

# Les Difficultés du Diagnostic Biologique des Maladies associées au Virus d'Epstein-Barr

Montpellier 2009

*P Morand, M Baccard-Longère, JM Seigneurin*  
*Laboratoire de Virologie CHU Grenoble*



# A quoi sert le diagnostic virologique dans l'infection EBV dans un hôpital ?

---

## - Le plus souvent :

- . Prouver une primo-infection à EBV (mononucléose infectieuse) dans un contexte clinique plus ou moins évocateur

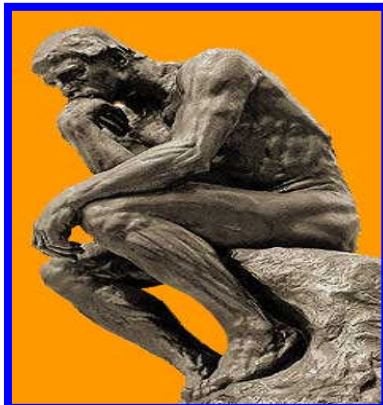
## - Moins souvent :

- . Statut sérologique lors d'un don d'organes ou de cellules
- . « Débrouillage » d'une fatigue chronique

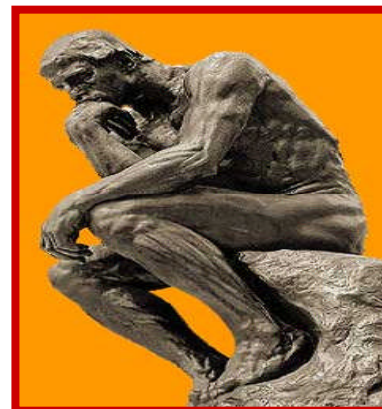
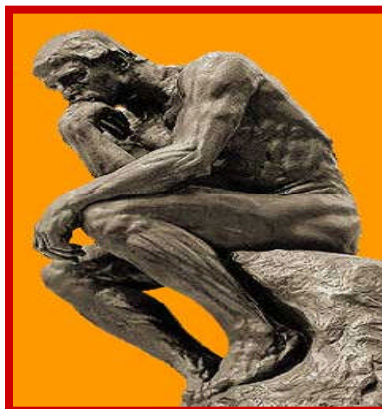
## - Dans un contexte plus spécialisé :

- . « Aider » le diagnostic et le suivi des lymphoproliférations associées à l'EBV chez l'immunodéprimé
- . « Aider » le diag et suivi du carcinome indifférencié du cavum
- . « Compléter » le dossier d'un lymphome de Burkitt

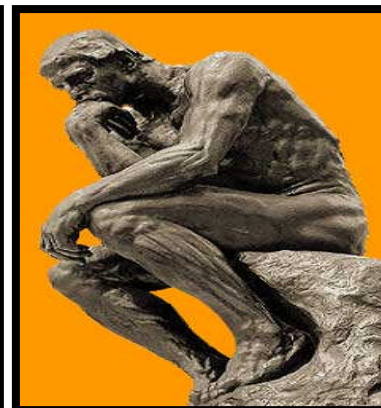
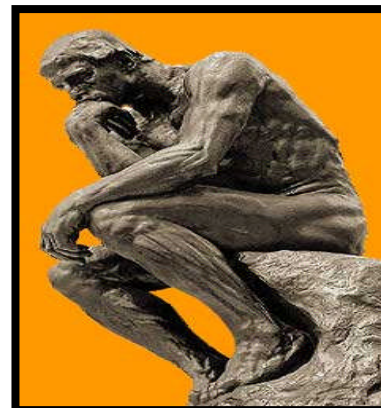
**Facile ...  
mais  
éventuellement  
discutable**



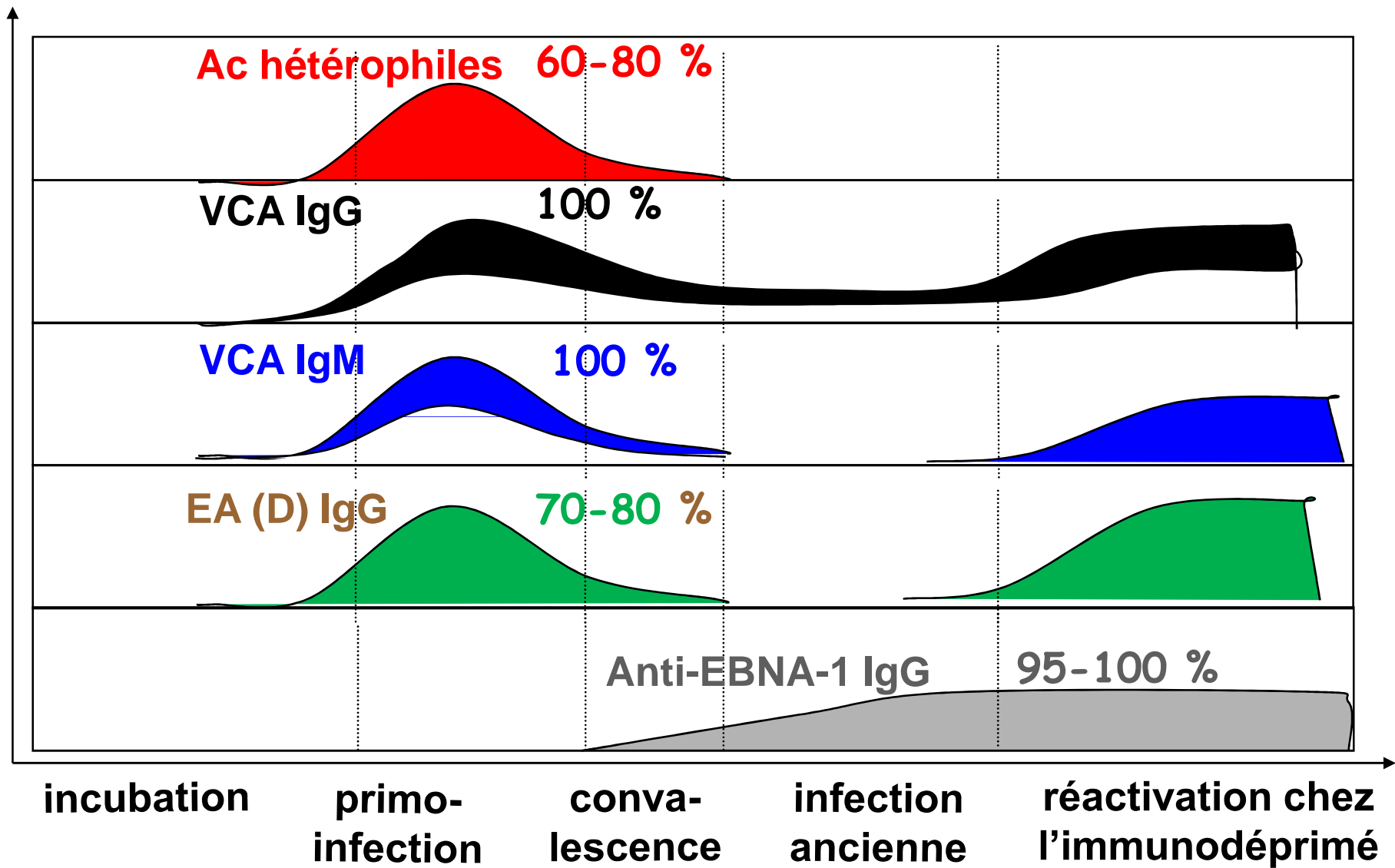
**Difficile...  
et  
probablement  
discutable**



**Difficile...  
et  
forcément  
discutable**



# Cinétique des Ac anti EBV (IF pour anti-VCA, EA et EBNA)



## Profils sérologiques EBV (IF)

	VCA IgG	VCA IgM	VCA IgA	EA IgG	EBNA
<b>Sujet séronégatif (non infecté)</b>	-	-	-	-	-
<b>MNI aiguë</b>	++	++	- / +	++ / -	-
<b>Sujet séropositif sain (= infection ancienne)</b>	+ / +++	-	-	-	+ / +++
<b>Lymphome de Burkitt associé à l'EBV</b>	+++	-	-	+++	+ / -
<b>Carcinome indifférencié du nasopharynx (NPC)</b>	+++	-	++ / +++	+++ (+ IgA)	++ / ++++

**Facile ...  
mais  
éventuellement  
discutable**



**En présence de symptômes cliniques évocateurs chez l'adulte ou l'adolescent, un MNI-test positif (détection rapide d'Ac hétérophiles) peut suffire pour confirmer une mononucléose infectieuse.**

- 1. Plutôt d'accord**
- 2. Plutôt pas d'accord**
- 3. Ne se prononce pas**

# Réponse 1 car les faux + du MNI test sont rares

---

## - Faux positifs :

- essentiellement pb de lecture

- Primo-infection VIH :

  - . 3 cas décrits

  - . contexte épidémiologique / interrogatoire

*Vidrih J A Am J Med 2001*

*Walenski Rp Clin Inf Dis 2001*

- Plus rarement CMV

- Maladies auto-immunes (contexte)

*Hurt C Am J Med 2007*

- MNI test : IgM = durée 2-3 mois : parfois coïncidence entre une primo-infection EBV passée inaperçue et une autre infection virale en cours



**Chez l'immunocompétent, le tableau sérologique suivant :**

- . Ig G anti VCA positive**
- . Ig M anti VCA positive**
- . Ig G anti EBNA1 positive**

**Peut correspondre à :**

- 1. une fin de primo infection à EBV**
- 2. une infection ancienne à EBV avec une réactivation sérologique de l'EBV**
- 3. une infection ancienne à EBV avec un croisement sérologique sur les IgM**
- 4. toutes les réponses sont exactes**



## **réponse 4 : IgM VCA + avec IgG EBNA1 : tout est possible!!**

---

**43 patients (8-75 ans ) avec symptômes compatibles avec MNI  
IgG VCA +, IgM VCA + IgG EBNA1+**



**Avidité des IgG  
IMMUNOBLOT IgM EBV**



**42 %**

**Fin de primo-infection  
à EBV**

**25 %**

**Infection ancienne à EBV  
avec réaction croisée**

**23 %**

**Réactivation  
Sérologique à EBV**

*Nystad TW, J Clin Virol 2007*

**Rq L'avidité des IgG anti VCA : moins facile et moins utile que  
pour le CMV ou la rubéole**

IgG VCA	IgM VCA	IgG EBNA1
+	+	+
-	+	-
-	-	-
-	-	+

**Contexte clinique? (âge/ terrain / gammaglobulines)**

**±**

**Cinétique des anticorps EBV**  
**Autres tests sérologiques / Immunofluorescence**  
**Avidité IgG VCA ?**  
**PCR sanguine et salivaire EBV**  
**Diagnostic autre virus**

# Sérologie EBV à Grenoble

---

## - ELISA (3500 / an):

**IgG anti EBV ( mélange Ag)** (*Enzygnost Dade Behring*)

- . bien corrélé avec IF VCA
- . titre > 640 taux élevé

**IgM anti EBV (Mélange d'Ag)** (*Enzygnost Dade Behring*)

- . modification de coffret en 2005
- . plus spécifique mais moins sensible
- . quelques cas de MNI test + IgM négative

**Ig G anti EBNA 1 (recombinant)** (*BMD, biomedical diagnostic* )

- . si vraie MNI : jamais positif avant deux mois
- .quelque faux positif faible

- immunoDot EBV IgG (100/an, PMO) (*BMD*)

- Monospot (150/an) ( Meridian bioscience)

- IFI ( carcinome indifférencié du Cavum, vérification ELISA)

# Pourquoi ne détecte-t-on pas spécifiquement les IgG EA au CHU de Grenoble ?

---

## **. Pas d'intérêt dans la MNI ?:**

**.détectables dans seulement 70 à 80 %  
(vs IgM anti-VCA dans presque 100 %)**

## **. Peu d'intérêt dans la réactivation virologique:**

- . toujours accompagnés par titres élevés d'IgG anti-VCA**
- . charge virale apporte beaucoup plus utile pour réactivation**

## **. Intérêt modéré pour prouver l'association EBV-cancer :**

**. IgG anti-EA (R) élevés dans le lymphome de Burkitt mais intérêt médical nul**

**. IgG anti-EA (D) très élevés dans le carcinome du cavum mais Ig A anti EA et VCA plus utile et IF > ELISA**

# Sérologies évaluées récemment à Grenoble (*M Baccard*)

---

## **-LIAISON (Diasorin) :**

- . Evalué en 2003
- . Le plus sensible en IgM mais faux +
- . Nouveau coffret IgM plus spécifique ?

## **- BIOPLEX 2200( Biorad) :**

- . Evalué en 2006
- . praticabilité ++
- . Retard important des IgG anti VCA dans les MNI  
(due à l'utilisation isolée de l'Ag de capsid P18)
- . Quelques Retards en IgM anti VCA sur 1<sup>er</sup> sérum dans les MNI  
(rattrapé par Ac hétérophiles très sensible)

## VIDAS 2009

621 sérums (négatifs, infection ancienne, primo-infection)

	VCA IgM	VCA/EA IgG	EBNA IgG
<b>Spécificité</b>	<b>97,8 %</b>	<b>100 %</b>	<b>98,0 %</b>
<b>Sensibilité</b>	<b>88,4 % (77-94%)</b>	<b>96,4 %</b>	<b>97,1 %</b>

**concordance clinique : 92,6 %**

## Immunocquick IgM ( ZEBRA +p18) AllDiag

**254 MNI / 88 infections anciennes/ 108 sérums interférents**

**sensibilité 88,6 %**

**spécificité / infection ancienne 98%**

**spécificité sérum interférent 80 %**

## L'interprétation de la sérologie EBV: difficile mais les résultats s'améliorent !!!

---

3 contrôles de qualité 2000, 2003, 2006

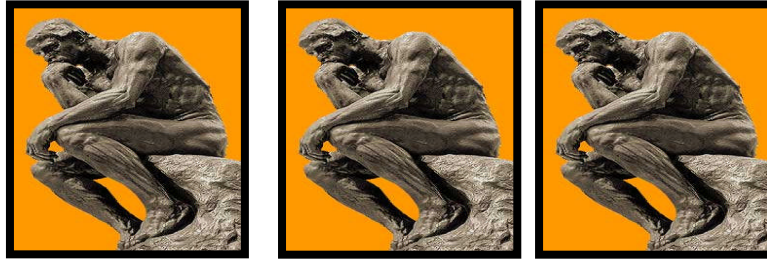
Détection des Ac hétérophiles, IgM et IgG anti VCA, IgG anti-EBNA ....

2006 : 1200 labo (17 % plaque ELISA / 81% immunodot / 2% IF)

		Réponses exactes (%)		
		2000	2003	2006
<b>MNI test</b>	MNI test +	90.5	96.3	<b>98</b>
	MNI test -	98.8	nd	<b>99.3</b>
<b>Sérologie EBV</b>	Primo-infect. EBV	50	nd	<b>98</b>
	Infect. ancienne EBV	57	nd	<b>98</b>

---

*Afssaps , JM Seigneurin (résultats non publiés)*



**La fatigue prolongée post MNI (> 6 mois) est très souvent associées avec des anomalies de la sérologie EBV et de la charge virale EBV**

- 1. Plutôt d'accord**
- 2. Plutôt pas d'accord**
- 3. Pas d'opinion**



## Réponse 2 : Fatigue prolongée post MNI : un casse tête !

---

- **Fatigue > 6 mois post MNI : 10% des patients**

. **≠ du syndrome de mononucléose chronique**  
*(Chronic Active EBV Infection (CAEBV))*

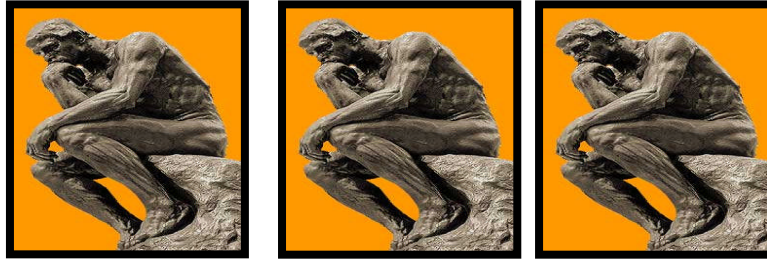
. **Pathogénie et Prise en charge pas évident :**

. **sérologie virale et charge virale souvent normale**  
*Cameron B, J infect dis 2006*

. **études actuelles sur l'expression des gènes cellulaires**

. **fonction mitochondriale altérée? (12 gènes sur 24)**  
*Vernon S BMC infect dis 2006*

. **essais thérapeutiques avec valganciclovir / valacyclovir**  
*Lerner A, In Vivo 2007*  
*kogelnik J clin Virol 2006*



**Du fait d'une modification de l'épidémiologie de la primo-infection à EBV dans les pays industrialisés, il est probable que le nombre de MNI « graves » augmentent dans ces pays**

- 1. Plutôt d'accord**
- 2. Plutôt pas d'accord**
- 3. Pas d'opinion**

# Réponse 1 ? Augmentation des MNI Graves ?

---

- 38 hospitalisations au CHU de Rennes entre 1990 et 2005 pour MNI:

- . Hépatites sévères (12)
- . Syndromes d'activation macrophagique (5)
- . Méningo-encéphalites (3)

...

. 1990-2001:

.17 admissions (1.4 par an)

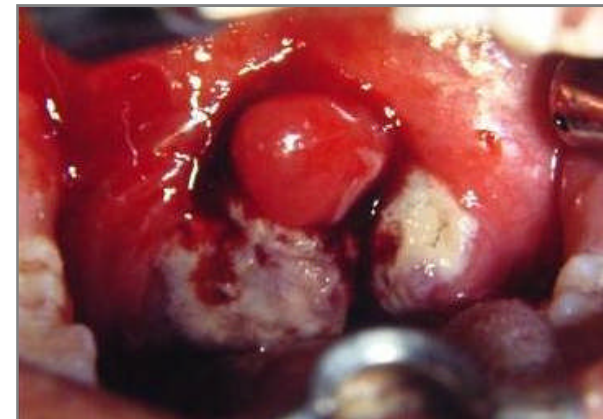
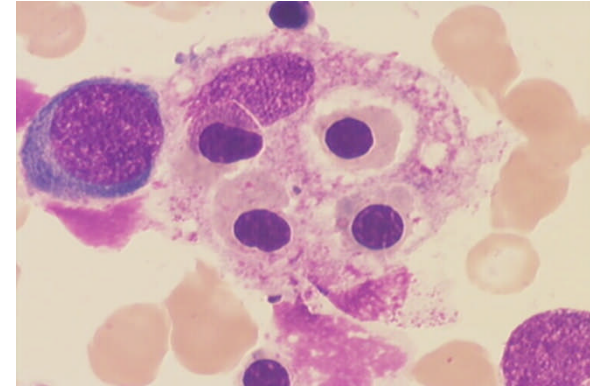
.1 transfert en soins intensifs

. 2002-2004:

. 21 admissions

**.8 transferts en soins Intensif**

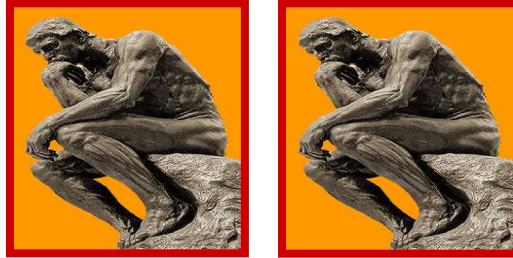
**.2 décès ( 17, 20 ans):**



Explications : Primo-infection plus tardives dans la pop générale ?

Marqueurs virologiques ?

Traitement ?



**Un vaccin anti-gp 350 (glycoprotéine d'enveloppe) actuellement à l'essai (phase II) pourrait prévenir les symptômes de la MNI en empêchant la primo-infection EBV**

- 1. Vrai**
- 2. faux**

**Table 1. Distribution of cases of infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus infection among vaccine and placebo recipients.**

Case, presentation category	ATP population		ITT population	
	Given placebo (n = 90)	Given gp350/AS04 vaccine (n = 86)	Given placebo (n = 91)	Given gp350/AS04 vaccine (n = 90)
Infectious mononucleosis	8	2	9	2 <sup>a</sup>
Definite	8	2	8	2
Probable	0	0	1	0
Asymptomatic infection	9	11	9	11
Total	17	13	18	13



**En transplantation d'organe solide, le statut EBV D+/R- est considéré comme le facteur de risque le plus important pour le développement d'un Syndrome Lymphoprolifératif post transplantation (SLPT)**

- 1. D'accord**
- 2. Pas d'accord**
- 3. Pas d'opinion**

## EBV et Syndromes lymphoprolifératif-post transplantation (SPLT)

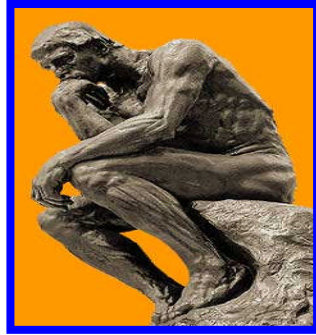
---

- . Fréquence des SPLT en greffe d'organe solide dépend du :
  - . statut EBV : D+/R- ( risque X10 - 80 )
  - . type d'organe transplanté +++
  - . type et surtout intensité immunosuppression +++
  - . Autres facteurs
- . incidence cumulée à 5 an  $\cong$  1% en greffe de rein de l'adulte
- . plus élevée pour autre greffe (poumon > foie)
- . Enfant : cancer le plus fréquent
- . Adulte : second cancer après les cancers cutanés
- . Lymphomes : 30 à 50 fois plus fréquent/ non transplanté

*Slifkin M, Drugs 2004*

*Preiksaitis Clin Infect dis 2004*

*Gottschlack Ann Rev Med 2005*



**En transplantation d'organe solide, en cas de suspicion clinique de SLPT, la mesure de la charge virale dans le sang total est sensible mais peu spécifique.**

- 1. D 'accord**
- 2. Pas d 'accord**
- 3. Pas d'opinion**



## SPLT avéré et charge virale EBV dans sang total

- . 1 série d'enfants avec greffe hépatique (n=30)

- seuil 4000 copies / $\mu$ g d'ADN ( $\cong$  40 000 copies/ml sang total)
- 16 CV CV > 4000 :

- .11 PTLD-

- . 5 PTLD+ ( 16% 5/30)

- . Sensibilité 100% spécificité 83%

- . VPN 100% VPP 53%

## SPLT avéré et charge virale EBV dans sang total

---

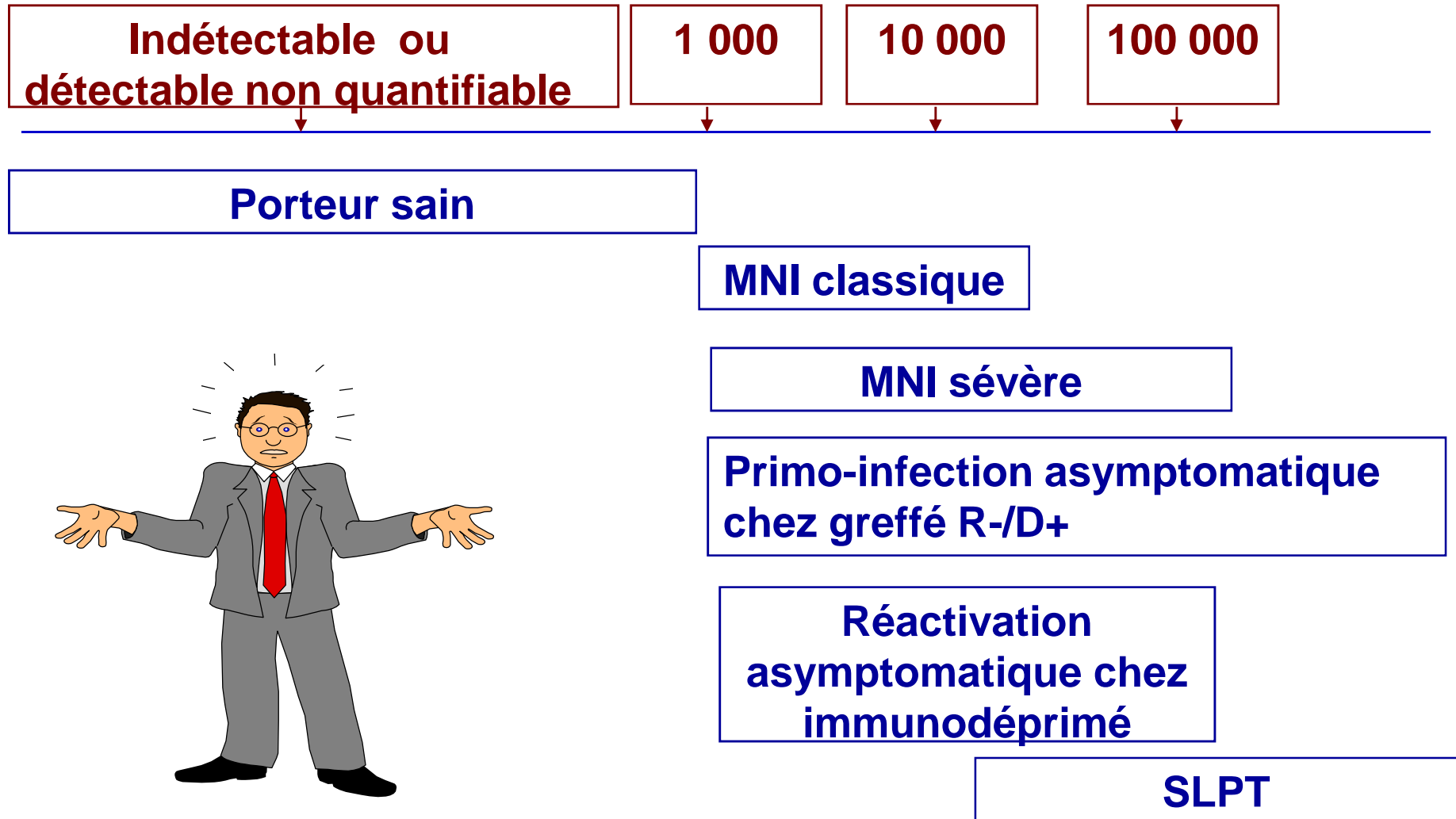
.59 greffes moelle allogéniques (22 enfants et 37 adultes) PCR sang total

Etude	Méthode	Sensibilité	Spécificité	Cut-off
Sang total	Quantitative PCR (copies/ $\mu$ g ADN)	87%	91%	100 000

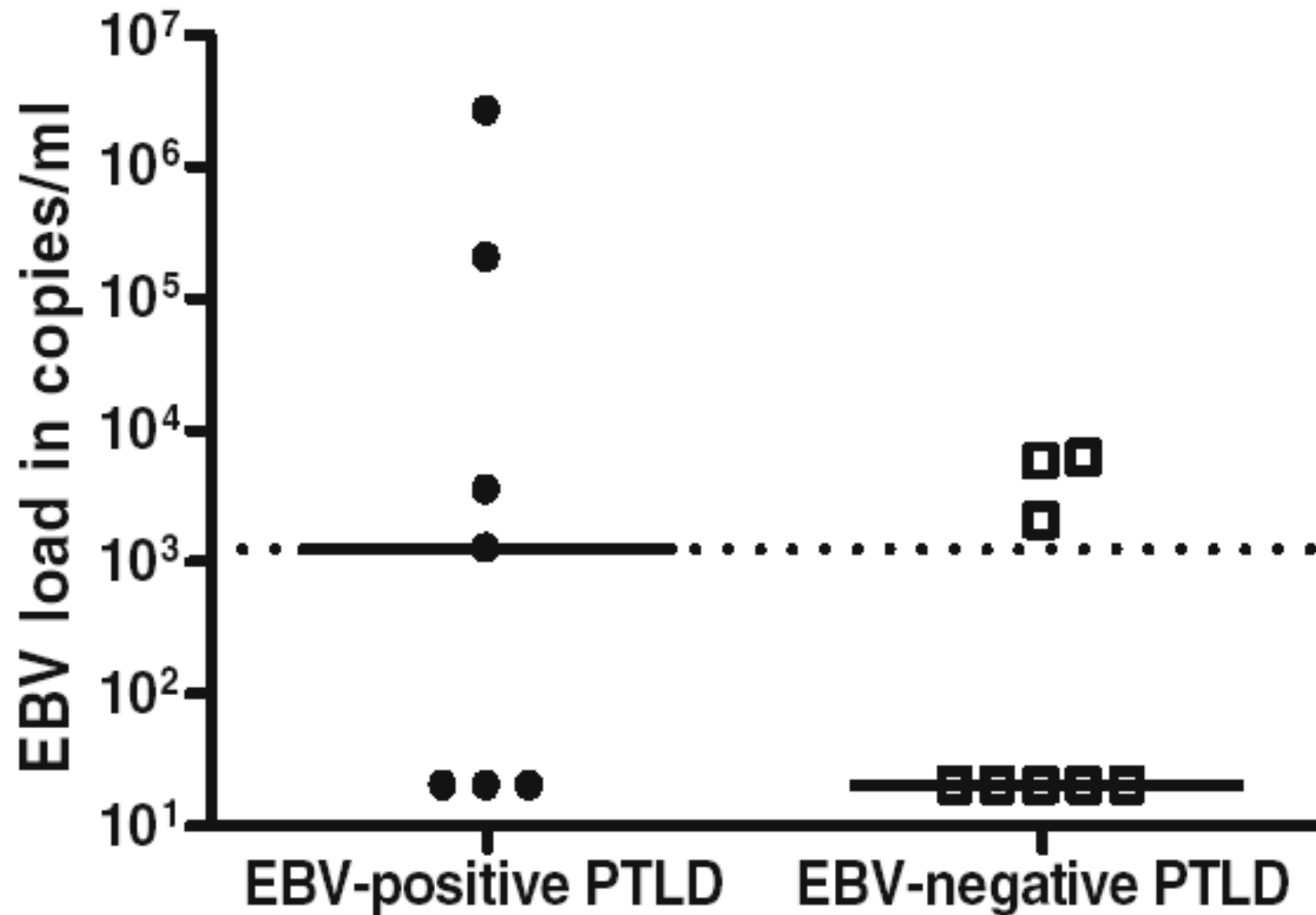
	Prévalence SLPT %	VPP %	VPN %
1 facteur de risque	1.7	14	99
2 facteurs de risque	8	46	99
3 facteurs de risque	22	74	96

# CV EBV par PCR en temps réel en copies/ml de sang total

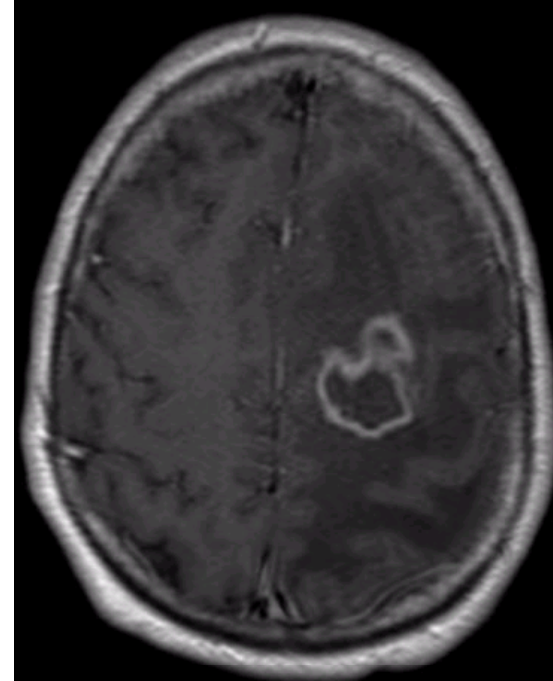
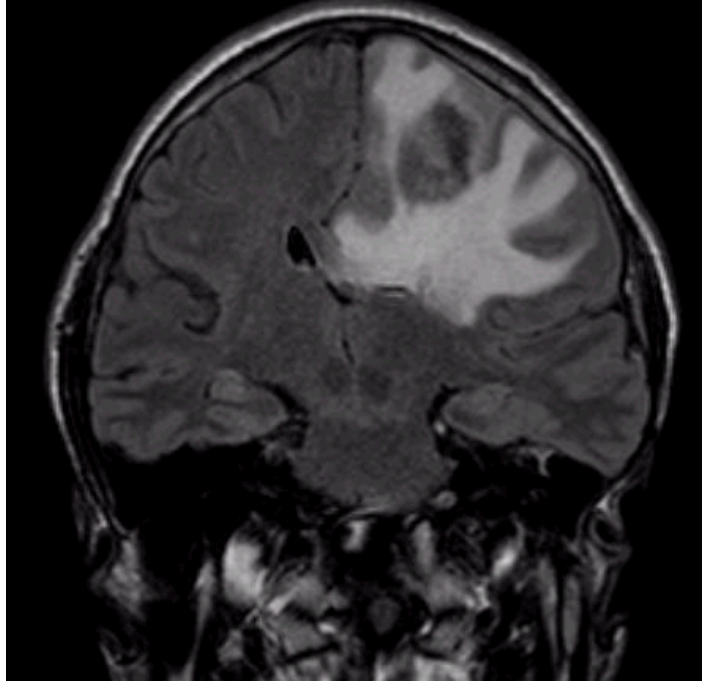


d'après Fafi-Kremer S, J Clin Virol 2004

## SPLT avéré et charge virale EBV dans sang total

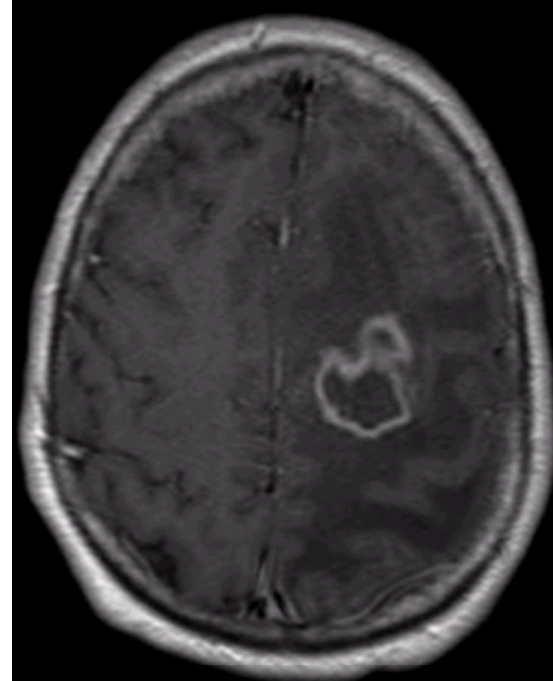
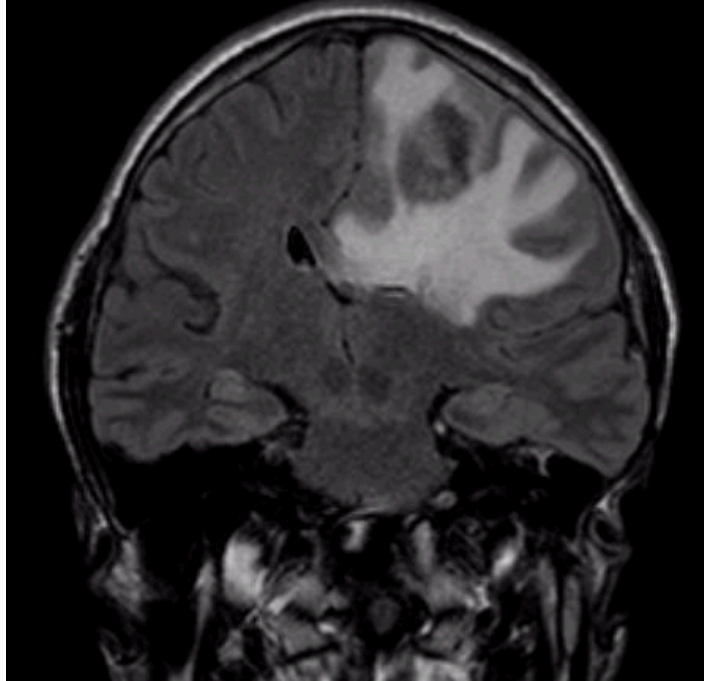


*Oertel S , Ann Hematol 2006*



**Patient de 40 ans Greffé rénal en 2004**  
**02/ 2008 Hospitalisé en maladie infectieuse pour convulsions**  
**PL impossible**  
**Imagerie lymphome ou abcès fongique ou parasitaire**

**Diagnostic ?**

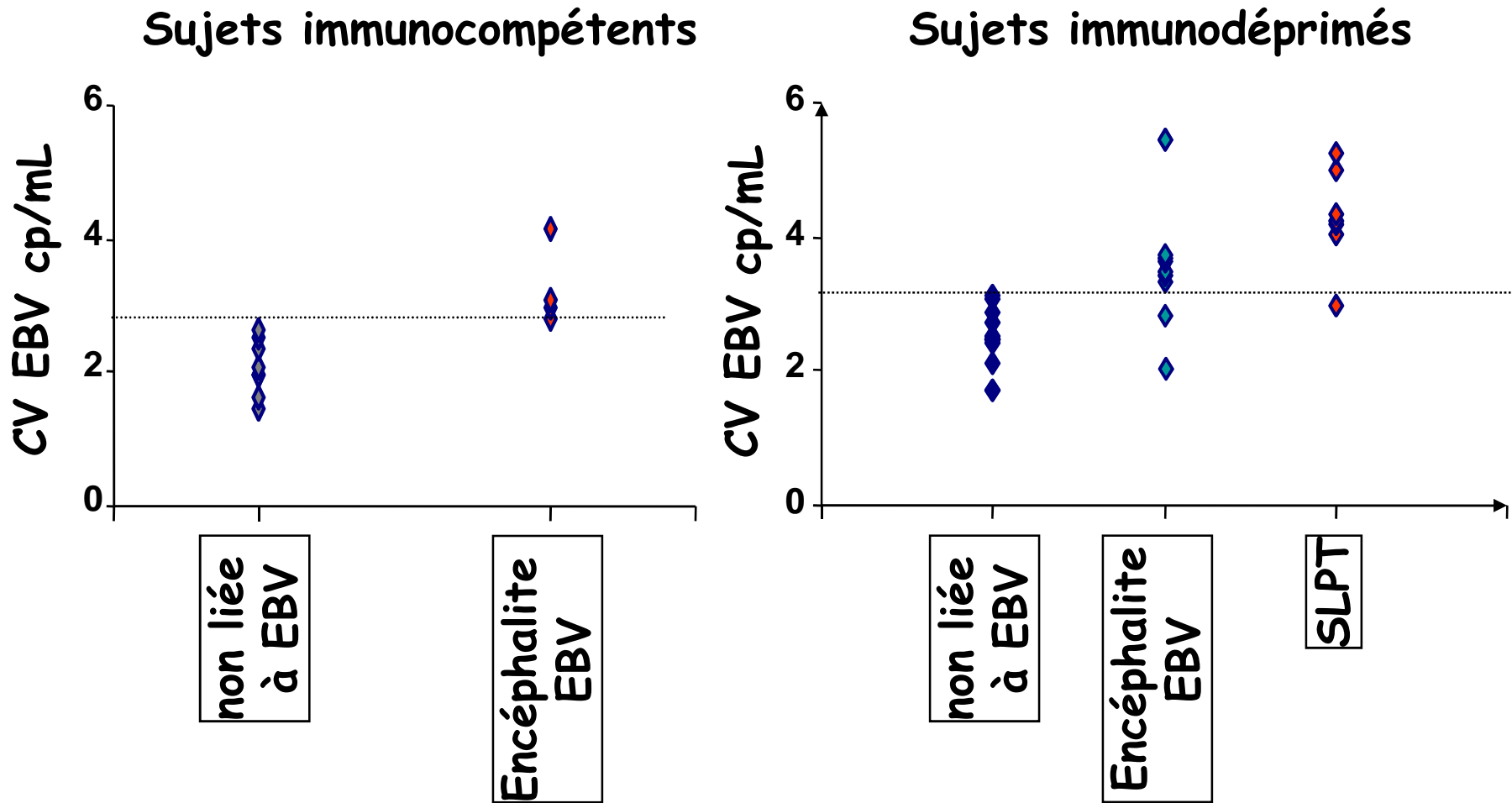


**Patient de 40 ans Greffé rénal en 2004**  
**02/ 2008 Hospitalisé en maladie infectieuse pour convulsions**  
**PL impossible**  
**Imagerie lymphome ou abcès fongique ou parasitaire**

**Charge virale sang total : 650 copies/ml**

**Biopsie cérébrale : anapath petit doute ?**  
**charge virale > 2 millions copies/ ug d'ADN**

# Charge virale EBV /LCR: quelle interprétation ?



## Intérêt et limite de la charge virale EBV en transplantation

---

- **Utile** (cinétique) . à confronter avec facteurs de risque pour décider d'un tt préemptif.
- **Utile** (cinétique). à confronter avec facteurs de risque, clinique, imagerie pour décider d'un tt curatif si pas de preuve histologique
- **Utile** pour « monitorer » l'IS ?
- Les meilleurs prélèvements ( sang total ++ / plasma?)
- Les seuils ?
- Les suivis ?
- **A associer « d'urgence ? » avec marqueurs immunologiques (CTL , Cytokines? )**

*Gulley M, J Mol Diag, 2008*

*Kimura H Rev med virol, 2008*



## **Grenoble greffe d'organe solide :**

---

### **-R EBV+ :**

**pas de suivi séro**

**PCR : M1, M2, M3, M6, M9, M12, M24**

**M24 < 10 000 arrêt > 10 000 une fois par an**

### **- Si PCR entre 50 et 100 000 copies**

**réduction IS ( corticoïde anti calcineurine)**

**surveillance tous les 3 mois pendant un an**

### **- Si PCR > 100 000**

**réduction IS**

**imagerie**

**image + : biopsie et/ou anti CD20**

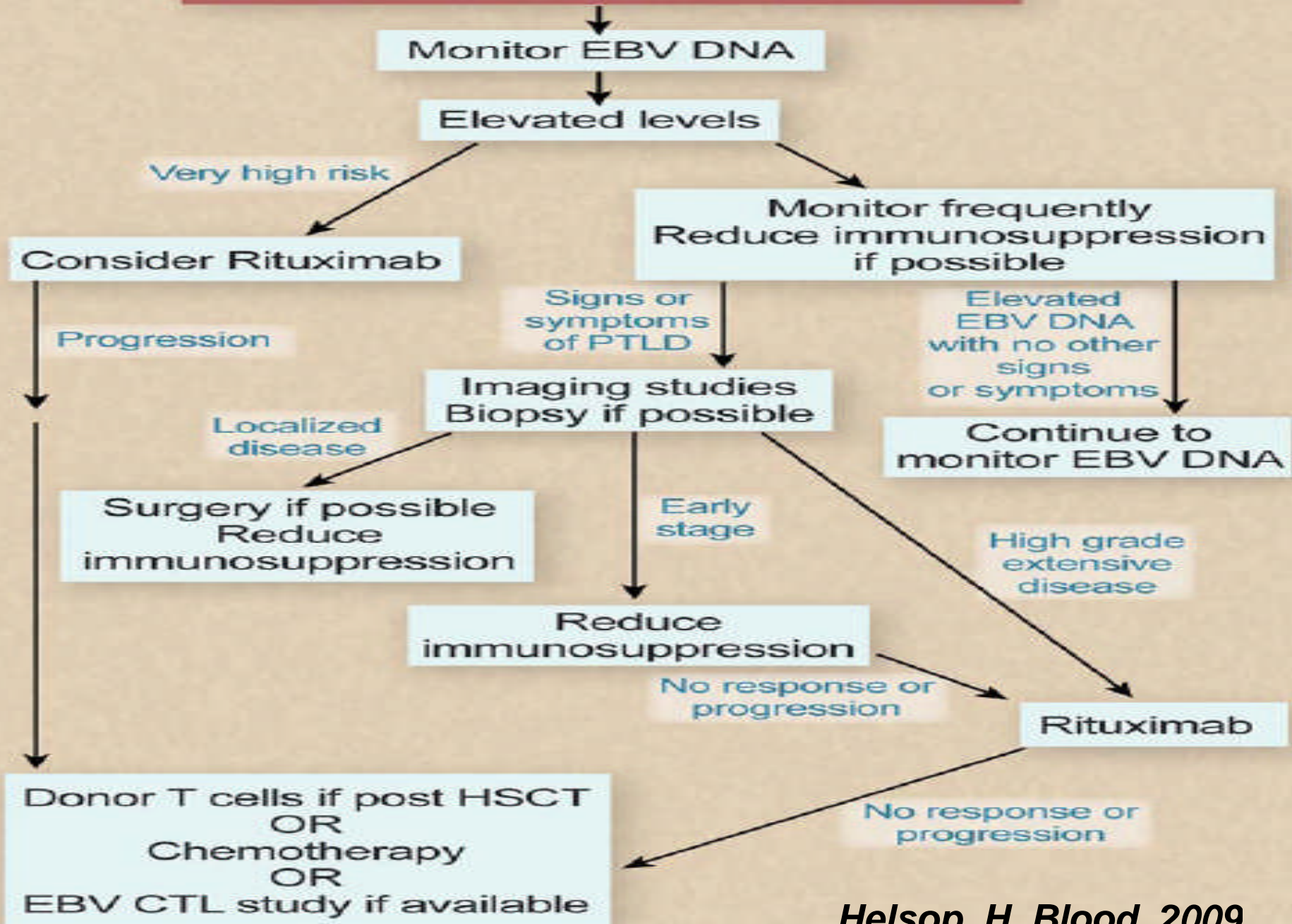
**image -**

**suivi CV EBV /mois + imagerie à 6 mois**

**si bilan négatif à 6 mois et CV élevée :**

**discussion anti CD20**

**High Risk patient post HSCT or SOT**



*Helsop H, Blood, 2009*

# Intérêt et limite de la charge virale EBV dans l'infection VIH

---

## La charge virale EBV :

- . Plus élevée dans le sang et la salive que chez le sujet VIH -
- . Corrélée avec diminution des T CD4 + et ARN VIH
- . Corrélée avec activation des TCD4+ et des T CD8 +
- . **Non prédictive de l'apparition d'un lymphome**
- . Utile dans le cadre du diagnostic/ suivi lymphome avéré?
- . Utile en cas de suspicion de lymphome cérébral (CV LCR)?

*Dehee 2001, Righetti 2002, Van Baarle 2002, Brengel Pesce 2002 ,  
Fafi Kremer 2004, Fan 2005 Bonnet 2006 , Bossolasco 2006,  
Stevens 2007, Piriou 2008, Amiel 2009*

## PCR quantitative en temps réel : les kits commercialisés en France

Dénomination	Distributeur en France	Appareils
Affigene® EBV trender	Instrumentation Laboratory	Mx3000, ICycler, RG
Artus EBV PCR kit	Qiagen	ABI, LC, RG
EBV R-gene™ Quantification kit	Argene	ABI, LC I et II, RG, SC
LightCycler®– EBV quantification kit	Roche Diagnostics	LC
EBV Q-PCR Alert	Eurobio	ABI, LC, RG
ReSSQ® EBV assay spec	Orgentec	ABI, LC, RG
Smart EBV	Cepheid	SC

MX3000 (Stratagène), ICycler (Bio-Rad), Rotor-Gene (RG) (Corbette), ABIprism (Abi) (Applied Biosystems), LightCycler (LC) (Roche Diagnostics), SmartCycler (SC) (Cepheid)

