

Virologie vétérinaire

Chapitre 5

A. Méthodes d'étude des virus

B. Méthodes de diagnostic virologiques

Historique du diagnostic en virologie

Ere moderne de la virologie : à partir de 1898 : Loeffler et Frosch mise en évidence de l'agent de la fièvre aphteuse (agent filtrable, *virus*)

Première moitié du XXe siècle : détection principalement basée sur les méthodes de mise en évidence de la réaction antigène/anticorps (sérologie, test de la fixation du complément)

1948 : première description de la croissance d'un virus en culture cellulaire (Weller et Enders)

1956 : première utilisation d'anticorps fluorescents pour la mise en évidence du virus de l'Influenza humain dans des sécrétions nasales (Liu)

1970 : développement de la technologie des anticorps monoclonaux

Fin du XXe siècle : essor des technologies basées sur l'amplification moléculaire (PCR)



5A. Méthodes d'étude des virus

1. Multiplication du virus en culture cellulaire
2. Infections *in vivo*
3. Purification du virus à partir d'une suspension
4. Dénombrement de particules virales
5. Etude de l'acide nucléique viral (génomique)
6. Etude des protéines virales (proteome)
7. Etude des glycoprotéines virales (glycome)

5A.1 Multiplication du virus en culture cellulaire

- 1.1. Culture et croissance cellulaire
- 1.2. Types de cultures cellulaires
- 1.3. Lignée cellulaire manipulée génétiquement
- 1.4. Préparation de l'échantillon et inoculation
- 1.5. Détection de la réplication virale
- 1.6. Culture virale sur œufs embryonnés

5A.1 Mise en culture du virus

Culture et croissance cellulaire

Intérêt de la culture virale en virologie :

les virus requièrent une machinerie cellulaire de réplication donc des organismes vivants (animal, insectes, plantes, œufs embryonnés, cellules)

Production de virus en laboratoire

Milieu de culture :

liquide, riche en acides aminés, minéraux, tampon pH, source d'énergie, facteurs de croissance, facteurs d'attachement.

5A.1 Mise en culture du virus

Types de cultures cellulaires

Culture de cellules primaires :

cellules mises en culture à partir de l'organe prélevé chez l'animal (souvent un fœtus), utilisées dès la 1ère culture.

Ex: *primary monkey kidney cells, primary rabbit kidney cells*

Lignée diploïde ou semi-continue:

nombre de chromosomes constant, durée de vie limitée (cellules engagent leur sénescence après un certain nombre de divisions)

Ex: cellules de fibroblastes humains (MRC-5)

Lignée continue ou transformées:

transformées *in vitro* ou provenant de tumeurs, aneuploïdes, durée de vie illimitée (« immortalisées »)

Ex: HeLa, A549, *Madin-Darby Canine Kidney cells*

Cellules hématopoïétiques:

croissance en suspension

Ex: cellules mononucléaires sanguines périphériques ou cellules de cordon ombilical

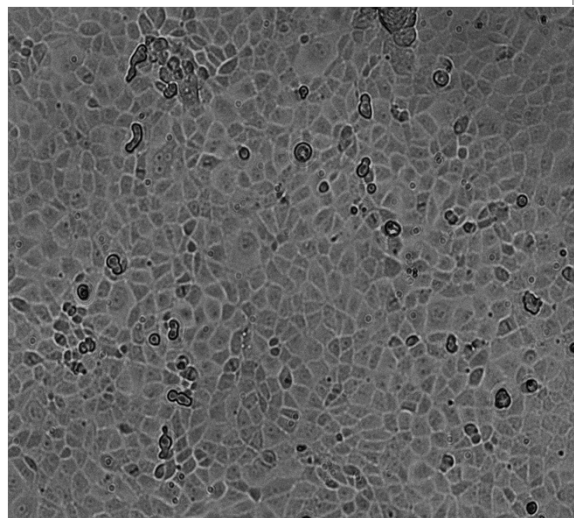
5A.1 Mise en culture du virus

Types de cultures cellulaires

- Cellules adhérentes :
2 types de morphologie : épithéliale (polygonale) et fibroblastique (étiré).
- Cellules non adhérentes :
Flottent dans le milieu de culture
Sphériques
Destinées à la production cellulaire en masse.

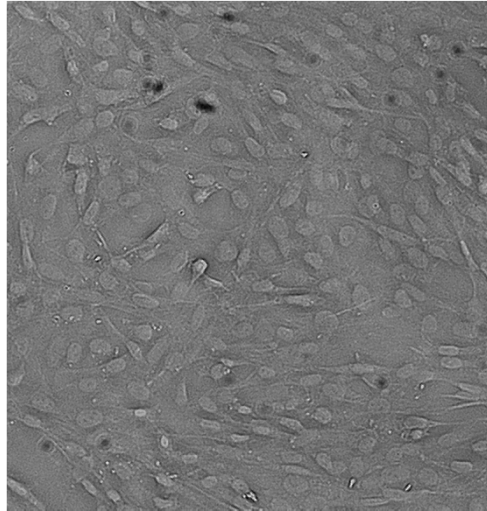
5A.1 Mise en culture du virus

Types de cultures cellulaires



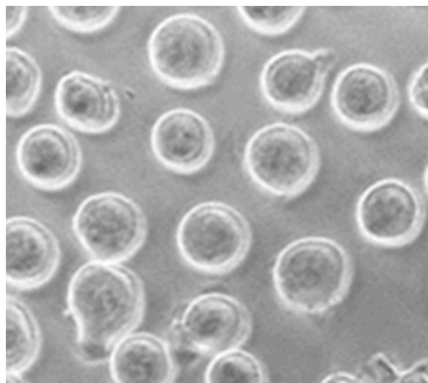
5A.1 Mise en culture du virus

Types de cultures cellulaires



5A.1 Mise en culture du virus

Types de cultures cellulaires



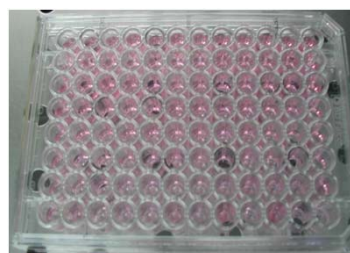
Supports pour cellules adhérentes



Supports pour cellules adhérentes



Plaque de 6 puits

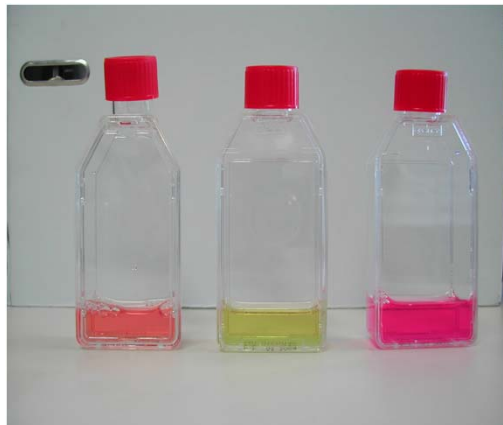


Plaque de 96 puits à fond plat

Support pour cellules en suspension



Virage de l'indicateur de pH suivant l'acidification ou l'alcalinisation du milieu de culture



La notion du passage cellulaire:

Nécessaire pour la pérennité et la conservation d'une culture cellulaire en laboratoire

voir film

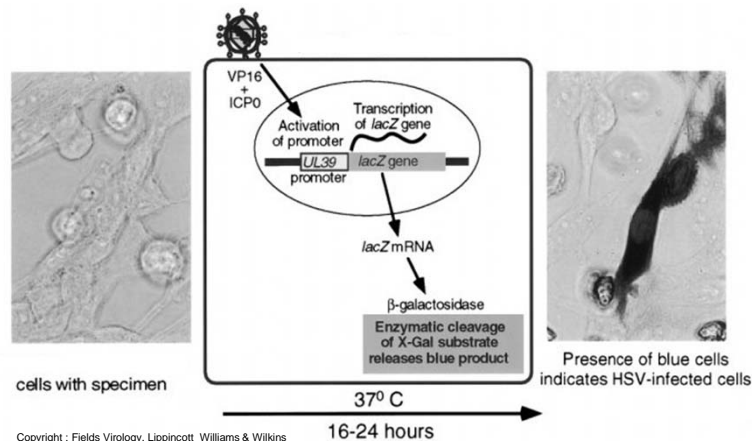
Université
de Liège



5A.1 Mise en culture du virus

Lignée cellulaire manipulée génétiquement

Lignée cellulaire modifiée par génie génétique afin de devenir permissive pour un virus pour lequel elle ne l'est normalement pas ou pour permettre une détection facilitée de la multiplication virale



ité
ège



5A.1 Mise en culture du virus

Préparation de l'échantillon et inoculation

Les virus contenus dans des fluides stériles (ex: fluide cérébro-spinal) peuvent être directement mis en culture cellulaire

Les échantillons urinaires devraient être uniquement préalablement stabilisés pour leur pH si prélevés stérilement

Les échantillons provenant de sites ou de fluides typiquement contaminés par des bactéries (échantillons respiratoires, génitaux, matières fécales) doivent être immergés ou mis en contact avec des solutions de liquide physiologique ou de milieu de croissance cellulaire additionné d'antibiotiques (si possible bactéricides) et d'antimycotiques

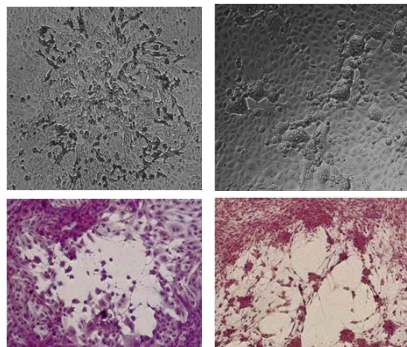
5A.1 Mise en culture du virus

Détection de la multiplication virale

Effet cytopathogène (cytolytique ou autre)

Définition: changement morphologiques visibles des cellules lors d'une multiplication virale.

On peut retrouver un ou plusieurs des éléments suivants: arrêt ou diminution de la synthèse des ARN et des protéines cellulaires, fusion des cellules, relargage des enzymes lysosomiales, modification de la perméabilité de la membrane cellulaire, changements diffus des structures intracellulaires, présence de corps d'inclusion d'origine virale, aberrations chromosomiques

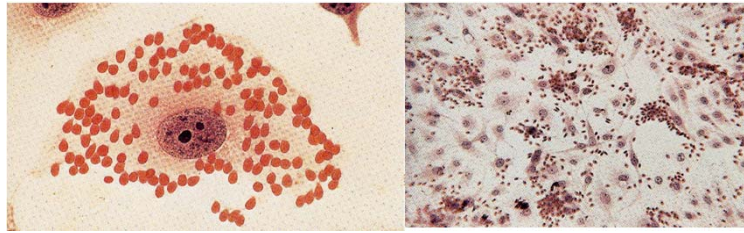


5A.1 Mise en culture du virus

Détection de la multiplication virale

Hémadsorption

Capacité d'un virus à agglutiner des hématies en surface des cellules qui infectent par expression en surface membranaire de protéines virales appelées hémagglutinines



Cellules infectées par le virus des oreillons

Cellules infectées par le virus Sendai (paramyxovirus)

5A.1 Mise en culture du virus

Détection de la multiplication virale

Interférence

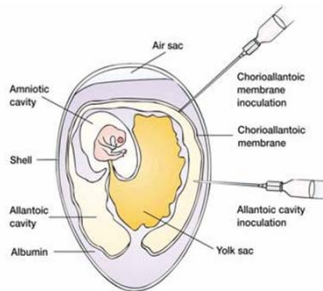
plus rare, basée sur une moindre permissivité de la culture cellulaire à l'infection par un virus défini si préalablement infectée par un virus présent dans l'échantillon à tester

Détection quantitative de l'acide nucléique ou des antigènes viraux voir les différentes méthodes d'étude du génome ou des protéines virales présentées par la suite

5A.1 Mise en culture du virus

Culture virale sur œufs embryonnés

Ex: pour l'isolement du virus de la fièvre catarrhale ovine



Université
de Liège



5A.2 Infections *in vivo*

Ethique

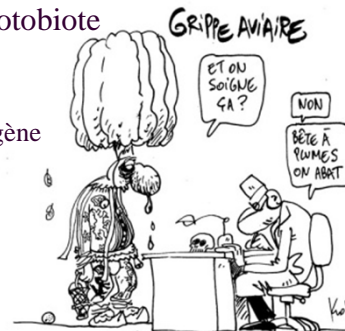
Protocoles de manipulations/infections d'animaux doivent être soumis pour approbation préalable à une commission d'éthique – règle des 3R

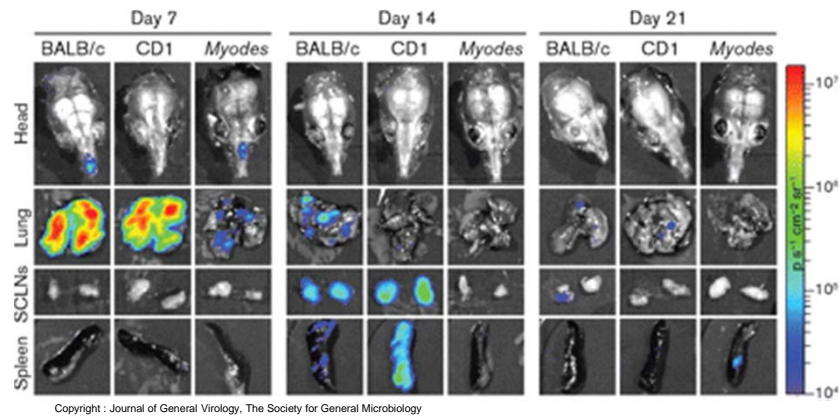
Notions de modèle animal/hôte spécifique de l'infection

Animal SPF (*specific pathogen free*)/gnotobiotique

Conditions de biosécurité (BSL 2, 3, 4)

En fonction de la classe de risque du pathogène





5A.3 Purification des virus à partir d'une suspension

Par centrifugation :

1. Centrifugations différentielles :

- Centrifugation à basse accélération
- Centrifugation à haute accélération sur surnageant

Obtention d'un culot contenant le virus semi-purifié

2. Ultracentrifugation :

- séparation virus-impuretés par propriétés physiques
- "en gradient de densité à l'équilibre" (séparation sur base de la densité)
- "zonale" (séparation sur base de la vitesse de sédimentation)

Obtention d'une suspension de virus très purifiée

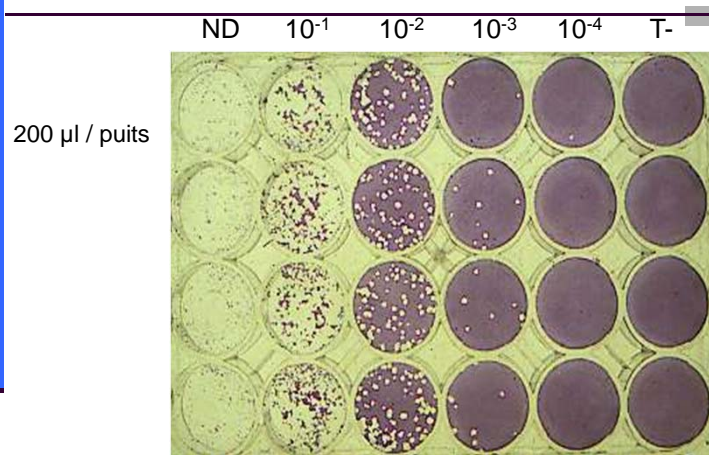
5A.4 Dénombrement de particules virales

Particules physiques = infectieuses + non infectieuses (ex: particules défectives interférentes)

Particules infectieuses =
capable de mener à bien un cycle complet de multiplication virale
(peuvent être dénombrées par la méthode des plages de lyse ou par la méthode des DICC₅₀) basées toutes deux sur l'effet cytopathogène
« lyse de la cellule infectée »

5A.4 Dénombrement de particules virales

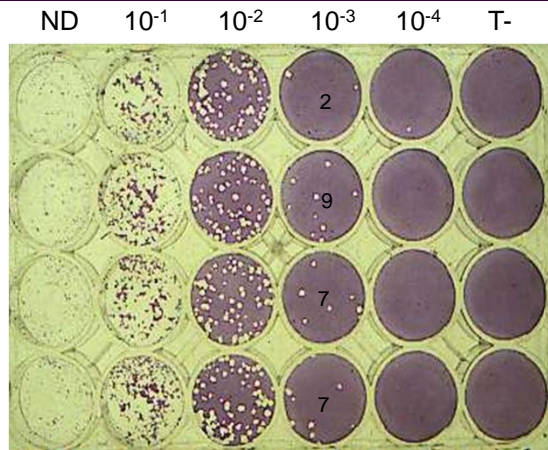
Méthode des plages de lyse



Concentration virale de départ (non diluée, ND) ?

5A.4 Dénombrement de particules virales

Méthode des plages de lyse



Voir film

Moyenne de 6,25 plages de lyse à la dilution 10⁻³
 La concentration virale de départ est de 3,1 10⁴ UFP/ml
 (car inoculum de 200 µl/puits).

5A.4 Dénombrement de particules virales

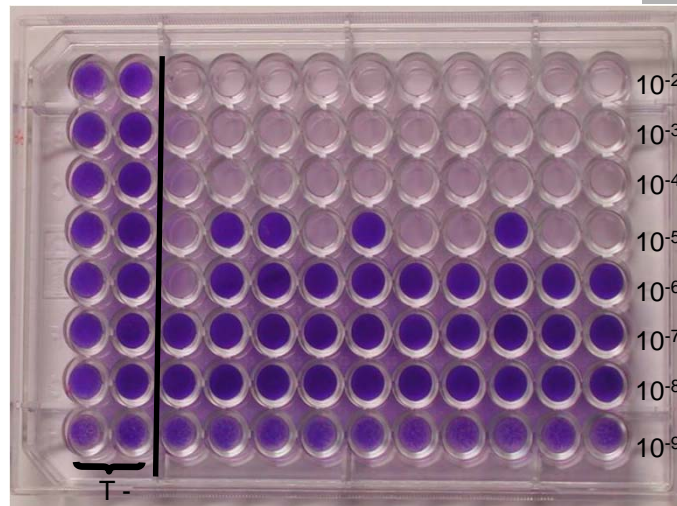
Détermination de la dose infectieuse en culture de cellules

On cherche la dilution virale pour laquelle 50%
des supports de cellules montrent un effet
cytopathogène (cette dilution est celle dont le
volume contient une DICC₅₀).

5A.4 Dénombrement de particules virales

Détermination de la dose infectieuse
en culture de cellules

Virologie vétérinaire – BMV3- E. Thiry



DICC₅₀

10⁻²

10⁻³

10⁻⁴

10⁻⁵

10⁻⁶

10⁻⁷

10⁻⁸

10⁻⁹

Inoculum =
50 µl par
puits

Université
de Liège



Virologie vétérinaire – BMV3- E. Thiry

Dilution virale	Nbre d'infectés/ Nbre d'inoculés	Nbre d'infectés	Nbre de non-infectés	Somme		% d'infectés
				I	non I	
10 ⁻²	10/10	10	0	37	0	100
10 ⁻³	10/10	10	0	27	0	100
10 ⁻⁴	10/10	10	0	17	0	100
10 ⁻⁵	6/10	6	4	7	4	64
10 ⁻⁶	1/10	1	9	1	13	7
10 ⁻⁷	0/10	0	10	0	23	0
10 ⁻⁸	0/10	0	10	0	33	0
10 ⁻⁹	0/10	0	10	0	43	0

Le point d'infectivité à 50 % se situe entre 10⁻⁵ et 10⁻⁶ : (64-50) / (64-7) = 0.25

Cela signifie que 50 µl d'une dilution à 10^{-5,25} contient 1 DICC₅₀.

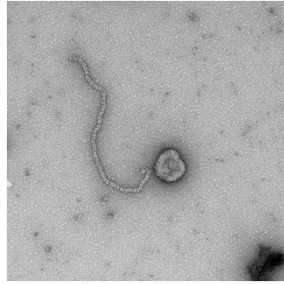
donc, le titre de la suspension virale 1/10^{-5,25} X 1000/50 = 3,6 .10⁶ DICC₅₀ / ml

Université
de Liège

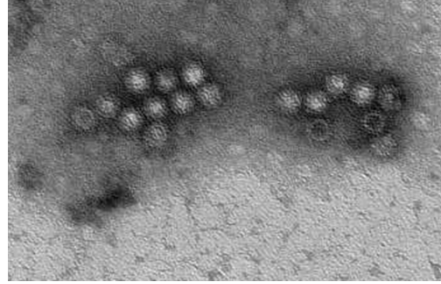


5A.4 Dénombrement de particules virales

Dénombrement de particules physiques par microscopie électronique



Particules physiques enveloppées
(à gauche : paramyxovirus ; à
droite : nucléocapside non
enveloppée d'un
paramyxovirus)



Copyright : Veterinary Microbiology, Elsevier

Particules physiques non
enveloppées
(norovirus bovins, famille
Caliciviridae)

Université
de Liège



5A.5 Etude de l'acide nucléique viral

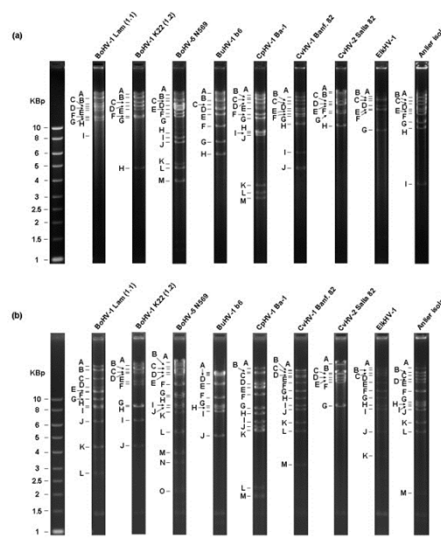
- 5.1. Analyse de restriction
- 5.2. Hybridation moléculaire (Southern- et Northern blot)
- 5.3. Amplification génique (PCR)
- 5.4. Clonage et séquençage
- 5.5. Bioinformatique
- 5.6. Puces à ADN (*Microarrays*)
- 5.7. Méthodes basées sur les mutations induites dans les séquences génétiques à étudier (*mutagenèse dirigée*)

Université
de Liège



5A.5 Etude de l'acide nucléique viral

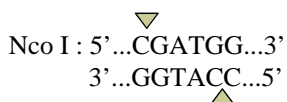
Analyse de restriction



Par des enzymes appelées endonucléases, reconnaissant des sites spécifiques dans une séquence nucléotidique et clivant à cet endroit

Enzymes d'origine souvent bactérienne (mécanisme de protection contre les bactériophages)

Exemple:



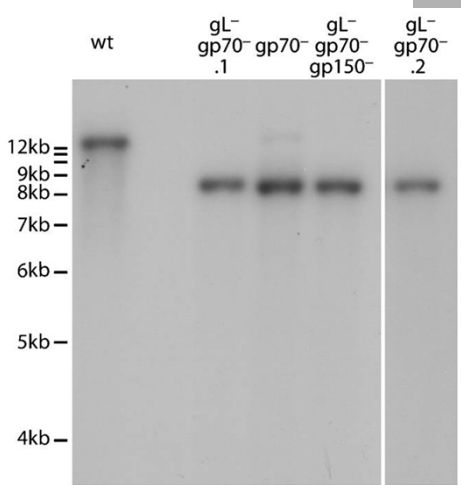
Copyright : BMC Veterinary Research, Biomed Central

5A.5 Etude de l'acide nucléique viral

Hybridation moléculaire (Southern et Northern blot)

Southern blot : ADN

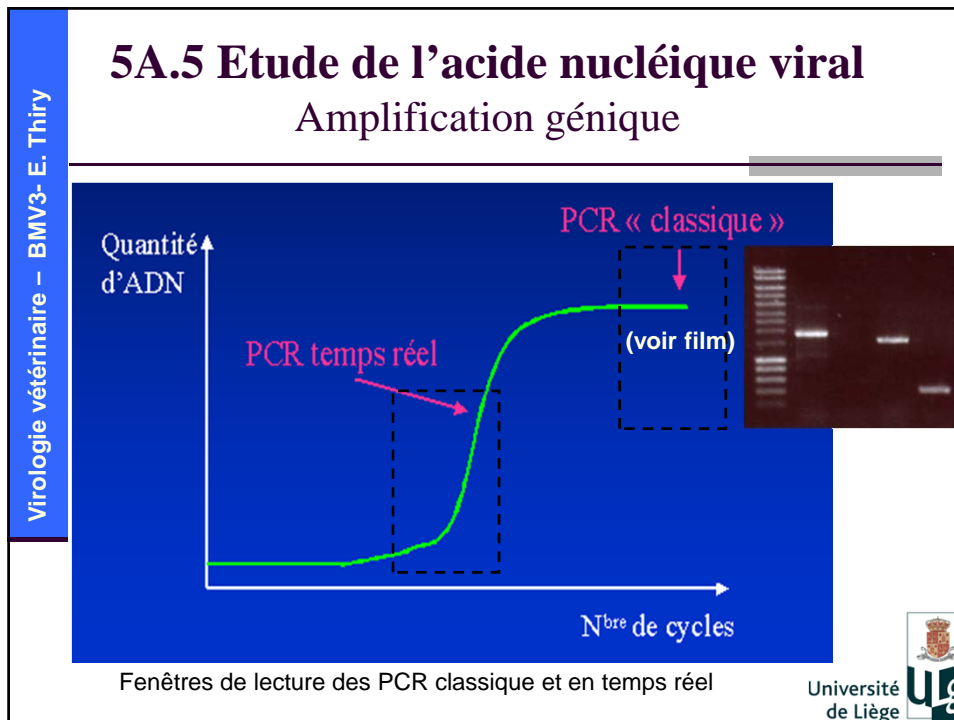
Northern blot : ARN



gp70 locus
EcoRI digest



Copyright : Journal of General Virology, The Society for General Microbiology



Virologie vétérinaire – BMV3- E. Thiry

5A.5 Etude de l'acide nucléique viral

Amplification génique

Chimie des intercalants :

Molécules (SYBR Green, bromure d'éthidium) ayant la propriété de s'intercaler de façon aspécifique dans les doubles brins d'ADN au cours de leur synthèse, conformation qui les rend fluorescentes.

Excitation (UV) → émission de fluorescence proportionnelle à la quantité de molécules liées → lecture en fin de phase d'élongation dans le processus de PCR

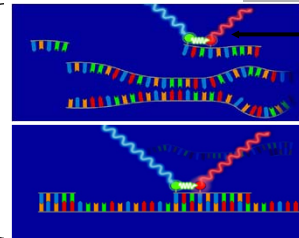
Inconvénient : tous les doubles brins d'ADN seront marqués. Des émissions aspécifiques sont donc attendues dans le signal total

Université de Liège

5A.5 Etude de l'acide nucléique viral

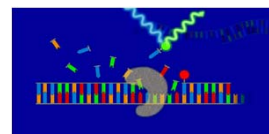
Amplification génique

Chimie des sondes :
 Fixation d'une sonde spécifique du fragment amplifié, lié à 2 fluorochromes, 1 émetteur (en vert) et 1 récepteur (en rouge).
 Sonde intègre : émission uniquement par fluo récepteur (rouge)

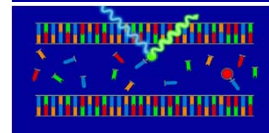


Ex. : TaqMan

Polymérisation → action exonucléasique de la polymérase
 → sonde lysée → séparation fluo émetteur et fluo récepteur



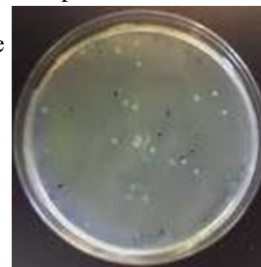
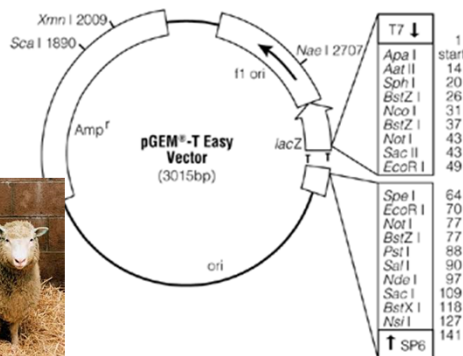
Emission par fluo émetteur (vert)



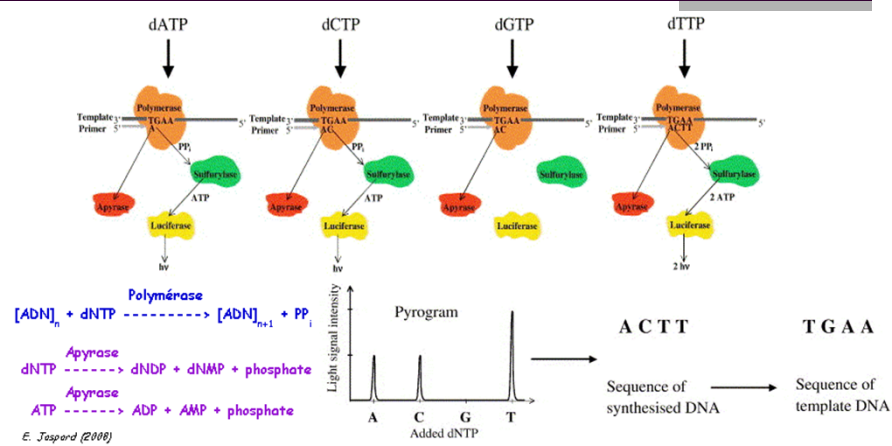
5A.5 Etude de l'acide nucléique viral

Clonage et séquençage

- Détermination précise de la séquence en nucléotides (laboratoires spécialisés)
- Méthode de Sanger (plus rarement Maxam et Gilbert) et pyroséquençage
- Si virus à ARN : ADN complémentaire nécessaire (transcription inverse requise)
- A partir du produit de PCR ou clonage de la séquence



5A.5 Etude de l'acide nucléique viral Pyroséquence (« real time sequencing »)



5A.5 Etude de l'acide nucléique viral Clonage et séquençage

Application :

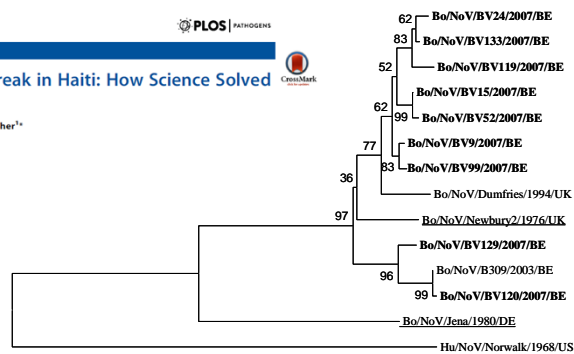
Lors d'épidémie (ex. : intoxication alimentaire), isolement d'un virus, puis envoi au labo qui séquence une partie déterminée du génome de la souche pour permettre un (géo)typage très fin du virus. Permet l'épidémiologie moléculaire.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS PATHOGENS

The 2010 Cholera Outbreak in Haiti: How Science Solved a Controversy

Fabini D. Orata¹, Paul S. Keim^{2,3}, Yan Bouche^{1*}



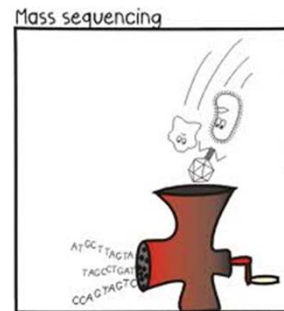
0.05

Copyright : Veterinary Microbiology, Elsevier

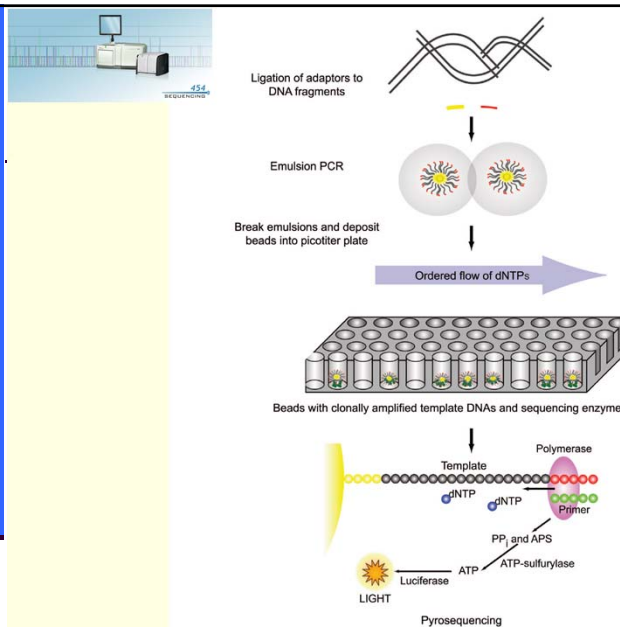
5A.5 Etude de l'acide nucléique viral

Séquençage à haut débit (« *High throughput sequencing* »)

- *Next generation sequencing*
- Plusieurs technologies: 454, Illumina, SOLiD
- Applications:
 - Virus discovery
(Schmallenberg virus)
 - Etude des populations virales,
études génomiques quantitatives

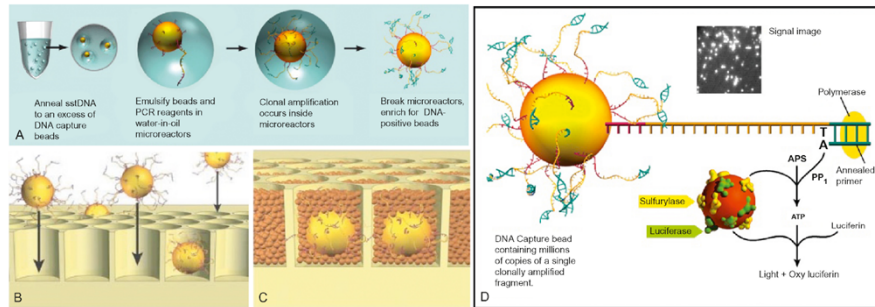


Université
de Liège



**Roche
454**

Fig. 1. Roche 454 GS FLX sequencing. Template DNA is fragmented, end-repaired, ligated to adaptors, and clonally amplified by emulsion PCR. After amplification, the beads are deposited into picotiter-plate wells with sequencing enzymes. The picotiter plate functions as a flow cell where iterative pyrosequencing is performed. A nucleotide-incorporation event results in pyrophosphate (PP_i) release and well-localized luminescence. APS, adenosine 5'-phosphosulfate.



Illumina/Solexa

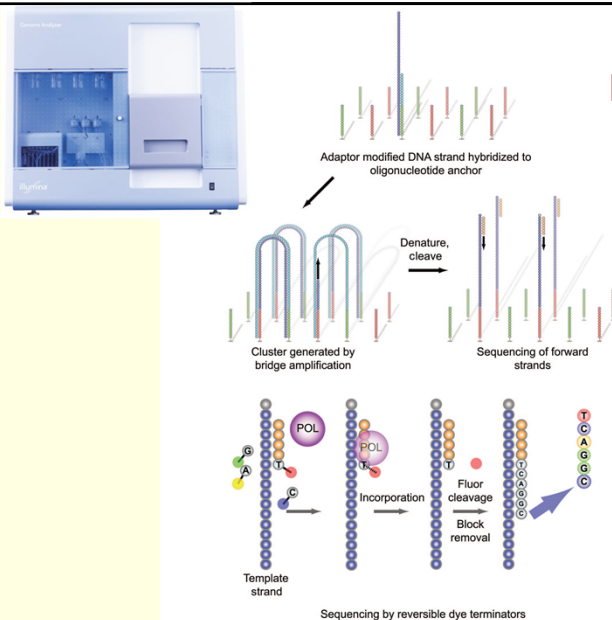
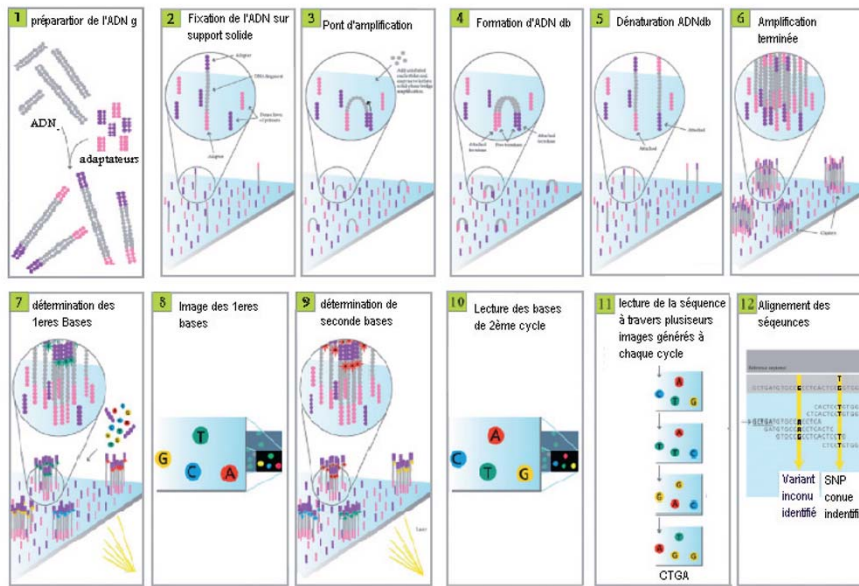


Fig. 2. Illumina Genome Analyzer sequencing.
 Adapter-modified, single-stranded DNA is added to the flow cell and immobilized by hybridization. Bridge amplification generates clonally amplified clusters. Clusters are denatured and cleaved; sequencing is initiated with addition of primer, polymerase (POL) and 4 reversible dye terminators. Postincorporation fluorescence is recorded. The fluor and block are removed before the next synthesis cycle.



	Platform	Roche/454	Illumina	SOLID
Sequencing chemistry	Pyrosequencing		Polymerase-based sequencing-by-synthesis	Ligation-based sequencing
Amplification approach	Emulsion PCR		Bridge amplification	Emulsion PCR
Paired ends/separation	Yes/3 kb		yes/200 bp	Yes/3 kb
Mb/run	100 Mb		1300 Mb	3000 Mb
Time/run (paired ends)	7 h		4 days	5 days
Read length	250 bp		32-40 bp	35 bp
Cost per run (total direct*)	\$8439		\$8950	\$17 447
Cost per Mb	\$84.39		\$5.97	\$5.81

*Total direct costs include the reagents and consumables, the labor, instrument amortization cost and the disc storage space required for data storage/access.



5A.5 Etude de l'acide nucléique viral

Bioinformatique

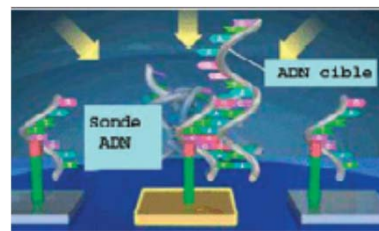
Différentes analyses possibles à partir des séquences nucléotidiques rentrées dans des banques de données (ex: GenBank) disponibles via internet.

Ex: phylogénie, identification des séquences codantes (cadres de lectures et gènes), identifications des fonctions des produits de gènes viraux par analogie, développement d'outils de diagnostic (choix d'amorces de PCR)

5A.5 Etude de l'acide nucléique viral

Puces à ADN (*microarrays*)

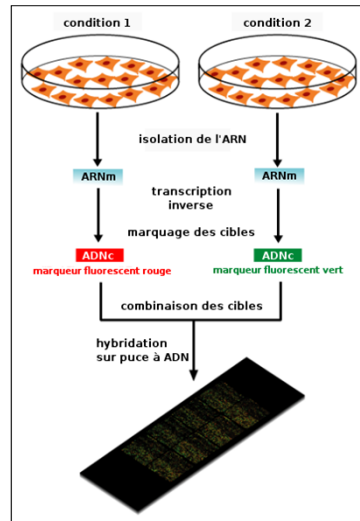
- Principe :
 - Isolation d'ARN d'un échantillon biologique
 - Transcription inverse et marquage des cibles
 - Hybridation avec une sonde potentiellement complémentaire sur le microdamier
 - Résultat : analyse informatique de la fluorescence émise : on connaît la nature de la sonde fixée au microdamier par rapport à sa place sur celui-ci, donc déduction de la cible qui s'y est fixée
- Application : diagnostic, recherche (étude du génome et du transcriptome, niveau d'expression génique, effet de traitement en comparaison avec non-traités), *virus discovery* (ex: SARS comme nouveau coronavirus)
- Voir aussi en ligne : Thomas *et al.*, Ann. Méd. Vét., 2005, **149** (2), pp 93-116.



Hybridation de l'ADNc cible marquée sur la sonde complémentaire fixée au microdamier. Analyse des signaux émis après lavage des cibles non fixées

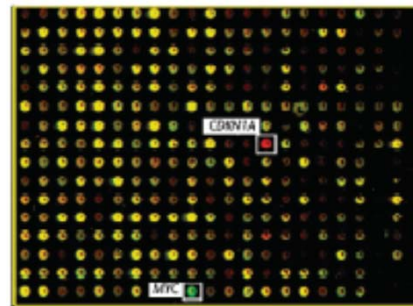
5A.5 Etude de l'acide nucléique viral

Puces à ADN



Puces

- Basse densité (5-100 sondes)
- Moyenne densité (100-1000 sondes)
- Haute densité (100.000 sondes)



Université de Liège 

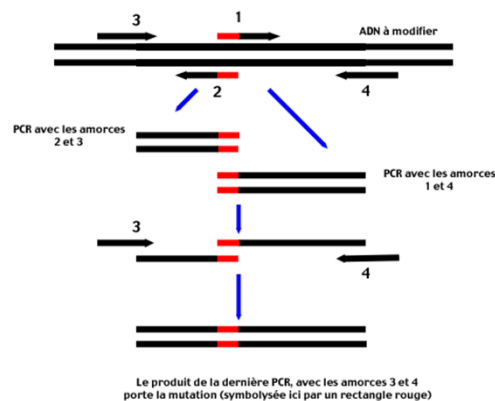
5A.5 Etude de l'acide nucléique viral

Méthodes basées sur les mutations induites dans les séquences génétiques à étudier (mutagenèse dirigée)

Mutation introduite à un endroit bien précis d'un génome viral afin d'en étudier la modification phénotypique induite

Permet l'étude de la fonction des gènes viraux

Reverse genetics et technologie du BAC cloning (clones infectieux)



Université de Liège 

5A.6 Etude des protéines virales

- 6.1. Marquage radioactif
- 6.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide
- 6.3. Western blot
- 6.4. Immunoprécipitation
- 6.5. Systèmes d'expression protéique
- 6.6. Autres

5A.6 Etude des protéines virales

Marquage radioactif

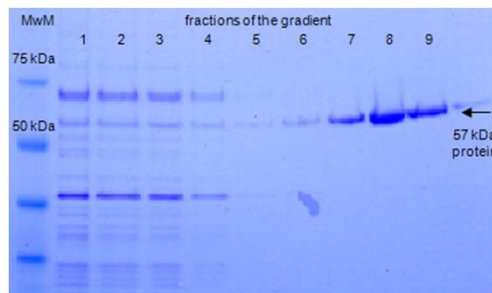
Marquage radioactif : un acide aminé essentiel du milieu remplacé par le même ayant incorporé un isotope radioactif (méthionine marquée S^{35}).
Marquage de toutes les protéines néosynthétisées.

5A.6 Etude des protéines virales

Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Electrophorèse en gel de polyacrylamide (*SDS-PAGE*) : séparation des protéines selon leur masse moléculaire, révélation par radioactivité ou colorants spécifiques des protéines (bleu de Coomassie, coloration à l'argent).

En conditions dénaturantes ou non, 2D.



Copyright : Veterinary Microbiology, Elsevier

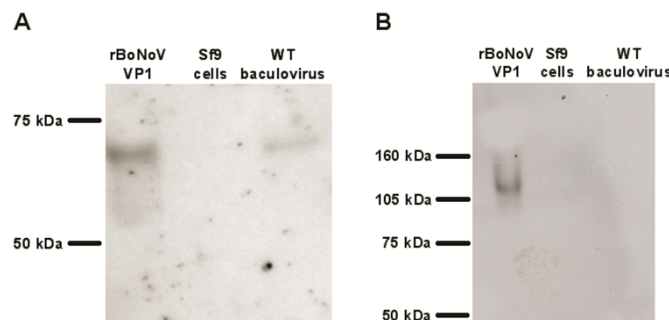
Université
de Liège



5A.6 Etude des protéines virales

Western Blot

Western blotting ou Immunoblot : électrophorèse, transfert sur membrane puis identification des déterminants antigéniques par des anticorps spécifiques et révélation par une méthode immuno-enzymatique.



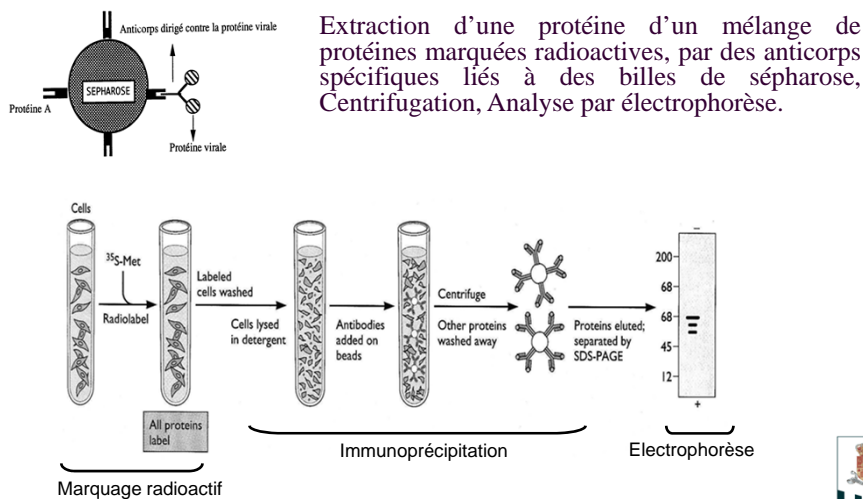
Copyright : Veterinary Microbiology, Elsevier

Université
de Liège



5A.6 Etude des protéines virales

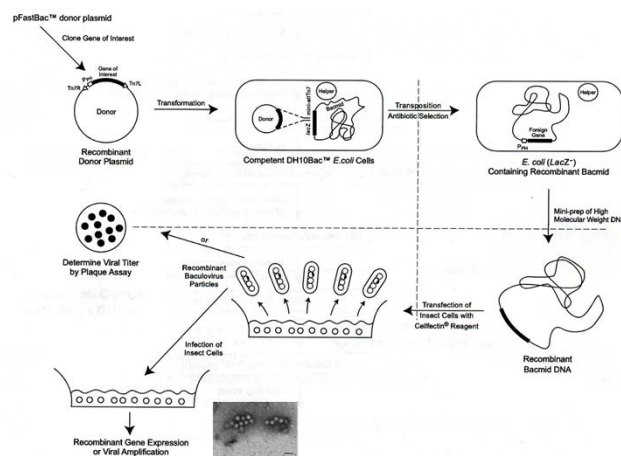
Immunoprécipitation



5A.6 Etude des protéines virales

Systèmes d'expression protéique

Exemple : système baculovirus



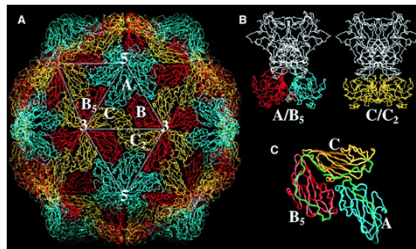
5A.6 Etude des protéines virales

Autres

Séquençage protéique : une bande protéique obtenue après électrophorèse en gel de polyacrylamide peut être séquencée (permet aussi analyses en bioinformatique).

Spectrométrie de masse

Cristallographie : permet d'obtenir la structure 3D d'une protéine virale.
Exemple : étude des interactions d'une virus avec son récepteur.



Copyright : Science, AAAS



Mmdbsrv.val

Université
de Liège



5A.7 Etude du glycome viral

Structures saccharidiques peuvent se trouver sur les protéines virales (glycoprotéines) ou sur les structures cellulaires cibles (interviennent alors dans les interactions virus-hôte ; ex: liaison à un récepteur/facteur d'attachement)

Etude par utilisation d'anticorps, d'enzymes, par spectrométrie de masse, cristallographie, résonance magnétique nucléaire, glycoarray, lectines

Université
de Liège



5B. Méthodes de diagnostic virologiques

1. Spécimens et échantillons pour le diagnostic virologique
2. Signification de la détection virale
3. Diagnostic des infections virales

5B.1 Spécimens et échantillons pour le diagnostic virologique

La qualité du diagnostic viral (probabilité d'identifier l'agent étiologique) dépend fortement de la qualité de l'échantillon reçu par la laboratoire (quantité, durée et conditions du transport).

Le meilleur prélèvement est souvent obtenu sur le site de la lésion et dans les premiers jours de l'apparition de celle-ci.

La culture virale requiert des conditions plus drastiques que celle requises pour la détection des antigènes ou la PCR

Transport de + d'1h : 4°C (autre que sang)

Transport de + de 24h : -70°C (attention à la t° de congélation pour certains virus : RSV, herpesvirus)

5B.1 Spécimens et échantillons pour le diagnostic virologique

Echantillon	Instructions/recommandations
Sang	3-10 ml, type de tube dépend du type de test *
Ecouvillon	En Dacron, placés dans du milieu de culture ou du sérum physiologique (antibiotique parfois requis)
Fluide	En récipient stérile
Tissu	En récipient stérile avec sérum physiologique (maintien d'humidité)
Matière fécales	Au moins 4 g en récipient stérile

* Sang complet, leucocytes, plasma requièrent anticoagulant (héparine : inhibiteur de PCR)

La plupart des tests sérologiques, culture et PCR : tube sec

5B.2 Signification de la détection virale

La détection du virus dans un échantillon (surtout après utilisation de méthodes très sensibles comme la PCR) n'est pas une preuve en elle-même de l'implication de ce virus dans l'étiologie des signes cliniques

Toujours remettre le résultat du test dans son contexte sémiologique (signes cliniques relevés par le praticien) et pathologique

5B.3 Diagnostic des infections virales

- 3.1. Méthodes de diagnostic direct non spécifique
- 3.2. Méthodes de diagnostic direct spécifique
- 3.3. Méthodes de diagnostic indirect

5B.3 Diagnostic des infections virales

Pathologie observée, récolte des signes cliniques



Diagnostic différentiel



Confirmation de l'étiologie par :

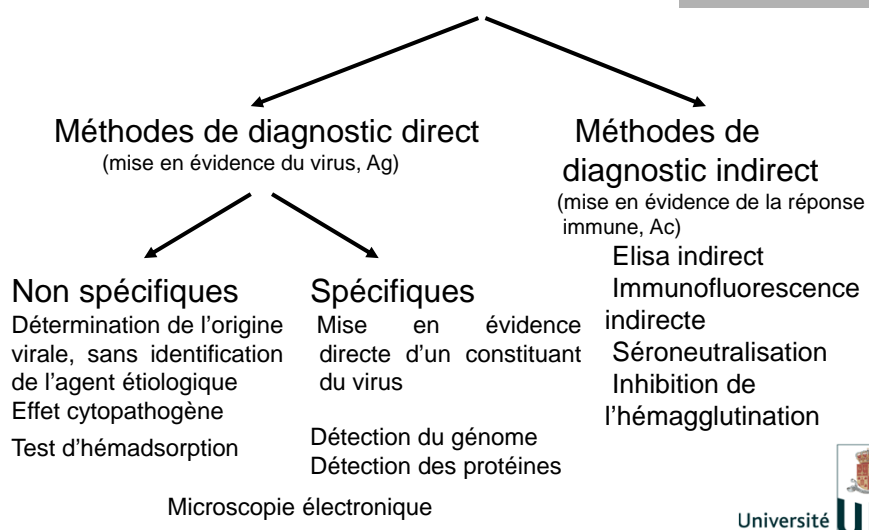
- Mise en évidence de l'agent pathogène (direct)
- Mise en évidence de la réponse immunitaire (indirect)

5B.3 Diagnostic des infections virales



Ecouvillons naseaux

5B.3 Diagnostic des infections virales



5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic direct non spécifique

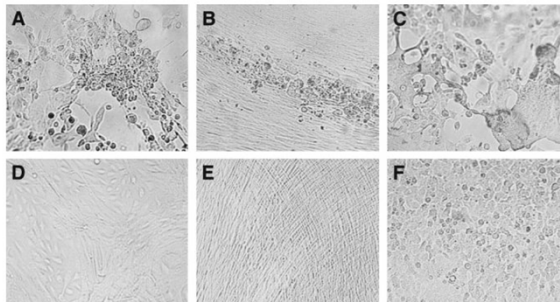
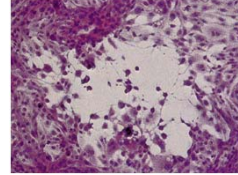
I. Effet cytopathogène en culture de cellules

Quel type cellulaire est affecté?

Temps et vitesse de progression de l'effet cytopathogène

Distribution de l'effet (diffus, focal, limité aux marges de la culture)

Nature des changements morphologiques



Copyright : Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins

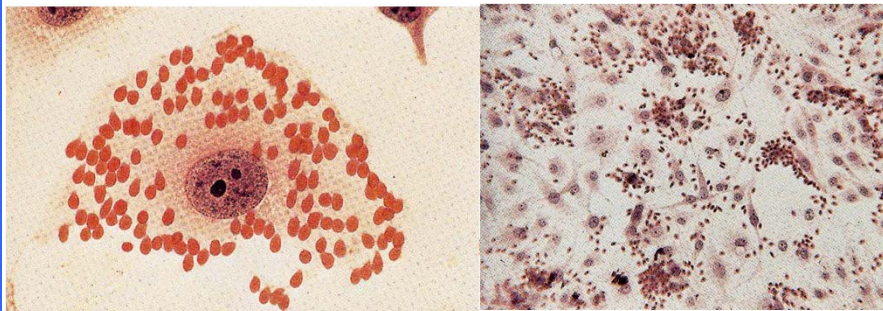
Université
de Liège



5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic direct non spécifique

II. Test d'hémadsorption :



Virus des oreillons
(paramyxovirus)

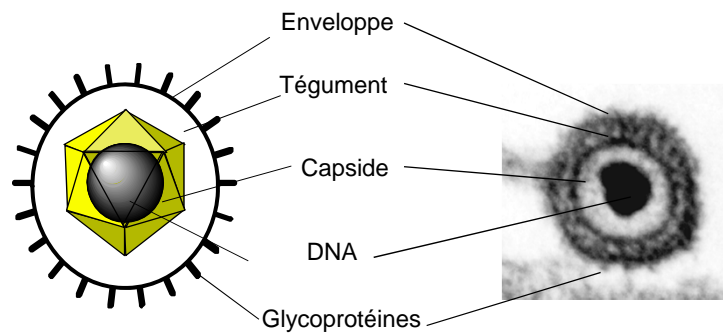
Virus Sendai

Université
de Liège



5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic direct spécifique



5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic direct spécifique

- I. Visant la détection de l'ADN viral à partir du prélèvement
- II. Visant la détection des protéines virales :
 - Techniques immunoenzymatiques (ELISA)
 - Techniques d'immunofluorescence
- III. Mise en évidence directe du virus:
 - Microscopie électronique

Virologie vétérinaire – BMV3- E. Thiry

5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic direct spécifique

ELISA direct

<p>Réactifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ac spécifiques des Ag d'intérêt - Echantillon inconnu <p>Laisser incuber (temps de réaction)</p> <p>Lavages (enlève toutes substances non liées)</p>	<p>Echantillon positif</p> <p>Ag présents et fixation aux Ac</p>	<p>Echantillon négatif</p> <p>Ag absent</p>	<p><u>Etape 1</u> :</p> <p>Ajout de l'échantillon sur le support</p>
<p>- Ac couplés à une enzyme (E) spécifique des Ag d'intérêt </p> <p>Laisser incuber (temps de réaction)</p> <p>Lavages (enlève tous les Ac-E non liés)</p>			<p><u>Etape 2</u> :</p> <p>Ajout des anticorps couplés à une enzyme</p>
<p>- Substrat de l'E</p> <p>POSITIF : substrat converti en produit coloré</p> <p>NEGATIF : pas de coloration</p>			<p><u>Etape 3</u> :</p> <p>Révélation par ajout du substrat de l'enzyme</p>

Virologie vétérinaire – BMV3- E. Thiry

5B.3 Diagnostic des infections virales

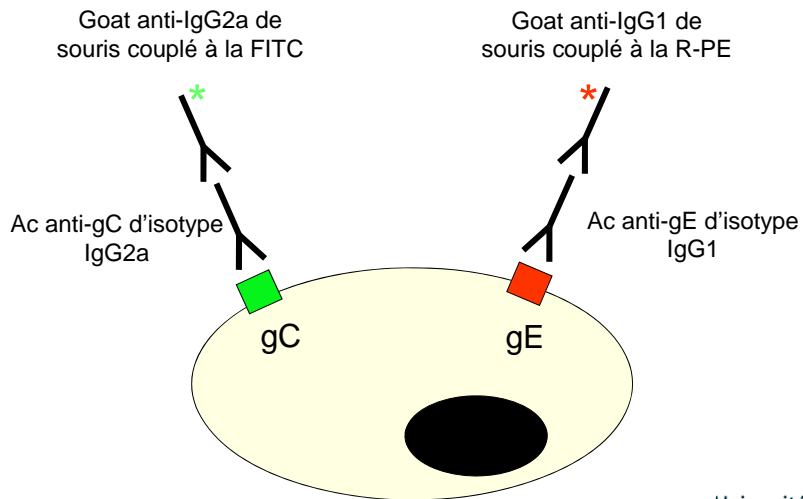
Méthodes de diagnostic direct spécifique

Immunofluorescence (directe spécifique)

Université de Liège

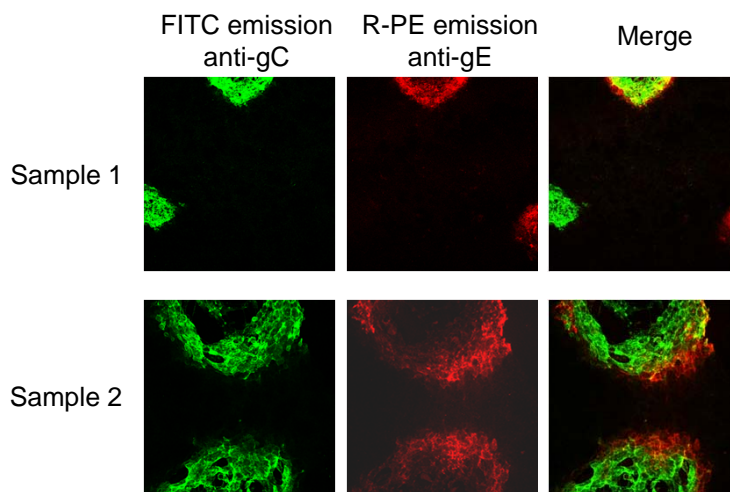
5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic direct spécifique Immunofluorescence (directe spécifique)



5B.3 Diagnostic des infections virales

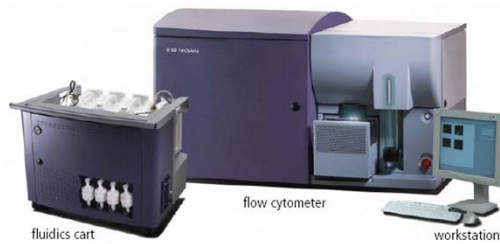
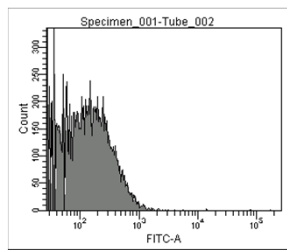
Méthodes de diagnostic direct spécifique Immunofluorescence (directe spécifique)



5B.3 Diagnostic des infections virales

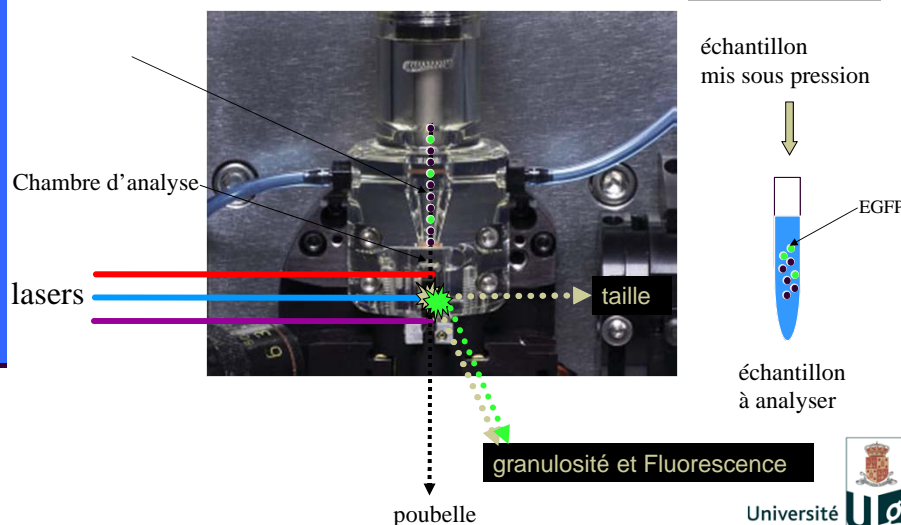
Méthodes de diagnostic direct spécifique
 Immunofluorescence (directe spécifique)- Cytométrie en flux

Réaction antigène-anticorps peut aussi être étudiée par cytométrie en flux



5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic direct spécifique
 Immunofluorescence (directe spécifique)- Cytométrie en flux



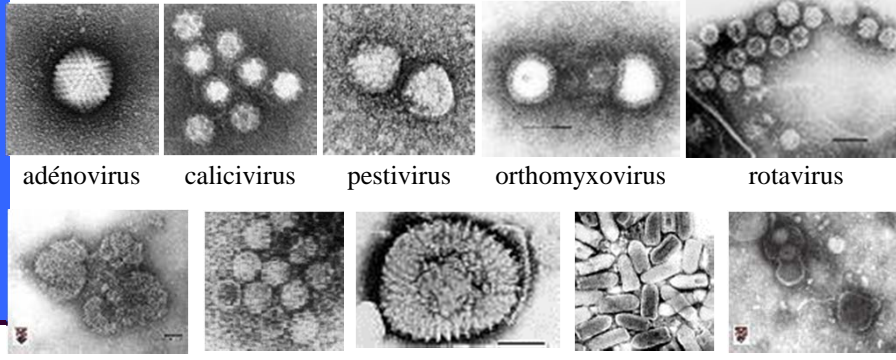
Virologie vétérinaire – BMV3- E. Thiry

5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic direct


Microscopie électronique

Après coloration négative (acétate d'uranyl, acide phosphotungstique)



adénovirus calicivirus pestivirus orthomyxovirus rotavirus
 paramyxovirus parvovirus poxvirus rhabdovirus herpesvirus

Copyright : ICTV dB picture gallery, <http://www.ictvdb.org>


Université de Liège 

Virologie vétérinaire – BMV3- E. Thiry

5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic indirect

- 3.1. ELISA indirect
- 3.2. Immunofluorescence indirecte
- 3.3. Séroneutralisation
- 3.4. Inhibition de l'hémagglutination
- 3.5. Immunodiffusion en gel d'agarose (AGID)

Université de Liège 

Virologie vétérinaire – BMV3- E. Thiry

5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic indirect

ELISA indirect simple

<p>Réactifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ag - Echantillon inconnu <p>Laisser incubé (temps de réaction)</p> <p>Lavages (enlève toutes substances non liées)</p>	<p>Echantillon +</p> <p>Ac spécifiques présents et se fixent aux Ag</p>	<p>Echantillon -</p> <p>Ac spécifiques absents ; les autres Ac sont éliminés aux lavages</p>	<p><u>Etape 1</u> : Ajout de l'échantillon sur le support</p> <p><u>Etape 2</u> : Ajout des anticorps couplés à une enzyme</p> <p><u>Etape 3</u> : Révélation par ajout du substrat de l'enzyme</p>
<p>- Ac couplés à une enzyme (E) spécifiques des Ac (antiglobuline) </p> <p>Laisser incubé (temps de réaction)</p> <p>Lavages (enlève tous les Ac-E non liés)</p>			
<p>- Substrat de l'E</p> <p>POSITIF : substrat converti en produit coloré</p> <p>NEGATIF : pas de coloration</p>			

Virologie vétérinaire – BMV3- E. Thiry

5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic indirect

ELISA indirect de compétition (blocage)

<p>Réactifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ag - Echantillon inconnu <p>Laisser incubé (temps de réaction)</p> <p>Lavages (enlève toutes substances non liées)</p>	<p>Echantillon</p> <p>Ag viraux fixés ; les Ac spécifiques s'y fixent</p>	<p>Echantillon</p> <p>Ac spécifique absent ; les autres Ac sont éliminés aux lavages</p>	<p><u>Etape 1</u> : Ajout de l'échantillon sur le support</p> <p><u>Etape 2</u> : Ajout des anticorps couplés à une enzyme</p> <p><u>Etape 3</u> : Révélation par ajout du substrat de l'enzyme</p>
<p>Réactifs</p> <p>- Ac couplés à une enzyme (E) spécifiques des Ag </p> <p>Laisser incubé (temps de réaction) - Lavages (enlève tous les Ac-E non liés)</p>			
<p>Réactifs</p> <p>- Substrat de l'E</p> <p>POSITIF : pas de coloration</p> <p>NEGATIF : substrat converti en produit coloré</p>			

5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic indirect

Séroneutralisation

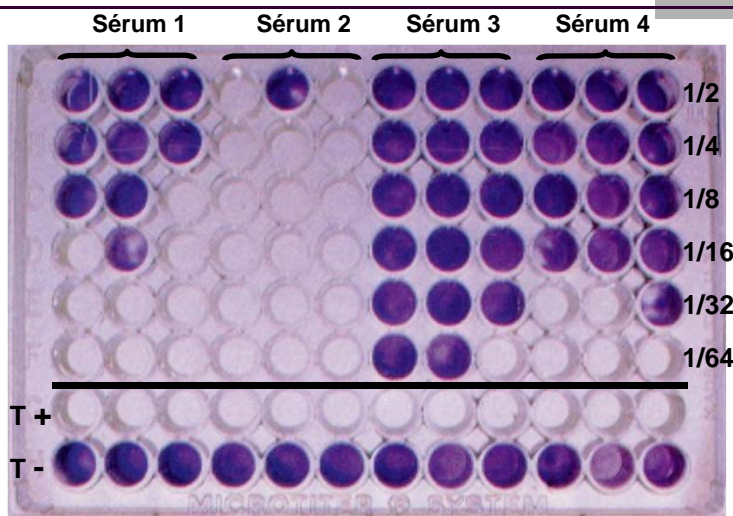
Basée sur la capacité des Ac à empêcher le virus d'infecter un tapis cellulaire et d'y provoquer un effet cytopathogène (lyse).

<p>- virus</p> <p>- Echantillon inconnu</p> <p>Laisser le temps à la réaction Ag-Ac de se produire</p>		<p>Echantillon positif</p> <p>Ac spécifiques se fixent aux virus</p>	<p>Echantillon négatif</p> <p>Ac spécifique absent</p>	<p>Étape 1 : Mélange du sérum à tester avec une suspension virale</p>
<p>Réactifs</p> <p>Ajouter le mélange sérum-Ag à la culture de cellules</p> <p>Laisser incuber (temps de multiplication du virus)</p>				<p>Étape 2 : Mise en contact du mélange avec un tapis cellulaire confluent</p>
<p>POSITIF : les Ac ont empêché la multiplication virale : le tapis cellulaire est intact</p> <p>NEGATIF : le virus s'est multiplié et a détruit le tapis cellulaire</p>				<p>Étape 3 : Lecture du résultat après coloration</p>

5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic indirect

Séroneutralisation




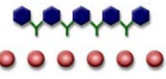
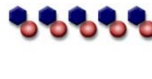
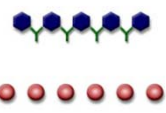
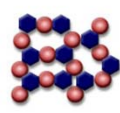


Virologie vétérinaire – BMV3- E. Thiry

5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic indirect Inhibition de l'hémagglutination

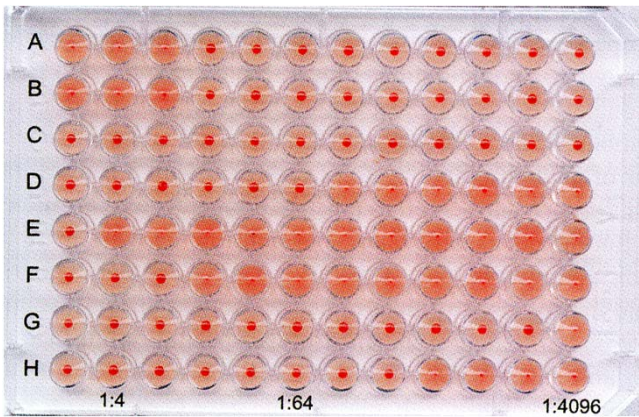
Basé sur la capacité des Ac à neutraliser le virus → Pas de fixation du virus aux GR

<p>Echantillon inconnu</p> <p>- Virus</p> <p>Laisser le temps à la réaction Ag-Ac de se produire</p>	<p>Echantillon positif</p> <p>Ac spécifiques se fixent aux virus</p> 	<p>Echantillon négatif</p> <p>Ac spécifique absent</p> 	<p><u>Etape 1</u> : Mélange du sérum à tester avec une suspension virale</p>
<p>Reactifs</p> <p>Ajouter une suspension de globules rouges (GR)</p> 	<p>Inhibition de la fixation des virus aux GR</p> 	<p>Fixation des virus aux GR</p> 	
<p>POSITIF : les Ac ont empêché la fixation des GR aux virus → inhibition de l'hémagglutination</p> <p>NEGATIF : le virus se fixe aux GR → hémagglutination</p>			<p><u>Etape 3</u> : Lecture du résultat (voir photo dia suivante)</p>


Virologie vétérinaire – BMV3- E. Thiry

5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic indirect Inhibition de l'hémagglutination



Copyright : Fenner 's Veterinary Virology, Academic Press

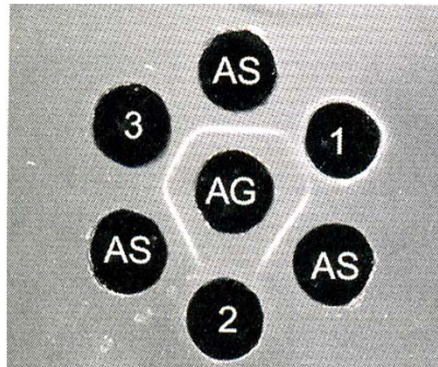


Université de Liège

5B.3 Diagnostic des infections virales

Méthodes de diagnostic indirect

Immunodiffusion en gel d'agarose (AGID)



Copyright : Fenner 's Veterinary Virology, Academic Press

Université
de Liège



C. Futur et perspectives dans le diagnostic en virologie

- Techniques applicables « sur le terrain » :
 - Amplification isotherme (LAMP, NASBA)
 - *Lateral flow devices*
- Techniques de multiplexage :
 - Puces à ADN, *microsphere immune assay*, *cytométrie en flux*
- Méthodes adaptées à la *virus discovery* :
 - Séquençage à haut débit

Université
de Liège



Bibliographie

Fields Virology. 2007. 5th edition, ed. D.M. Knipe, P.M. Howley. Chapitre 17, Diagnostic Virology, pp.565-604.

Fenner's Veterinary Virology. 2011. 4th edition, ed. N.J. MacMachlan, E.J. Dubovi. Chapitre 5, Laboratory Diagnosis of Viral Infections, pp. 101-122.

Boonham et al., Virus Research, 2013. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing.

Cours de Virologie vétérinaire

<http://www.ictvdb.org>, consulté le 2 février 2011.