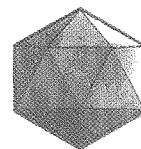


IHMF, MONTE CARLO, 15-16 NOVEMBRE 1993

**DIAGNOSTIC : L'APPORT DU LABORATOIRE**

par le Dr A.F. Nikkels et le Prof. B. Rentier (\*)



**Chez le sujet immunodéprimé (SIDA, greffe, cancer, médicaments), la femme enceinte et le nouveau-né, la gravité potentielle des infections herpétiques exige l'instauration rapide d'un traitement efficace. Etant donné que, chez ces sujets, des formes atypiques rendent le tableau clinique souvent déroutant, il est indispensable de pouvoir disposer de techniques diagnostiques rapides et précises<sup>(1,2)</sup>.**

Les techniques modernes d'hybridation faisant appel aux sondes nucléiques et à l'immunomarquage par anticorps mono- ou polyclonaux permettent d'identifier les séquences génomiques spécifiques ainsi que les protéines correspondantes. Il est ainsi possible aujourd'hui de distinguer les types I et II du virus herpès simplex. D'autre part, avec le développement d'agents antiviraux de plus en plus spécifiques, un diagnostic précis revêt une grande importance clinique.

Mais avant d'en venir au typage viral, commençons par confirmer la nature herpétique de l'infection. Le tableau clinique n'est en effet pas toujours limpide, surtout chez les sujets immunodéprimés. Chez le patient sidéen, de nouvelles entités cliniques ont même été décrites, comme les lésions verruciformes contenant de l'HSV ou du VZV<sup>(3)</sup>.

### La biologie classique

Le dosage des IgG et des IgM dans le sang est surtout utile dans la surveillance des patients immunodéprimés<sup>(4)</sup>. Un diagnostic rapide de primo-infection n'est pas possible en raison de la lenteur de la séroconversion.

Le test de la fixation du complément<sup>(5)</sup> manque de sensibilité, de même que l'agglutination au latex<sup>(6)</sup> ou les anticorps neutralisants. Le FAMA (Fluorescent Antibody Membrane Antigen) reste le test le plus performant, même s'il est moins utilisé en routine que l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), qui s'avère par ailleurs très sensible et très spécifique<sup>(7)</sup>.

Le liquide provenant des vésicules ou des lésions muqueuses ulcérées se prête également aux examens de biologie clinique. L'écouvillonnage est fréquemment utilisé en routine par les dermatologues et les gynécologues. Les antigènes viraux de l'HSV et du VZV peuvent être identifiés par méthode immunoenzymatique (Elisa)<sup>(8)</sup> ou par immunofluorescence<sup>(9)</sup>. Le DNA viral peut être détecté par les techniques plus récentes comme l'hybridation<sup>(10)</sup> ou l'amplification génique, encore appelée PCR (Polymerase Chain Reaction)<sup>(11)</sup>. Cette technique permet de déterminer

### BIOLOGIE CLINIQUE CLASSIQUE

#### SANG PÉRIPHÉRIQUE

**ELISA** (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)  
très sensible et très spécifique  
le plus utilisé

**FAMA** (Fluorescent Antibody Membrane Antigen)  
le plus performant

**IgG et IgM**  
ne convient pas au diagnostic d'une primo-infection pour la surveillance du statut immunitaire

**fixation du complément, agglutination au latex, anticorps neutralisants**  
peu sensibles pour le VZV et l'HSV

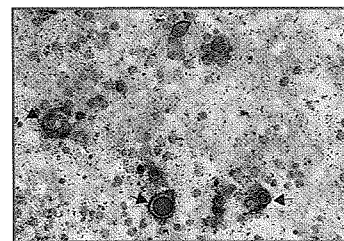
#### LIQUIDE VÉSICULAIRE (écouvillonnage)

**ELISA**  
**immunofluorescence**  
**amplification génique** (PCR, polymerase chain reaction)  
**hybridation** (sondes nucléiques)

la nature et la provenance d'un fragment d'ADN. Elle met en oeuvre une sonde (ou amorce) dont la séquence de nucléotides est complémentaire de celle d'un brin d'ADN déterminé, caractéristique de la cible recherchée. Après hybridation de la sonde avec le fragment d'ADN cible, ce dernier est copié à des millions d'exemplaires par une enzyme ADN-polymérase.

### L'histologie

La recherche directe du virus sur frottis exige de prélever des cellules infectées. Il est donc très important de bien gratter le plancher de la lésion. Après coloration Giemsa (test de Tzanck), l'examen au microscope met en évidence des cellules géantes et des inclusions intranucléaires caractéristiques des lésions provoquées par les herpès virus<sup>(12)</sup>. L'identification par anticorps monoclonaux permet en outre de différencier immédiatement les HSV du VZV. La sensibilité et la fiabilité de la méthode dépendent directement de la qualité du prélèvement et le test ne peut être réalisé que par un pathologiste expérimenté.



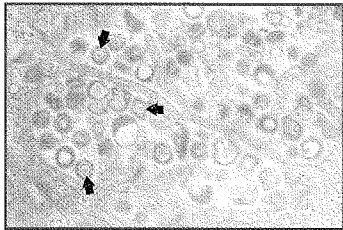
En face de lésions érythémateuses ou papuleuses, ou en cas de manifestations atypiques, il

*Frottis d'une lésion varicelleuse. Immunomarquage avec l'anticorps monoclonal VL8 identifiant la glycoprotéine gpl du VZV.*

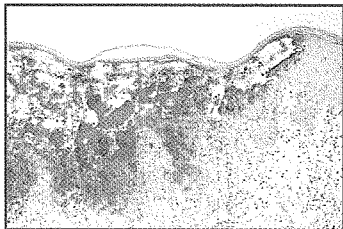
## HISTOLOGIE

	présence du virus	distinction entre HSV/VZV
<b>frottis</b> (lésions des muqueuses)	test de Tzanck : (inclusions, cellules géantes)	anticorps monoclonaux
<b>biopsie/lavage ponction</b>	histologie microscopie électronique	AC >> prot. du VZV >> prot. de l'HSV hybridation in situ

est nécessaire de recourir à la biopsie, pour examen au microscope optique ou électronique. La microscopie électronique permet de reconnaître les caractéristiques morphologiques des particules virales, pour autant que la concentration du virus atteigne  $10^5$  particules/ml<sup>(13, 14)</sup>.



Particules virales de type Herpes Viridae en microscopie électronique dans un kératinocyte épidermique (x 16000).



Marquage des glycoprotéines de l'HSV de type I dans l'épiderme.

La distinction entre HSV et VZV se fera, à nouveau, à l'aide d'anticorps dirigés, par exemple, contre certaines protéines spécifiques du VZV (gpl, gpII, IE 63 et IE 62). On peut encore utiliser l'hybridation in situ<sup>(15-18)</sup>.

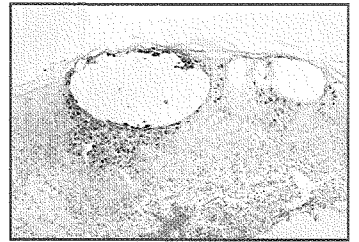
Ces mêmes techniques peuvent être mises en oeuvre pour l'examen d'autres fragments biopsiques (foie, tube digestif, tractus respiratoire supérieur), ou celui de ponctions du LCR, de lavage broncho-alvéolaire ou d'aspiration chorionique<sup>(19-20)</sup>.

## Cultures virales

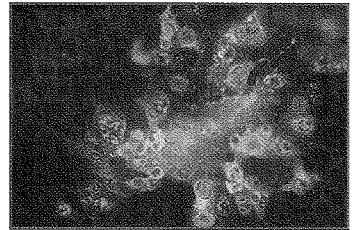
L'examen direct est souvent complété par une culture virale<sup>(21)</sup>. L'inoculation des cultures cellulaires se fait à partir du liquide des vésicules ou à partir d'un écouvillonnage. La mise en évidence d'un effet cytopathique permet de poser

le diagnostic. L'effet cytopathique devient rapidement évident pour l'HSV (18 heures) mais demande nettement plus de temps pour le VZV (3 à 4 jours).

Les "shell vial cultures" ont été développées pour accélérer les possibilités diagnostiques. Cette méthode est basée sur l'identification des constituants antigéniques au sein des cultures avant que l'effet cytopathique n'apparaisse<sup>(22-24)</sup>. Malgré la spécificité de la méthode, la culture virale est lente et peu sensible. Son avantage est que l'on dispose de l'agent viral en cause s'il s'avère nécessaire, en cas de résistance au traitement, de procéder à une étude fonctionnelle des thymidine-kinases virales.



Identification d'une séquence génomique du VZV au sein de l'épiderme.



Effet cytopathologique du VZV dans des cellules de la lignée MRC-5. Immunofluorescence avec un sérum anti-VZV.

(\*) Dr A.F. Nikkels, Service de Dermatopathologie, CHU de Liège (Prof. G.E. Piérard). Prof. B. Rentier, Service de Virologie fondamentale, CHU de Liège.

## CULTURE VIRALE\*

### 1. culture classique

- recherche de l'effet cytopathique sur cultures cellulaires
- lente et peu sensible

### 2. shell vial cultures

- détection des antigènes viraux dans les cultures cellulaires
- variante plus rapide

\* inoculation à partir du liquide vésiculaire ou d'un écouvillonnage.

\* isolement du virus vivant pour examens complémentaires éventuels

Réf. 1. Corey L. Laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. Principles guiding the development of rapid diagnostic tests. *Diagn Microbiol Infect Dis* 4:1115-1193, 1986 2. Nikkels A.F., Hermans-Lé T., Nikkels-Tassoudji N. et al. Diagnostic des infections cutanées par les herpes virus de types simplex et varicelle-zona. *Rev Méd Liège* 48:401-405, 1993 3. Hoppejans W.B., Bibler M.R., Orme R.L. et al. Prolonged cutaneous herpes zoster in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Dermatol* 126:1048-1050, 1990 4. Osborne T.A., Thomson R.B., Bostick C.C. et al. Several methods of detecting Varicella-Zoster virus (VZV) and measuring VZV immune status. *Diagn Microbiol Infect Dis* 12:287-288, 1989 5. Gerna G., Achilli G., Chambers R.W. Determination of neutralizing antibody and IgG antibody to Varicella-Zoster virus and of IgG antibody to membrane antigens by the immunoperoxidase technique. *J Infect Dis* 135:975-979, 1977 6. Steinberg S.P., Gershon A.A. Measurement of antibodies to Varicella-Zoster virus by using a latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 29:1527-1529, 1991 7. Wasmuth E.H., Miller W.J. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for antibody to Varicella-Zoster virus using purified VZV glycoprotein antigen. *J Med Virol* 32:189-193, 1990 8. Cleveland P.H., Richman D.D. Enzyme immunofiltration staining assay for immediate diagnosis of Herpes simplex virus and Varicella-Zoster virus directly from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 25:416-420, 1987 9. Drew W.L., Mintz L. Rapid diagnosis of Varicella-Zoster virus infection by direct immunofluorescence. *Amer J Clin Pathol* 73:699-701, 1980 10. Langenberg A., Smith D., Brakel C.L. et al. Detection of herpes simplex virus DNA from genital lesions by in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 26:933-937, 1988 11. Kido S., Ozaki T., Asada H. et al. Detection of Varicella-Zoster virus (VZV) DNA in clinical samples from patients with VZV by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29:76-79, 1991 12. Barr R.J., Herten J., Graham J.H. Rapid method for Tzanck preparation. *JAMA* 237:1119-1120, 1977 13. Lee F.K., Nahmias A.J., Nahmias D.G. et al. Demonstration of virus particles within immune complexes by electron microscopy. *J Virol Methods* 7:167-181, 1983 14. Folkers E., Vreeswijk J., Oranje A.P. et al. Rapid diagnosis in varicella and herpes zoster: re-evaluation of direct smear (Tzanck test) and electron microscopy including colloidal gold immuno-electron microscopy in comparison with virus isolation. *Brit J Dermatol* 121:287-296, 1989 15. Nikkels A.F., Debrus S., Sadzot-Delvaux C. et al. Comparative immuno-histochemical study of herpes simplex and varicella-zoster infection. *Virchows Archives A* 422:121-126, 1993 16. Martin J.R., Holt R.K., Langston C. Type specific identification of herpes simplex and Varicella-Zoster virus antigen in autopsy tissues. *Hum Path* 22:75-80, 1991 17. Nikkels A.F., Sadzot-Delvaux C., Cloes J.M. et al. Granulomatous reactions following herpes zoster contain varicella-zoster glycoprotein gpl. *J Invest Dermatol* 98:522, 1992 18. Nikkels A.F., Delvenne P., Debrus S. et al. Distribution of varicella-zoster virus gpl and gpII and corresponding genome sequences in the skin. *J Med Virol* (in press) 19. Weigle K.A., Grose C. Varicella pneumoniae: immunodiagnosis with a monoclonal antibody. *J Pediat* 105:265-269, 1984 20. Lakeman F.D., Koga J., Whitley R.J. Detection of antigen to herpes simplex virus in cerebrospinal fluid from patients with herpes simplex encephalitis. *J Infect Dis* 155:1172-1178, 1987 21. Isada N.B., Paar D.P., Johnson M.P. et al. In utero diagnosis of congenital varicella zoster virus infection by chorionic villus sampling and polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 165:1727-1730, 1991 22. Prober C.G., Hensleigh P.A., Boucher F.D. et al. Use of routine viral cultures at delivery to identify neonates exposed to herpes simplex virus. *II Engl J Med* 318:887-891, 1988 23. Forghani B., Yu G.J., Hurst J.W. Comparison of biotinylated DNA and RNA probes for rapid detection of Varicella-Zoster virus genome by in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 29:583-591, 1991 24. Schirm J., Meulenber J.J., Pastoor G.W. Rapid detection of Varicella-Zoster virus in clinical specimens using monoclonal antibodies on shell vials and smears. *J Med Virol* 28:1-6, 1989