

Comparaison moléculaire de trois techniques de détection d'ADN du cytomegalovirus humain chez des immunodéprimés

Leila Mhiri, Amine Slim

Laboratoire de Virologie, Hôpital Charles Nicolle.
Université El Manar

L. Mhiri, A. Slim

Comparaison moléculaire de trois techniques de détection d'ADN du cytomegalovirus humain chez des immunodéprimés

LA TUNISIE MEDICALE - 2010 ; Vol 88 (n°12) : 890 - 893

R É S U M É

Prérequis: L'infection à cytomegalovirus humain (CMVH) est chez les sujets sains, le plus souvent asymptomatique, mais elle peut conduire chez les patients immunodéprimés (greffés ou atteint de SIDA) à des atteintes sévères.

But : Détecter l'ADN du CMVH par trois méthodes moléculaires, de les comparer entre elle et d'identifier la méthode la plus rapide et la plus sensible.

Méthodes : Nous avons testé 50 échantillons afin de détecter la présence du CMVH. Cette recherche a été réalisée par hybridation moléculaire, par antigénémie pp65 et par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) sur le sang des patients présentant une infection à CMVH.

Résultats : L'hybridation moléculaire est positive dans 64%, l'antigénémie est détectée dans 26 cas (soit 50%) et la PCR plasmatique est positive dans 13 cas (soit 26%). L'hybridation moléculaire est une technique rapide pratiquée généralement sur différents types de prélèvement alors que la détection du CMVH pour les deux autres techniques est déterminée sur des leucocytes. La PCR plasmatique apporte des résultats purement qualitatives.

Conclusion : Les examens de la biologie moléculaire actuellement disponibles, nous permettent de faire un diagnostic de certitude.

L. Mhiri, A. Slim

Comparison of different molecular methods for detection of human cytomegalovirus infection for immunodepressed

LA TUNISIE MEDICALE - 2010 ; Vol 88 (n°12) : 890 - 893

S U M M A R Y

Background: A Cytomegalovirus infection (HCMV) causes severe complications in immunosuppressed individuals (transplant recipients and AIDS patients).

Aim: To detect the DNA of the HCMV by three molecular methods, and to identify the fastest method and most significant.

Methods: we tested 50 samples in order to detect the presence of the HCMV. This research was carried out by molecular Hybridization, the pp65 Antigenemia and PCR on the blood of the patients presenting an infection to CMV.

Results: Molecular hybridization is positive for 64%, Antigenemia is detected in 26 cases (50%) and the plasma PCR is positive in 13 cases (26%). These studies demonstrated that molecular hybridization permitted CMV detection of different biological liquid but Antigenemia and PCR techniques were used to determine of from leukocytes. Plasma-PCR and Hybridization assay presented the qualitative results.

Conclusion: These studies indicate that there is a combining virological between molecular methods

Mots-clés

Cytomegalovirus Humain; Hybridation moléculaire, Antigénémie pp65 ; PCR; immunodéprimés.

Key- words

Human Cytomegalovirus, Molecular hybridization, pp65 Antigenemia, PCR; immunosuppressed.

Le Cytomégalovirus humain (CMVH), appelé aussi herpes virus humain 5 (HHV5) appartient à la famille des herpes virus. C'est un virus à ADN double brin, dont le génome est de 240 kpb et de 200 nm de diamètre. Il se compose d'une capsidie icosaédrique constituée de deux protéines : majeure (MCP) et mineure (mCP), entourée d'un tégument composé d'une vingtaine de phosphoprotéines dont la phosphoprotéine 65 (pp65) représente 95%. L'enveloppe virale qui porte des glycoprotéines cibles des anticorps neutralisants dont la principale est la glycoprotéine B (gB). Le cycle virale du CMVH est divisé en trois périodes: très précoce codant des protéines régulant les transcriptions ultérieures, précoces correspondant à la synthèse d'enzyme de réplication virale et tardive produisant les protéines de structures constitutives du virion mature [1].

L'infection à CMVH est banale chez un hôte sain généralement. Malgré l'amélioration des thérapeutiques, l'infection à CMVH peut entraîner une morbidité et une mortalité significative chez les immunodéprimés (transplantés et sidéens). Les risques peuvent résulter aussi bien d'une primo-infection que de la réactivation d'une infection latente.

Par ailleurs, le CMVH a une importance chez les immunodéprimés. Le diagnostic de l'infection à CMVH est d'une grande importance pour déterminer la présence du virus et guider le traitement antiviral et pour ceci, le diagnostic virologique de l'infection à CMVH peut être affirmé par l'utilisation de plusieurs méthodes moléculaires.

L'objectif de ce travail est de comparer trois méthodes moléculaires sensibles permettant de suivre la virémie CMVH et de pratiquer à la recherche du virus détectant soit l'antigène, soit l'ADN viral et s'appliquent soit au plasma, soit aux cellules mononuclées sanguines. Ces trois techniques sont l'hybridation moléculaire, l'antigénémie pp65 et la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).

PATIENTS ET METHODES

50 échantillons dont 33 hommes (66%) et 17 femmes (34 %) des patients immunodéprimés (greffés et atteints de SIDA) provenant de différents services de médecine, centres de greffes Tunisiens (Moelle osseuse et reins) et Service Infectieux ont été inclus dans cette étude et testés. Le prélèvement nécessaire pour ces techniques est du sang collecté sur EDTA. Une étude comparative des trois techniques: hybridation moléculaire, antigénémie pp65 et PCR a été menée (Tableau 1).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des trois techniques moléculaire utilisées

Définition	Compartiment	Méthode
ADNémie leucocytaire	leucocytes	Hybridation
Antigénémie pp65	leucocytes	Détection des antigènes intracellulaires
ADNémie plasmatique	plasma	PCR

L'hybridation moléculaire est une technique qui signe l'amplification des acides nucléiques, c'est une méthode de détection originale qui consiste à effectuer une capture de l'hybride à l'aide d'un anticorps anti-hybride fixé sur un support. L'hybride formé va réagir avec l'anticorps spécifique conjugué. L'ensemble va être détecté par un substrat en unité relative de lumière. L'intensité de cette lumière est proportionnelle à la quantité d'ADN cible dans le prélèvement. La recherche d'antigène est réalisée par l'antigénémie pp65. Les leucocytes du sang périphériques recueillis subissent la lyse directe avec une solution de lyse des érythrocytes. Un comptage est effectué afin de déterminer la numérotation cellulaire leucocytaire. Une Cytocentrifugation, une fixation et une perméabilisation des cellules fixées sont effectuées. Ainsi la présence du CMVH dans les leucocytes est révélée par immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine pp65.

La PCR (ou polymérase Chain Reaction) est un test basé sur l'amplification in vitro de l'acide nucléique. Il permet la mesure quantitative de l'ADN du CMVH dans le plasma humain. L'ADN CMVH est isolé du plasma par lyse des particules virales. Des molécules d'ADN du standard de quantification CMVH sont introduits en quantité connue dans chaque échantillon avec le réactif de lyse et qui sert à déterminer la quantité d'ADN du CMVH présents dans l'échantillon à analyser.

RESULTATS

Cinquante patients immunodéprimés ont été inclus dans cette étude, présentant des signes cliniques différents tel que: une aplasie médullaire, cytolysse, leucémie aiguë myélorachidien, leucémie myéloïde chronique, VIH+...etc. L'analyse des résultats met en évidence une différence entre les différentes techniques.

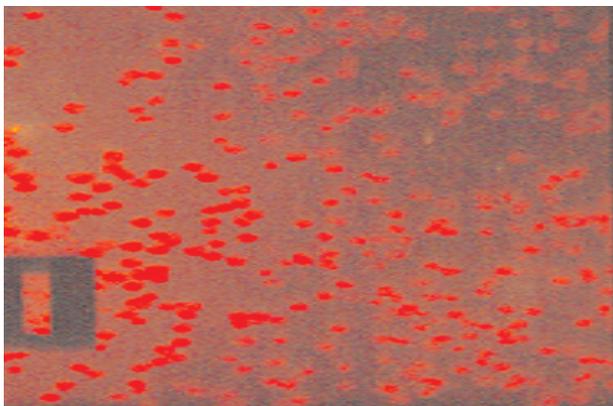
La méthode d'hybridation moléculaire peut produire des résultats qualitatifs (comparaison par rapport à une valeur seuil exprimés en copies/ml indiquant la présence d'ADN de CMVH) et quantitatifs.

La recherche de l'antigénémie pp65 se traduit par la présence de la protéine de tégument pp65 dans les leucocytes polynucléaires du sang circulant. Cette phosphoprotéine précoce tardive est captée par les polynucléaires circulants au contact des cellules endothéliales infectées. Après sa pénétration dans le polynucléaire, elle gagne le noyau du fait de son tropisme nucléaire. Les résultats s'expriment en nombre de noyaux marqués pour 2105 leucocytes examinés. L'antigénémie apparaît dans les polynucléaires sous forme de noyaux polylobés fluorescents caractéristiques (Figure 1).

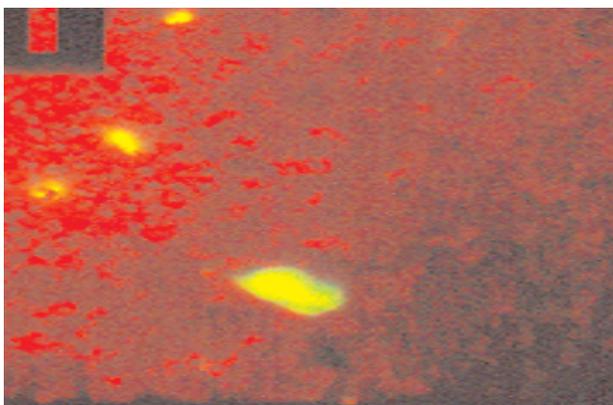
L'analyse par PCR calcule le taux d'ADN de CMVH présent dans les échantillons cliniques et sont déterminés par comparaison du signal émis par le CMVH au signal émis par le standard de quantification pour chaque échantillon. La quantité d'ADN présente dans chaque échantillon se calcule à partir du rapport entre la densité optique total du CMVH et la densité optique du standard de quantification du CMVH et du nombre

de molécules d'ADN du standard de quantification du CMV qui ont été introduites.

Figure 1 : Technique d'antigénémie pp65. Les cellules positives présentent une fluorescence.



Antigénémie négatif



Antigénémie positif

L'hybridation moléculaire est positive dans 32 cas (64%). L'antigénémie est détectée dans 26 cas (50%) et la PCR plasmatique est positive dans 13 cas (26%). Parmi les 32 hybridations moléculaires positives, 10 le sont également en antigénémie pp65 et PCR plasmatique.

DISCUSSION

Plusieurs études se sont intéressées à comparer les différentes techniques de détection de l'ADN dans le diagnostic du cytomegalovirus. Dans le suivi des patients notamment les immunodéprimés, il a été démontré que l'antigénémie est la méthode de choix pour dépister précocement la maladie à CMV [13]. La phosphoprotéine pp65 représente une fraction importante des protéines du virion, localisée au niveau du tégument, et est présente en quantité abondante dans les corps denses des cellules infectées [9,11].

L'hybridation moléculaire est une technique rapide et qui utilise une stratégie relativement simple. Elle est pratiquée généralement sur différents types de prélèvement qui peuvent être stockés pendant une longue période. Les sondes sont stables pour une période bien déterminée et les conditions de stérilité ne sont pas déterminantes pour cette technique [6]. C'est une technique spécifique, qui permet aussi de reconnaître les différentes souches de cytomegalovirus [3]. D'après nos résultats on remarque que l'hybridation moléculaire est plus sensible que l'antigénémie, et cette sensibilité relativement élevée de l'hybridation est liée à l'étape d'amplification du signal ou au nombre très important de leucocytes utilisés dans cette technique [7]. De même l'étude de Veal et al montre que 82,7% de concordance entre l'hybridation et l'antigénémie [12]. Par contre Mazulli et al trouvent que l'antigénémie est plus sensible que l'hybridation [5]. Ainsi la technique d'hybridation moléculaire a un avantage technique important c'est qu'elle permet d'opérer et de manipuler plusieurs échantillons conservés en même temps contrairement à l'antigénémie qui doit s'effectuer dans un délai ne dépassant pas 6 heures après le prélèvement [2], et manipule un petit nombre d'échantillon [7]. En matière de délai de résultats, l'antigénémie est préférée à l'hybridation moléculaire pour les urgences [8]. Cependant, il a été montré que l'antigénémie fournit des informations 8 jours plus tôt en moyenne que les autres méthodes de diagnostic [10].

La détection de l'ADN viral par PCR plasmatique et hybridation moléculaire apporte des données purement qualitatives. La recherche des ADN viraux par PCR est réalisable à partir de tous les types de prélèvements. La pratique de la PCR au laboratoire impose des contraintes à respecter afin de limiter le risque de contamination et de la détecter si elle survient [4]. Les tests de PCR utilisés pour le diagnostic ne détectent que l'infection active, avec une sensibilité toujours supérieure à celle de la culture ou de l'hybridation.

CONCLUSION

Les infections à cytomegalovirus humain constituent l'une des principales complications infectieuses chez les immunodéprimés. Les moyens moléculaires mis à la disposition des laboratoires pour le diagnostic sont nécessaires. Par ailleurs, la quantification rend l'antigénémie un moyen très utile dans le suivi de la thérapie antivirale vu que le nombre des cellules positives décroît après traitement chez les patients immunodéprimés. La présence de l'ADN CMV dans le plasma est un marqueur clinique utile pour l'infection sévère. Mais il devrait être évalué dans le sang total ou autres liquides biologiques.

La PCR en temps réel est réalisée à l'aide des technologies nouvelles "Taqman" et "Lightcycler". La synthèse des amplicons est révélée par une émission de fluorescence mesurée en continu. La quantification est réalisée en phase exponentielle par comparaison avec une gamme étalon externe. Ces PCR en temps réel permettent d'évaluer un rapport entre la charge virale et le risque de la maladie à CMV. Ils ont de

nombreux avantages : leur simplicité, leur économie en manipulations, un échantillon évoluant en circuit fermé de l'amplification à la révélation, diminuant les risques de contamination. Ces techniques détectent l'infection active, et permettent de mesurer la charge virale, avec une large gamme de quantification.

La PCR temps réel peut être utilisé comme une alternative précise et robuste à l'essai de l'antigénémie pour prévoir la maladie à CMV et contrôler l'efficacité du traitement.

REMERCIEMENTS :

Nous remercions vivement tous ceux qui ont aidé à la réalisation de ce travail :

- L'équipe du Laboratoire de Virologie de l'Hôpital Charles Nicolle.

- L'équipe du Centre de Greffe de la Moelle Osseuse de Tunis et en particulier Pr. Essia BEN HASSEN.

- L'équipe du Service de Néphrologie et de Médecine Interne de l'Hôpital Charles Nicolle et en particulier Pr. Taib BEN ABDALLAH.

- L'équipe du Service des Maladies Infectieuses de l'Hôpital La Rabta et en particulier Pr. Fakher KANOUN.

Références

1. Britt W.J., Alford C.A. Cytomegalovirus. In : Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M., eds. Virology, pp. 2493-2525 Philadelphia : Lippincott-Raven, 1996.
2. Boivin G., Relanger R., Delagage R., Beliveau C., Demeurs C., Goyette N. Quantitative analysis of CMV viremia using the pp65 antigenemia assay and the Cobas Amplicor CMV Monitor PCR Test after blood and marrow allogeneic transplantation. *J. Clin. Microbiol* 2000; 38: 4356-60.
3. Huang E.S.- Detection of human cytomegalovirus and analysis of strain variation. *J. Biol. Med* 1976; 49: 29-43.
4. Lisbay G., Dessau R.B., Andersen C.B., Ladeforged S. Polymerase chain as a rapid diagnostic assay for CMV infection in renal transplant patients. *APMIS* 1994; 102: 690-94.
5. Mazulli T., Wood S., Chua R., Walmsley .- Evaluation of the Digene Hybrid Capture System for detection and quantitation of human cytomegalovirus viremia in human immunodeficiency virus- infected patients. *J. Clin. Microbiol* 1996; 34: 2959-62.
6. Meyerson D., Hachman R.C., Meyers J.D. Diagnosis of cytomegalovirus pneumonia by in situ hybridation. *J. Infect. Dis* 1984; 150: 272-77.
7. Stephen.K., Fu-keung.K., Lai, T chan. Comparison of 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: 3743-45.
8. Stephen K., Chi yen Lo., Ignatus K.P., Tak Maochan.- Rapid CMV pp65 antigenemia assay by direct erythrocytes lysis and immunofluorescence staining. *J. Clin. Microbiol* 1998; 36: 638-40.
9. The T.H., Langenhuysen M.M. Antibody reactions to virus-specific early antigens (EA) in patients with cytomegalovirus (CMV) infection. *Clin. Exp. Immunol* 1974; 16: 1-12.
10. The T.H., Van der Bij W., Van der Berg A.P., Van der Giessen M. Cytomegalovirus antigenemia. *Rev. Infect. Dis* 1990; 12: S737-S744.
11. Van der Bij W., Schirm J., Torens R.- Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J. Clin. Microbiol* 1988; 26: 2531-35.
12. Veal N., Payan C., Fray D., et al. Novel DNA assay for cytomegalovirus detection: comparaison with conventional culture an pp65 antigenemia assay. *J. Clin. Microbiol* 1996 ; 34 : 3097-100.
13. Wattré P., Dewilde A., Lobert P.E., Actualités sur la pathologie du cytomegalovirus humain, carrefour des spécialités. *Rev. Med. Interne* 1995 ; 16 : 354-67.