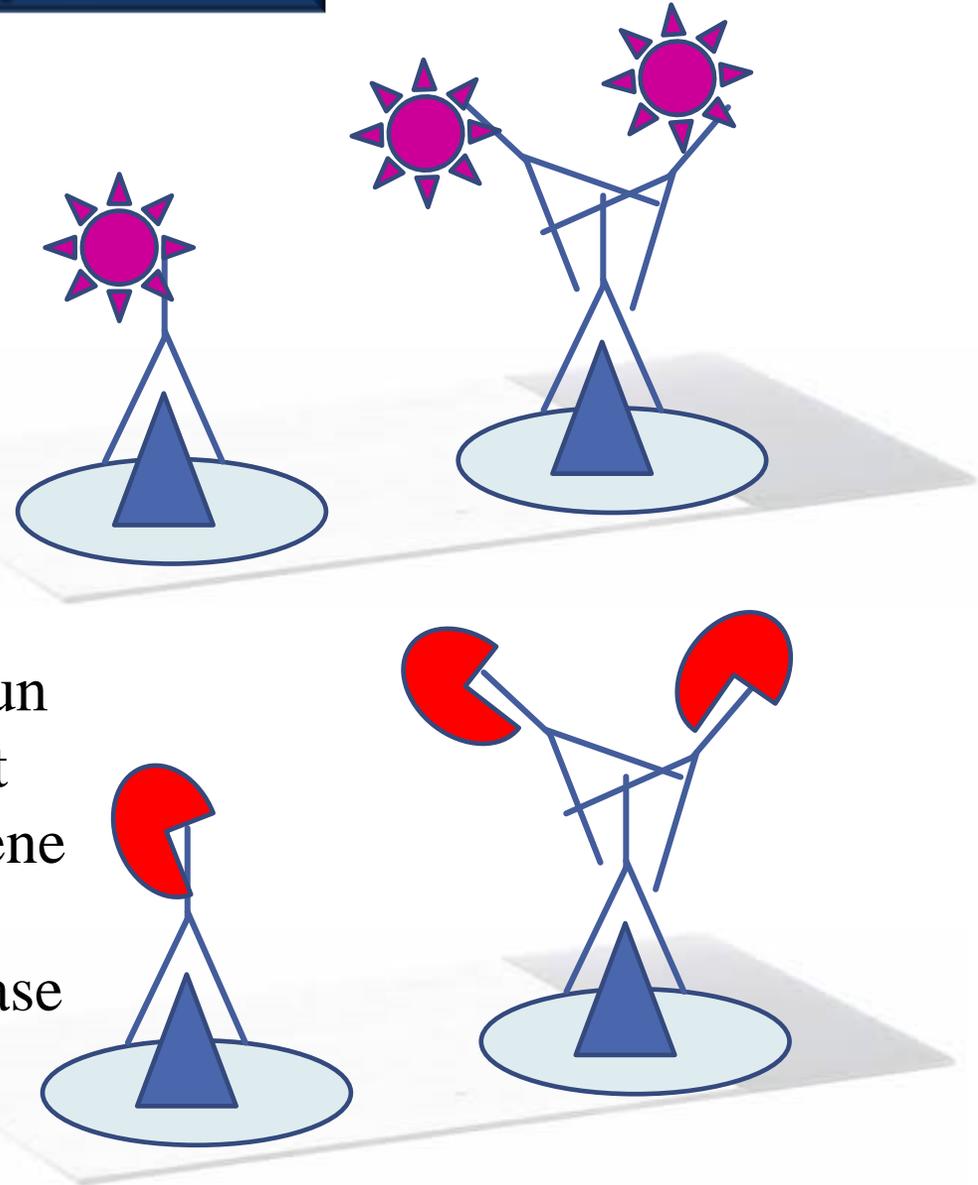


Négatif

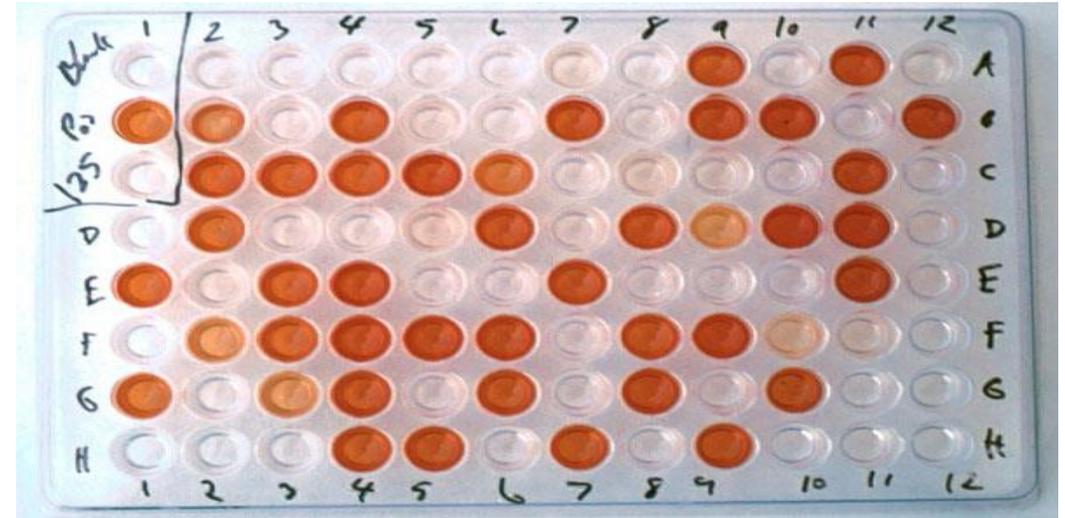
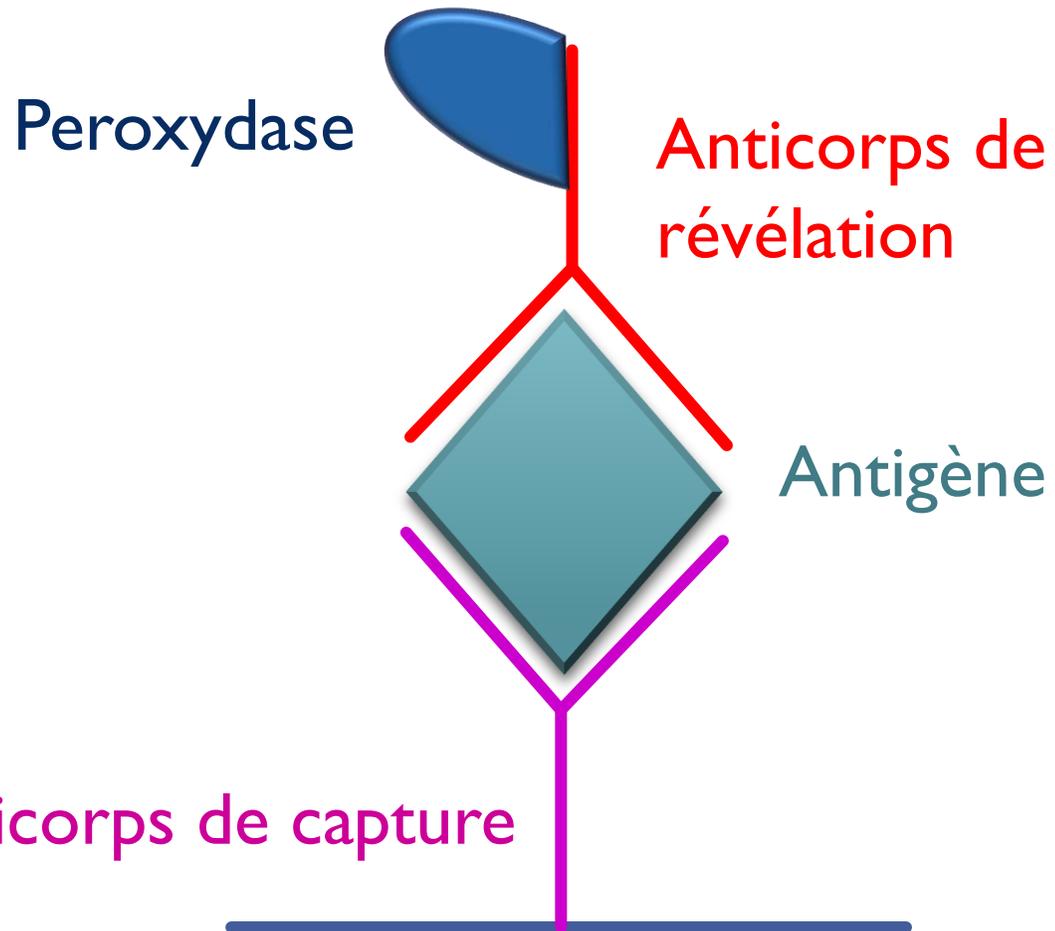
Positif

Ajout d'un substrat chromogène

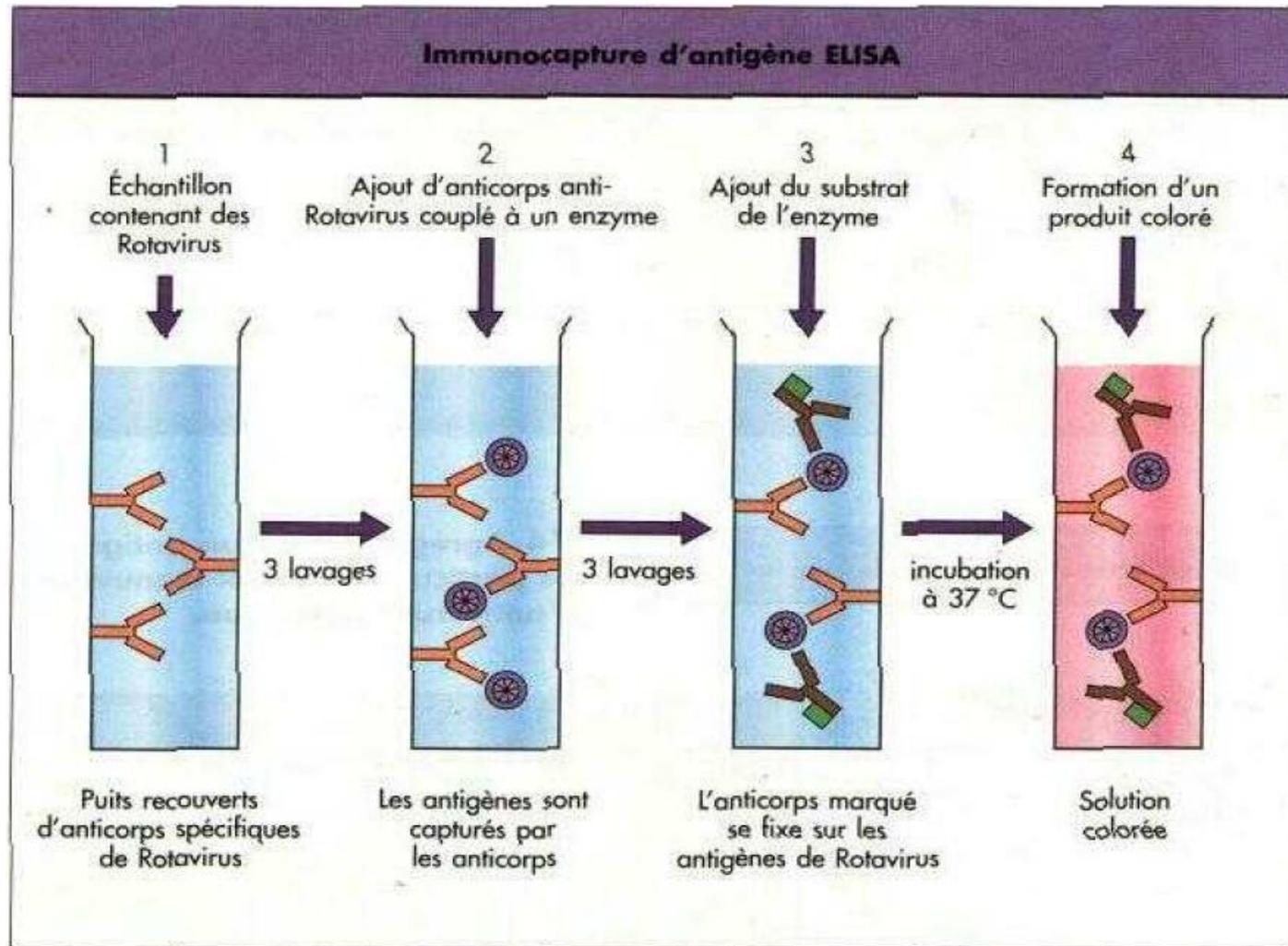
Peroxydase



ELISA (Enzyme Linked Sorbent Assay)



- Résultats rapide
- Automatisable
- Techniques quantitative



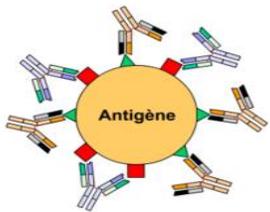
72 Capture d'antigène ELISA. Les puits sont recouverts d'anticorps dirigés contre le virus. L'échantillon contenant le virus (1) est mis en contact, et après plusieurs lavages, on ajoute un second anticorps antiviral, couplé à un enzyme (2). Après un autre cycle de lavage, le substrat de l'enzyme (3) est ajouté. Une coloration se développe si l'antigène viral est présent dans l'échantillon (4).

STRATÉGIE DE DIAGNOSTIC

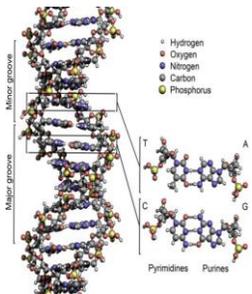
Diagnostic direct



Virus entier



Antigènes



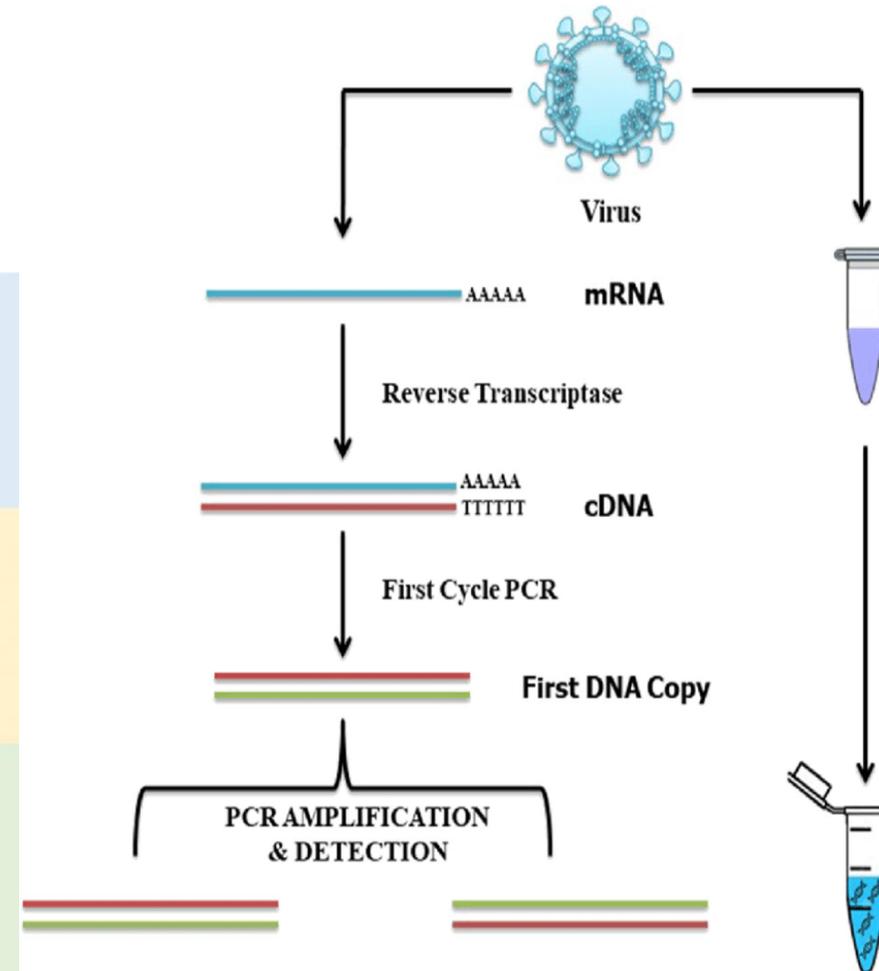
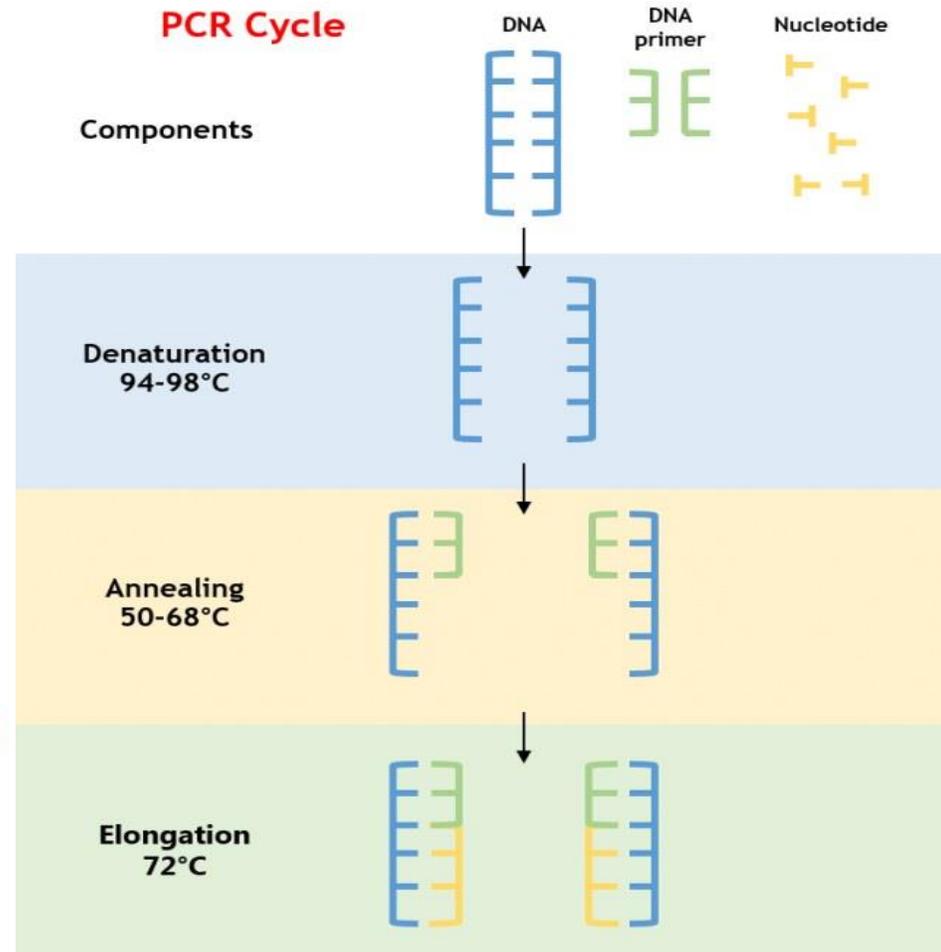
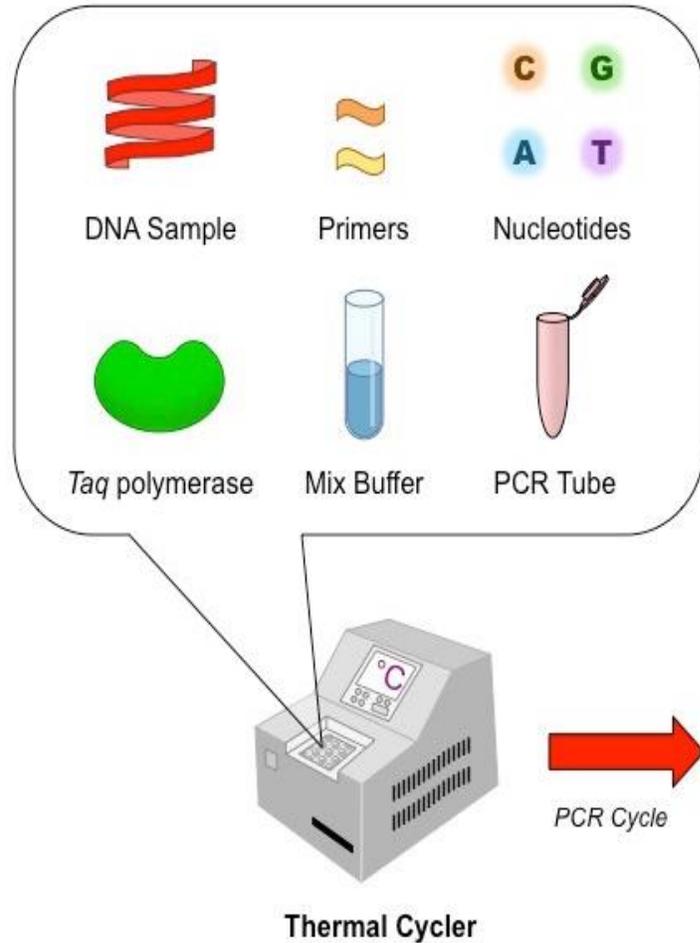
Acides nucléiques



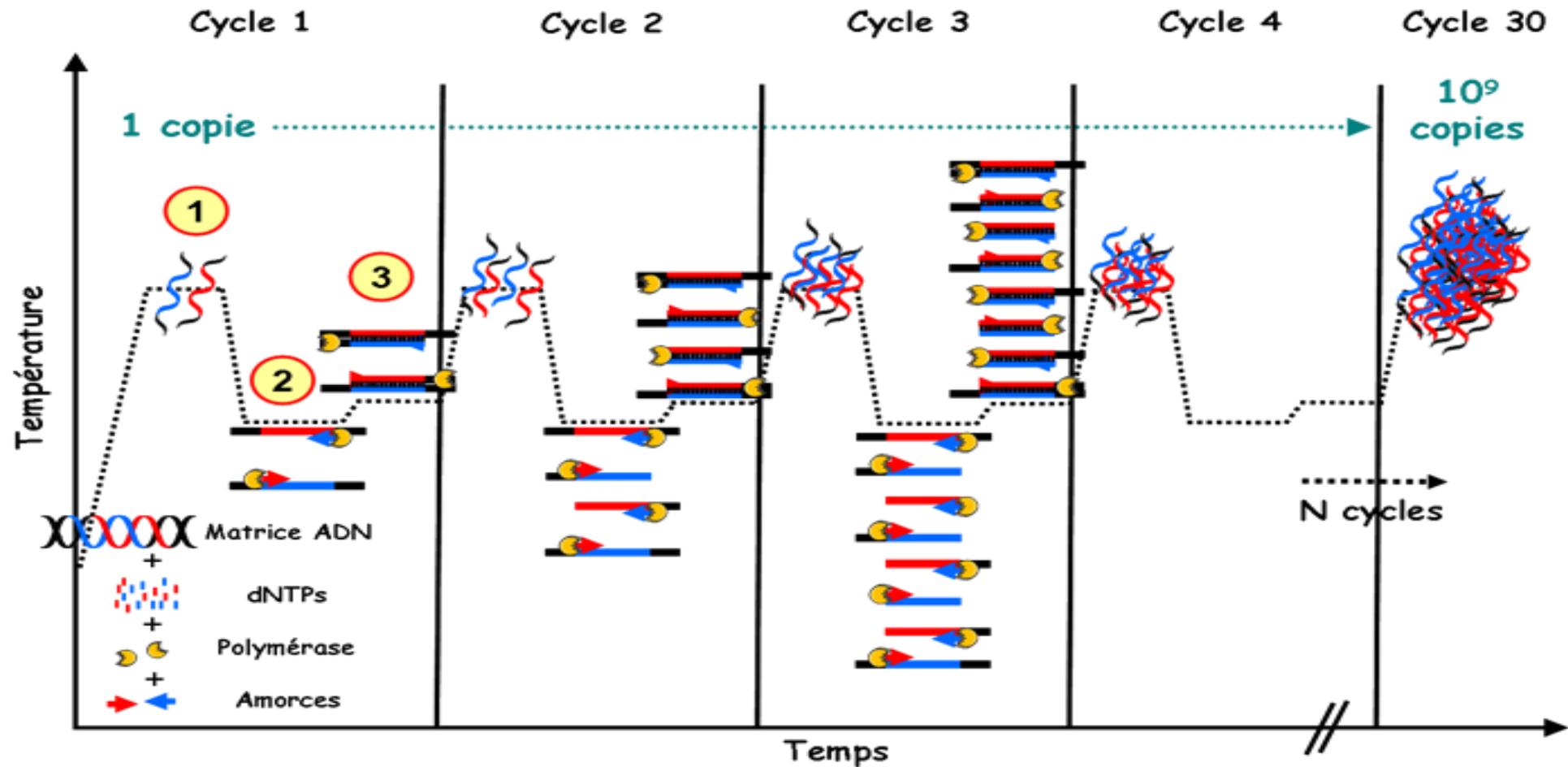
Techniques de la PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Amplification sélective d'un gène d'un virus

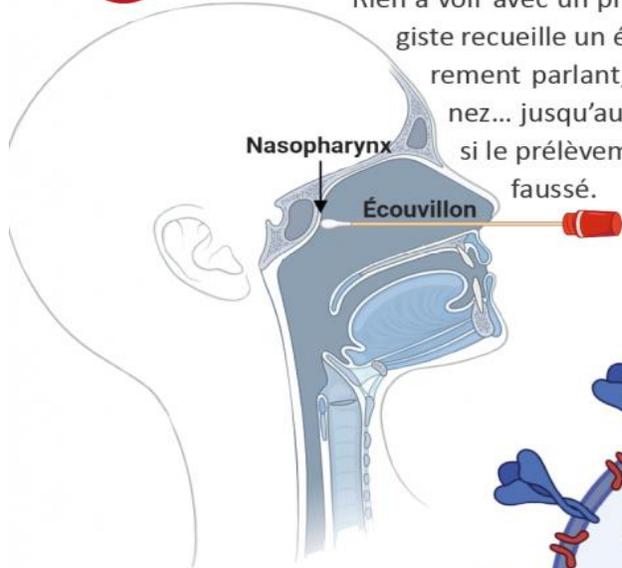


PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)



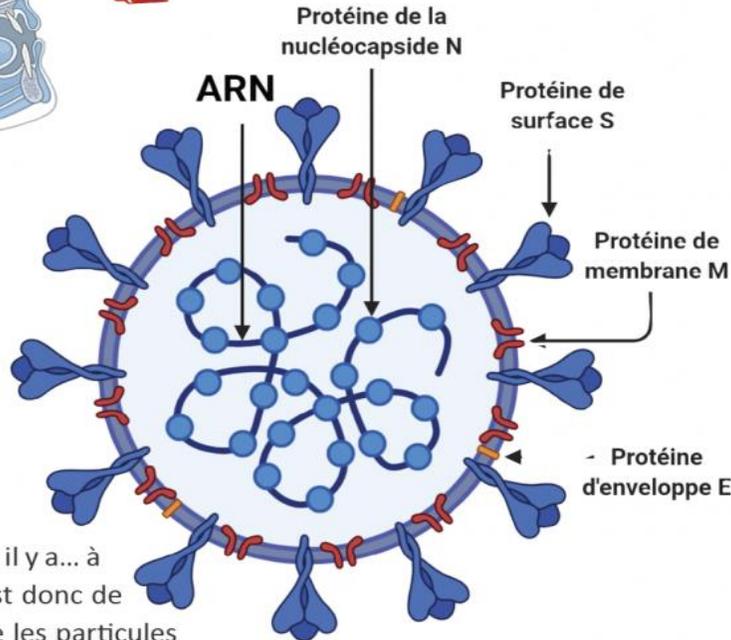
1 Le prélèvement naso-pharyngé

Rien à voir avec un prélèvement nasal... Ici, le ou la biologiste recueille un échantillon de sécrétion – ou familièrement parlant, de la morve – très loin derrière le nez... jusqu'au pharynx ! Cette étape est cruciale : si le prélèvement est mal fait, le test risque d'être faussé.



2 L'extraction du matériel génétique

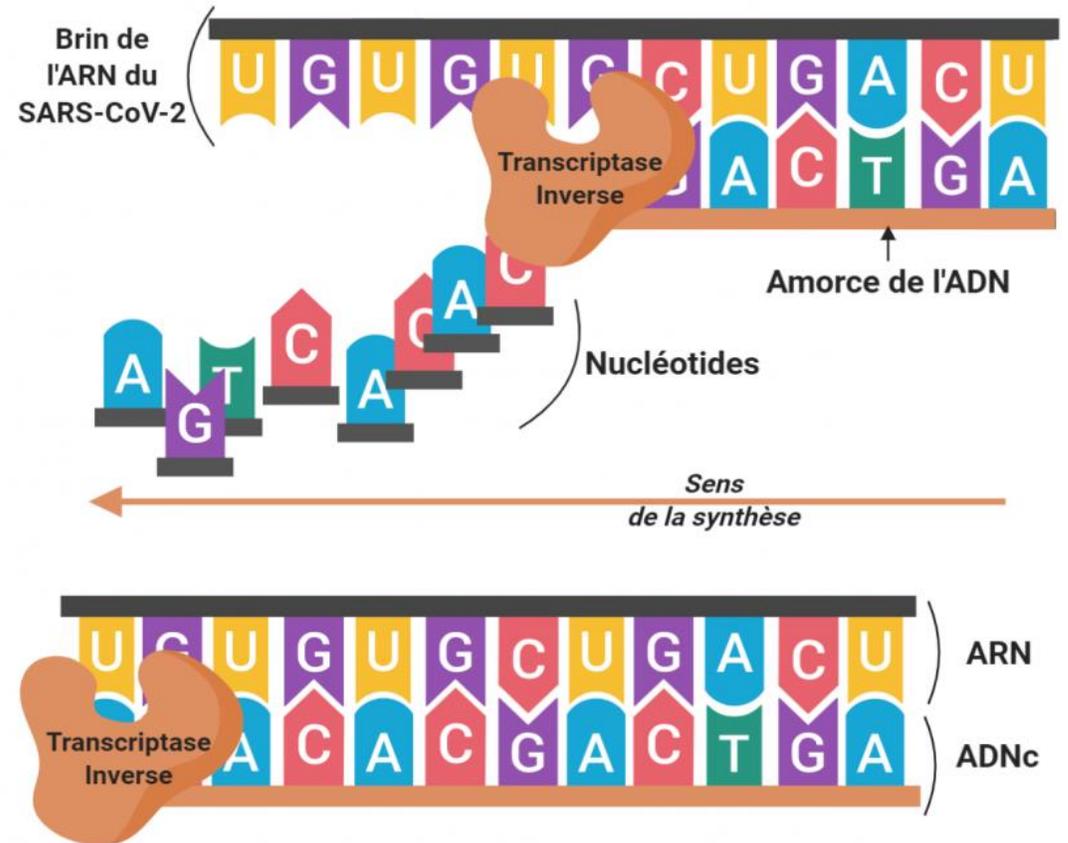
Dans cet échantillon de mucus, il y a... à boire et à manger. L'objectif est donc de le nettoyer pour ne garder que les particules virales du SARS-CoV-2, si elles sont bien présentes. Après quoi, l'échantillon est traité à l'aide d'une solution pour briser l'enveloppe qui entoure le coronavirus, puis en extraire son matériel génétique. Sa carte d'identité, en somme ! Contrairement à la grande majorité des êtres vivants, le SARS-CoV-2 n'est pas constitué par de l'acide désoxyribonucléique (ADN), mais par son cousin, l'acide ribonucléique (ARN).



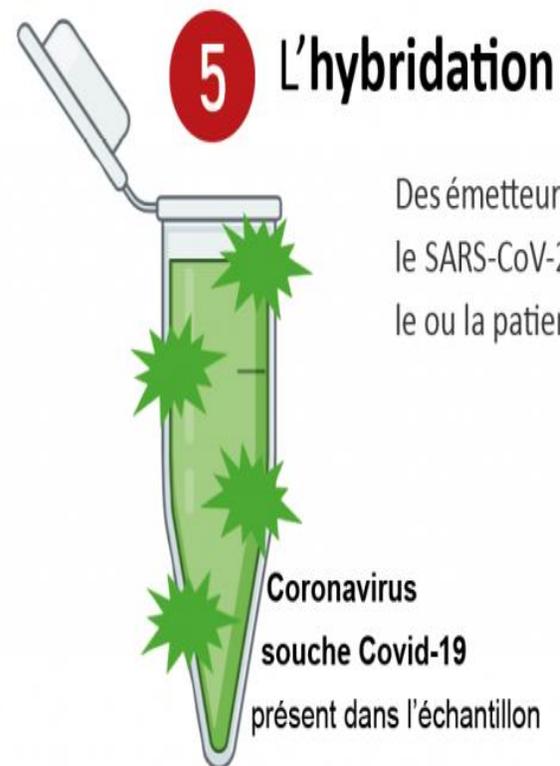
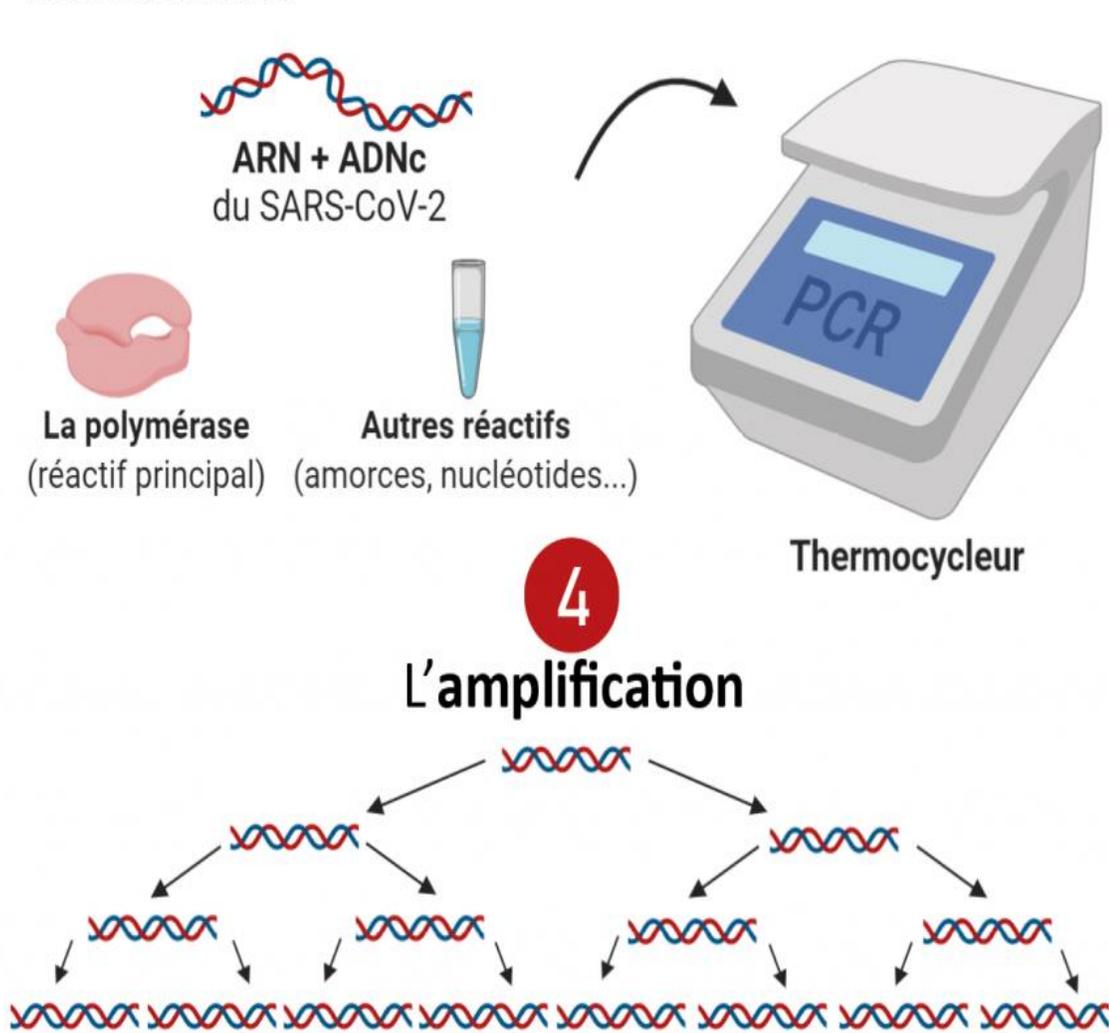
3 Une lecture inversée

La réaction en chaîne par polymérase (PCR), qu'on cherche à provoquer, est une multiplication massive de copies d'ADN. Dans cette PCR, la polymérase – une enzyme – tient le rôle de photocopieuse d'ADN. Mais... comment provoquer une PCR dans le cas du SARS-CoV-2, un virus à ARN ?

C'est ici que les transcriptases inverses (RT) – d'autres enzymes – entrent en scène : à chaque fois qu'elles tombent sur l'ARN du nouveau coronavirus, elles le traduisent en ADN complémentaire (ADNc). Un langage que la polymérase est capable de comprendre.



La polymérase multiplie, des milliers de fois, l'ADNc du matériel génétique du SARS-CoV-2. Bien au chaud dans le thermocycleur, la machine où s'effectue la RT-PCR. Sans cette démultiplication, la quantité de particules virales, trop faible, serait indétectable.



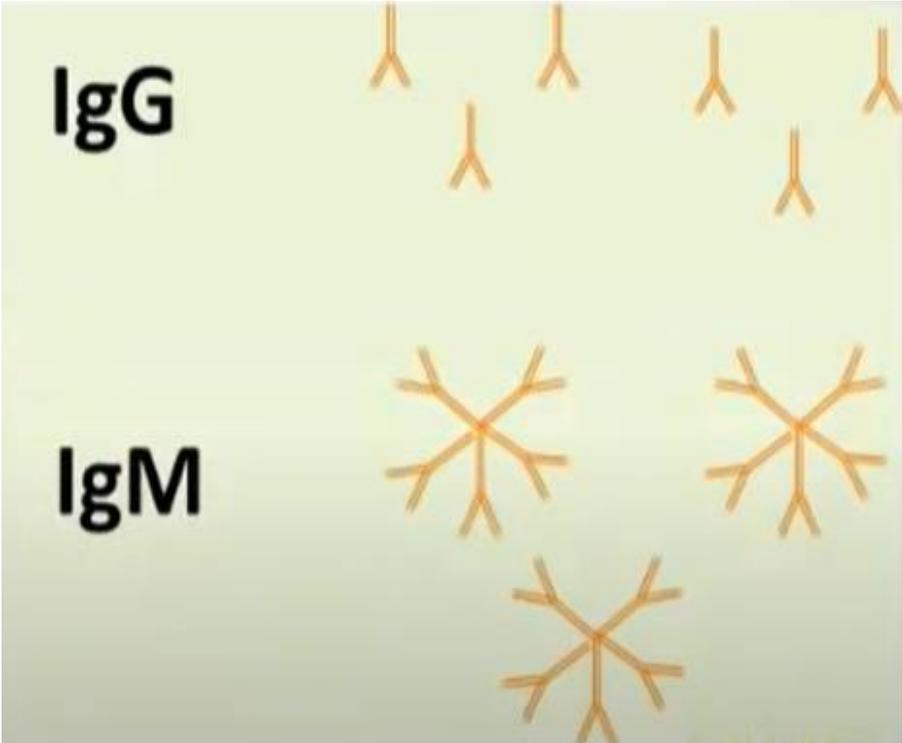
Infographie : Aline Nippert
Réalisé sur BioRender.com



www.dnalc.org

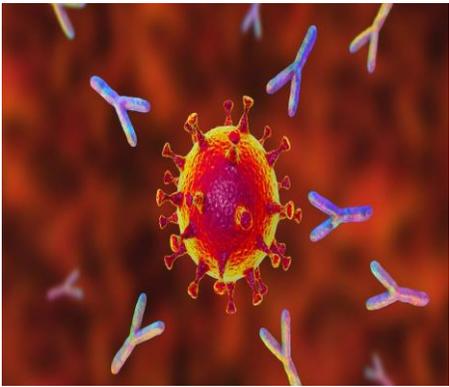
STRATÉGIE DE DIAGNOSTIC

Diagnostic indirect

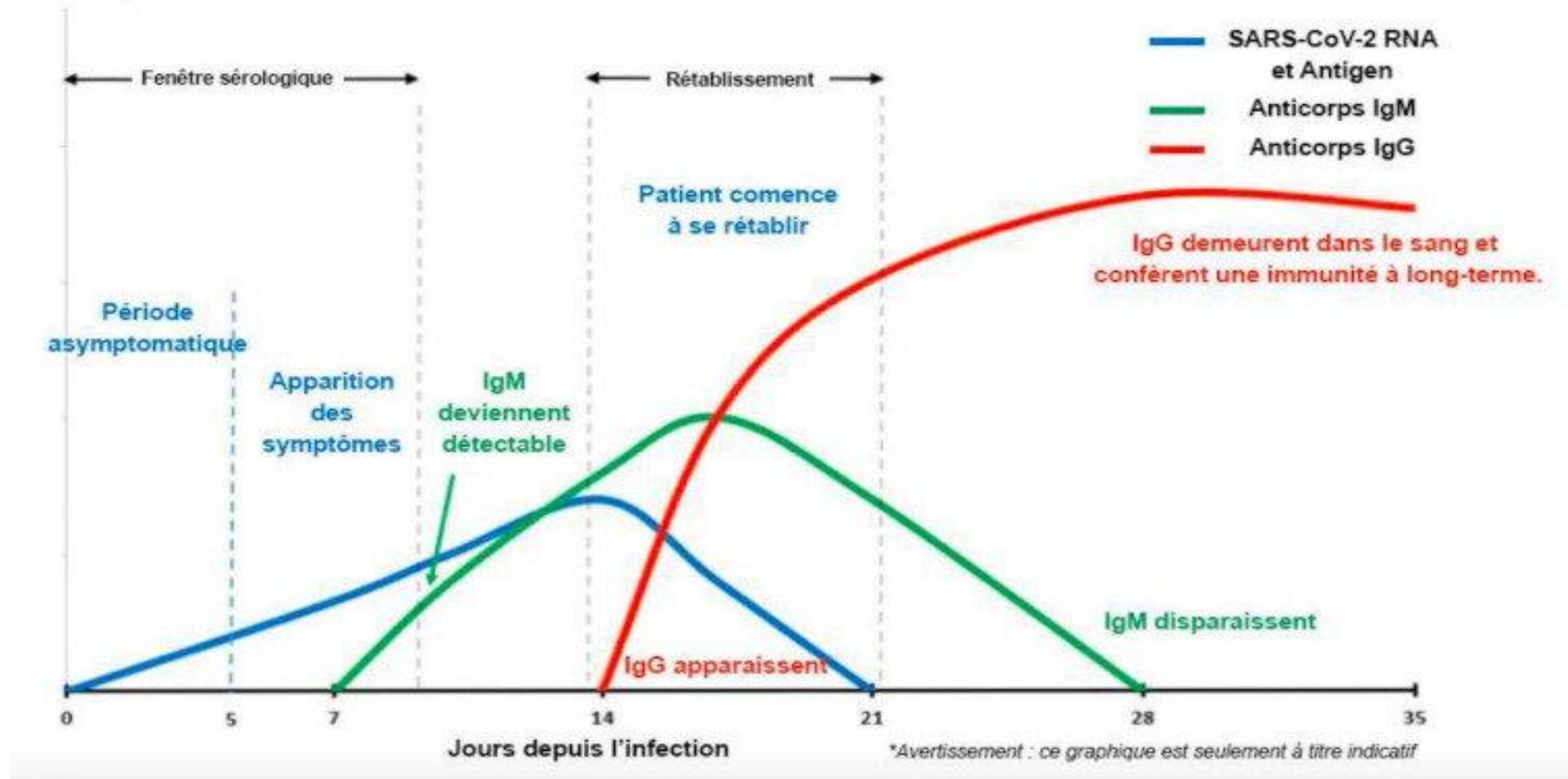


Tests sérologiques

Sang du malade



Anticorps



DIAGNOSTIC INDIRECT

Test d'agglutination

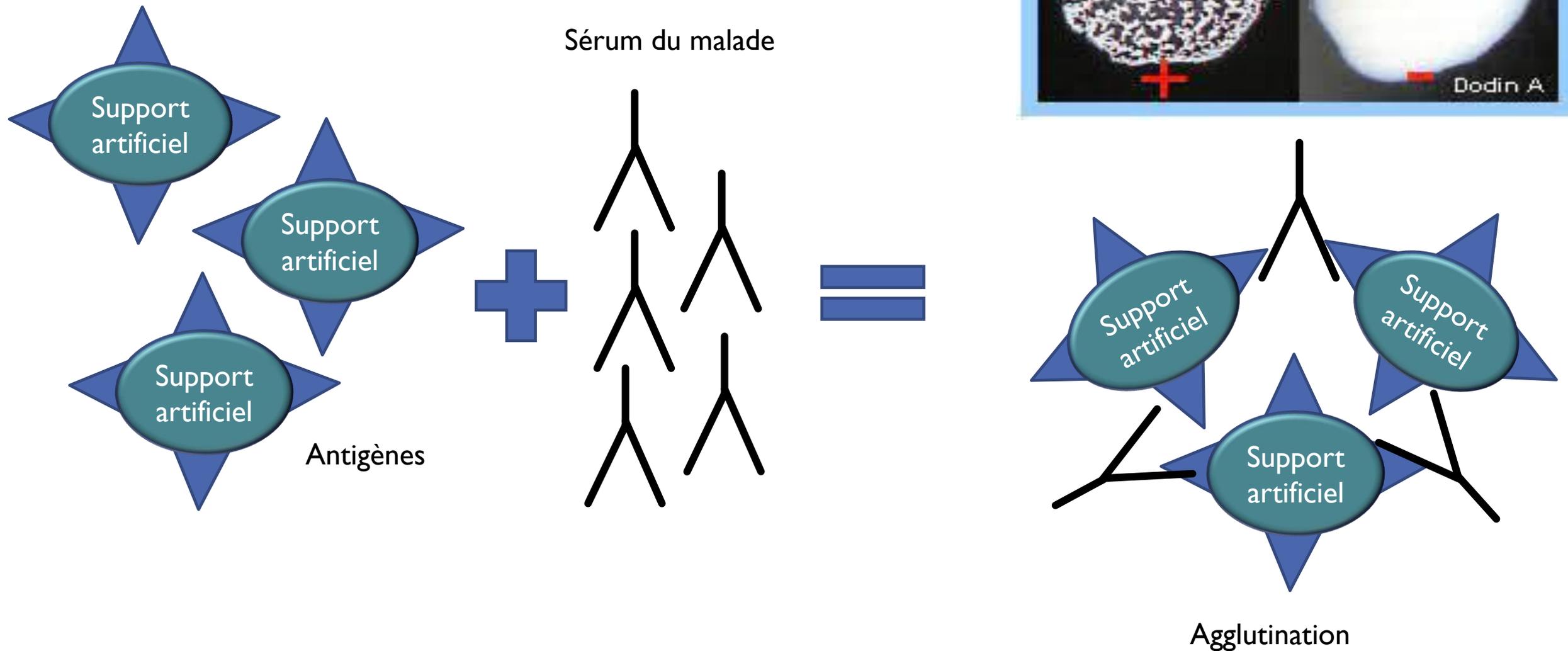
Western Blot



Test ELISA

Tests sérologique

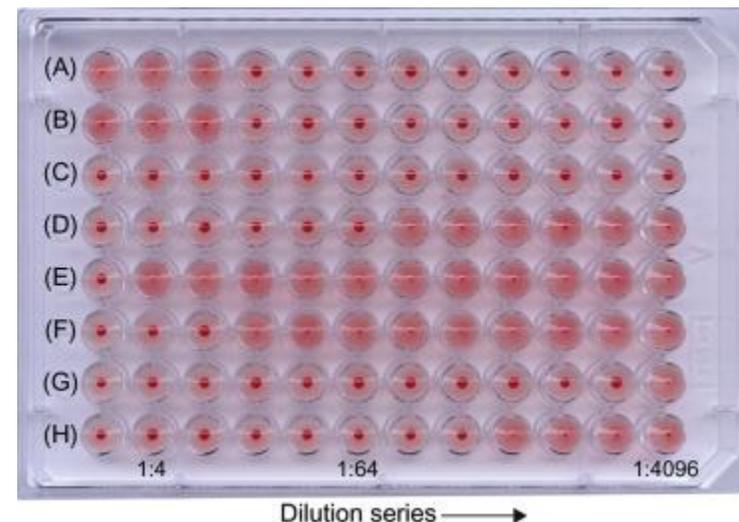
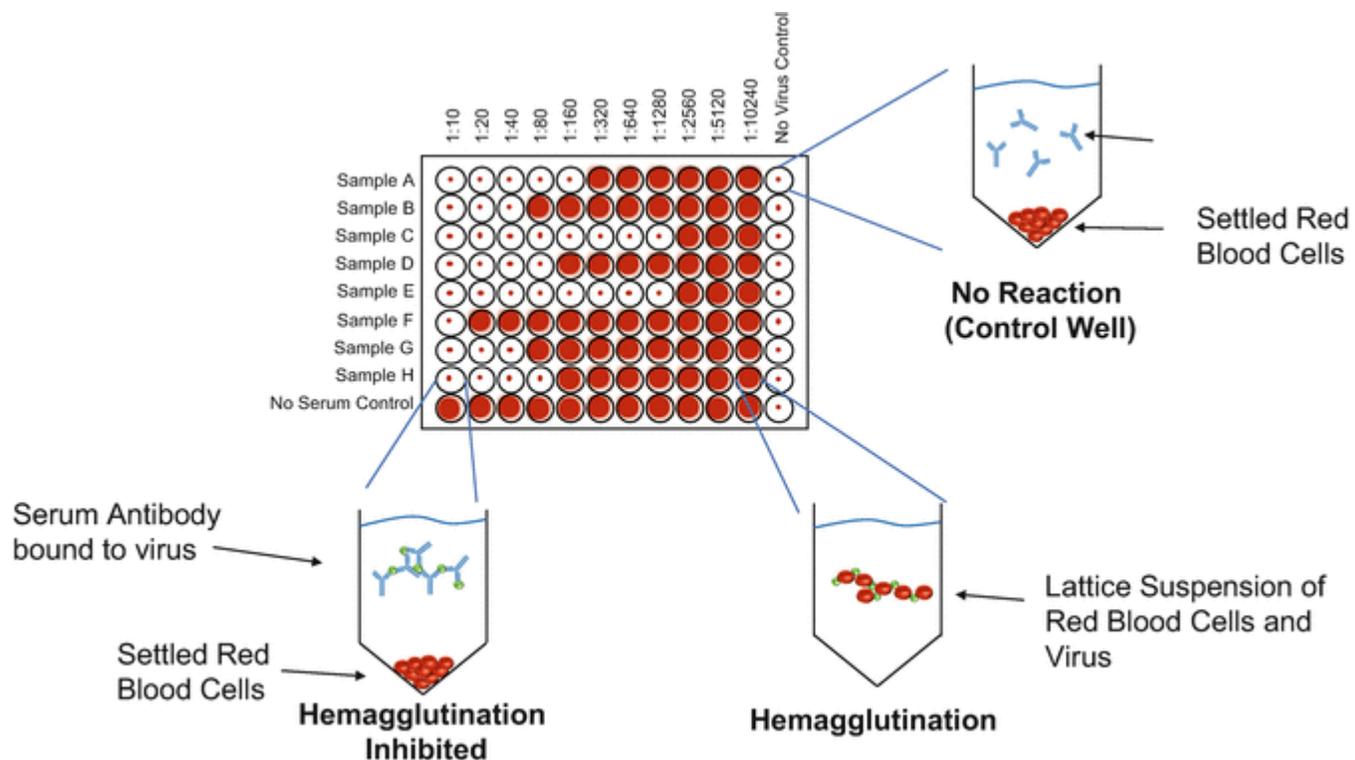
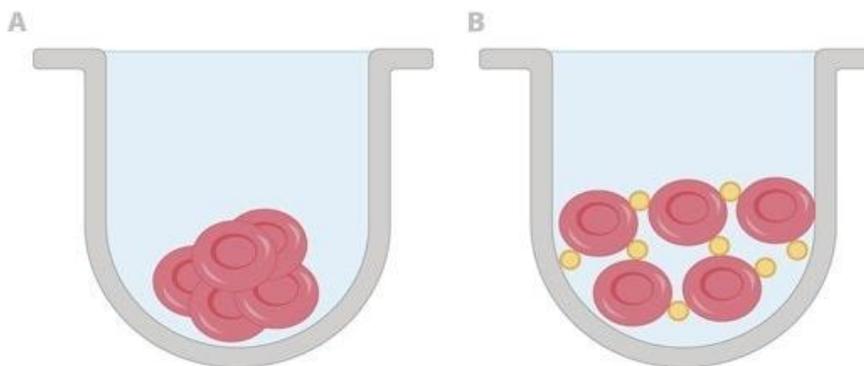
Test d'agglutination



Tests sérologique

Hémagglutination

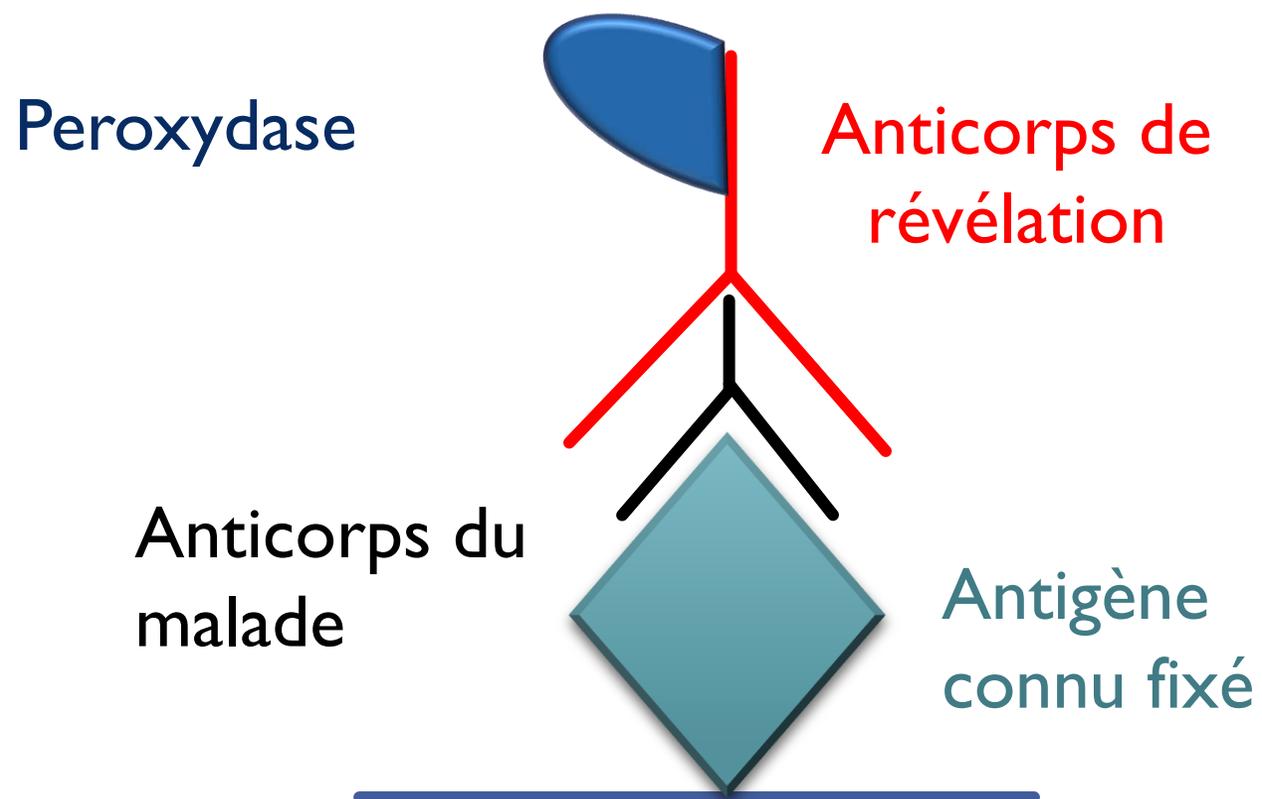
Utilisation
des hématies



Tests sérologique

ELISA (Enzyme Linked Sorbent Assay)

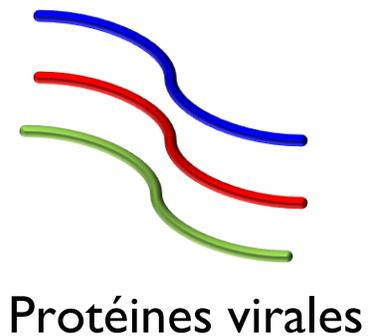
- Résultats rapide
- Automatisable
- Très sensible et spécifique
- Permet de détecter les Ac IgG et IgM



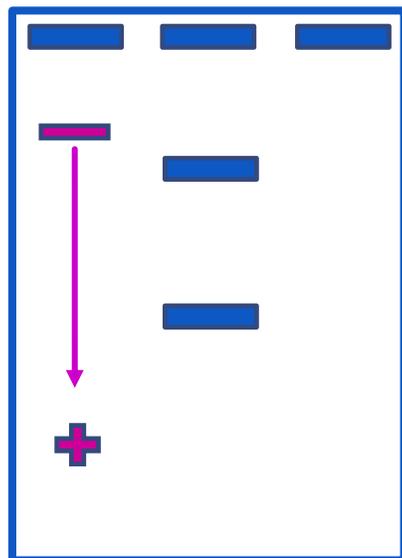


Tests sérologique

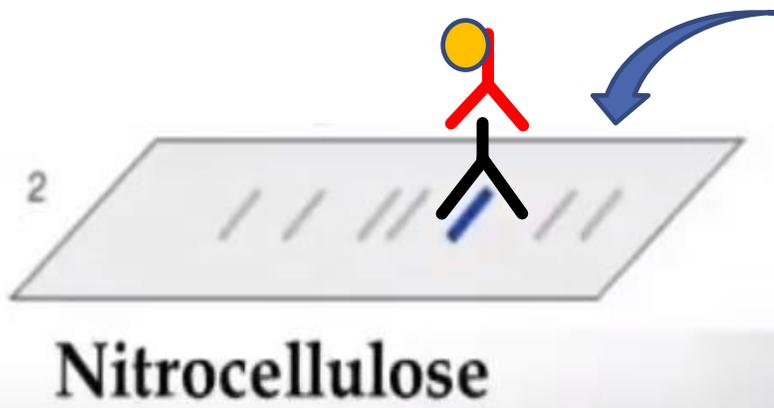
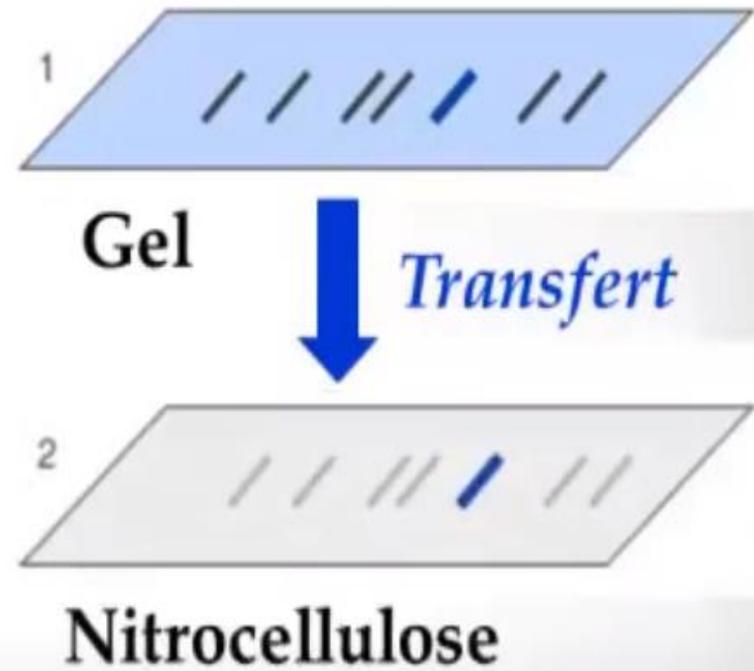
Western Blot



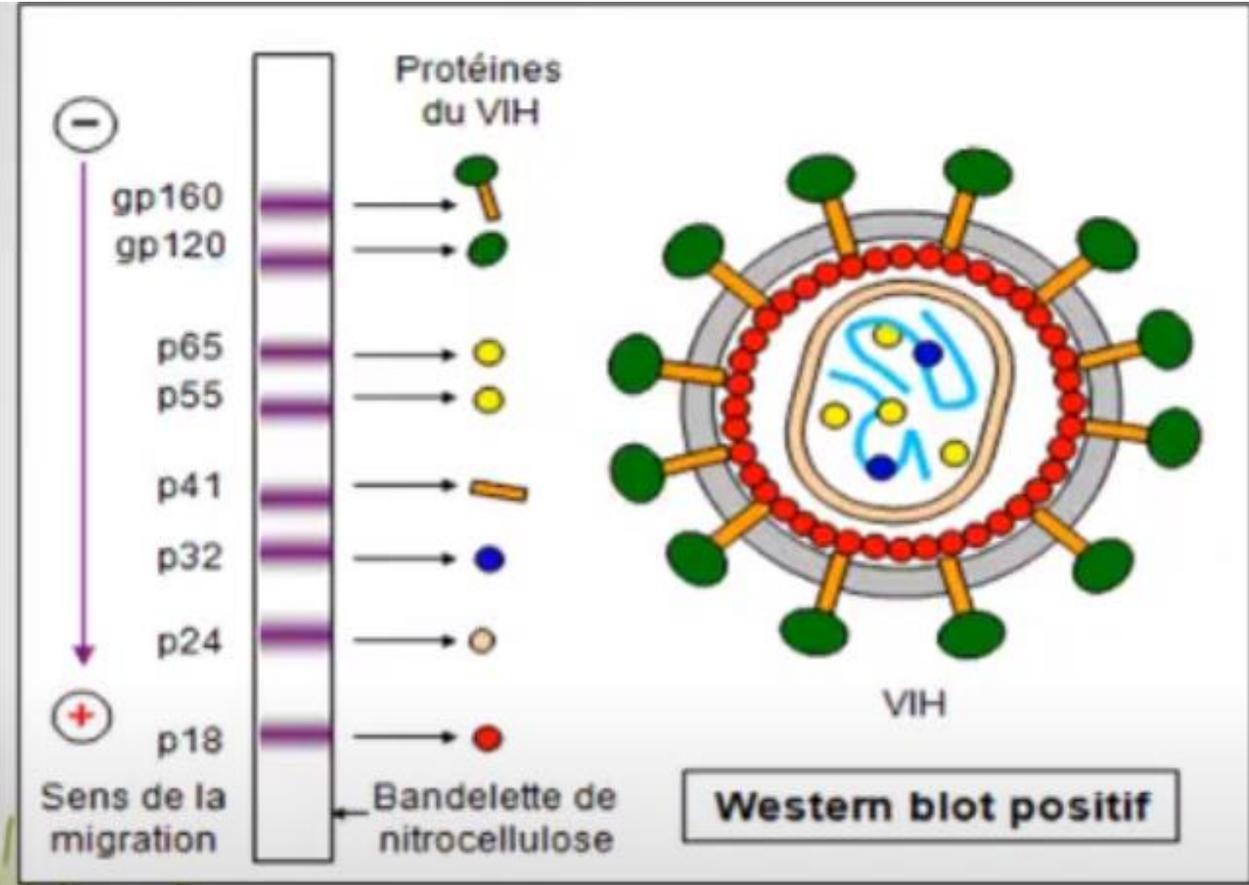
SDS



Migration selon le poids moléculaire



Sérum du malade



Q : Avec plus de 4 137 500 individus infectés au 1^{er} juin 2020, la COVID-19 s'est rapidement répandue dans le monde après les premiers cas détectés en Chine. Le virus responsable est le SARS-CoV-2. Le test PCR reste le plus fiable pour la détection de ce virus.

- a. Quelle est la variante de la PCR utilisée pour le dépistage de ce virus ?
- b. Pourquoi ce test est le plus fiable ?
- c. Expliquez les différentes étapes pour la réalisation de ce test ?
- d. Lors de PCR classique, quelle est la technique pour vérifier le bon déroulement de la PCR ?