

Eric Pasmant, Martine Harzic\*

# Diagnostic biologique de l'infection par le virus d'Epstein-Barr

## RÉSUMÉ

Le diagnostic de l'infection par le virus d'Epstein-Barr est réalisé dans la majorité des cas par la recherche d'anticorps spécifiques et l'analyse du profil sérologique. Toutefois, dans des situations particulières et notamment chez le patient immunodéprimé, la recherche du virus et de ses constituants, en particulier la détection du génome viral, est nécessaire.

## MOTS-CLÉS

Anticorps anti Epstein-Barr virus, Charge virale EBV, PCR EBV, Mononucléose infectieuse

## Biological diagnosis of the Epstein-Barr virus infection

### SUMMARY

In most cases the diagnostic of the Epstein-Barr virus infection is based on the research for specific antibodies and the analysis of the serological pattern. However in some special cases and notably when the patient is immunosuppressed, the research for EBV and its components, especially the viral genome, is necessary.

### KEY WORDS

Anti Epstein-Barr virus antibodies, EBV PCR, EBV viral load, Infectious mononucleosis

## I – Introduction

Le virus EBV est un virus ubiquitaire, 95% de la population ayant été en contact avec le virus à l'âge de 30 ans.

L'infection aiguë est souvent asymptomatique ; les manifestations cliniques typiques réalisent le tableau de la mononucléose infectieuse surtout observée chez l'adolescent et le jeune adulte. Chez le jeune enfant l'infection est le plus souvent asymptomatique ou atypique. De même chez le patient âgé les manifestations sont plus souvent atypiques.

L'évolution se fait vers la guérison dans la quasi totalité des cas.

Exceptionnellement la primo-infection peut revêtir un aspect grave, en particulier un syndrome d'activation macrophagique, ou évoluer vers la chronicité et un syndrome de lympho-prolifération bénigne ou tumorale. Dans la grande majorité des cas, cette évolution est associée à un déficit

immunitaire acquis (lymphome, chimiothérapie, greffe de moelle ou d'organe) ou congénital (syndrome de Purtillo ou maladie lymphoproliférative liée au chromosome X).

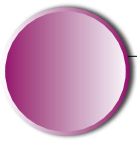
Chez le patient immunocompétent au décours de la guérison clinique le virus reste persistant à l'état latent dans les lymphocytes B ; des réactivations biologiques sont fréquentes mais asymptomatiques.

Rarement le virus EBV a été associé à des manifestations tumorales : chez le patient immunocompétent le virus EBV est associé au carcinome du nasopharynx, au lymphome de Burkitt africain et à environ 50 % des lymphomes de Hodgkin. Le virus EBV est un cofacteur dans la genèse de ces tumeurs.

Le virus EBV joue un rôle primordial dans la genèse des lymphomes du patient immunosupprimé (*tableau I*, voir page suivante) (1, 2).

En raison du polymorphisme des manifestations associées à EBV le diagnostic de l'infection repose

\*Service de Microbiologie - Hôpital de Versailles - 177 Rue de Versailles-Le Chesnay 78150 - Tél. : 01 39 63 87 51 - Fax : 01 39 63 93 12  
E-Mail : mharzic@ch-versailles.fr



**Tableau I - Manifestations cliniques associées à l'EBV.**

	Primo-infection	Infection ancienne
<b>Immunocompétent</b>	Mononucléose infectieuse Formes asymptomatiques Formes atypiques Syndrome d'activation macrophagique : SAM	Réactivations toujours asymptomatiques Tumeurs associées à l'EBV : - Carcinome du nasopharynx - Lymphome de Burkitt - Lymphome de Hodgkin - Autres tumeurs : rares
<b>Immunodéprimé</b>		
Déficit congénital	Syndrome Purtillo : SAM et/ou prolifération	Aplasie, lymphomes
Greffe* SIDA	Lympho-prolifération	Lymphomes Lymphomes, leucoplasie chevelue

\*Greffe de moelle ou greffe riche en Lymphocytes B.

sur une stratégie différente en fonction de la situation clinique (3). Le diagnostic de primo-infection EBV chez le patient immunocompétent repose sur la mise en évidence d'un profil d'anticorps caractéristique. Le rôle d'EBV vis-à-vis de manifestations atypiques peut être confirmé par la mise en évidence directe du virus dans un site particulier. Chez le patient immunodéprimé la réponse anticorps au cours de la primo-infection peut être atypique imposant la mise en évidence directe du virus.

## II - Tests sérologiques : détection des anticorps

L'analyse des marqueurs sérologiques permet le diagnostic de primo-infection EBV dans la majorité des cas. En effet, la cinétique de différents anticorps permet de dater l'infection. Les anticorps anti capsid (VCA) de classe IgM (anti-VCA-IgM) apparaissent environ 15 jours après le contact infectieux tandis que les IgG de même spécificité apparaissent quelques jours après. Ils sont présents dans la majorité des cas au moment de l'apparition des signes cliniques qui surviennent après une incubation d'environ 1 mois. Les anticorps anti-EBNA 2 apparaissent précocement et sont détectés chez 30 % des patients au moment de l'apparition des symptômes. Les anticorps anti-EA (IgG et IgA) sont souvent présents lors de la phase aiguë tandis que les anticorps anti-EBNA 1 apparaissent plus tardivement. Au décours de l'infection les anticorps anti-VCA et anti-EBNA persistent tandis que les anticorps anti-EA disparaissent. Ces derniers peuvent être détectés lors des réactivations virales (3, 4, 5).

De nombreux réactifs permettant la détection des différents anticorps sont commercialisés. La méthode de référence reste l'immunofluorescence (IF) (immunofluorescence indirecte pour les anticorps anti-VCA et anti-EA ou immunofluorescence anti-complémentaire pour les anticorps

anti-EBNA) réalisée sur des cellules exprimant les antigènes VCA, EA ou EBNA. Seul un pourcentage des cellules expriment ces antigènes ; la qualité des lames est variable et la lecture parfois difficile. Dans le cas de l'antigène EBNA plusieurs antigènes EBNA sont exprimés, en particulier EBNA 1 et 2 ; les anticorps anti EBNA2 apparaissent précocement au cours de l'infection et les anticorps anti-EBNA1 sont plus tardifs. Des cellules exprimant uniquement EBNA1 ont été développées par transfection mais ne sont pas commercialisées.

Les techniques ELISA sont de plus en plus utilisées ; la préparation des antigènes est très variable, antigènes natifs à partir de cellules infectées ou protéines recombinantes ou peptides. Les tests sont développés le plus souvent par comparaison avec les techniques d'IF ; toutefois des discordances sont observées en fonction des réactifs utilisés (5).

Des immunoblots ont été développés. Ils permettent la détection simultanée de différents anticorps et les résultats sont corrélés à ceux obtenus par IF (6).

La détermination de l'avidité des anticorps est intéressante car une faible avidité est caractéristique d'une infection récente ; toutefois cette technique est mal standardisée et la détermination du seuil de l'index d'avidité reste à définir.

La détection des anticorps hétérophiles, anticorps de classe IgM dirigés contre des hématies de bœuf ou cheval, après adsorption de l'antigène Forsman sur extrait de rein de cobaye, est simple et permet donc un diagnostic rapide de primo-infection EBV. Ces anticorps peuvent persister 6 à 12 mois (5). Toutefois ils sont inconstants : présents chez 85 à 90% des adolescents infectés, plus rarement chez le jeune enfant et le sujet âgé. De plus, ils sont présents chez 2 à 3% des patients avec une pathologie auto-immune. Ils témoignent de la stimulation polyclonale associée à l'infection EBV. Même s'ils sont présents, le diagnostic de primo-infection EBV doit être confirmé par la recherche d'anticorps spécifiques.

## Diagnostic biologique de l'infection par le virus d'Epstein-Barr

## III - Mise en évidence du virus

L'isolement du virus par culture cellulaire est difficile et aléatoire. Le développement de techniques de détection du génome a permis la mise en évidence fiable et facile du virus.

Toutefois, il n'existe pas de méthode standardisée et des résultats discordants sont parfois rapportés. Il n'existe pas non plus d'unanimité sur le prélèvement : la recherche dans les cellules mononuclées du sang périphérique ou du sang total semble préférable à la recherche dans le plasma (7).

Le virus peut être retrouvé dans d'autres sites : sa présence dans le LCR est associée à une encéphalite ou à un lymphome cérébral.

Chez les patients porteurs d'un lymphome ou d'un carcinome du nasopharynx (NPC) la recherche du génome viral et de transcrits viraux est réalisée dans la lésion permettant de préciser le type de cellules in-

fectées grâce à des marquages cellulaires spécifiques.

## IV – Diagnostic

## 1 - Primo-infection

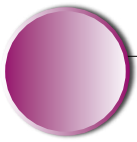
Le diagnostic de primo-infection chez le patient immunocompétent repose sur l'analyse des résultats pour les trois marqueurs VCA-IgM, VCA-IgG et EBNA qui permet de dater l'infection (*tableau II*). Des résultats ambigus sont observés dans environ 10% des cas, en particulier la présence de ces trois marqueurs ou la présence d'anticorps anti-VCA IgG isolés. Ces résultats peuvent s'expliquer par un manque de sensibilité ou de spécificité des tests ou par une réponse particulière du patient, ainsi la réponse IgM au cours de la primo-infection peut faire défaut ou être très fugace tandis que

Tableau II – Pathologies et profil sérologiques

Interprétation	Anticorps hétérophiles	VCA IgG	VCA IgM	VCA IgA	EBNA IgG	EA IgG
Séronégatif	-	-	-	-	-	-
Primo-infection	+/-	+/-	+	+/-	-	+
Infection ancienne	-	+	-	-	+	+/-
Indéterminé	+/-	+	-		-	
Indéterminé	-	+	+		+	
NPC	-	+	-	++	+	+
Lymphome de Burkitt	-	+	-	-	+/-	+

Tableau III – Indication et interprétation des tests biologiques en fonction de la situation clinique.

Méthode	Prélèvement	Indications
<b>Culture cellulaire</b>	Lymphocytes	Non indiquée
<b>Détection d'Ag viraux par immunohistochimie</b>	Biopsie	Tumeurs associées à EBV
<b>Détection du génome viral :</b>		
• <b>Hybridation <i>in situ</i> (ARN Eber)</b>	Biopsie	Association EBV et tumeur
• <b>PCR <i>in situ</i></b>	Biopsie	Association EBV et tumeur
• <b>PCR qualitative</b>	LCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>Immunodéprimé : lymphome cérébral (interprétation difficile)</li> <li>Immunocompétent : méningo-encéphalite</li> </ul>
• <b>PCR quantitative</b>	Lymphocytes, LCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lymphomes associés à EBV</li> <li>Prolifération chez le transplanté</li> <li>Carcinome du nasopharynx               <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Seuil de décision thérapeutique</li> <li>✓ Suivi thérapeutique</li> </ul> </li> </ul>



la réponse anti-EBNA1 est variable. Il faut signaler que la nomenclature française n'autorise pas la détection de 3 marqueurs et limite le nombre de tests à réaliser en fonction de la clinique. Ceci ne permet pas d'identifier les réactions atypiques. Au cours de la primo-infection (PI) chez le patient immunocompétent la recherche du virus a peu d'intérêt, car non spécifique de la PI en raison de la persistance d'une réplication virale durant toute la vie. La charge virale diminue au décours de la PI, mais une augmentation est observée lors de réactivations (7). (*tableau III*, voir page précédente).

## 2 - Carcinome du nasopharynx et lymphomes

Des profils sérologiques évocateurs ont été rapportés dans certaines pathologies associées à l'EBV en particulier le carcinome du nasopharynx et à un moindre degré le lymphome de Burkitt. (*tableau II*) (4). Ils ont un intérêt diagnostique et pronostique. Leur intérêt a toutefois diminué depuis l'uti-

lisation des tests de diagnostic direct (*tableau III*). Chez le patient immunodéprimé, dans le cas de formes graves et de syndromes de lympho-prolifération la détection des génomes viraux dans le sang et surtout la quantification virale a une valeur diagnostique et prédictive au cours du suivi thérapeutique (9, 10).

## V – Conclusion

Le diagnostic de l'infection EBV a été amélioré ces dernières années même s'il reste parfois difficile en particulier en cas de formes atypiques ou graves chez le patient immunodéprimé. La détection du génome et sa quantification constitue un outil majeur dans ces situations. Heureusement la majorité des infections EBV est bénigne et le diagnostic aisé et fiable grâce aux méthodes sérologiques usuelles. Celles-ci doivent cependant être améliorées et mieux standardisées.

### BIBLIOGRAPHIE

- (1) COHEN J. I. Epstein-Barr Virus Infection. N. Engl. J. Med., 2000, **343**, 481 – 492.
- (2) THORLEY D.A., GROSS A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas, N. Engl. J. Med, 2004, **350**, 1328-1337.
- (3) HESS R.D. Routine Epstein-Barr virus diagnosis from the laboratory perspective :still challenging after 35 years, J. Clin. Microbiol., 2004, **42**, 3381-3387.
- (4) NICOLAS J.C., MEYOHAS M.C. Traité de virologie médicale, Paris 2004
- (5) SVAHN A., MAGNUSSON M., JAGDAHL L., et al. Evaluation of three commercial Enzyme-linked immunosorbent assays and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection, J. Clin. Microbiol., 1997, **35**, 2728-2732.
- (6) BUISSON M., FLEURENT B., MAK M. et al P, New immunoblot assay using four recombinant antigens for diagnosis of Epstein-Barr virus primary infection and reactivation J. Clin. Microbiol., 1999, **37**, 2709-2714.
- (7) DEHEE A., ASSELOT C., PILOLOT T. et al. Quantification of Epstein-Barr virus load in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients using real-time PCR. J. Med. Virol. 2001, **65**(3), 543-52
- (8) MAURMANN S, FRICKE L, WAGNER H.J. et al. Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. J. Clin. Microbiol. 2003, **41**, 5419-5428
- (9) PREIKSAITIS J.K. New developments in the diagnosis and management of post-tranplantation lymphoproliferative disorders in solid organ transplant recipients. CID, 2004, **39**, 1016-1023.
- (10) LIN J.C., WANG W.Y., CHEN K et al. Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. N. Engl. J. Med. 2004, **350**, 2461-2470.



## Presse Communication International

Quatre revues professionnelles au service des professionnels







