

Archives de pédiatrie xxx (2012) xxx–xxx

Utilisation des tests virologiques pour le diagnostic, le pronostic et la surveillance des infections congénitales à cytomégalo virus

Virological tools for the diagnosis, the prognosis and the surveillance of congenital cytomegalovirus infections

V. Avettand-Fenoel^a, J.-F. Magny^b, Y. Ville^c, M. Leruez-Ville^{a,*}

^a Laboratoire de virologie, EA 36-20, centre national de référence du cytomégalo virus, université Paris-Descartes, hôpital Necker–Enfants-Malades, AP–HP, Sorbonne Paris Cité, 149, rue de Sévres, 75015 Paris, France

^b Service de réanimation néonatale, hôpital Necker–Enfants-Malades, AP–HP, Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France

^c Service d'obstétrique, université Paris-Descartes, hôpital Necker–Enfants-Malades, AP–HP, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Résumé

L'infection à cytomégalo virus (CMV) est la cause la plus fréquente d'infection congénitale virale. Les outils virologiques utilisés à des fins diagnostiques sont la sérologie pour la mise en évidence d'une primo-infection maternelle, la Polymerase Chain Reaction (PCR) dans le liquide amniotique pour le diagnostic d'infection fœtale, la PCR dans les urines ou la salive pour le diagnostic néonatal et, enfin, la PCR dans le sang séché du carton de Guthrie pour le diagnostic rétrospectif chez le jeune enfant. La valeur pronostique de la charge virale dans le liquide amniotique, le sang fœtal et le sang à la naissance sera discutée. La performance des différents tests virologiques pour un dépistage anténatal ou postnatal de cette infection sera aussi évoquée.

© 2012 Publié par Elsevier Masson SAS.

Abstract

Cytomegalovirus (CMV) infection is the main cause of congenital infection in industrialized countries. The virological tools used for the diagnosis of congenital CMV are serology for diagnosis of primary infection in the mother, CMV PCR in amniotic fluid for diagnosis of fetal infection, PCR in urine or saliva for neonatal diagnosis and PCR in dried blood spots on Guthrie cards for retrospective diagnosis in young children. The prognostic value of viral load in amniotic fluid, fetal blood and neonatal blood will be discussed. The performance of the virological tests for antenatal or postnatal screening of congenital CMV will also be discussed.

© 2012 Published by Elsevier Masson SAS.

1. INTRODUCTION

L'infection congénitale à cytomégalo virus (CMV) a une prévalence estimée entre deux à cinq sur 1000 naissances en

France [1]. Cependant, en 2004, les autorités de santé françaises saisies sur le sujet n'avaient pas recommandé le dépistage systématique de l'infection à CMV lors de la grossesse et/ou à la naissance [2]. Cette décision était essentiellement motivée par l'absence de résultats d'évaluation concernant le traitement de ces infections pendant la grossesse, le peu de données concernant le traitement des enfants infectés

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : marianne.leruez@nck.aphp.fr (M. Leruez-Ville).

et l'absence de vaccin disponible. Depuis, des traitements anténataux par des cures d'immunoglobulines hyper-immunes ou par le valaciclovir, ainsi que des cures de valganciclovir en postnatal sont en cours d'évaluation dans différentes études nationales ou internationales [3,4]. Si des résultats encourageants étaient obtenus, il serait, à nouveau, utile de débattre de la pertinence du dépistage systématique de l'infection congénitale à CMV. Dans ce cadre et pour permettre un diagnostic dans des cas évocateurs, il est particulièrement important que les laboratoires de virologie disposent de tests performants pour le diagnostic, le pronostic et le dépistage de cette infection. Dans cet article, nous ferons l'état des lieux des différents outils disponibles et de leurs indications.

2. LES OUTILS DU DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE DE L'INFECTION CONGÉNITALE À CYTOMÉGALOVIRUS (CMV)

2.1. La sérologie est l'outil de choix pour le diagnostic de la primo-infection maternelle

La primo-infection maternelle étant associée à un risque beaucoup plus élevé de transmission de l'infection au fœtus (30–50 % des cas) que les réactivations/réinfections virales chez une mère déjà immunisée avant la grossesse (1–3 % de risque de transmission) [5], le diagnostic de primo-infection maternelle est essentiel et repose sur la sérologie avec la recherche d'immunoglobulines (Ig) G et d'IgM. La présence d'IgG spécifiques témoigne d'un contact avec le virus, mais sans présager de la date de la primo-infection. Une séroconversion témoigne d'une primo-infection mais est rarement mise en évidence. En pratique, le diagnostic de primo-infection chez la femme enceinte doit être évoqué devant la présence d'IgM spécifiques. Cependant, l'interprétation de la présence d'IgM anti-CMV doit être extrêmement prudente. En effet, la présence d'IgM ne signifie pas toujours une primo-infection récente : les IgM peuvent persister longtemps chez certains individus au décours de la primo-infection (pendant plusieurs mois), il peut y avoir une ré-ascension du taux d'IgM à l'occasion d'une réactivation ou d'une réinfection à CMV, des IgM peuvent également être détectées en raison de réactions croisées. Les IgM peuvent également être faussement dépistées par des trousses peu spécifiques, ce qui impose de la prudence dans l'interprétation des dossiers.

En raison des difficultés d'interprétation des IgM spécifiques, le recours à la mesure de l'avidité des IgG doit être systématique. L'indice d'avidité des IgG représente la mesure de la force de liaison entre des antigènes viraux (contenus dans le réactif) et les anticorps polyclonaux, de classe IgG présents dans le sérum. L'avidité des IgG spécifiques augmente au cours de la réponse immunitaire : en début d'infection, l'indice d'avidité des IgG est faible, et plus on s'éloigne du début de l'infection, plus cet indice est élevé. En présence d'IgM, l'indice d'avidité permet d'exclure ou de confirmer une primo-infection récente de moins de trois mois dans 80 % des cas [6]. Dans ces cas, si l'échantillon de sérum testé a été prélevé au premier trimestre de la grossesse, il sera donc possible d'exclure ou

d'affirmer la survenue d'une primo-infection pendant la grossesse. Dans environ 20 % des cas, l'indice d'avidité est intermédiaire (ni élevé, ni bas) et il sera alors impossible d'affirmer ou d'infirmer la survenue d'une primo-infection pendant la grossesse. Il est alors parfois aussi nécessaire de reprendre des sérums prélevés en tout début de grossesse, par exemple pour le dosage des β HCG ou pour les marqueurs sériques du dépistage de la trisomie 21, pour déterminer si l'infection maternelle est survenue en période péri-conceptionnelle ou au cours de la grossesse. L'interprétation des résultats de l'indice d'avidité n'est pas toujours simple et peut dépendre de l'expérience du biologiste et de la qualité du test utilisé, la concordance entre les trousses proposées dans le commerce n'étant pas toujours bonne [7].

La Polymerase Chain Reaction (PCR) CMV dans le sang maternel chez une femme déjà immunisée avant la grossesse, mais pour laquelle on suspecte une transmission au fœtus, peut aider à diagnostiquer une réactivation ou une réinfection du CMV.

2.2. La Polymerase Chain Reaction (PCR) dans le liquide amniotique est la technique de référence pour le diagnostic de l'infection fœtale

Trois conditions doivent être réunies pour optimiser la sensibilité et la spécificité du diagnostic de l'infection fœtale :

- la détection du CMV dans le liquide amniotique doit être réalisée par PCR, une meilleure sensibilité de cette dernière par rapport à la culture a en effet été clairement démontrée dans la littérature [1] ;
- par ailleurs, il est très important de bien programmer la date de l'amniocentèse ; celle-ci doit être faite à partir de 20 semaines d'aménorrhée (terme au-delà duquel la maturation du système urinaire fœtal est acquise) pour ne pas s'exposer à un risque de faux négatif ;
- au final, la ponction de liquide amniotique doit être réalisée au moins sept semaines après la primo-infection maternelle, une ponction trop proche de la séroconversion maternelle expose aussi à un risque de faux négatif [1].

Lorsque ces conditions optimales de prélèvement et de technique sont réunies, la spécificité du diagnostic prénatal est proche de 100 % et la sensibilité est supérieure à 90 % [8]. Quelques faux négatifs sont cependant décrits, avec un diagnostic prénatal négatif (PCR négative dans le liquide amniotique) et un diagnostic à la naissance positif (PCR positive dans les urines à la naissance), ces cas sont de bon pronostic et sont liés à une transmission tardive du virus de la mère au fœtus, celui-ci n'étant pas encore infecté au moment où le diagnostic prénatal a été réalisé [9].

2.3. La Polymerase Chain Reaction (PCR) dans les urines prélevées dans les dix premiers jours de vie est la technique de choix du diagnostic de l'infection congénitale chez le nouveau-né

Le prélèvement d'urines doit être fait dans les dix premiers jours de vie pour ne pas risquer d'interpréter des infections

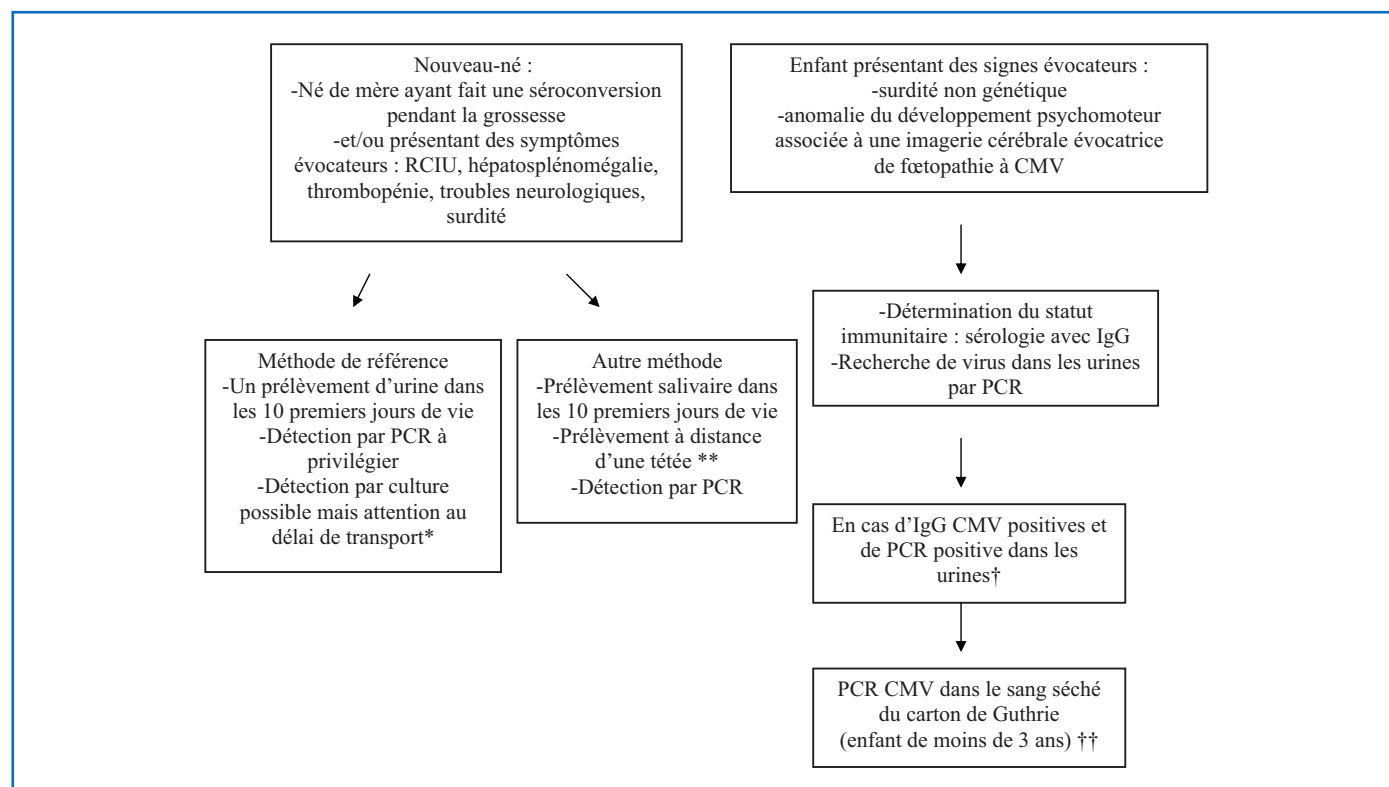


Fig. 1. Le diagnostic de l'infection congénitale à cytomégalovirus (CMV) chez l'enfant en pratique : * : il y a un risque de faux négatif si le prélèvement d'urine n'est pas recueilli dans un milieu de transport et transporté rapidement au laboratoire. Il est recommandé de refaire le prélèvement au moins une fois en cas de recherche de CMV par culture en revanche lorsque la recherche est effectuée par Polymerase Chain Reaction (PCR) un seul prélèvement suffit ; ** : environ 1 h après la tétée. Vérifier qu'il n'y pas de lait dans la bouche du nouveau-né et si besoin éliminer le lait avec une compresse stérile avant d'écouvillonner ; † : dans les infections congénitales, le virus est retrouvé dans les urines à des taux élevés pendant plusieurs années ; †† : la durée de conservation des cartons de Guthrie est variable d'un centre de dépistage à l'autre, mais elle est le plus souvent de deux ans. RCIU : retard de croissance intra-utérin.

postnatales précoces comme infections congénitales (Fig. 1). La recherche de l'ADN viral dans la salive prélevée dans les premiers jours de vie a été proposée comme alternative au prélèvement d'urine, mais il y a peu de données de comparaison de ce mode de diagnostic par rapport à la méthode de référence (prélèvement des urines). Le prélèvement salivaire est cependant assez largement utilisé, il doit être réalisé à distance des tétées pour éviter les faux positifs liés à la présence de CMV dans le lait maternel.

La quantification de l'ADN CMV dans le sang à la naissance ne permet de détecter que 80 % des nouveau-nés infectés congénitalement car environ 20 % de ceux-ci ne sont pas virémiques. Cependant, les nouveau-nés symptomatiques sont toujours virémiques, ainsi que ceux parmi les asymptomatiques qui vont ultérieurement développer une surdité [10].

2.4. La Polymerase Chain Reaction (PCR) sur sang séché de la carte de Guthrie est une technique efficace pour le diagnostic rétrospectif de l'infection congénitale chez l'enfant symptomatique

Lorsque le diagnostic néonatal n'a pas été pratiqué et qu'un jeune enfant présente des signes cliniques compatibles avec une infection congénitale à CMV (signes neurologiques ou surdité), le seul moyen de certitude pour faire le diagnostic rétrospectif de

l'infection congénitale à CMV est de tester le sang séché conservé sur les cartes de Guthrie, en sachant qu'en France les cartes de Guthrie sont conservées entre six mois et trois ans suivant les centres (Fig. 1). Dans le cadre des activités du Centre national de référence du CMV, nous avons développé depuis 2005 une technique de PCR CMV sur sang séché sur carte de Guthrie. Cette technique avait une sensibilité de 96 % et une spécificité de 99 % lorsqu'elle a été comparée à la technique de référence, (PCR sur échantillon d'urines), cette étude avait été réalisée dans une population de nouveau-nés à haut risque d'infection congénitale à CMV (nés de mère ayant fait une primo-infection pendant la grossesse et/ou ayant des symptômes compatibles) [11]. L'utilisation de cette technique en prospectif nous a permis de montrer que 10 % des cas de surdités bilatérales de l'enfant de moins de deux ans étaient liés à une infection congénitale à CMV qui était ainsi la seconde cause de surdité de l'enfant après les mutations du gène de la connexine [12]. Cette technique n'est actuellement réalisée que dans des laboratoires spécialisés, après obtention du consentement des parents.

3. LA VALEUR PRONOSTIQUE DES OUTILS VIROLOGIQUES

Le bilan pronostique des infections congénitales à CMV repose essentiellement sur des arguments échographiques en

anténatal et des arguments cliniques et d'imagerie cérébrale en néonatal. Cependant, d'autres marqueurs notamment biologiques ont été étudiés pour essayer d'affiner le bilan pronostique. Les techniques de biologie moléculaire utilisées en virologie depuis une dizaine d'années sont basées sur la technologie de PCR en temps réel qui permet la détection de l'ADN viral mais aussi sa quantification. Le lien entre les valeurs de charges virales et le pronostic de l'infection a donc été étudié par différentes équipes, mais les résultats à ce jour sont peu convaincants peut-être en raison des faibles effectifs des séries publiées.

3.1. La charge virale dans le liquide amniotique ne semble pas prédictive de la sévérité de l'infection

Dans les différentes études, les médianes de charge virale dans le liquide amniotique étaient le plus souvent significativement plus élevées dans les cas sévères que dans les cas asymptomatiques, mais les valeurs étaient chevauchantes si bien qu'il reste très difficile d'interpréter une valeur isolée. Par ailleurs, la charge virale augmente avec l'âge gestationnel quel que soit le pronostic de l'infection. Cependant, il semble que les valeurs basses (< 10 000 copies/mL) soient de bon pronostic [13].

3.2. La valeur de la charge virale dans le sang fœtal est encore peu explorée

En cas d'infection fœtale, certaines équipes pratiquent une ponction de sang fœtal à visée pronostique, notamment pour mesurer l'ADN viral dans le sang fœtal et le taux de plaquettes fœtales. Si la valeur pronostique de la thrombopénie fœtale semble maintenant établie [13,14], celle de la charge virale sanguine fœtale reste plus difficile à définir. Peu d'études sont disponibles, l'une ne retrouvait pas de lien entre charge virale sanguine fœtale et pronostic [14] et une autre a décrit une médiane de charge virale sanguine fœtale significativement plus élevée dans les cas sévères que dans les cas asymptomatiques, mais des valeurs élevées étaient trouvées dans les deux groupes, cependant les valeurs basses (< 10 000 copies/mL) n'étaient retrouvées que chez les fœtus asymptomatiques [13].

3.3. La valeur de la charge virale sanguine à la naissance reste controversée

Dans une première étude, Lanari et al. [15] avaient montré que la charge virale était un facteur prédictif de survenue de séquelles : en effet, 70 % des nouveau-nés qui avaient une charge virale supérieure à 10 000 copies pour 10⁵ cellules mononuclées sanguines développaient des séquelles à long terme et une charge virale sanguine à la naissance inférieure à 1000 copies avait une valeur prédictive négative de 95 % pour la survenue de séquelles. L'équipe de Boppana et al. [10] avait montré qu'à la naissance les enfants symptomatiques avaient des charges virales dans le sang total et dans les urines significativement supérieures à celles des enfants asymptomatiques et que, parmi les enfants asymptomatiques à la naissance,

ceux qui avaient développé ultérieurement une surdité étaient ceux qui avaient une charge virale sanguine supérieure à 10 000 copies/mL. Cependant, une autre publication plus récente du même groupe rapporte des résultats différents puisque, dans cette dernière étude, une charge virale dans le sang total supérieure à 3500 copies/mL avait une mauvaise valeur prédictive positive pour la survenue de la surdité. En revanche, une charge virale dans le sang total inférieur à 3500 copies/mL à la naissance avait une valeur prédictive négative de survenue de la surdité de 95 % [16]. Par ailleurs, il faut souligner qu'il est difficile d'extrapoler à partir des valeurs de charge virale rapportées dans la littérature. En effet, les techniques de PCR CMV n'étaient pas, jusqu'à une période récente, bien homogénéisées d'un laboratoire à l'autre. Une harmonisation de la quantification inter laboratoire est en cours grâce à l'utilisation d'un standard international.

4. L'UTILISATION DES OUTILS VIROLOGIQUES DANS LE CADRE DE LA SURVEILLANCE OU DU DÉPISTAGE

Dans le cas où un dépistage systématique de l'infection congénitale serait envisagé, les outils virologiques disponibles permettraient-ils sa réalisation ?

4.1. Outils sérologiques et dépistage anténatal systématique au premier trimestre

Un dépistage systématique de la primo-infection maternelle au premier trimestre reposerait sur la détection d'IgG et d'IgM et la réalisation d'un indice d'avidité en cas d'IgM positive. Certaines maternités pilotes françaises pratiquent ce dépistage depuis plusieurs années et rapportent un taux d'IgM autour de 5 % parmi les femmes ayant des IgG positives [6]. Cependant, dans près de 80 % de ces cas, les indices d'avidité sont élevés permettant d'exclure une primo-infection maternelle pendant la grossesse et dans 20 % des cas les indices d'avidité des IgG sont faibles ou intermédiaires pouvant amener à une décision d'amniocentèse [6]. Cette stratégie tout à fait réalisable dans des établissements possédant une bonne expertise tant clinique que biologique nécessiterait pour être mise en œuvre sur une plus large échelle un encadrement très strict. Un effort d'homogénéisation des techniques de dosage d'IgM et d'indice d'avidité des IgG serait nécessaire, ainsi qu'une formation des biologistes et des médecins cliniciens et un recours systématique à des laboratoires experts en cas de difficultés d'interprétation.

4.2. Outils de biologie moléculaire et dépistage à la naissance

L'outil idéal pour un dépistage systématique à la naissance devrait être suffisamment sensible et réalisable sur un prélèvement facile à obtenir. Le dépistage sur les urines n'étant pas réalisable à large échelle, l'utilisation d'une technique de dépistage par PCR CMV sur sang séché de la carte de Guthrie était une option très séduisante. Cependant, la

sensibilité de la PCR CMV sur Guthrie pour un dépistage universel s'est révélée très décevante dans la seule étude à large échelle réalisée [17]. En effet, dans cette étude, la sensibilité n'était que de 28 %. Les possibles causes à ce défaut de sensibilité pourraient être, d'une part, une technique d'extraction de l'ADN viral (étape indispensable avant la PCR) pas assez performante (emploi d'une extraction automatisée sur seulement une fraction de spot) et, d'autre part, une forte proportion d'enfants asymptomatiques non virémiques dans la population étudiée. Très récemment, l'équipe de Boppana et al. [18] a rapporté une méthode de dépistage par PCR dans des spots de salive déposés sur buvard, cette méthode s'est avérée avoir une excellente sensibilité et spécificité (97/99 %) pour un dépistage en population générale.

5. CONCLUSION

Le diagnostic de primo-infection maternelle à CMV reste un diagnostic délicat qui nécessite, pour être bien maîtrisé, l'utilisation de trousses sérologiques sensibles et spécifiques et une interprétation par un biologiste expérimenté. Le diagnostic d'infection fœtale lorsqu'il est réalisé dans les conditions optimales a une excellente valeur prédictive et négative. La méthode de référence du diagnostic de l'infection congénitale à la naissance reste la détection du virus dans les urines, la PCR dans le sang séché prélevé sur buvard est une bonne technique pour le diagnostic rétrospectif de l'infection congénitale et la détection du virus par PCR dans la salive séchée sur buvard semble un outil prometteur de dépistage universel.

DÉCLARATION D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

RÉFÉRENCES

- [1] Mazeron M, Alain S, Leruez-Ville M, et al. Les infections à cytomégalo-virus. Encyclopédie Médico-Chirurgicale: Elsevier Masson; 2009.
- [2] ANAES. Évaluation de l'intérêt du dépistage de l'infection à cytomégalo-virus chez la femme enceinte en France. Saint-Denis La Plaine: Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé; 2004.

- [3] Nigro G, Adler SP, La Torre R, et al. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 2005;353(13):1350–62.
- [4] Jacquemard F, Yamamoto M, Costa JM, et al. Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intra-uterine cytomegalovirus infection. *BJOG* 2007;114(9):1113–21.
- [5] Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 2007;17(4):253–76.
- [6] Vauloup-Fellous C, Picone O, Cordier AG, et al. Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *J Clin Virol* 2009;46(Suppl. 4):S49–53.
- [7] Revello MG, Genini E, Gorini G, et al. Comparative evaluation of eight commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *J Clin Virol* 2010;48(4):255–9.
- [8] Gouarin S, Palmer P, Cointe D, et al. Congenital HCMV infection: a collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR. *J Clin Virol* 2001;21(1):47–55.
- [9] Revello MG, Furione M, Zavattoni M, et al. Human cytomegalovirus (HCMV) DNAemia in the mother at amniocentesis as a risk factor for iatrogenic HCMV infection of the fetus. *J Infect Dis* 2008;197(4):593–6.
- [10] Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, et al. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr* 2005;146(6):817–23.
- [11] Leruez-Ville M, Vauloup-Fellous C, Couderc S, et al. Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots. *Clin Infect Dis* 2011;52(5):575–81.
- [12] Avettand-Fenoel V, Marlin S, Vauloup-Fellous C, et al. Congenital cytomegalovirus is the second most frequent cause of bilateral hearing loss in French young children. *J Pediatr* 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.08.009>.
- [13] Fabbri E, Revello MG, Furione M, et al. Prognostic markers of symptomatic congenital human cytomegalovirus infection in fetal blood. *BJOG* 2010;118(4):448–56.
- [14] Benoist G, Salomon LJ, Jacquemard F, et al. The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *BJOG* 2008;115(7):823–9.
- [15] Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 2006;117(1):e76–83.
- [16] Ross SA, Novak Z, Fowler KB, et al. Cytomegalovirus blood viral load and hearing loss in young children with congenital infection. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28(7):588–92.
- [17] Boppana SB, Ross SA, Novak Z, et al. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA* 2010;303(14):1375–82.
- [18] Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, et al. Saliva polymerase chain reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med* 2011;364(22):2111–8.