

## Comparaison des résultats de la PCR, de l'antigénémie et de l'hybridation froide dans le diagnostic des infections actives à cytomégalo virus (CMV)

N. BEN SAÏDA  
 N. BOUZGARROU  
 S. BEN OTHMAN  
 I. FODHA  
 A. TRABELSI

**Résumé :** Le diagnostic des infections actives à CMV continue à poser des problèmes concernant le choix des techniques, et la maîtrise de l'interprétation des résultats. Les nouvelles techniques immunologiques et moléculaires mises au point au cours des dernières années ont amélioré ce diagnostic.

Dans notre travail, nous nous sommes proposés de comparer les résultats de la PCR, de l'antigénémie et de l'hybridation froide, au cours d'une suspicion d'infection active à CMV. Nous avons commencé par la recherche des marqueurs Sérologiques IgG/IgM pour 16 échantillons de Sang total provenant de 4 transplantés rénaux, 4 candidats à la greffe de rein, hémodialysés et deux volontaires sains, ainsi que pour 12 échantillons de LCR provenant d'enfants admis en pédiatrie pour suspicion d'une infection du SNC.

Pour les volontaires ainsi que pour les candidats à la greffe le profil Sérologique était IgG<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup>. Ce même profil est observé pour deux des transplantés de rein, malgré la présence d'une infection active à CMV confirmée par l'antigénémie et la PCR. les deux autres transplantés avaient des IgM anti CMV - La PCR suivie de la révélation sur gel d'agarose à 3% était négative pour les deux témoins (volontaires sains), pour l'ancien greffé asymptomatique et pour les hémodialysés. Alors qu'elle était positive pour 6 prélèvements sur 7 provenant des 3 transplantés de rein présentant des signes cliniques évocateurs d'une infection active par le CMV avec une antigénémie positive.

- Sur les 12 prélèvements de LCR, la PCR suivie par la révélation sur gel d'agarose à 3% était positive uniquement pour un seul cas.

Notre étude a bien montré, malgré le nombre d'échantillons pas très important, que la PCR est la technique la plus sensible. L'antigénémie, qui a la même spécificité que la PCR, demeure plus accessible aux laboratoires de virologie clinique, elle permet aussi de suivre le traitement par quantification des cellules infectées, mais, son handicap majeur reste, le nombre faible des leucocytes chez plusieurs malades notamment les insuffisants rénaux .

Laboratoire de Microbiologie  
 Hôpital Farhat Hached, Sousse

### Introduction

Le CMV ou herpes virus de type 5 est un virus de la famille des herpesviridae dont la prévalence est importante 50 à 100% (7) de la population. Il est doué de propriétés de latence.

Son caractère ubiquitaire, la fréquence de ses réactivations favorisées par l'immunodépression cellulaire, ses interactions avec le complexe d'histocompatibilité CMH en on fait l'agent infectieux majeur après toute

greffe d'organes. De ce fait il est responsable d'une mortalité et d'une morbidité importantes chez les greffés. (2) Ces patients nécessitent un suivi virologique pour différencier l'infection active de l'infection latente avant la survenue des symptômes, afin de mettre en place un traitement adapté le plus précocement possible. Les marqueurs virologiques actuellement disponibles, la virémie et l'antigénémie sont corrélés avec l'apparition des manifestations cliniques (10) mais leurs apport reste

encore insuffisant (9) et de nouveaux marqueurs plus sensibles et plus précoces seraient très utiles.

L'objectif de ce travail est en premier lieu la mise au point d'une technique de PCR qualitative permettant la mise en évidence d'une infection active à CMV par la détection du génome viral dans les polynucléaires du sang périphérique des greffés rénaux.

Les résultats obtenus avec cette technique ont été ensuite comparés à ceux de l'antigénémie pp65 et de l'hybridation froide réalisées chez les mêmes malades.

### Matériel

Notre étude menée sur une période d'une année entre janvier 2002 et février 2003, a porté sur 16 échantillons de sang total prélevé sur EDTA et provenant de :

- 3 transplantés rénaux présentant des signes cliniques évocateurs d'une infection active à CMV.
- 4 insuffisants rénaux candidats à une greffe.
- un ancien greffé de rein asymptomatique
- Tous ces malades nous ont été adressés, par le service de néphrologie de l'hôpital Fattouma Bourguiba de Monastir
- 2 volontaires sains, choisis parmi le personnel du laboratoire de microbiologie de l'hôpital F. Hached de Sousse
- 12 prélèvements de LCR provenant d'enfants admis dans les services de pédiatrie de Sousse et de Monastir pour une suspicion d'infection virale du SNC.

### Méthodes

- **Sérologie** : la recherche des IgG et IgM anti-CMV a été réalisée par une technique immunoenzymatique (MEIA ABBOT)

- **Séparation des Leucocytes du sang** :

3,5 ml de sang total sont prélevés sur EDTA et ont servi pour l'Antigénémie et la PCR qualitative.

Les Leucocytes sont séparés sur un gradient de dextran 5% qui permet d'obtenir uniquement des polynucléaires purifiés.

- **Antigénémie pp65** :

La trousse CMV-Vue FITC® Diasorin est basée sur la détection immunocytochimique de la protéine pp65 du CMV dans les polynucléaires. Les Leucocytes sont d'abord fixées sur lames au formaldéhyde et sont par la

suite incubées avec un mélange de deux anticorps monoclonaux de souris différents dirigés contre la protéine pp65 Ceci est suivi par l'addition d'un conjugué anti-IgG marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.

Les cellules sont par la suite observées au microscope à fluorescence au grossissement X 40. Une réaction positive est caractérisée par une fluorescence granulaire à localisation nucléaire et ou perinucléaire d'au moins une cellule sur 10000.

- **PCR qualitative** :

● **Extraction** : 10<sup>6</sup> polynucléaires sont nécessaires pour l'extraction de l'ADN. On réalise d'abord la lyse des protéines avec une solution de protéinase K (25 mg / ml) pendant une heure à 55°C, suivi de l'inactivation des enzymes (RNase-DNase) à 94°C pendant 10 min. Après centrifugation à 3700 tours / min pendant 5 min, le surnageant est collecté et précipité à - 80°C pendant 1 heure en présence de 40 µl d'acétate de sodium 0,2M et 3 volumes d'éthanol absolu. L'ADN du témoin positif est extrait à partir de culture de la souche de référence AD<sub>169</sub> sur cellule MRC<sub>5</sub>.

● Pour l'extraction à partir des LCR, 10 µl de LCR sont congelés décongelés 3 fois, puis traités à la protéinase K (120mg/ml) à 60°C pendant une heure, suivi d'une incubation à 95°C pendant 10 min. Après centrifugation à 8000 tours/min pendant 5 min, le surnageant est collecté et va servir directement à la PCR.

**PCR**

Les séquences des amorces utilisées sont :

5' AGA CCT TCA TGC AGA TCT CC 3'

5' GGT GCT CAC GCA CAT TGA TC 3'

Elles sont localisées au niveau de l'exon 4 du gène très précoces IE<sub>1</sub> (Zipeto et al : 1990)

● **Mélange réactionnel** :

Le mélange réactionnel comprend 5 µl du tampon (10x), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 4 µl d'oligo I E, sens (10 pmol / ml), 4 µl d'oligo IE1, anti-sens (10 pmol/ml), 1µl DNTP (10 mM), 0,25 µl Taq polymérase (50U/µl) et 22,7 µl d'eau stérile. 10 µl d'ADN de chaque échantillon sont ajoutés à ce mélange pour avoir un volume réactionnel final de 50 µl.

## Diagnostic des infections actives à cytomégalo virus (CMV)

### ● Amplification :

La PCR est réalisée dans un thermocycleur type Hybaid et comporte une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, suivie de 38 cycles composé chacun d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 s une hybridation des amorces 30S à 50°C, une étape d'élongation d'une min à 72°C. L'élongation finale dure 7 min à 72°C.

### ● Révélation :

- Révélation sur gel d'agarose à 3% :

La révélation se fait par migration sur gel d'agarose à 3% contenant 2 µl de bromure d'ethidium (BET) à 10 mg/ml la migration est faite à 110 v pendant 40 min. La bande recherchée fait 270 pb.

### Hybridation froide : (Trousse Hybrid - capture CMV- DNA®).

La trousse Hybrid - capture CMV - DNA est conçue pour mesurer la charge virale au niveau des Leucocytes du sang périphérique ; le protocole expérimental comprend une étape de dénaturation, suivie d'une hybridation avec un mélange de ribosondes complémentaire de 17% du génome du CMV. Ensuite on réalise la capture des hybrides ADN / ARN à l'aide d'un anticorps spécifique et la révélation se fait en chimiluminescence grâce à un Luminomètre type DCR qui converti le signal émis en unité relative de lumière ou RLU. Les résultats des échantillons sont extrapolés à partir de la courbe tracée sur la base des RLU des standards.

Le seuil de détection est de 700 copies /ml ce qui correspond à 1,5 pg/ml.

## Résultats

- Pour les deux volontaires sains, aucun marqueur d'infection active par le CMV n'a été observé (Ag-, PCR- ). Mais ils présentent tout les deux des marqueurs sérologiques d'une infection ancienne IgG+ IgM-. Les mêmes résultats sont retrouvés chez les insuffisants rénaux et le transplanté de rein asymptomatique.

- Pour les 3 transplantés de rein symptomatiques (patients N° 7, 8 et 9), la PCR était positive pour 7 échantillons sur 7 témoignant d'une infection active par le CMV (figure.1) confirmée par l'antigénémie et/ou par l'hybridation froide (tableau I).

- Le patient N°7, malgré qu'il n'avait pas d'IgM anti-CMV, sa PCR était positive au 21<sup>ème</sup> jours post-greffe et son antigénémie s'est positivé à partir du 28<sup>ème</sup> jour, à ce moment, le patient a été mis sous traitement par le ganciclovir. L'antigénémie faite au 45<sup>ème</sup> jour était négative alors que la PCR et l'Hybrid-capture demeuraient positifs

- Pour le patient N°8, il avait des IgM anti CMV, sa PCR était positive ainsi que l'Hybrid-capture L'antigénémie était ininterprétable à cause du faible nombre de cellule, le malade étant leucopénique

- Pour le malade N°9, il a eu une seule antigénémie positi-

**Tableau I : Evolution des paramètres de l'infection par le CMV chez les transplantés rénaux**

	Date de prélèvement	Sérologie	ANTIGENEMIE	PCR QUALITATIVE (révél : gel d'agarose)	HYBRYD-CAPTURE (leucocytes)
N°7	21Jours post. g	IgG+, IgM-	-	+	Indéterminée
	28jours post.g	IgG+, IgM-	+	+	Indéterminé
	45jours post.g	IgG+, IgM-	-	+	+ (3.5pg/ml)
N°8	1 mois post.g	IgG+, IgM+	peu de cellules	+	Indéterminée
	2 mois post.g	IgG+, IgM+	Peu de cellules	+	Indéterminée
	3 mois post.g	IgG+, IgM+	douteuse	+	+ (6.3pg/ml)
	4 mois post.g	IgG+, IgM+	+	+	Indeterminée
N°9	28jours post.g	IgG+, IgM-	-	+	Indéterminée
	40jours post.g	IgG+, IgM-	+	+	Equivoque(0.5pg/ml)
N°10		IgG+, IgM-	-	-	-

ve avec en même temps une valeur équivoque pour l'Hybrid-capture (zone grise, la PCR était positive depuis le 28<sup>ème</sup> jours post-greffe.

- Le patient N°10, est un greffé ancien qui ne souffrait d'aucune infection, les examens lui ont été réalisés dans le cadre d'un contrôle de routine, et aucun marqueur d'une infection active n'a été trouvé chez lui.

Tous ces résultats sont résumés au tableau I

● Pour les 12 prélèvements de LCR, la PCR suivie de la révélation sur gel d'agarose à 3% était positive uniquement pour un prélèvement.

### Discussion

La sérologie était parfois sans valeur diagnostique vu que chez deux des transplantés symptomatiques on a remarqué l'absence des IgM anti-CMV qui marque généralement une infection récente (tableau I).

Dans notre étude la PCR qualitative s'est révélé plus sensible que l'antigénémie dans le diagnostic de l'infection active à CMV et dans le suivi de l'infection après traitement, ceci a été vérifié avec les patients. N° 7, 9 et 8 dont la PCR s'est positivé respectivement une semaine, 2 semaines et 3mois avant l'antigénémie (tableau I et figure. 1). Cette

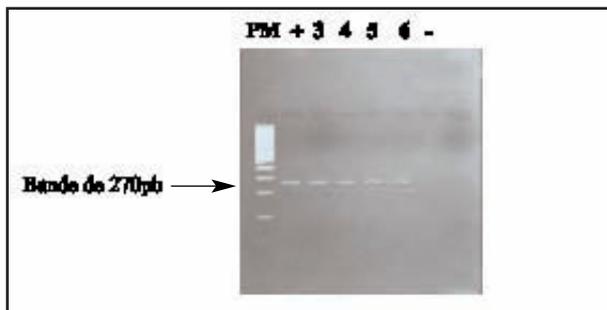


Figure 1 : Gel d'agarose de concentration 3%

- Puits 1 : Marqueur du poids moléculaire.
- Puits 2 : Souche AD 169 (contrôle positif) : on observe une bande de 270 pb.
- Puits 3 : Greffé de rein (malade N°7, 21 jours post-greffe) positif.
- Puits 4 : Greffé de rein (malade N°8, un mois post-greffe) positif.
- Puits 5 : greffé de rein (malade N°8, 4 mois post-greffe) positif.
- Puits 6 : Greffé de rein (malade N°7 ; 45 jours post-greffe) positif.
- Puits 7 : contrôle négatif : aucune bande n'est observée.

même constatation a été rapportée dans plusieurs études (1). La PCR s'est révélée aussi très utile pour les patients leucopéniques où on doit concentrer la suspension cellulaire pour avoir le nombre de cellules exigée par la technique de l'antigénémie ( $4 \times 10^6$  cellules/ml), ou d'essayer d'avoir un volume de sang plus important ( $>3.5$  ml) ce qui n'est pas toujours possible vu l'état général souvent altéré des patients testés. Cet apport de la PCR a été vérifié dans notre étude avec le patient N°8 dont les IgM+, était positives dans les trois prélèvements de 1 mois, 2 mois et 3 mois post-greffe alors que l'antigénémie était non affirmative et elle est devenue positive seulement après quatre mois post-greffe. Par contre la PCR était positive depuis le premier prélèvement (1 mois après la greffe), et elle a pu mettre en évidence le développement d'une maladie à CMV avant l'apparition chez cette patiente des signes cliniques associés à cette maladie à savoir une fièvre plus une leucopénie sévère  $< 2000$  cellules /  $\text{mm}^3$  du sang.

- En plus, l'antigénémie qui utilise la technique de dépôt utilisée dans ce travail peut donner des faux négatifs, car des cellules non infectées peuvent se déposer sur des cellules positives et masquer totalement ou partiellement le signal comme dans le cas du patient N°8, où on a observé des points lumineux très évocateurs d'une antigénémie positive, confirmé par la présence chez cette patiente des IgM associées à une leucopénie sévère. Ce problème de faux négatifs peut être surmonté par une cyto centrifugation des échantillons (4). Pour la PCR aucun faux négatifs n'a été observé dans notre travail, mais certains auteurs ont observé un cas d'antigénémie positive avec PCR négative et ils ont conclu qu'il s'agit d'une simple erreur d'échantillonnage ou de manipulation (1).

- Un avantage majeur de l'antigénémie c'est qu'elle permet une approche quantitative simple vu que l'expression de ses résultats se fait en nombre de cellules positives. En effet la présence d'un faible nombre de cellules positives après transplantation d'organes indique généralement une infection asymptomatique (3), alors qu'un nombre élevé de cellules positives implique généralement une infection active et un grand risque de développement d'une maladie à CMV (6). Ceci n'est pas toujours

vrai dans la mesure où d'autres études ont montré qu'une antigénémie faible peut se voir au cours d'une infection active à CMV alors qu'une antigénémie très forte est retrouvée chez des patients asymptomatiques (6) (1) (3). Pour le suivi du traitement anti-viral, la PCR devient négative après  $125 \pm 73$  (22-225) jours de traitement avec le ganciclovir (11,13), alors que l'antigénémie devient négative après en moyenne  $65 \pm 59$  (18-172) jours de traitement par le ganciclovir (3,10). Ceci a été observé avec le patient N°7 dont l'antigénémie est devenue négative après 16 jours de traitement. Ceci est attribué à la très grande sensibilité de la PCR qui peut détecter une cellule infectée dans un million de cellules (13). - A côté de cette sensibilité très élevée, la PCR qualitative faite sur des polynucléaires purifiés (selon le protocole utilisé dans notre travail), peut distinguer l'infection active de l'infection latente (11). Ceci a été vérifié dans notre travail, par la négativité de la PCR chez les volontaires sains ainsi que chez les receveurs prélevés une semaine après la greffe, alors qu'elle était devenue positive après développement de l'infection : Plusieurs études ont montré que des patients ayant eu une infection active à CMV confirmée par l'antigénémie et la culture cellulaire durant le second ou le troisième mois post-greffe, avaient négativé leur PCR 6 à 12 mois après la transplantation (4). Ce qui prouve que la PCR qualitative réalisée sur les polynucléaires ne détecte que l'infection active, ceci a été expliqué par Greet et al comme suit : les particules virales peuvent être phagocytées et l'ADN viral présent dans les phagosomes est détecté par PCR c'est pour cela que celle-ci n'est positive que lors d'une infection active à CMV étant donné qu'en dehors des infections actives, il n'y a pas de phagosomes et l'ADN ne peut être retrouvé dans les polynucléaires (1)

Pour les infections du SNC, la PCR a permis de poser le diagnostic d'une encéphalite à CMV chez une fille hospitalisée dans le service de pédiatrie pour trouble de déglutition, un déficit oculo-moteur et des céphalées, la sérologie réalisée sur le LCR n'a donné aucun résultat évocateur d'une infection active. Ce même résultat est rapporté dans toutes les études réalisées sur l'infection à

CMV du SNC (7).

### Conclusion

L'infection à CMV constitue l'une des principales complications dans le domaine de transplantation d'organes et notamment dans les greffes de rein.

Le diagnostic des infections actives à CMV pose toujours un problème d'interprétation, l'antigénémie et surtout la PCR sur les polynucléaires ont permis au cours des six dernières années, d'améliorer le diagnostic ainsi que la prise en charge des malades, si l'antigénémie présente l'avantage de la quantification, la facilité d'exécution et surtout le faible coût, la PCR s'est avérée plus sensible et permet, de ce fait, de poser le diagnostic de la maladie avant même l'apparition de signes cliniques ce qui améliore la réponse au traitement et évite les complications majeures de l'infection, reste l'inconvénient du coût élevé et la lourdeur de la technique. De ce fait, nous suggérons, à la fin de ce travail, d'utiliser la sérologie et l'antigénémie en première intention et de réserver la PCR pour des cas particuliers notamment chez les malades leucopéniques. La PCR reste en plus l'examen de choix dans le diagnostic des infections du système nerveux central.

### Références

- 1- Boland G. J, Weger.D, M.Tilanusverver. C, Bsboom-Kalsbeek. K, and De.Gast.G  
detection of CMV in granulocytes by polymerase chain reaction compared with CMV antigen test J.Clin.Micobiol 1992 ; 30 : 1763-1767.
- 2- Brennan, D. C.  
Cytomégalo virus in Rénal transplantation. J.Am Soc Nephrol. 2001 ; 12 : 848-855.
- 3- V. Ghisetti, A. Barbui, E. Donegani, M. Bobio, P. Caimmi, S. Pansini, G. Zatera, A. Puccini, M.di Summa, and G. Marchiaro.  
comparison of polymerase chain reaction and pp65 antigen test for early detection of human CMV in blood leucocytes of cardiac transplant recipients. technical report : 1995 : 195-202.
- 4- A. Gregory, Storche, R. S. Butter, J. C. Bailer, N. A. Ettinger, Tulanglois, M. Keener, and Welboy.  
comparison of PCR and antigenemia assay with quantitative shell

vial culture for detection of CMV in blood leucocytes from solid-organ transplant recipients. *J. Clin. Microbiol* 1994 ; 32 : 997-1003.

**5-** Irené-G.Sia, And R. Patel :

new strategies for prevention and therapy of CMV infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clin microbiol. Rev.* 2000 ; 13 : 83-121.

**6-** M. Landry, And D. Ferguson.

comparison of quantitative CMV antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *J. Clin. Microbiol* 1993 ; 31 : 2851-56.

**7-** MC Mazon, S. Alain.

infections à CMV *Encyc. Med. chir (éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris) maladies infectieuses* ; 8-052-C-610-2001-18.

**8-** Michelsons.

Interaction of human CMV with monocytes / macrophages : a love-hate relationship. *Path Biol* 1997 ; 45 : 146-158.

**9-** YMichel, N. Desire, A. Garbarg -Chenon CMV : aspects clinico-biologique et intérêt des marqueurs virologiques quantitatifs ; *feuillets de biologie* 1999 ; XXXX, 35-43.

**10-** Stephen K.N.Ho, Fu-Keung, K. Lai, And T. Chan.

comparison of CMV brite turbo assay and the digene hybrid capture CMV DNA (version 2.0) assay for quantification of CMV in renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol* 2000 ; 38 : 3743-3745.

**11-** P. Shfer, W. Tensert, L. Cremashi, K. Gutensohn, and R. Laufs.

Utility of major leucocytes sub populations for monitoring secondary CMV infection in renal allograft recipients by PCR. *J. Clin. Microbiol* 1998 ; 36 : 1008-1014.

**12-** Stephen K.N.Ho, Chi-Yen Lo, Ignatus K.P. Ceng, and Tak-Maochan.

rapid CMV pp65 antigenemia assay by direct erythrocytes lysis and immunofluorescence staining *J. Clin. Microbiol* 1998 ; 36 : 638-640.

**13-** Zipeto. D, Revello. M, Sillini. E, Parea. M, Percivalle.E, Zavattoni., Ilanesi.G, And Gerna G.

development and clinical significance of a diagnosis assay based on the polymerase chain reaction for detection of CMV in blood samples from immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol* 1992 ; 30 : 527-530.

**14-** Zipeto D., Sillini E, Parea M, and al.

Identification of human cytomegalovirus isolates by the poly-