ISSN 1188-4169

Relevé des maladies transmissibles au Canada

Date de publication : septembre 2000

Volume 26S4

Supplément

Groupe d'experts sur les tests de laboratoire et le diagnostic du HHV-6 et du HHV-7

Santé Canada Health Canada

Canada

Notre mission est d'aider les Canadiens et les Canadiennes à maintenir et à améliorer leur état de santé.

Santé Canada

Cette publication a été produite par la Division de la diffusion des documents, Direction générale de la santé de la population et de la santé publique, Santé Canada.

Pour obtenir des exemplaires supplémentaires ou pour vous abonner au Relevé des maladies transmissibles au Canada, veuillez communiquer avec le Centre des services aux membres, Association médicale canadienne, 1867 promenade Alta Vista, Ottawa (Ontario), Canada K1G 3Y6.
Tél. : (613) 731-8610, poste 2307; 888-855-2555 (sans frais au Canada et aux É.-U.) ou par télécopieur : (613) 236-8864.

On peut aussi avoir accès électroniquement à cette publication par Internet en utilisant un explorateur Web, à http://www.hc-sc.gc.ca/hpb/lcdc

Groupe d'experts sur les tests de laboratoire et le diagnostic du HHV-6 et du HHV-7

les 7 et 8 mars 2000

Centre scientifique canadien de la santé humaine et animale
Winnipeg, Canada

Bureau de microbiologie*
Bureau des maladies infectieuses**
Programme de laboratoires de référence pour
la surveillance des maladies infectieuses
Laboratoire de lutte contre la maladie***
Santé Canada

Remaniement de Santé Canada :
* Laboratoire de la santé humaine et animale
** Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses
***Direction générale de la santé de la population et de la santé publique

Table des matières

Introduction 1

Recommandations 2

Vue d'ensemble 4

Propriétés des HHV-6 et 7 et vue d'ensemble du spectre clinique de la maladie (Pellett) 4

Méthodes de laboratoire 7

Vue d'ensemble des méthodes actuelles de diagnostic du HHV-6 et du HHV-7 en laboratoire (Tipples) 7

Standardisation et contrôle/assurance de la qualité en virologie de laboratoire (Campione-Piccardo) 8

Recherche internationale 11

Sérologie des HHV-6 et 7 : comparaison des données épidémiologiques de divers pays et de différentes techniques (Cermelli et Jacobson) 11

Le HHV-6 et la sclérose en plaques (Jacobson) 13

La recherche au Canada 16

Le HHV-6 dans la transplantation rénale (Acott et Lee) 16

Virémie plasmatique du HHV-6, du HHV-7 et du CMV chez les greffés médullaires (Diaz-Mitoma) 17

Diagnostic et traitement des infections dues au HHV-6 chez les greffés médullaires à Toronto (Allen) 19

Le HHV-6 chez les patients dépourvus d'anticorps hétérophiles qui ont des lymphocytes atypiques et/ou une lymphocytose (Doyle) 20

Le HHV-6 en pédiatrie (Thomas) 21

Essai multiplex pour la détection semi-quantitative et la distinction des bêtaherpèsvirus humains : prévalence durant l'infection par le VIH et la sclérose en plaques (Sahai) 23

Études sur le HHV-6 au Laboratoire central du Ministère de la Santé de l'Ontario (George) 24

Tests de détection du HHV-6 au Laboratoire provincial de santé publique du sud de l'Alberta (Fonseca) 25

Réseau collaborateur de chercheurs sur les maladies infectieuses chez les enfants au Canada (PICNIC) (Embree) 26

Surveillance des approvisionnements en sang 27

Surveillance des maladies transmissibles par le sang au Canada (Giulivi) 27

Annexe : Liste des participants 29

Introduction

S'il est vrai que les herpèsvirus humains ont une très longue histoire, ce n'est que vers le milieu des années 80 que les herpèsvirus humains 6 et 7 (HHV-6 et 7) ont été identifiés et que leur importance en tant qu'agents pathogènes humains a été comprise. À l'heure actuelle, il existe plusieurs techniques de laboratoire différentes pour le diagnostic des infections dues au HHV-6 et 7. Au cours des quelques dernières années au Canada, on a noté une augmentation constante du nombre de tests de diagnostic des HHV-6 et 7 demandés par les cliniciens. Malheureusement, il n'existe pas de lignes directrices claires concernant les meilleures méthodes de détection des HHV-6 et 7 chez différents groupes particuliers de patients. Les méthodes dont nous disposons actuellement n'ont pas fait l'objet d'une évaluation rigoureuse en contexte clinique. Aussi, une telle évaluation devrait-elle être réalisée dans les plus brefs délais afin de permettre une utilisation judicieuse des tests diagnostiques pour les HHV-6 et 7.

Grâce aux fonds versés par la Division des pathogènes à diffusion hématogène et le Programme de laboratoires de référence pour la surveillance des maladies infectieuses (Bureau des maladies infectieuses, Laboratoire de lutte contre la maladie), le Laboratoire des exanthèmes viraux (Bureau de microbiologie) a tenu une réunion de 2 jours d'un Groupe d'experts sur les tests de laboratoire et le diagnostic du HHV-6 et 7, les 7 et 8 mars 2000 à Winnipeg (voir la liste des participants en annexe). L'objectif de la session était réunir des chercheurs cliniciens et des chercheurs de laboratoire oeuvrant dans le domaine des HHV-6 et 7 d'un bout à l'autre du Canada ainsi que des experts de réputation internationale afin de discuter de diverses questions et de faire des recommandations pour améliorer le diagnostic des HHV-6 et 7. L'amélioration des méthodes de diagnostic de ces deux virus permettra non seulement d'accroître la fiabilité du diagnostic dans les laboratoires d'analyses cliniques, mais encore elle jettera de la lumière sur le rôle de ces herpèsvirus dans la maladie humaine.

Ce recueil d'articles est un résumé de la réunion du Groupe d'experts et il comprend des recommandations sur les épreuves actuelles de détection des HHV-6 et 7 et sur les mesures à prendre pour améliorer celles-ci

Recommandations

1. Actuellement, les scénarios cliniques dans lesquels le diagnostic en laboratoire du HHV-6 semble le plus indiqué sont les suivants :
   a) primo-infection chez les enfants âgés de < 3 ans qui présentent une affection fébrile accompagnée ou non d'une éruption cutanée;
   b) primo-infection ou une réactivation du virus chez les personnes immunodéprimées, comme celles qui sont atteintes du sida ou les greffés;
   c) syndrome apparenté à la mononucléose infectieuse chez les patients qui n'ont pas d'anticorps hétérophiles ou d'anticorps spécifiques contre le virus Epstein-Barr (EBV).
2. Le diagnostic en laboratoire d'une infection active ou récente par le HHV-6 peut être établi de l'une des façons suivantes :
   a) mise en évidence d'une séroconversion (présence de l'anticorps spécifique contre le HHV-6) ou changement marqué du titre d'anticorps entre des paires de sérum prélevés pendant la phase aiguë et la convalescence;
   b) mise en évidence d'un anticorps spécifique de faible avidité contre le HHV-6 dans le sérum (associé à la primo-infection);
   c) résultat positif de la PCR sur un échantillon de sérum ou de plasma;
   d) résultat positif de la RT-PCR sur des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) qui ciblent un gène activé au cours du cycle lytique;
   e) ensemble de résultats d'épreuves pouvant révéler une primo-infection, comme :
      i) IgG négatif et sérum/plasma/sang total positif par PCR;
      ii) IgM positif ou sérum/plasma positif par PCR chez des enfants âgés de moins de 3 ans.
3. Il faut procéder à une évaluation plus approfondie en contexte clinique (spécificité, sensibilité, valeurs prédictives) pour améliorer la certitude et la fiabilité des épreuves en laboratoire pour le HHV-6.
   a) comparaison des méthodes sérologiques et de la PCR chez divers groupes de patients (dont les nourrissons et les personnes atteintes d'un déficit immunitaire);
   b) comparaison de différentes méthodes sérologiques (immunofluorescence [IFA], dosage immunoenzymatique [ELISA], antigènes recombinants purifiés);
   c) comparaisons de différents protocoles de PCR qui ciblent différentes régions génomiques et utilisent différents types de spécimens (urine, salive, sérum, plasma, PBMC). En outre la PCR quantitative et la RT-PCR doivent faire l'objet d'études plus poussées;
   d) différenciation des variants du HHV-6 dans un laboratoire de virologie clinique pour laquelle les méthodes de PCR sont très utiles. Ces études permettront de mieux comprendre le rôle de chaque agent (HHV6A et HHV-6B) dans la maladie chez l'homme.

4. Diagnostic en laboratoire du HHV-7 :

   a) pour l'instant, le HHV-7 n'a pas été lié de façon probante à des situations cliniques quelconques, et il y a lieu de croire que celles qui devraient faire l'objet d'un diagnostic en laboratoire seraient les mêmes que dans le cas du HHV-6, à savoir les enfants atteints d'une maladie fébrile et les personnes présentant un déficit immunitaire;

   b) il faut choisir avec soin les sérologies pour le HHV-7 afin d'éviter les réactions croisées avec les anticorps du HHV-6 (p. ex., la protéine 89 KDa du HHV-7 n'entraîne pas de réaction croisée avec les anticorps du HHV-6).

   c) les épreuves faisant appel à la PCR peuvent distinguer le HHV-7 du HHV-6. Il faut faire des études plus poussées pour déterminer quels sont les échantillons les plus appropriés et la meilleure technique PCR (c.-à-d. qualitative ou quantitative) pour la détection d'une infection active par le HHV-7.

Vue d'ensemble

Propriétés des HHV-6 et 7 et vue d'ensemble du spectre clinique de la maladie

Philip Pellett

Les herpèsvirus humains (HHV) de types 6 et 7 ont été décrits pour la première fois en 1986 et 1990 respectivement et appartiennent à la sous-famille des bêtaherpèsvirus de la famille des herpèsvirus humains. Les HHV-6 et 7 présentent un certain nombre de caractéristiques biologiques communes, et la relation entre eux est tout aussi étroite que celle qui existe ente les virus herpès simplex 1 et 2 de la sous-famille des alphaherpèsvirus.

HHV-6

Le HHV-6 présente les caractéristiques suivantes :

- Il croît principalement sur des lymphocytes T possédant le récepteur CD4 tant *in vivo* qu'*in vitro*.
- Il est présent dans la plupart des cerveaux.
- La transmission congénitale est possible.
- La séroprévalence est supérieure à 90 %.
- Il est associé à une vaste gamme de maladies.
- Il existe des interactions pathogènes éventuelles avec d'autres virus.
- Il est souvent mal diagnostiqué ou non diagnostiqué.
- Il existe deux variantes, soit le HHV-6A et le HHV-6B.

Bien qu'elles soient très étroitement apparentées, les variantes HHV-6A et 6B peuvent être différenciées sur la foi de divers paramètres : le tropisme cellulaire, la réaction aux anticorps monoclonaux (AcM), les profils des endonucléases de restriction, les séquences nucléotidiques et les caractéristiques épidémiologiques. Il n'existe aucun gradient génétique entre 6A et 6B.

Dans le laboratoire, les HHV-6A et 6B croissent tous deux dans des PBMC stimulés CD4 positifs. La souche 6A se réplique efficacement dans les lymphocytes T de la lignée HSB-2 alors que la variante 6B est cultivée dans la lignée Molt-3. Dans l'organisme, les deux variantes peuvent être retrouvées dans le système nerveux central (SNC), la peau et les poumons. Le HHV-6B est plus facilement détectable dans le sang et la salive que le 6A. Bien que le HHV-6B soit plus souvent présent dans le liquide céphalorachidien (LCR), le HHV-6A affiche un neurotropisme relatif plus important.

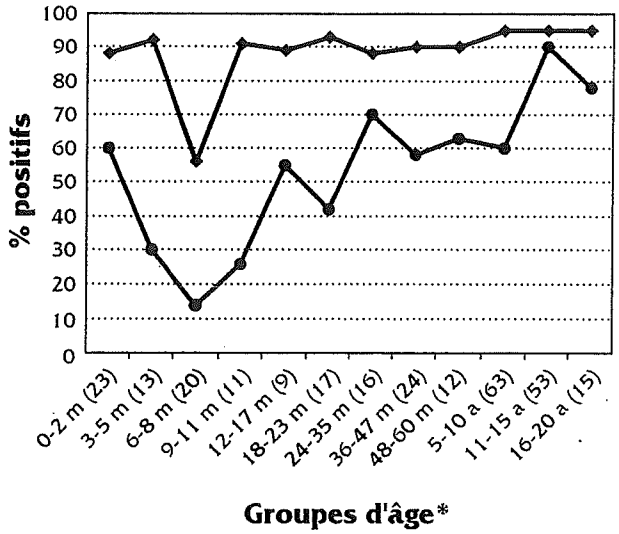
L'hybridation de Southern avec une sonde d'ADN du HHV-6 purifié et l'analyse des profils des endonucléases de restriction ont montré que le HHV-6 ne s'hybride qu'avec lui-même. Il n'y a pas d'hybridation avec le cytomégalovirus humain (CMV), qui fait également partie de la famille des bêta-herpèsvirus, ou avec des herpèsvirus appartenant à d'autres sous-familles, comme le virus varicelle-zona (VZV) ou le virus EBV, tandis que dans le cas du HHV-7, il y a une certaine hybridation croisée. La comparaison des séquences génomiques des variantes HHV-6A et 6B permet de constater que 90 % des séquences de nucléotides sont identiques dans la portion moyenne du génome, mais que

l'homologie est moins importante dans les séquences terminales et n'est plus que de 50 % à 70 % dans la région qui contient le gène précoce immédiat. Dans une comparaison similaire de deux souches du HHV-6B, on note très peu de divergence dans les séquences, ce qui porte à croire que les variantes 6A et 6B sont peut-être en fait deux virus distincts.

D'après les enquêtes sérologiques, la prévalence des HHV-6A et 6B est supérieure à 90 % dans la population adulte. La primo-infection par le HHV-6 survient généralement au cours de la petite enfance, peut-être dès que le taux d'anticorps maternels protecteurs commence à chuter (à l'âge de 6 mois environ) et à l'intérieur d'une période restreinte (figure 1). Le HHV-6 semble transmis surtout par la salive, mais il n'a pas été établi que le lait maternel pouvait être un véhicule pour la transmission du virus. Certaines données semblent évoquer la possibilité d'une infection congénitale, et de rares cas de transmission chromosomique ont été signalés. La principale maladie observée lors de la primo-infection dans l'enfance est la roséole (exanthème subit ou sixième maladie), qui se manifeste par une forte fièvre durant quelques jours suivie d'une éruption cutanée. L'infection peut également se manifester par une éruption sans fièvre, une fièvre sans éruption ou des convulsions. De ces deux variantes, le HHV-6B est celle qui est presque exclusivement en cause dans la roséole. Chez les enfants, les maladies fébriles causées par le HHV-6 peuvent souvent être diagnostiquées à tort comme une hypersensibilité à un antibiotique, une rougeole ou une autre maladie infectieuse éruptive de l'enfance.

Chez les greffés, le HHV-6 peut causer une éruption cutanée (parfois confondue avec une réaction de greffon contre l'hôte), une pneumonite, une rejet du greffon ou un échec de la greffe, et une hypoplasie médullaire ou une prise tardive de la greffe chez les greffés médullaires. Les études *in vitro* ont décrit un certain nombre d'interactions entre le HHV-6 et le VIH-1. En effet, le HHV-6 peut induire l'expression des cellules CD4, de sorte que le nombre potentiel de cellules réceptives à l'infection par le VIH-1 se trouve accru. Il a été établi que la charge virale du VIH est augmentée en présence du HHV-6. Le rôle du HHV-6 dans la sclérose en plaques sera abordé par le Dr Jacobson. Parmi les autres maladies pour lesquelles les chercheurs ont tenté de trouver un lien avec le HHV-6 figurent le syndrome de fatigue chronique, le syndrome

Figure 1
Étude transversale de la prévalence du HHV-6 (◆) et du HHV-7 (●)



* Les groupes d'âge sont indiqués en mois (m) ou en années (a) et le nombre total d'échantillons analysés par groupe est indiqué entre parenthèses.

d'hypersensibilité d'origine médicamenteuse et des affections malignes.

Pour ce qui est du diagnostic de laboratoire, il existe très peu de trousses diagnostiques commerciales standardisées. Les options dont disposent la majorité des laboratoires, soit la culture, la détection de l'antigène (avec des AcM), la détection de l'acide nucléique (au moyen de la PCR sur le sérum ou le sang total, plus l'hybridation par transfert), et les méthodes sérologiques (IFA, ELISA [technique immunoenzymatique]) - comportent toutes des limites, à quoi s'ajoute le problème de la prévalence élevée du HHV-6 dans la population générale, ce qui porte à se demander ce que signifie un résultat positif. Récemment, des chercheurs ont travaillé sur des algorithmes pour le diagnostic de la primo-infection chez les enfants qui permettraient de faire subir des épreuves rapides à l'endroit où est traité le patient. Les essais multiplex deviendront probablement des outils importants dans ce domaine. Quant au traitement, il a été établi que le HHV-6 est sensible au ganciclovir et au foscarnet *in vitro*, et l'on a noté une baisse de l'activité du HHV-6 chez les greffés médullaires recevant de l'acyclovir.

HHV-7

Le HHV-7 est étroitement lié au HHV-6 tant du point de vue génétique qu'antigénique. Il infecte

les lymphocytes ayant des récepteurs CD4 mais, contrairement au HHV-6 (et à l'instar du VIH), il utilise les CD4 comme ses propres récepteurs puis diminue le nombre de récepteurs CD4. La prévalence du HHV-7 est d'au moins 85 % de la population adulte en bonne santé, et il est possible de détecter le virus dans la salive de 75 % des gens. La plupart des séroconversions se produisent au cours des 2 premières années de la vie, mais le virus n'est pas contracté aussi rapidement que le HHV-6 après la disparition des anticorps maternels et l'infection peut n'être acquise que plus tard dans la vie (figure 1).

La structure génomique du HHV-7 est très semblable à celle du HHV-6 du point de la haute densité de ses gènes et de leur arrangement. L'hybridation croisée entre le HHV-6 et 7 ne se produit que dans une petite région. Au laboratoire, le HHV-7 croît dans des cellules CD-4+; dans l'organisme, il a été retrouvé dans les lymphocytes, les glandes salivaires et dans les cellules épithéliales, mais non dans le cerveau. Il n'y a pas de colocalisation avec le HHV-6.

Le HHV-7 est associé à la roséole (5 % à 10 % des cas), aux convulsions fébriles (bien que le virus ne persiste pas dans le SNC), à la maladie due au CMV chez les greffés et peut-être au pityriasis rosé de Gilbert. À l'instar des autres herpèsvirus, il est probable que le HHV-7 donne lieu à une maladie plus sévère s'il est contracté plus tard dans la vie.

Les outils diagnostiques dont on dispose pour le HHV-7 sont moins bien développés que ceux pour le HHV-6, et les méthodes sérologiques causent des problèmes en raison de la réactivité antigénique croisée entre le HHV-7 et le HHV-6B. En laboratoire, le HHV-7 peut réactiver une infection latente par le HHV-6B. La primo-infection par l'un de ces deux virus chez une personne déjà séropositive pour l'autre se traduit par une élévation de 2 à 4 fois du titre des anticorps contre l'autre virus. Le HHV-6 et le HHV-7 peuvent co-infecter la même cellule, par exemple les cellules porteuses du récepteur CD68+ dans les lésions du sarcome de Kaposi (SK). Les conséquences de la co-infection sur la pathogenèse du SK n'ont pas encore été déterminées.

Le tableau 1 résume les caractéristiques des HHV-6 et 7. Dans l'avenir, une étude plus approfondie des différences qui existent entre les variantes du HHV-6 sera probablement utile. Il faudra déterminer comment les deux virus (HHV-6 et 7) persistent et entrent en interaction avec d'autres virus en plus de clarifier leur rôle dans un certain nombre de maladies.

Tableau 1
Caractéristiques des HHV-6A, HHV-6B et HHV-7

	HHV-6A	HHV-6B	HHV-7
Infecte les CD4+	oui	oui	oui
CD4 est le récepteur	non	non	oui
Virus dans la salive	0/85	3/85	55/85
Virus dans les glandes salivaires	0/8	5/8	8/8
Virus dans les sécrétions cervicales	0/72	14/72	2/72
Virus dans les LSP*	oui	oui	oui
Virus dans le SNC	oui	oui	non
Roséole	très peu	la plupart	quelques-uns

* Lymphocytes du sang périphérique

Méthodes de laboratoire

Vue d'ensemble des méthodes actuelles de diagnostic du HHV-6 et du HHV-7 en laboratoire

Graham Tipples

L'objet de ce bref survol est de présenter sommairement les méthodes actuelles de diagnostic des HHV-6 et 7. Au nombre des méthodes pratiques de diagnostic des HHV-6 et 7 dans un laboratoire d'analyses cliniques figurent les méthodes sérologiques pour la mise en évidence des anticorps ainsi que les méthodes moléculaires pour la détection des virus eux-mêmes. L'isolement des HHV-6 et 7 n'est pas abordé ici étant donné qu'il s'agit d'une opération très longue et complexe qui ne se prête pas actuellement au diagnostic rapide dans un laboratoire de virologie clinique. Il est très important que toute méthode utilisée dans un laboratoire d'analyses cliniques soit évaluée dans le contexte clinique approprié. Il faut interpréter les résultats en étant conscient des limites d'une épreuve particulière. L'évaluation des méthodes diagnostiques englobe habituellement la détermination de la sensibilité, la spécificité et des valeurs prédictives positives et négatives, comme on peut le voir à la figure 2. Le lecteur trouvera une analyse plus détaillée de la méthode d'évaluation dans l'exposé du Dr Campione-Piccardo (voir page 8).

Les méthodes sérologiques englobent, entre autres, les techniques d'immunofluorescence (IFA) et les dosages immunoenzymatiques (EIA) pour l'analyse quantitative et qualitative des anticorps et la détermination de leur avidité. Les techniques IFA et EIA utilisent toutes deux une lignée de lymphocytes T humains telle HSB-2 infectée par une souche comme GS (HHV-6A) pour la préparation des microplaquettes ou des antigènes, respectivement. Les méthodes sérologiques actuelles utilisées pour les HHV-6 et 7 présentent un certain nombre de difficultés et il en va de même de l'interprétation des résultats. Ces difficultés englobent : 1) la prévalence élevée des anticorps contre les HHV-6 et 7 dans la population générale (voir Cermelli, page 11); 2) l'incapacité de distinguer les souches (HHV-6A par rapport à HHV-6B) par des techniques sérologiques; 3) le recours à l'IgM comme marqueur diagnostique général de l'infection aiguë (5 % de la population adulte peut être IgM positive à n'importe quel moment donné tout en n'ayant aucun symptôme de maladie), et 4) la probabilité de réactivité croisée entre les HHV-6 et 7.

Il existe de nombreuses études publiées qui ont recours à des méthodes reposant sur la PCR pour la détection des HHV-6 et 7. Ces méthodes

Figure 2
La sensibilité et la spécificité, et les valeurs prédictives positives et négatives d'un test de laboratoire

		État du patient	
		malade	non-malade
Résultat du test	+	a	b
	-	c	d

sensibilité = a / (a + c)
spécificité = d / (b + d)

VPP = a / (a + b)
VPN = d / (c + d)

englobent la PCR et la RT-PCR qualitative et quantitative, utilisent un grand nombre de gènes viraux différents comme cibles spécifiques et peuvent être réalisées sur des échantillons de sérum, de plasma, de PBMC, de sang total et de salive.

Outre les nombreuses analyses maison développées pour la détection des HHV-6 et 7, il existe un certain nombre de produits commerciaux utilisés dans la recherche. Ceux-ci englobent les épreuves IFA, EIA pour la sérologie et les techniques moléculaires pour la détection de l'ADN du HHV-6.

Seules quelques études ont tenté d'évaluer rigoureusement l'usage de différentes méthodes pour la détection des HHV-6 et 7 en contexte clinique. Ces études importantes sont mentionnées brièvement ici. Norton *et al*[1] ont utilisé l'isolement du virus comme méthode de référence et ont examiné l'usage de la RT-PCR sur des PBMC pour distinguer le virus latent de celui qui se réplique. Ward *et al*[2] ont développé un essai d'avidité de l'IgG pour distinguer la primo-infection à faible avidité de l'infection récurrente à forte avidité. Bland *et al*[3] ont utilisé la séroconversion ou une élévation significative du titre des anticorps comme critère de référence pour évaluer à la fois le sérologie IgM et la PCR sur un échantillon de sérum dans le diagnostic de l'infection aiguë par le HHV-6 causant une maladie fébrile chez l'enfant. Ils ont établi que la PCR sur un échantillon de sérum et le dosage des IgM sont tous deux nécessaires pour assurer une meilleure sensibilité (p. ex., un résultat IgM positif ou PCR positif révèle l'existence d'une infection aiguë par le HHV-6). Chiu *et al*[4] ont également utilisé la séroconversion IgG dans les cas de maladie fébrile aiguë chez les enfants comme technique de référence et ont comparé la PCR quantitative pour le HHV-6 sur des échantillons de plasma et de sang total. Ils ont déterminé qu'un résultat positif à la PCR sur un échantillon de sang total et une sérologie IgM négative dans du plasma prélevé dans les 5 jours suivant l'apparition de la maladie est un bon indicateur d'une primo-infection par le HHV-6 chez les enfants âgés de > 3 mois et de < 3 ans. Black *et al*[5] ont comparé les méthodes sérologiques EIA, immunoblotting et IFA pour le HHV-7 et ont déterminé que l'immunoblotting était la méthode la plus spécifique alors l'EIA était la plus sensible. À l'aide de l'immunoblotting, ils ont également identifié une protéine 89 KDa comme marqueur sérologique spécifique du HHV-7, marqueur qui permettra vraisemblablement d'éliminer certains problèmes liés à la réactivité croisée des HHV-6 et 7.

En terminant, il faudra poursuivre les travaux pour établir quelles sont les méthodes les plus utiles et faciles à interpréter pour le diagnostic des HHV-6 et 7 en contexte clinique.

Standardisation et contrôle/ assurance de la qualité en virologie de laboratoire

José Campione-Piccardo

Le Programme de laboratoires de référence pour la surveillance des maladies infectieuses du LLCM vise à fournir une interface entre les professionnels de la santé publique travaillant en laboratoire et ceux qui évoluent dans d'autres milieux pour l'étude des questions se rapportant à la recherche et au développement dans le domaine de la santé publique, de l'assurance de la qualité et du contrôle de la qualité, de l'accréditation et de la formation.

Les techniques de laboratoire utilisées dans les soins de première ligne et la surveillance sont semblables et souvent appliquées par les mêmes professionnels dans les mêmes installations. Cependant, la prévalence différente de la maladie dans les populations à l'étude (soins de première ligne par opposition à surveillance) exigent que les épreuves aient des sensibilités, des spécificités ainsi que des seuils de positivité différents. De plus, les résultats sont aussi généralement différents.

Une épreuve diagnostique idéale permettra de détecter toutes les personnes porteuses de la maladie et aucune personne indemne. Cependant, aucune épreuve n'est parfaite, c'est pourquoi il faudra s'attendre à faire face aux situations suivantes :

- Il n'y habituellement pas de concordance absolue entre les résultats du test et l'état pathologique (présence ou absence d'infection).
- Dans certains cas l'état pathologique est difficile à évaluer.
- Les conclusions tirées des résultats des tests sont plus importantes que les valeurs observées.
- La corrélation des résultats des épreuves n'est d'aucune utilité.

- En raison de facteurs biologiques, même des résultats corrects de tests peuvent ne pas toujours détecter correctement un état pathologique.

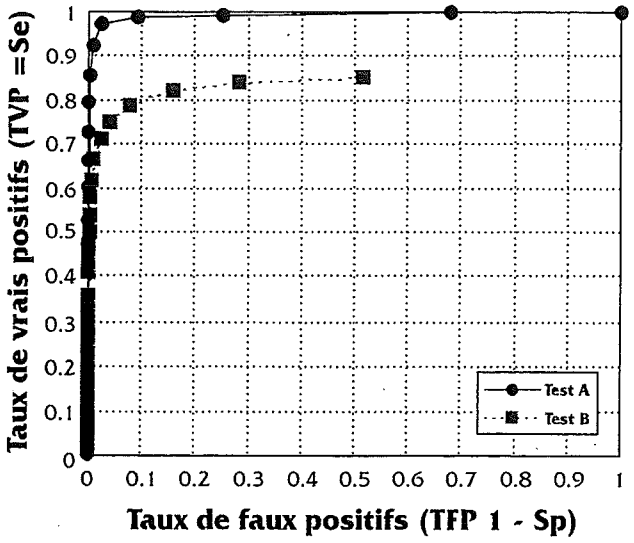
Les mesures de la performance d'un test diagnostique englobent la sensibilité (Se) ou le taux de vrais positifs, la spécificité (Sp), le taux de faux positifs (1 - Sp), l'efficacité (Ef) ou l'identification correcte des personnes infectées et non infectées (a + d dans la figure 2), la valeur prédictive positive (VPP), la valeur prédictive négative (VPN), le rapport de vraisemblance d'un résultat positif (RVP = Se/[1–Sp]), le rapport de vraisemblance d'un résultat négatif (RVN =Sp[1-Se] et le rapport de cotes (OR = RVP/RVN), utilisé surtout pour combiner les résultats de différentes études dans des méta-analyses.

Des biais peuvent survenir dans les mesures de la performance d'un test diagnostique parce que la sensibilité du test varie selon le stade clinique de la maladie et que le spectre de la maladie n'est pas représenté de façon proportionnelle dans l'échantillon. Il peut y avoir un biais lié aux investigations (la valeur de référence est évaluée après le fait, c'est-à-dire après l'usage du test et le suivi), un biais d'échantillonnage (par exemple, la prévalence dans l'échantillon est déterminée d'avance) et un biais de sélection. Afin d'accroître la précision des mesures de performance d'un test, il existe des façons d'estimer d'avance la sensibilité et la spécificité et de calculer la taille de l'échantillon nécessaire pour obtenir des intervalles de confiance optimaux (p. ex., $p < 0{,}05$) pour la Se et la Sp. La Se et la Sp varieront également en fonction de la relation hôte-agent pathogène qui est utilisée, le plan expérimental, la population et la stratégie d'échantillonnage et la pondération de la Se et la Sp par la valeur seuil choisie.

Le seuil de positivité d'une épreuve sera déterminé par la prévalence réelle de l'infection dans la population, le coût des résultats faux positifs et faux négatifs et la stratégie de décision. L'une des façons de fixer la valeur seuil consiste à utiliser la valeur à laquelle le coût d'une classification erronée est au minimum. Une autre méthode fait appel à la courbe ROC (pour receiver operator characteristic). Pour obtenir une courbe ROC, on indique sur un graphique le taux de vrais positifs (Se) en fonction du taux de faux négatifs positifs (1 – Sp) pour une gamme de valeurs seuils. Plus la courbe ROC se rapproche de l'angle supérieur gauche du graphique, plus le test est exact parce que le taux de vrais positifs est plus proche de 1 et que le taux de faux positifs avoisine 0. Le point « nord-ouest » qui est le plus loin de la diagonale bissectrice (Se = Sp) représente habituellement la meilleure valeur-seuil (figure 3). Il est possible de comparer diverses épreuves diagnostiques en analysant leurs courbes ROC. Voilà qui est particulièrement utile dans des méta-analyses d'un certain nombre d'études de validation indépendantes, dans lesquelles une analyse ROC sommaire (ROCs) peut être tirée des données de chaque étude. La courbe ROCs englobera un point de données sommaire calculé pour chacune des études différentes par lequel on fera passer une ligne d'ajustement optimal pour montrer la valeur moyenne obtenue dans ces études.

L'un des avantages des courbes ROC est qu'elles peuvent être utilisées pour comparer des épreuves sans devoir à se reporter à une épreuve de référence. Le recours à une épreuve de référence peut poser un problème si tous ne s'entendent pas sur ce qui devrait être considéré comme une épreuve de référence et sur le moment auquel un nouveau test plus performant devrait remplacer un test de référence anciennement reconnu. Une solution à ces problèmes consiste à utiliser une méthode du maximum de vraisemblance, par exemple, le modèle à classes latentes (Latent Class Model). Deux tests différents sont effectués dans deux populations ayant des taux de prévalence différents de la

Figure 3
Courbes ROC pour un test avec Se = 0,97 et Sp = 0,97 et un autre avec Se = 0,79 et Sp = 0,92 à des valeurs limites optimales.

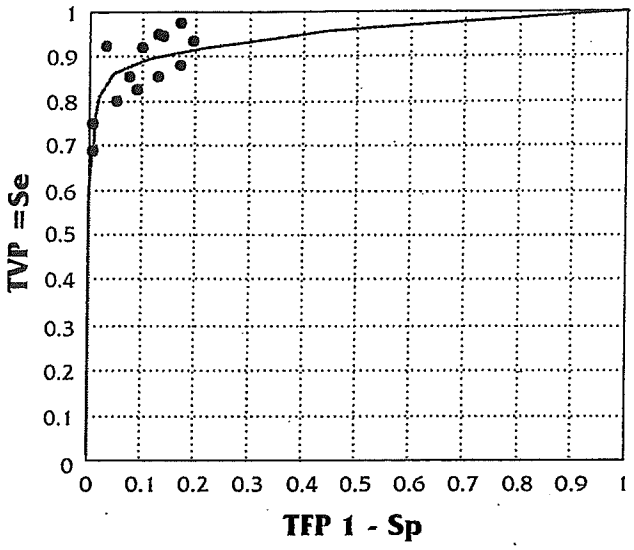


maladie en question, les deux étant réalisés dans des laboratoires différents. On calcule la Se, la Sp et la prévalence dans chaque population par des méthodes numériques itératives bien établies en utilisant des équations de vraisemblance déterminées pour chaque cellule (voir la figure 4). Le modèle à classes latentes appliqué à au moins deux séries de données (chaque série pour deux épreuves et deux populations) peut être utilisé pour obtenir une courbe ROC pour chaque test sans devoir se reporter à un test de référence.

Le Laboratoire de référence pourra dans l'avenir avoir pour rôle de déterminer les seuils, valider les tests au moyen de méta-analyses et évaluer les nouveaux tests en ayant recours à des modèles avec ou sans épreuves de référence.

Figure 4

Les points individuels représentent des évaluations indépendantes du même test. La courbe sROC a été obtenue par analyse de regression de transformations linéaires des points individuels.



Recherche internationale

Sérologie des HHV-6 et 7 : comparaison des données épidémiologiques de divers pays et de différentes techniques

Claudio Cermelli et
Steven Jacobson

La séroépidémiologie des HHV-6 et 7 n'a pas évolué aussi rapidement qu'on l'avait prévu lorsqu'on a décrit et étudié ces virus pour la première fois; les méthodes diagnostiques ne sont pas standardisées et il n'existe pas encore d'épreuve de référence. Même les tests commerciaux ne semblent pas plus fiables que les tests maison. Une revue des études qui ont estimé la séroprévalence du HHV-6 à des âges différents (au moyen de l'IFA) montre qu'il y a un intervalle de 39 % à 100 % chez les adultes et de 80 % à 100 % chez les enfants. Il y a également une variation énorme dans les seuils de dilution utilisés, l'intervalle allant de 1:2,5 à 1:160, ce qui influe grandement sur le taux de séropositivité obtenu. D'autres facteurs qui pourraient expliquer ces écarts englobent les différences géographiques dans la circulation des virus, la variante et la souche du HHV-6 utilisées, le caractère subjectif de l'interprétation et l'absence de standardisation.

Pour déterminer dans quelle mesure l'usage de souches et de variantes différentes explique les résultats aussi divergents, on a comparé la réactivité par IFA de 117 échantillons de sérum à des lymphocytes de sang de cordon infectés soit par la souche U1102 du HHV-6A ou la souche CV du HHV-6B. Tous les sérums étaient IgG+ vis-à-vis des deux variantes du virus. Seuls 14,7 % des sérums positifs laissaient voir une différence d'une dilution dans le titrage des anticorps avec les deux variantes et aucun ne différait de plus d'une dilution. Il semble donc clair que ces épreuves sérologiques ne permettent pas de distinguer les anticorps contre les deux variantes.

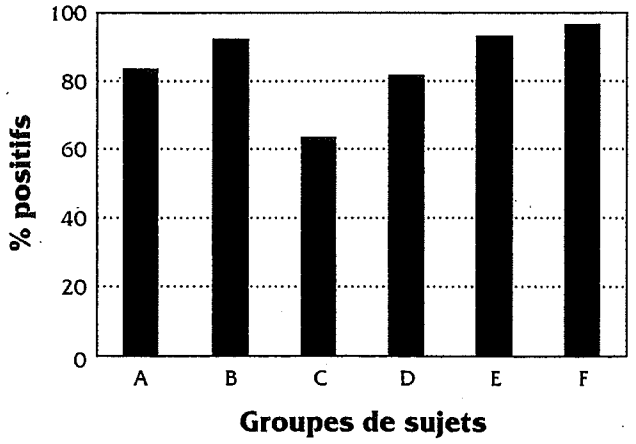
Une étude de la séroprévalence du HHV-6 en Italie a été réalisée au moyen d'une technique IFA maison qui utilisait des lymphocytes de sang de cordon infectés par une souche du HHV-6 provenant d'un enfant atteint d'un exanthème subit. Le seuil de dilution était de 1:40. On a analysé des échantillons de sérum provenant de 582 sujets d'âges différents atteints d'infections diverses afin de déterminer la présence d'IgG contre le HHV-6. La figure 5 montre la séroprévalence selon l'âge et l'état clinique. La valeur chute avec l'âge et chez les adultes elle atteint son maximum chez les sujets présentant une infection à CMV ou à VIH active. Afin de valider les résultats ainsi que le choix du seuil de dilution 1:40, les chercheurs ont développé un ELISA à l'aide d'un lysat brut de lymphocytes de sang de cordon infectés par la même souche du HHV-6; une partie des sérums analysés par IFA a été utilisée. Ils ont déterminé que la séroprévalence était un peu inférieure à celle obtenue avec la méthode IFA : chez les enfants en bonne santé âgés de 1 à 6 ans, elle était de 87,1 % comparativement à 90,3%, chez les jeunes en bonne santé âgés de 6 à 18 ans, elle se chiffrait à 86,7 % comparativement à 90%, et chez les adultes en bonne santé, elle s'établissait à 60,3 % comparativement à 63,6 %. Ce résultat n'a

rien d'étonnant étant donné la source de l'antigène. La concordance globale se chiffrait à 79,7 %. Les chercheurs ont estimé que le seuil de 1:40 était validé, mais que les taux de concordance n'étaient pas suffisamment élevés pour justifier l'adoption d'ELISA comme technique de choix.

La détection des IgM soulève également certains problèmes, surtout parce que 5 % de la population est IgM+ en tout temps. On peut ajouter une étape supplémentaire à l'IFA pour évaluer l'avidité des anticorps, qui est faible immédiatement après la primo-infection mais beaucoup plus importante après la réactivation de l'infection. Le sérum est préparé sur deux lames, l'une est lavée avec du soluté physiologique tamponné au phosphate après incubation du sérum et l'autre avec de l'Urée 8M. L'urée élue l'anticorps à faible activité mais non à forte activité de l'antigène. On considère que l'avidité est faible si la différence des titres entre les deux lames équivaut à au moins trois dilutions. Quand ils ont utilisé cette technique d'IFA modifiée pour tester le sérum d'un petit échantillon d'enfants présentant des pathologies liées au HHV-6, les chercheurs ont pu constater que l'avidité de l'IgG était un indicateur plus fiable d'une primo-infection récente que l'IgM. La figure 6 montre les résultats obtenus quand on a utilisé l'épreuve pour évaluer l'avidité de l'anticorps dans le cadre d'une enquête de séroprévalence des HHV-6 et 7 chez des enfants.

Figure 5

Pourcentage de sujets qui ont des anticorps contre le HHV-6



A = sujets bien portants âgés de 1 à 6 ans; B = sujets bien portants âgés de 6 à 18 ans; C = sujets bien portants âgés de plus de 18 ans; D = échantillons de sang de cordon; E = sujets âgés de plus de 18 ans atteints d'une infection active par le CMV; F = sujets âgés de plus de 18 ans qui sont séropositifs pour le VIH.

La figure 7 présente la séquence temporelle de l'acquisition des HHV-6 et 7 à différents stades de l'enfance, encore une fois en mesurant l'avidité de l'anticorps. Pour chaque groupe d'âge, le nombre d'enfants chez qui l'infection par le HHV-6 a précédé celle par le HHV-7 était supérieur à celui chez qui le HHV-7 avait été contracté en premier. Dans l'ensemble, les résultats donnaient à penser que l'infection par les deux virus est répandue au cours de la petite enfance; l'infection par le HHV-6 survient au cours des 2 premières années de la vie alors que

Figure 6

Pourcentage des enfants ayant des anticorps de faible avidité spécifiques du HHV-6 (barres noires) et du HHV-7 (barres grises)

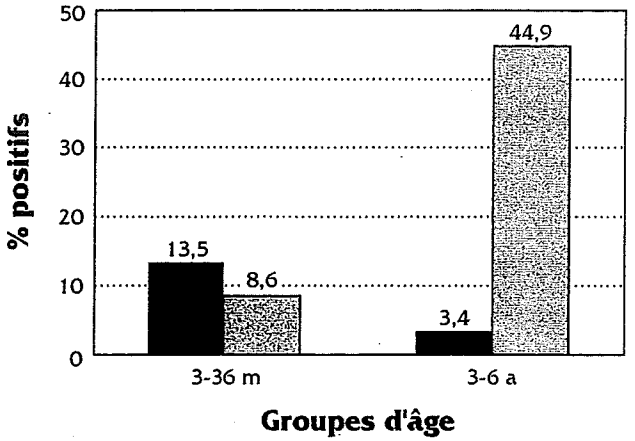
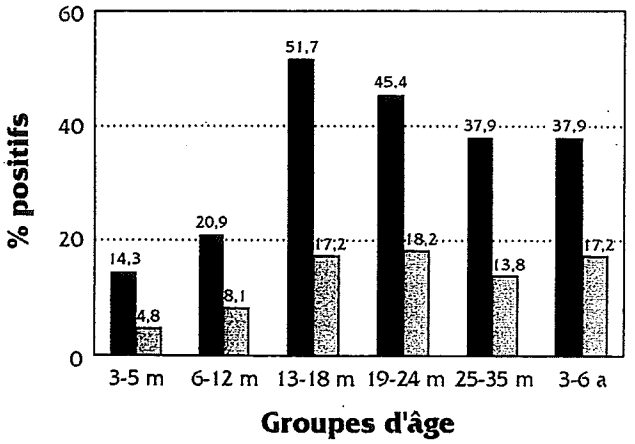


Figure 7

Séquence temporelle des infections par HHV-6 et HHV-7 chez les enfants (barres noires : infection par le HHV-6 a précédé celle par le HHV-7; barres grises : infection par le HHV-7 a précédé celle par le HHV-6)



la primo-infection par le HHV-7 se produit plus tard, soit entre les âges de 3 et 6 ans.

Certaines études en cours, réalisées en collaboration avec le Dr Steve Jacobson aux National Institutes of Health (NIH), portent sur l'usage de la technique ELISA pour détecter les anticorps de types IgM et IgG contre l'antigène précoce p41-38 du HHV-6 chez des patients atteints de sclérose en plaques (SEP). On purifie l'antigène à partir du lysat de cellules infectées sur des colonnes d'affinité préparées avec des anticorps monoclonaux spécifiques. On n'a noté aucune différence dans la réponse en IgG entre les patients et les sujets témoins normaux (des patients atteints d'autres troubles neurologiques ou de maladies inflammatoires et des sujets bien portants), mais il y avait cependant une différence très significative dans le taux d'IgM, en particulier chez les sujets présentant une forme rémittente-progressive de SEP. On espère pouvoir élargir cette recherche.

● Le HHV-6 et la sclérose en plaques

Steven Jacobson

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie démyélinisante qui frappe les jeunes adultes (la prévalence est d'environ 250 000 à 300 000 aux États-Unis). Les deux principales formes de la maladie sont la forme rémittente-progressive et la forme continue-progressive. Des facteurs immunologiques, génétiques et environnementaux ont été mis en cause dans l'étiologie de la maladie. Au cours des 50 dernières années, de nombreux virus ont été liés à la SEP, mais encore aujourd'hui, il n'a pas été établi clairement quels virus, si tant est qu'il y en ait, jouent effectivement un rôle dans la maladie. En, 1995, Challoner *et al*[6] ont utilisé une analyse différentielle représentationnelle sur des tissus cérébraux de sujets atteints de SEP et ont trouvé une séquence d'ADN qui correspondait au HHV-6. Des études subséquentes faisant appel à des anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine 101K du HHV-6 ont permis de voir une coloration surtout dans les oligodendrocytes (les sites qui sont à l'origine de la formation de la myéline) des cerveaux atteints de SEP mais non dans les échantillons témoins.

Plus récemment, à la Viral Immunology Section des NIH, les chercheurs ont utilisé la technique ELISA pour détecter des anticorps de types IgG et IgM dirigés contre l'antigène précoce p41-38 du HHV-6 dans environ 130 échantillons provenant de plusieurs groupes : des patients atteints de la forme rémittente-progressive de SEP ainsi que de la forme continue-progressive de la maladie, des patients présentant d'autres maladies inflammatoires, des patients atteints de troubles neurologiques et des sujets bien portants. Ils n'ont noté aucune différence dans la réponse en IgG, mais une réponse beaucoup plus marquée en IgM a été observée chez les patients atteints de SEP. Ils n'ont relevé aucune différence parmi les groupes dans la réponse en IgM aux virus EBV et CMV. Des études réalisées dans d'autres centres qui ont utilisé cette technique viennent corroborer les résultats selon lesquels il se produit une élévation des IgM contre le HHV-6 chez environ 18 % des sujets normaux et entre 70 % et 80 % des patients atteints de SEP. Une recension des études qui utilisaient diverses techniques de dosage auprès de différentes populations de patients atteints de SEP dans le monde entier a mis en lumière des résultats assez semblables faisant état d'une élévation des titres d'IgM dans le sérum ou le LCR.

Outre les preuves sérologiques, les techniques de PCR viennent étayer la théorie en démontrant la présence d'ADN du HHV-6 chez les patients atteints de SEP. On a utilisé une PCR nichée pour déceler la présence d'ADN dans du matériel acellulaire dans le sérum de patients atteints de SEP et de groupes témoins. Au cours de la première phase, habituellement il n'y a rien de décelable, mais les différences sont mises en évidence avec la PCR nichée. Ces études sont toujours en cours, mais de façon générale, on peut détecter l'ADN du HHV-6 chez environ 25 % à 33 % des patients atteints de SEP mais chez aucun des groupes témoins. Sur les sept études semblables recensées dans la littérature qui utilisaient des techniques différentes (ayant des sensibilités différentes), quatre viennent étayer la présence du HHV-6 dans du matériel acellulaire, soit le sérum ou le LCR, de patients atteints de SEP.

Avec l'évolution des connaissances, on en vient à s'interroger sur le lien qui existe entre la présence du HHV-6 et l'activité clinique chez les patients atteints de SEP. Une avenue de recherche fructueuse a consisté à observer si le HHV-6 est associé à la présence de lésions prenant le gadolinium, celles-ci

étant un signe cardinal de la SEP. Ces lésions peuvent être détectées par résonnance magnétique (IRM) et évoluent de façon cyclique. L'observation des résultats des examens par IRM réalisés sur plusieurs mois et la recherche périodique par PCR du HHV-6 dans le sérum au cours de la même période (échantillons codés et chercheurs aveugles quant aux résultats) a mis en évidence une réduction du nombre de lésions avec la mise en route d'un traitement à base d'interféron bêta et l'absence d'ADN du HHV-6. Chez les patients qui connaissent une nouvelle poussée évolutive, les lésions commencent à réapparaître et le virus est alors de nouveau détectable. Ces résultats préliminaires ont permis de mener une étude prospective sur une période de 5 mois auprès de 67 patients atteints de SEP afin de suivre les poussées évolutives et les rémissions de la maladie et de les corréler à la présence du HHV-6 détecté par PCR. Chez les 59 patients pour qui on disposait de résultats, 10 ont connu une exacerbation et le virus était détectable chez 5 d'entre eux; pour ce qui est des 49 patients en rémission, le HHV-6 n'a été trouvé que chez 9 d'entre eux. Utilisons maintenant le nombre d'échantillons plutôt que le nombre de patients. Sur les 11 échantillons de patients qui connaissaient une poussée évolutive, 5 contenaient le HHV-6 tandis que le virus n'a été détecté que dans 11 des 214 provenant de patients en rémission. Le suivi des poussées évolutives de 2 patients (dont l'un présentait des lésions prenant le gadolinium et l'autre non) sur des périodes plus longues (18 mois et 23 mois) a révélé l'existence d'associations semblables.

En ce qui concerne la variante particulière du HHV-6 qui pourrait être à l'origine de la SEP, celle-ci a été étudiée dans une étude d'assez grande envergure destinée à déceler au moyen de la PCR nichée la présence de l'ADN du HHV-6 dans le sérum, l'urine, la salive et les lymphocytes du sang périphérique (LSP) de patients atteints de SEP et de sujets témoins indemnes. Les chercheurs ont utilisé deux jeux différents d'amorces, le premier pour la région de protéine majeure de la capside (MCP) et l'autre pour la région de la protéine majeure du tégument (LTP); ce dernier, même s'il était moins sensible que le jeux d'amorces MCP a permis de réaliser la cartographie des enzymes de restriction pour distinguer le HHV-6A du HHV-6B. Chez des sujets témoins indemnes, le HHV-6 n'a été décelé ni dans le sérum ni dans l'urine avec les deux jeux d'amorces, mais il a été trouvé dans 88 % et 75 % des échantillons de salive et de LSP, respectivement. Chez les sujets atteints de SEP, les résultats étaient comparables pour les échantillons de salive et de LSP; cependant, le HHV-6 a pu être décelé dans le sérum de 23 % des patients atteints de SEP et dans 26 % des échantillons d'urine. Chez les cinq patients porteurs du HHV-6 dont les échantillons de sérum ont pu être typés, quatre montraient des signes du HHV-6A, et dans les quatre échantillons d'urine qui ont pu aussi être typés, trois contenaient le HHV-6A. Dans l'ensemble, on n'a pu détecter le HHV-6A dans aucun des échantillons de salive ou de LSP.

Du point de vue immunologique, les réponses des LSP aux HHV-6 et 7 chez des patients atteints de SEP et des sujets indemnes ont été étudiées au moyen de techniques plus anciennes faisant appel à des lysats de lymphocytes T infectés qui sont utilisés comme antigènes dans une étude de la réponse lymphoproliférative. On n'a observé aucune différence entre les patients atteints de SEP et les sujets indemnes pour ce qui est de leur réponse lymphoproliférative au lysat du HHV-6B ou du HHV-7, mais il y avait cependant une différence dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire au HHV-6A, celle-ci étant plus marquée chez les sujets atteints de SEP. Une analyse de la fréquence des précurseurs a mis en évidence une réponse au HHV-6A de 1 sur 20 000 lymphocytes périphériques chez les sujets indemnes comparativement à 1 sur 2 000 chez les patients atteints de SEP.

On a procédé à la détection au moyen de techniques immuno-histochimiques du HHV-6 dans le cerveau des personnes atteintes de SEP et l'on a corrélé les résultats avec les caractéristiques radiologiques des lésions de SEP, par exemple, si la lésion est active ou chronique. Dans la substance blanche normale et dans des tissus du SNC de sujets témoins, on ne pouvait observer aucun signe histologique du HHV-6, alors que la coloration pour la gp116 était nette dans les zones de démyélinisation des tissus de sujets atteints de SEP. Une activité accrue du HHV-6 était évidente dans les lésions actives. Du point de vue morphologique, les cellules atteintes étaient semblables aux oligodendrocytes, mais il y avait aussi une coloration pour la GFAP (glial fibrillary acidic protein), un marqueur des astrocytes. On espère amplifier les cellules des tissus cérébraux et quantifier le HHV-6 dans les régions contenant des plaques de sclérose et celles qui en sont exemptes.

De façon générale, il y a de bonnes raisons de croire que le HHV-6 joue un rôle quelconque dans la SEP, bien qu'il puisse s'agir d'un épiphénomène si un autre facteur intervient dans la pathogenèse et réactive le virus. Il est possible que le HHV-6 soit un des déclencheurs de la maladie, car chez certaines personnes la réponse immunitaire au virus consiste à générer des cellules spécifiques de l'antigène qui agissent en sécrétant des chimiokines et des cytokines, lesquelles interviennent dans la destruction des oligodendrocytes. Dans une étude récente[7], les chercheurs ont indiqué que CD46 est le récepteur cellulaire du HHV-6. CD46 est une protéine membranaire qui fait partie de la famille des régulateurs du complément. Elle est exprimée dans toutes les cellules nucléées et est présente dans le plasma, les larmes et le liquide séminal. CD46 est également le récepteur du virus de la rougeole. Ces découvertes nous portent à nous demander si la SEP n'est pas une affection dans laquelle interviendrait un récepteur viral commun plutôt qu'une maladie causée par un virus particulier. L'hypothèse du récepteur commun repose sur les arguments suivants :

- Un certain nombre de virus ont été associés à la SEP de même qu'à d'autres maladies auto-immunes et atteintes du SNC.
- Personne n'a réussi à démontrer qu'un virus particulier est l'agent responsable de l'une ou l'autre de ces maladies.
- Hypothèse : de nombreux virus utilisent un récepteur commun (ou une famille de récepteurs) dont l'expression/la régulation/la fonction sont modifiées dans la maladie.

La poursuite des travaux sur le virus et son récepteur dans les tissus du SNC pourrait jeter de la lumière sur cette nouvelle hypothèse.

La recherche au Canada

Le HHV-6 dans la transplantation rénale

Philip Acott et Spencer Lee

Les méfaits du CMV et du EBV chez les transplantés rénaux est bien établi, que ce soit au niveau du rejet du greffon ou de la maladie post-greffe. De plus, les herpèsvirus peuvent causer certains types de néphrites interstitielles, comme la glomérulonéphrite proliférative mésangiale. En 1993, on a décidé de procéder à une enquête sérologique prospective auprès d'enfants greffés, dialysés ou atteints de néphrite rapidement évolutive avec insuffisance rénale. Des épreuves sérologiques ont été effectuées à intervalles de 6 mois et en présence d'une détérioration de l'état clinique. La réactivation était définie comme la réapparition des IgM chez un sujet ayant déjà obtenu un résultat IgM négatif documenté.

Des exemples des types de patients chez qui l'on a observé une réactivation du HHV-6 englobent trois enfants atteints de néphrite interstitielle qui ne présentaient que des symptômes bénins (nombre de plaquettes abaissé, fébricule, légère élévation des résultats des épreuves fonctionnelles hépatiques) : deux enfants atteints de myocardite virale confirmée – un pendant le traitement d'une néphrite aiguë et l'autre après une transplantation rénale – et trois enfants atteints de néphrite rapidement évolutive (dont deux avaient le lupus) qui recevaient de fortes doses de stéroïdes et de chimiothérapie cytotoxique, et avaient une éruption cutanée évocatrice de la roséole, une forte fièvre, des symptômes respiratoires et des résultats élevés aux épreuves fonctionnelles hépatiques en plus d'être IgM+ pour le HHV-6.

Avec le temps, il a été possible de mettre en évidence une réactivation des IgM contre le HHV-6 chez plus de 50 % des dialysés de longue date et des greffés rénaux suivis sur une longue période. Chez les enfants dialysés, la réactivation coïncidait avec une période de fatigue et de difficultés scolaires; du point de vue clinique, ces enfants présentaient une fébricule, une légère perturbation de la fonction hépatique et une thrombopénie (à un certain moment, on considérait que celle-ci était induite par l'héparine). Dans le groupe des greffés, la plupart des réactivations sont survenues peu de temps après la greffe et ont été assez longues (durée médiane 123 jours, intervalle de 18 à 1 075). Les trois enfants infectés *de novo* (aucune immunité antérieure) avaient des IgM dans les 100 jours qui suivaient la greffe. Les données semblent indiquer que plus la réactivation survient rapidement après la greffe plus la probabilité de rejet est élevée.

Dans une comparaison des types de thérapies d'induction d'anticorps chez des greffés, les chercheurs ont noté que dans le groupe recevant des préparations d'ARG/ALG (cheval/lapin) polyclonale (de 1993 à 1997) il y avait plus de cas de fièvre, d'élévation des enzymes hépatiques et de thrombopénie que dans le groupe recevant des anticorps monoclonaux humanisés IL-2 (1997-1999). En outre, la réactivation du HHV-6 est survenue chez 22 des 27 patients (81 %) du premier groupe alors qu'elle ne s'est produite que chez 5 des 15 patients (33 %) recevant des anticorps humanisés (tableau 2).

Tableau 2
Profil viral et rejets de greffes rénales

	Basiliximab (1997-1999)	ATG/ALG (1993-1997)
Rejet total	8/15	17/27
Infection due au EBV	3	14
a. Réactivation	1	9
b. *de novo*	2	5
Infection due au HHV-6	5/15	22/27
a. Réactivation	5	21
b. *de novo*	0	1
Rejet attribué à un virus (1re année)	2	13
a. HHV-6	0	9
b. EBV	2	4
HHV-6 sans rejet selon la biopsie	4	7
HHV-6 sans détérioration rénale	1	6

Plusieurs questions de recherche se posent chez ces enfants :

- Le HHV-6 est-il présent dans le rein avant la transplantation? La PCR liquide ou *in situ* ou l'immunofluorescence pour l'expression de l'antigène sur des tissus provenant d'un donneur séropositif pour le HHV-6 indiquerait si le rein du donneur abrite et peut transmettre le virus à l'hôte non infecté par ce virus.
- Est-il possible de détecter la réplication virale active dans le rein en voie de rejet, en particulier chez les enfants pour qui l'on possède des preuves sérologiques d'une infection par le HHV-6? La culture du virus, la PCR et des méthodes de détection de l'antigène aideraient à répondre à cette question.
- Les cellules lymphoïdes présentes dans le rein en voie de rejet sont-elles différentes lorsque le rejet est associé à un virus? L'expression de marqueurs de cellules lymphoïdes pourrait clarifier le rôle des cellules immunitaires dans le rejet d'un greffon rénal.

Les techniques de laboratoire utilisées pour la recherche englobent maintenant la culture, l'IFA et la PCR. Pour la culture, des cellules mononucléées du sang de cordon ou du sang périphérique sont stimulées pendant 2 jours avec de la phytohémagglutinine puis cultivées pendant jusqu'à 3 semaines en présence d'IL-2. On contrôle la croissance du virus afin de déceler un effet cytopathique syncytial et des antigènes viraux, lesquels peuvent être détectés par IFA et par des AcM. Les résultats obtenus par cette méthode de culture virale servent de témoins positifs dans l'évaluation de l'IFA et de la PCR. L'AcM HAR-4 reconnaît la protéine gp60-110 de l'enveloppe virale et a été utilisé pour détecter la présence de l'antigène viral HHV-6 dans des cellules de l'épithélium tubulaire de reins en voie de rejet. Le BO145 cible l'antigène p41 du HHV-6 et entraîne une coloration nucléaire dense. D'autres AcM englobent le BO150 (gp82) et le BO151 (gp102). Pour ce qui est de la PCR, on a utilisé des amorces oligonucléotidiques commerciales de Maxim Biotech. Il pourrait être nécessaire d'avoir recours au dot blot pour l'interprétation des profils d'amplification. Les travaux ont débuté en vue de la mise au point d'une technique de PCR *in situ* pour les frottis de cellules infectées ou non par le HHV-6 ou les pièces de biopsie incluses dans de la paraffine.

● Virémie plasmatique du HHV-6, du HHV-7 et du CMV chez les greffés médullaires

Francisco Diaz-Mitoma

Des résultats positifs de la PCR pour le HHV-6 obtenus au Laboratoire régional de virologie d'Ottawa ont été observés en association avec des cas d'hépatite, de méningoencéphalite, d'éruption cutanée sévère et d'échec de greffe chez des greffés médullaires. Le CMV représente l'une des principales causes de complications dans ce groupe de patients et a été mis en cause dans des cas d'échec de greffe, de pneumonite, d'éruption cutanée, de fièvre et d'ulcère. Une étude de laboratoire rétrospective a été menée auprès d'un sous-groupe de greffés médullaires dans le but d'évaluer les conséquences cliniques de la virémie plasmatique dans ce groupe.

Une épreuve diagnostique efficace et le résultat qu'elle fournit jouent un rôle dans la décision d'administrer ou non une chimiothérapie antivirale potentiellement toxique et, dans l'affirmative, dans le choix de l'agent. La méthode de laboratoire employée dans la présente étude était la PCR pour

la détection du HHV-6, du HHV-7 et du CMV dans le plasma, étant donné qu'un tel résultat est accepté comme preuve d'une réplication virale active. Des échantillons de sang ont été recueillis dans de l'EDTA toutes les 1 à 3 semaines et le plasma a été séparé des cellules; on a examiné les dossiers des patients toutes les 2 à 3 semaines pour la présence de manifestations cliniques de la virémie. Sur une période de 2 ans, on a terminé l'analyse sur 34 greffés médullaires qui ont été suivis pour une période médiane de 5 mois; six patients sont décédés au cours de la période de 2 ans. Le nombre total d'échantillons analysés se chiffrait à 170.

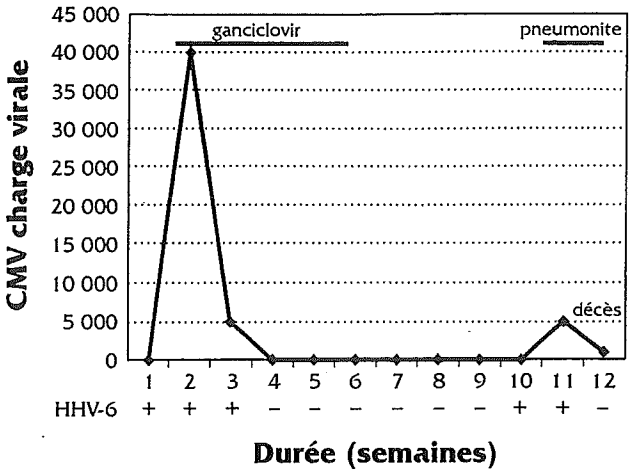
Au laboratoire, on a centrifugé 1 mL de plasma à 17 000 tr/min pendant 1 heure pour obtenir un culot viral (si le virus était présent). On a extrait l'ADN au moyen du TRI-reagent et l'on a ensuite dissous le culot d'ADN dans 25 µL d'eau distillée, prêt à être soumis à la PCR. Les méthodes de PCR utilisées était la trousse PCR HHV-6 fabriquée par Digene Diagnostics Inc., la CMV Amplicor PCR Assay de Roche Diagnostics et une technique maison de PCR nichée pour la détection du HHV-7.

Sur les 34 greffés médullaires, 15 (44 %) étaient positifs pour le CMV et avaient des symptômes d'infection, comme de la fièvre, une pneumonite et des troubles gastro-intestinaux. Sept des 34 patients (26 %) étaient positifs pour le HHV-6 et 5 patients (15 %) étaient positifs pour le HHV-7. (Cette forte proportion de positivité comparativement aux résultats décrits par le Dr Allen [voir page 19] pourrait être attribuable au moins en partie à l'approche plutôt prudente adoptée à Ottawa en matière de thérapie antivirale pré-greffe ainsi qu'à des différences dans les protocoles de laboratoire.) Cinq des 34 patients étaient porteurs à la fois du HHV-6 et du CMV, et chez deux de ces patients l'infection par le HHV-6 avait précédé l'infection par le CMV. De ces cinq patients, deux souffraient de pneumonite (les deux sont décédés) et trois avaient une fièvre, une pancytopénie et une éruption. Ceux-ci ont répondu à un traitement aux immunoglobulines et au ganciclovir.

La figure 8 montre le profil viral et le traitement administré à un patient infecté à la fois par le HHV-6 et le CMV. (Le CMV est mesuré quantitativement par la détermination de la charge virale dans le plasma virale tandis que la mesure du HHV-6 est qualitative). Environ 5 semaines après la fin du

Figure 8

Traitement et profil viral d'un patient co-infecté par le HHV-6 et le CMV (la charge virale du CMV est indiquée par le graphique linéaire)



traitement au ganciclovir, on a assisté à une réactivation du HHV-6 ainsi que du CMV, et le patient est décédé d'une pneumonie et d'une bactériémie, deux complications d'une pneumonite. Sur les cinq patients porteurs d'une infection par le HHV-7, quatre étaient symptomatiques (fièvre, manifestations respiratoires) et un patient infecté à la fois par le HHV-7 et le CMV a souffert de violents maux de tête et d'une pancytopénie.

Pour conclure, on a observé les caractéristiques cliniques et virologiques suivantes :

- 70 % des patients étaient ou sont devenus symptomatiques quand la virémie plasmatique s'est révélée positive pour le CMV, le HHV-6 ou le HHV-7.
- Les résultats des épreuves ont permis de décider si un patient avait besoin d'un traitement antiviral.
- Des résultats négatifs peuvent permettre d'éviter d'administrer des thérapies potentiellement toxiques.
- Les patients qui sont décédés avaient une virémie CMV.
- Deux patients avaient à la fois une virémie CMV et HHV-6 lors de leur décès (pneumonite).
- On a découvert le HHV-6 dans le LCR d'un patient (encéphalopathie).
- On a identifié le HHV-6 dans des lésions cutanées de trois patients.

D'autres données glanées dans la littérature englobent : une association entre la présence d'ADN du HHV-6 (détecté par PCR dans le LCR) et un état de confusion, de somnolence et de coma post-greffe chez un groupe de 5 patients sur 11; le HHV-6A et le HHV-6B supprimaient de façon tout aussi efficace la formation de colonies hématopoïétiques chez des greffés médullaires alors que le HHV-7 n'avait pas d'effet semblable; la présence d'ADN du HHV-7 était associée à une prolongation marquée du temps de prise de greffe des neutrophiles chez les greffés médullaires, et l'ADN du HHV-6 et du HHV-7 a été décelé chez 2 patients pour qui la greffe a été un échec.

● Diagnostic et traitement des infections dues au HHV-6 chez les greffés médullaires à Toronto

Upton Allen

Cette étude avait pour but d'évaluer l'utilité de la PCR sur plasma pour la surveillance de l'infection par le HHV-6 humain chez des enfants greffés médullaires. L'étude prospective était non interventionnelle et comptait un groupe de sujets étudiés et un groupe de sujets témoins.

On a d'abord évalué les greffés médullaires et les sujets témoins en bonne santé. Dans le cas des greffés médullaires, on a effectué la PCR pour le HHV-6 toutes les 2 semaines pendant 12 semaines après la greffe alors qu'une seule PCR a été effectuée dans le cas des sujets témoins. On a recueilli du sang EDTA pour la PCR et extrait l'ADN du sang total et du plasma acellulaire au moyen des techniques standard. La PCR a d'abord été effectuée sur l'ADN du sang total, et si le résultat était positif, on répétait le test avec l'ADN du plasma. La détection du HHV-6 par PCR a été réalisée à l'aide d'une paire d'amorces qui permettait la détection du HHV-6, du HHV-7 et du VZV. On a déterminé l'espèce du virus par les profils de restriction obtenus à partir de l'amplicon avec les enzymes BamHI (Life Technologies) et BstUI (New England Biolabs). Les profils de restriction ont également permis d'établir si le HHV-6 détecté était la variante A ou B. La sensibilité de la technique PCR a été estimée à 1-10 copies génomiques (Dr Raymond Tellier, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario). La sérologie du HHV-6 a été effectuée au moyen d'une technique ELISA.

Trente greffés médullaires ont été recrutés, 13 autologues et 17 allogènes et, au total, 156 épreuves PCR ont été effectuées; six sur des échantillons provenant d'autant de sujets témoins en bonne santé. L'âge médian des greffés médullaires était de 6,2 ans (intervalle 0,5 à 17,5 ans) et celui des témoins, de 6,6 ans (intervalle 2 à 10 ans). Soixante pour cent avaient reçu une prophylaxie au ganciclovir tandis que 33 % (10/30) avaient reçu de l'acyclovir durant la période post-greffe. Quatre-vingt-sept pour cent (26/30) des greffés médullaires étaient séropositifs pour le HHV-6 avant la greffe. Parmi les greffés asymptomatiques surveillés par PCR, le taux de positivité était de 3,3 % (1/30) sur le sang total et de 0 % (0/30) sur le plasma. Aucun des six sujets en bonne santé n'a eu un résultat positif à la PCR, que ce soit sur le sang ou le plasma.

Pendant la durée de l'étude de surveillance, on a eu recours à la PCR pour le HHV-6 sur le plasma pour aider à l'évaluation diagnostique de 14 patients non inclus dans l'étude. Une maladie due au HHV-6 a été diagnostiquée chez 2 patients. En l'absence d'autres explications pour la maladie de ces patients, le HHV-6 a été considéré comme la cause la plus vraisemblable étant donné les fait suivants. On a observé un cas d'échec de la greffe qui a été attribué au HHV-6 et une réaction du greffon contre l'hôte, une aplasie médullaire, une encéphalite et une éruption vésiculeuse généralisée. Chez les deux patients, on a décelé le HHV-6B par PCR sur le sang, le patient qui a eu un échec de greffe a également obtenu un résultat positif au test sur le plasma. Chez l'autre patient, le HHV-6B a été décelé par PCR dans le LCR en présence d'une affection encéphalitique. Chez ce dernier, le HHV-6B a été détecté par PCR sur des pièces de biopsie du côlon réalisées dans le but de diagnostiquer une colite éventuelle. L'ADN du HHV-6 a été détecté dans le liquide vésiculaire d'une lésion cutanée, mais celui-ci était négatif pour le VZV par microscopie électronique et PCR. On a supposé que la découverte d'ADN du HHV-6 dans cet échantillon était imputable à la présence de traces de sang dans l'échantillon.

Pour terminer, bien qu'on sache que les taux de séropositivité pour le HHV-6 sont élevés chez les enfants, la fréquence de la positivité du plasma pour le HHV-6 par PCR est basse dans cette population

d'enfants greffés médullaires. Un résultat positif pour le plasma évoque la présence d'une infection active. Cela augmente l'utilité du test comme outil diagnostique pour l'évaluation des syndromes présumés attribuables au HHV-6 chez les enfants greffés médullaires. Bien que l'étude n'ait pas porté sur le traitement, il importe de noter que d'autres études ont révélé que certaines souches du HHV-6 sont résistantes au ganciclovir. Aussi, le foscarnet représenterait-il peut-être le traitement de choix lorsqu'on ne connaît pas la variante. Dans d'autres situations, comme la nôtre, lorsqu'on sait que la variante est le HHV-6B, on peut utiliser l'un ou l'autre de ces antiviraux. Toutefois, le foscarnet est l'agent thérapeutique de choix pour prévenir l'échec de la greffe.

Le HHV-6 chez les patients dépourvus d'anticorps hétérophiles qui ont des lymphocytes atypiques et/ou une lymphocytose

Patrick Doyle

La plupart des cas de mononucléose infectieuse (MI) sont porteurs d'anticorps hétérophiles. En général, ceux qui sont dépourvus de ces anticorps ont des lymphocytes atypiques et le diagnostic différentiel englobe alors une infection par l'EBV, le CMV, la toxoplasmose, le VIH, l'hépatite virale, la rubéole, le HHV-6, les oreillons et un streptocoque du groupe A. Une étude prospective en laboratoire a été menée de 1995 à 1996 pour déterminer quelle proportion d'un échantillon de patients dépourvus d'anticorps hétérophiles mais ayant des lymphocytes atypiques et/ou une lymphocytose souffraient d'une infection aiguë par le HHV-6 ou avaient contracté cette infection dans le passé.

La plupart des 60 échantillons analysés ont été obtenus lors de demandes de test mono spot soumises par des médecins, et quelques-uns (4/70) des échantillons inclus contenaient des lymphocytes atypiques au Stack-S (STK-S : un analyseur utilisé en hématologie). La lymphocytose a été définie comme un nombre de lymphocytes > 4 x 10^9/L et les lymphocytes atypiques ont été définis selon les critères du STK-S. Les objectifs secondaires consistaient à étudier l'association entre les variables explicatives et l'infection par le HHV-6 au moyen d'une analyse de régression logistique et à déterminer la séroprévalence d'autres virus (EBV, CMV, VIH).

L'IFA a été utilisée comme épreuve diagnostique. On a supposé que la positivité pour les IgM représentait une infection aiguë alors que les résultats équivoques ont été considérés comme négatifs. Puis on a procédé à la recherche d'IgG pour déterminer les infections antérieures. Voici quelques difficultés inhérentes aux épreuves sérologiques sur lesquelles il faudrait se pencher :

- L'EBV (par exemple) peut induire une activation non spécifique des lymphocytes B, ce qui donne lieu à une réponse polyclonale et à une élévation des anticorps contre d'autres agents.
- Une autre infection virale peut provoquer la réactivation d'un virus latent et des élévations des titres d'anticorps.
- La réactivité croisée (spécifique ou non) peut donner lieu à des faux positifs ou des erreurs.

L'âge moyen des patients était de 21,3 ans (médiane 10, intervalle 1 à 71) et 30 étaient de sexe masculin. Les résultats pour le HHV-6 sont fondés sur 65 échantillons en raison de la contamination de 5 des 70 échantillons. Sur ces 65, 16 (25 %) étaient IgM positifs pour le HHV-6 ce qui indique une infection aiguë; 4 de ces 16 étaient positifs pour le HHV-6 seulement, 8 étaient positifs pour le HHV-6 et le EBV, 7 étaient positifs pour le HHV-6 et le CMV et 1 était positif pour le HHV-6 et la toxoplasmose. Il n'y avait pas de données cliniques disponibles sur lesquelles on pouvait se fonder pour poser un diagnostic devant ce profil compliqué. Le tableau 3 présente la proportion des échantillons qui étaient positifs pour divers agents. Pour ce qui est des IgG, 56 sur 65 (86 %) étaient positifs, et 16/56 (29 %) étaient à la fois IgM et IgG positifs. Il n'y avait pas de cas IgM+ et IgG– pour le HHV-6.

Une analyse des lymphocytes atypiques de type Downey a révélé l'existence d'une association entre le CMV et le type 1 de Downey, le EBV et le type II de Downey et le HHV-6 et le type III de Downey. La corrélation entre le HHV-6 et le type III de Downey dans le groupe testé pour tous les virus (n = 65) était significative (p = 0,013), et il en était de même dans le groupe n'ayant pas obtenu de résultat positif pour plus d'un virus (n = 45) (p = 0,039).

Tableau 3

Proportion des patients (dépourvus d'anticorps hétérophiles qui ont des lymphocytes atypiques et/ou une lymphocytose) atteints d'une infection aiguë

	Nombre (proportion)	Nombre (proportion)*
HHV-6 IgM (+)	16/65 (25 %)	4/45 (9 %)
EBV IgM (+)	28/70 (40 %)	9/45 (20 %)
CMV IgM (+)	27/70 (39 %)	10/45 (22 %)
Toxo IgM (+)	2/70 (3 %)	1/45 (2 %)
VIH-1	0/70	–

* à l'exclusion des résultats positifs pour des virus multiples

On a procédé à une régression logistique en vue de l'élaboration d'hypothèses et les variables incluses englobaient le type Downey, l'âge, le sexe et les paramètres STK-S. Dans le groupe $n = 65$, le type III de Downey était associé de façon significative à l'IgM du HHV-6 comme paramètre mesuré ($p = 0{,}0157$); dans le sous-groupe de $n = 45$, l'association avec le type Downey approchait le seuil de signification ($p = 0{,}0631$).

Voici les conclusions de l'étude :

- La proportion des patients porteurs d'IgM du HHV-6 ($n = 65$) s'établissait à 25 %.
- La proportion des patients porteurs d'IgM du HHV-6 chez qui seulement un (ou aucun) marqueur d'une infection virale était positif ($n = 45$) était de 9 %.
- La prévalence du HHV-6 résultant d'une infection actuelle ou passée se chiffrait à 86 %.
- La présence de cellules de type III de Downey était associée de façon significative à la présence d'IgM du HHV-6 dans un modèle de régression logistique générant des hypothèses.

● Le HHV-6 en pédiatrie

Eva Thomas

Il a été établi que le HHV-6 était l'agent causal de la roséole infantile. Nous décrirons une étude cas-témoins réalisée pour examiner l'hypothèse que l'infection aiguë par le HHV-6 survient plus souvent chez les enfants ayant des convulsions fébriles que chez les sujets témoins. Quatre-vingt-six enfants fébriles, qu'ils soient ou non sujets aux convulsions fébriles, ont été recrutés. Divers autres symptômes ont été observés, dont une otite moyenne, une diarrhée, une éruption cutanée et des infections des voies respiratoires supérieures et inférieures.

Pour ce qui est du neurotropisme du HHV-6, il est établi que cet agent a été trouvé dans le cerveau d'adultes et dans le liquide céphalorachidien d'enfants; il a également été lié à la sclérose en plaques (SEP). On sait qu'il peut croître dans les cellules gliales, les cellules de glioblastomes et dans les astrocytes foetaux humains. Aussi, le caractère neurotrope du HHV-6 a été évalué dans le cadre d'une étude cas-témoins portant sur l'infection par le HHV-6 chez les enfants présentant des convulsions fébriles. L'hypothèse était que la primo-infection par le HHV-6 est plus fréquente chez les enfants ayant des épisodes de convulsions fébriles que chez les sujets témoins.

Des enfants âgés entre 6 mois et 2 ans ont été recrutés dans l'étude entre novembre 1992 et mai 1995. Les critères d'inclusion étaient la survenue d'un premier ou d'un second épisode de convulsions fébriles, une température documentée supérieure à 38 °C, une fièvre d'une durée inférieure à 4 jours et le consentement du parent à une réévaluation clinique et au prélèvement d'échantillons pour analyse 2 semaines après l'évaluation initiale. Les sujets témoins avaient les mêmes critères d'inclusion, à l'exception des convulsions fébriles. Les patients et les témoins étaient exclus s'ils avaient reçu les vaccins DCT (diphtérie/coqueluche/tétanos) ou le vaccin Hib dans les 48 heures précédant la consultation ou le vaccin RRO (rougeole/rubéole/oreillons) au cours des 10 jours précédents, s'ils souffraient d'un déficit immunitaire sous-jacent, s'ils affichaient une pléocytose du LCR avec coloration de Gram ou une culture bactérienne positive ou enfin s'il y avait eu un épisode antérieur de convulsions afébriles ou des signes d'autres troubles neurologiques ou de retard de développement.

Les patients ont été examinés lors de leur visite à la salle d'urgence et de nouveau entre 10 et 20 jours plus tard par un résident en pédiatrie ou un pédiatre. Lors des deux consultations, on a prélevé des échantillons de sérum de phase aiguë, de sang hépariné, de salive, d'urine et de fèces. Les parents

Tableau 4

Données démographiques et cliniques dans une étude cas-témoins des infections dues au HHV-6 chez les enfants présentant une maladie fébrile

	Groupe avec convulsions fébriles *n* = 45	Groupe témoin *n* = 41
Âge moyen	15,9 ans	12,27 ans
Sexe	21F/24H	17F/24H
Otite	11	11
Voies respiratoires supérieures	15	21
Voies respiratoires inférieures	3	6
Infection des voies urinaires	4	5
Bactériémie	3	0
Diarrhée	10	10
Température moyenne	36,69 °C	39,55 °C
< 2 jours température élevée	100 %	76 %
Éruption cutanée	17	16
Antécédents familiaux de convulsions (fébriles/afébriles)	9/9	2/6

F = femmes, H = hommes

ont reçu un journal dans lequel on leur a demandé de consigner la température de l'enfant et toute éruption ou convulsion.

Les méthodes de diagnostic en laboratoire employées étaient la sérologie pour le HHV-6 par IFA et PCR. L'IFA a été réalisée à l'aide de cellules HSB-2 infectées avec la souche U1102 et un substitut de sérum plutôt que du sérum de foetus de veau. On a utilisé une PRC nichée qui détecte environ 10 copies. Les critères pour la primo-infection étaient un titre d'IgM contre le HHV-6 supérieur à 1:40 dans un échantillon ou les deux, la multiplication par quatre du titre des IgG pour le HHV-6 ou la séroconversion à un titre d'IgG supérieur à 1:40, ou la séronégativité des deux échantillons mais un résultat positif de la PCR sur la salive et/ou les PBMC. Les critères pour une infection passée étaient la découverte de la négativité pour les IgM et de la positivité pour les IgG dans le premier échantillon ou une élévation inférieure à 4X du titre des IgG dans le deuxième échantillon de sérum. Les critères de laboratoire pour l'absence d'infection par le HHV-6 étaient la négativité pour les IgM et les IgG dans les premier et second échantillons de sang et un résultat négatif de la PCR sur des échantillons de salive et de PBMC.

Tableau 5

Infection par le HHV-6 déterminée par sérologie seulement ou par sérologie et PCR

Infection	Sérologie seulement	Sérologie et salive PCR (+)
Primo-infection	19	30
Infection passée	21	21
Non HHV-6	28	17

Il a été possible de déterminer le statut à l'égard du HHV-6 pour 68 des 86 patients (35 qui avaient des convulsions fébriles et 33 sujets témoins). Le tableau 4 présente les données démographiques et cliniques sur les patients inscrits. Les patients étaient plus nombreux que les sujets témoins à avoir des antécédents familiaux de convulsions. Le tableau 5 montre que le recours à la PCR en plus des techniques sérologiques a fait augmenter de 19 à 30 le nombre d'infections par le HHV-6 détectées. L'incidence de l'infection par le HHV-6 était comparable chez les patients qui avaient des convulsions fébriles et chez les groupes témoins de même âge (tableau 6). Par conséquent, le HHV-6 ne semble pas intervenir dans la pathogenèse de premiers et de deuxièmes épisodes de convulsions fébriles.

Tableau 6
Infection par le HHV-6 chez des patients ayant des crises convulsives et des patients témoins

Groupe	*n*	Aiguë	Passée	Non HHV-6
Patients avec convulsions	35	15	13	7
Patients témoins	35	15	8	10

Essai multiplex pour la détection semi-quantitative et la distinction des bêta-herpèsvirus humains : prévalence durant l'infection par le VIH et la sclérose en plaques

Beni M. Sahai

Les bêtaherpèsvirus humains (CMV ou HHV-5, HHV-6 et HHV-7) sont des virus ubiquitaires à croissance lente qui sont souvent contractés au cours de la petite enfance. La primo-infection par ces virus donne lieu à la production d'anticorps spécifiques contre le virus et à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques, réponses qui suppriment efficacement la virémie mais n'éliminent pas complètement le virus. Par la suite, ces virus persistent de façon latente dans les PBMC mais continueraient aussi à se répliquer dans certains compartiments de l'organisme, comme en témoigne leur détection occasionnelle à fréquente dans la salive et l'urine. Pareille persistance virale ne représente pas une menace pour la santé des sujets immunocompétents. Cependant, chez les personnes immunodéprimées et chez les nourrissons jamais exposés, ces virus peuvent causer des maladies graves et ont été mis en cause dans toute une variété de troubles neurologiques, immunitaires et malins.

Il est difficile d'établir que ces virus sont l'agent étiologique en raison de leur séroprévalence élevée, de la latence virale et du chevauchement des symptômes cliniques, notamment éruptions cutanées, encéphalite, rétinite et rejet de greffe de moelle osseuse ou d'organe. De plus, bien qu'il ne soit pas directement en cause, le HHV-7 intervient dans la réactivation du HHV-6 et peut donc être détecté durant des maladies causées par la réactivation du HHV-6 sans être l'agent étiologique véritable. Outre leur rôle dans la pathogenèse directe, le CMV et le HHV-6 peuvent transactiver le VIH et induire des molécules de surface (comme les récepteurs de CD4, C3b, Fc) qui peuvent médier l'entrée du VIH dans certaines cellules CD4. On a donc soupçonné que ces virus étaient des co-facteurs dans la pathogenèse du VIH.

Pour faciliter le diagnostic spécifique des virus en vue des études cliniques, épidémiologiques et de pathogenèse, nous avons mis au point un essai multiplex sensible et spécifique reposant sur la PCR pour la détection et la distinction semi-quantitative simultanée des bêtaherpèsvirus humains. Cet essai permet de détecter aussi peu que quatre copies du CMV ou du HHV-6 et 12 copies du HHV-7, et contrôle une région conservée de génome humain pour vérifier la qualité de la matrice. L'essai peut être appliqué à toute une gamme d'échantillons cliniques comme les PBMC, le sérum, le LCR, l'urine et la salive. Il peut être facilement automatisé et les résultats peuvent être des lectures colorométriques ou de flux.

Chez les personnes infectées par le VIH, on peut souvent observer la réplication du CMV ou du HHV-6 dans leurs PBMC, mais le rôle éventuel de ces virus dans la pathogenèse du VIH demeure inconnu. De plus, on ne sait pas si cette réplication virale est attribuable à la réplication de virions latents ou à une nouvelle infection résultant de l'immunodéficience. Récemment, le HHV-6 a également été mis en cause dans la pathogenèse de la sclérose en plaques (SEP), bien que l'association entre le virus et la maladie n'ait pas été sans équivoque, en partie en raison des différences dans les méthodes de détection du virus. Nous avons donc utilisé l'essai multiplex décrit ci-dessus pour déterminer la prévalence des bêtaherpesvirus humains chez les patients infectés par le VIH qui n'étaient pas traités ou qui recevaient une monothérapie ou une thérapie antivirale hautement active (HAART) et chez des patients atteints de SEP.

La présence des bêtaherpèsvirus humains dans 1 x 10^5 PBMC a été déterminée; les PBMC de sujets sains ont servi de témoins. Nos résultats indiquent

une prévalence variée mais faible du CMV (4 %), du HHV-6 (9 %) et du HHV-7 (7 %) chez les sujets témoins en bonne santé. En revanche, les personnes infectées par le VIH qui ne sont pas traitées ou qui recevaient une monothérapie antirétrovirale affichaient une prévalence beaucoup plus élevée de CMV (25 %, la plupart ayant une forme avancée de l'infection à VIH) et de HHV-6 (37 %) mais une prévalence modérée de HHV-7 (18 %) comparativement aux patients recevant une HAART. Une étude réalisée auprès des patients atteints de SEP n'a mis en lumière aucune association significative entre les bêtaherpèsvirus humains et l'incidence de SEP.

Études sur le HHV-6 au Laboratoire central du Ministère de la Santé de l'Ontario

Pauline George

Un certain nombre d'études sérologiques d'envergure restreinte du HHV-6 ont été réalisées au Laboratoire provincial de santé publique de l'Ontario entre 1994 et 2000. Toutes les études ont utilisé les résultats sérologiques pour le HHV-6 du Laboratoire d'exanthèmes viraux du LLCM comme valeurs de référence. La première étude réalisée en 1994 était une étude rétrospective de la prévalence du HHV-6 chez les enfants âgés de < 4 ans dont les échantillons avaient été soumis pour la recherche du EBV. La recherche du HHV-6 a été effectuée au moyen du dosage immunofluorescent des IgG Biotrin pour le HHV-6 et le conjugué IgM de Behring. Les chercheurs ont obtenu un taux de 68 % de positivité pour les IgG dans les sérums pris au hasard et 62 % et 100 % dans des sérums appariés et chez des patients greffés respectivement. Les résultats tendaient à confirmer l'infection par le HHV-6 et correspondaient à ceux qui ont été rapportés dans la littérature.

L'ELISA PanBio pour le HHV-6 a été évalué en 1996. Des échantillons ont été obtenus de 89 patients, et pour 86 de ces patients (96 %), on disposait de renseignements sur leur âge, leur sexe et leurs antécédents cliniques. La sensibilité et la spécificité du test étaient de 73,6 % et 57,0 % respectivement. Une analyse des données nous a porté à croire que les valeurs seuils pour le dosage PanBio avaient peut-être été fixées de façon trop prudente. Il faudrait procéder au dosage des IgM pour compléter celui des IgG.

En 1998, on a procédé à une évaluation de l'ELISA PanBio pour les IgM du HHV-6 et de l'IFA Biotrin pour les IgG. Des ELISA rétrospectifs pour les IgM ont été effectués sur 81 échantillons et l'IFA pour les IgG sur 37 échantillons. Les résultats de l'ELISA pour les IgM étaient : une sensibilité de 79,6 %, une spécificité de 75,0 %, une VPP de 86,0 % et une VPN de 60,7 %. Les résultats du dosage IFA des IgG Biotrin indiquaient une sensibilité de 73,9 %, une sensibilité de 92,8 %, une VPP de 94,4 % et une VPN de 68,4 %. Les séroconversions des IgG ont été détectées par Biotrin et le test de référence (tableau 7)

Un résumé des résultats réactifs pour les IgM et les IgG obtenus pour 77 sérums envoyés au laboratoire de référence pour la détection des HHV en 1999 est présenté au tableau 8. Les résultats indiquent qu'il devrait y avoir une réévaluation des valeurs seuils fixées par le laboratoire de référence.

Les tests réalisés pour la détection de multiples virus donnent souvent un ensemble de résultats divers que le médecin traitant doit interpréter à la

Tableau 7
Évaluation de 1998 de ELISA PanBio IgM HHV-6 et IFA Biotrin IgG : séroconversions HHV-6

Patient	Échantillon	Âge (ans)	LLCM EIA IgG	Biotrin IFA IgG	LLCM EIA IgM	PanBio ELISA IgM
A	1	3	–	–	–	–
	2		+	+	+	+
B	1	2	–	–	+ r = 0.27	+ r = 1.37
	2		+	+	+ r = 1	+ r = 1
C	1	27	+	+	–	+ r = 0.32
	2		+	+	+	+ r = 1

Tableau 8

Tableau récapitulatif des données IgM et IgG (n=77), 1999 (HHV-6 EIA du LLCM)

	IgG (+)	IgM (+)
Moyenne	1,084	0,26
Écart-type	0,59	0,22
Maximum	2,36	1,58
Minimum	0,16	0,11

lumière du tableau clinique du patient. Par exemple, un échantillon provenant d'un homme âgé de 37 ans était positif pour les IgM du HHV-6, du CMV et du EBV, mais le patient n'avait aucun symptôme apparent. Un échantillon provenant d'une personne de 42 ans était positif pour le HHV-6 et le EBV et indéterminé pour le VZV et le CMV. Des échantillons positifs pour le HHV-6 et le EBV ont été trouvés chez trois patients, dont un présentait une hépatosplénomégalie, un autre avait une fièvre et des céphalées et le troisième était greffé.

● Tests de détection du HHV-6 au Laboratoire provincial de santé publique du sud de l'Alberta

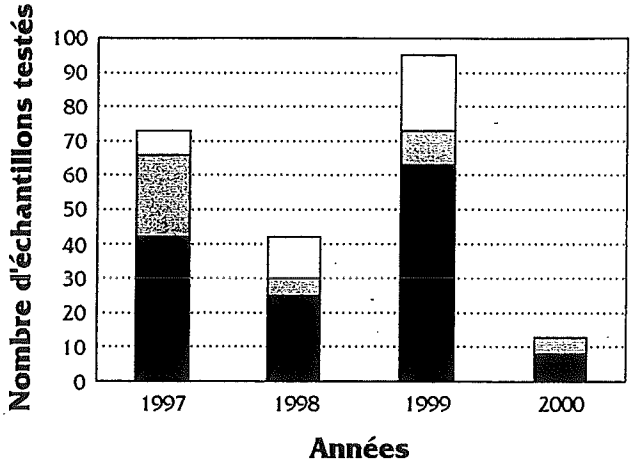
Kevin Fonseca

Nous décrirons ici les résultats des tests sérologiques pour le HHV-6 effectués sur des échantillons reçus par le Laboratoire provincial de santé publique du sud de l'Alberta entre 1997 et aujourd'hui. Dans 95 % des cas, ces tests ont été demandés par des médecins travaillant dans la communauté et 5 % des échantillons ont été envoyés pour évaluation par d'autres laboratoires accompagnés des antécédents cliniques (y compris une fièvre élevée et une éruption cutanée). Les échantillons ont été transmis au LLCM pour subir des épreuves ELISA pour la détection des IgG et des IgM du HHV-6.

Le nombre d'échantillons analysés pour le HHV-6 s'établissait à 66 en 1997, 30 en 1998, 73 en 1999 et 13 jusqu'ici en l'an 2000. La figure 9 montre la proportion d'échantillons qui se sont révélés IgM+ et IgG+ mais qui étaient négatifs lors du test initial.

Figure 9

Résultats de la sérologie pour le HHV-6*, 1997-2000



* barre blanches = échantillons IgM positifs, barres grises = IgG négatifs, barres noires = IgG positifs/indéterminés.

La phase aiguë de la maladie a été définie comme les 5 à 7 premiers jours suivant l'apparition des symptômes et la phase de convalescence comme débutant 10 jours ou plus après l'apparition des symptômes. On a demandé des échantillons prélevés au cours de la phase aiguë et 2 semaines plus tard afin de détecter les séroconversions.

En 1997, le nombre d'échantillons IgM+ s'établissait à 7 (4 hommes et 3 femmes), en 1998, il était de 12 (4 hommes et 8 femmes), et en 1999/2000, il atteignait 22 (10 hommes et 12 femmes) et un résultat était indéterminé. Une fois les cas IgM+ ventilés selon leur origine, on a pu constater que la plupart provenaient de la communauté (24/42 ou 57 %); 15 (36 %) étaient des greffés et trois cas étaient d'origine inconnue. L'analyse de la distribution des cas communautaires selon l'âge et le sexe a révélé que les sujets masculins et féminins étaient représentés également parmi les cas plus jeunes (de 0 à 2 ans et de 2 à 4 ans) alors que l'infection était observée surtout chez les sujets masculins entre les âges de 4 et 6 ans. Les cas âgés de > 8 ans semblaient asymptomatiques en ce sens que le tableau clinique n'englobait pas l'éruption cutanée et la fièvre élevée observées chez les sujets plus jeunes; dans ce groupe d'âge, tous les cas étaient de sexe féminin.

Le groupe des greffés était mélangé. La majorité des cas IgM positifs a été retrouvée parmi les greffés rénaux (11 cas, 6 hommes et 5 femmes). Pour

ce qui est des quatre cas restants, une jeune fille de 15 ans est décédée après une greffe de moelle osseuse, un homme de 44 ans a reçu un diagnostic de sclérose en plaques, une jeune femme de 18 ans a été atteinte de leucémie lymphoblastique aiguë, et une autre jeune fille de 15 ans a souffert d'une tumeur de Wilms.

Chez de nombreux greffés, l'infection par le HHV-6 représentait une réactivation d'une infection ancienne. Quand on a testé les échantillons pour déceler d'autres infections virales, environ 30 % avaient de faibles taux d'IgM pour le virus de la rougeole, le parvovirus, le CMV ou l'EBV, ce qui évoque la possibilité que ces virus interviennent dans la réactivation du HHV-6. Des analyses plus poussées par PCR au Laboratoire provincial de santé publique du sud de l'Alberta n'ont pas permis d'obtenir de résultats positifs pour ces virus et il pourrait être nécessaire d'obtenir un autre échantillon pour parvenir à un résultat plus clair.

Chez plusieurs greffés, on a noté une triade d'infection par le HHV-6, le CMV et l'EBV, ce qui nous porte à nous demander si l'immunosuppression ou la réactivation de l'un de ces herpèsvirus était le principal facteur diagnostique.

Pour conclure, ce sont surtout des greffés rénaux plutôt que des greffés médullaires qui se sont révélés IgM+ pour le HHV-6, et il est possible que le virus ait une influence différente sur l'évolution clinique de ces deux populations de greffés. Il reste à déterminer si la réactivation du HHV-6 est une mesure du rejet de la greffe ou s'il s'agit d'un facteur qui provoque ce rejet et s'il est possible que d'autres herpèsvirus agissent comme cofacteurs.

Réseau collaborateur de chercheurs sur les maladies infectieuses chez les enfants au Canada (PICNIC)

Joanne Embree

PICNIC est un réseau de spécialistes des maladies infectieuses infantiles au Canada qui pourrait apporter une aide précieuse à tout projet de recherche sur les HHV-6 et 7 chez les enfants. Il a participé à diverses études de surveillance d'un bout à l'autre du pays, la plupart dans les hôpitaux, mais également dans la communauté et auprès de malades ambulatoires. Le réseau PICNIC peut entreprendre ses propres projets ou collaborer à des recherches proposées par d'autres entités connexes. Parmi les exemples de projets qui ont été couronnés de succès, on peut mentionner l'étude du virus respiratoire syncytial, qui s'est penchée sur le tableau clinique et l'épidémiologie de la maladie au Canada de même que sur le diagnostic et la prise en charge. D'autres organisations avec lesquelles les membres de PICNIC ont collaboré incluent le réseau du Programme canadien de surveillance active des effets secondaires associés aux vaccins (IMPACT) qui surveille les effets secondaires graves des vaccins dans les hôpitaux pédiatriques, le Programme canadien de surveillance des infections nosocomiales (PCSIN) du Comité canadien d'épidémiologistes hospitaliers (CCEH) qui travaille de concert avec le LLCM pour surveiller les infections hospitalières, les programmes de surveillance de la Société canadienne de pédiatrie et le Groupe canadien de recherche sur le sida chez les enfants.

Surveillance des approvisionnements en sang

Surveillance des maladies transmissibles par le sang au Canada

Antonio Giulivi

Le rôle de la Division des agents pathogènes à diffusion hématogène, Bureau des maladies infectieuses, LLCM, consiste à mettre sur pied les systèmes de surveillance nécessaires et à avoir recours à l'expertise disponible pour faire en sorte que les réserves de sang, les transfusions sanguines et les transplantations (y compris les xénotransplantations) soient sûrs, tel que recommandé dans le Rapport Krever.

La surveillance systématique des agents pathogènes transmissibles par le sang s'effectue grâce au système existant de déclaration des maladies à déclaration obligatoire. Le Système de surveillance des incidents transfusionnels (SSIT) surveillera les risques de contracter un agent pathogène transmissible par le sang chez les transfusés et les receveurs de greffes d'organes et de tissus. Au départ, quatre hôpitaux dans quatre provinces participeront à ce programme. Le Système de surveillance améliorée par unité de santé sentinelle (SSAUSS) fournit une évaluation globale du risque encouru par la population générale lors d'une transfusion sanguine. Le Système de surveillance en milieu hospitalier (SSMH) évaluera la pratique médicale et les mesures de lutte contre la maladie dans le cas des patients recevant du sang ou des produits sanguins. Trois centres ont été mis sur pied (Manitoba, Ottawa et Toronto). Le système de surveillance de l'hépatite recueille des données de quatre centres de surveillance améliorée dans la communauté, et l'on estime qu'entre 20 % et 30 % des cas d'hépatite virale sont causés par des agents non encore identifiés. Le Système de surveillance et d'intervention rapide (SSIR) est le système de vigie pour les agents pathogènes émergents – par exemple, une surveillance d'urgence a été instaurée pour un nouvel agent semblable au TTV, qui pourrait être un nouveau virus ou un sous-type de TTV.

Depuis 2 ans, on assure la surveillance de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (le Système de surveillance de la MCJ et des prions). Cette surveillance englobe le prélèvement des cerveaux de patients qu'on croit atteints de cette maladie, des services de pathologie à Toronto et la collecte de renseignements auprès des familles des patients. Il y a des liens qui sont établis avec le Royaume-Uni.

Des consultations publiques sur la xénotransplantation débuteront dans un avenir prochain et l'on s'attend à recevoir des demandes au titre des nouvelles drogues de recherche au cours de la présente année. Il faut établir un cadre de surveillance et un protocole de lutte contre les infections avant le début des essais cliniques.

Des chercheurs viennent tout juste de terminer une étude multicentre sur le facteur de stimulation des granulocytes (G-CSF) et le facteur des cellules souches chez les receveurs d'une greffe de moelle osseuse autologue. Les résultats donnaient à croire

que chez certains des quelque 40 patients pour qui la prise de greffe a été excessivement longue, il y avait des signes d'infection par le HHV-6 et 7, bien que les résultats ne fussent pas concluants. Un projet soumis par le Canadian Blood and Marrow Transplant Group au Conseil de recherches médicales du Canada (CRM) et aux Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) en vue de la tenue d'un essai clinique chez les greffés médullaires a été accepté. Les 20 centres de transplantation (1 300 transplantations par année) d'un bout à l'autre du Canada participeront à l'étude et ils travaillent actuellement à constituer une base de données commune. En vue de standardiser la collecte des échantillons, il a été décidé que les virus soupçonnés d'avoir une incidence sur le délai nécessaire à la prise de greffe et sur le rejet seront inclus. Aussi, des analyses seront-elles réalisées afin de détecter le VIH-1, le VIH-2, le HTLV-I (virus du lymphome humain à cellules T), le HTLV-II, les virus des hépatites B et C, le CMV, le parvovirus, le HHV-6, le HHV-7, éventuellement le HHV-8 et toute une gamme de bactéries.

Les préparatifs en vue de cette étude dureront environ 2 ans, mais il est important de s'entendre maintenant sur les méthodes de laboratoire à utiliser pour la standardisation des tests de détection des herpèsvirus.

Références

1. Norton RA, Caserta M, Breese Hall C et al. *Detection of human herpesvirus 6 by reverse transcription-PCR.* J Clin Microbiol 1999;37:3673-75.
2. Ward KN, Gray JJ, Joslin ME, et al. *Avidity of IgG antibodies to human herpesvirus 6 distinguishes primary from recurrent infection in organ transplant recipients and excludes cross-reactivity with other herpesviruses.* J Med Virol 1993;39:44-49.
3. Bland RM, Mackie PLK, Shorts T et al. *The rapid diagnosis and clinical features of human herpesvirus 6.* J Infection 1998;36:161-65.
4. Chiu SS, Cheung CY, Tse CYC et al. *Early diagnosis and primary human herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction, and virus load.* J Infect Dis 1998;178:1250-56.
5. Black J, Schwarz T, Patton J et al. *Evaluation of immunoassays for detection of antibodies to HHV7.* Clin Diagn Lab Immunol 1996;3:79-83.
6. Challoner PB, Smith KT, Parker JD et al. *Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis.* Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:7440-44.
7. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G et al. *CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6.* Cell 1999;99:817-27.

Annexe : Liste des participants

Dr Philip D. Acott, FRCPC
Assistant Professor of Pediatrics
Faculty of Medicine, Dalhousie University
IWK-Grace Health Centre
Halifax, Nova Scotia

Dr Upton Allen
Associate Professor of Pediatrics
Division of Infectious Diseases
Hospital for Sick Children
Toronto, Ontario

Dre José Campione-Piccardo, PhD, RSM (CCM)
Meeting co-chair
Science and Laboratory Advisor
Reference Laboratory Capacity Program for
Infectious Disease Surveillance
Bureau of Infectious Disease, LCDC
Ottawa, Ontario

Claudio Cermelli, PhD
Post-doctoral Fellow, Viral Immunology
NINDS/National Institutes of Health
Bethesda, Maryland
Microbiology and Biostatistics
University of Modena and Reggio Emilia, Italy

Dr Francisco Diaz-Mitoma, PhD
Chief, Regional Virology Laboratory
Children's Hospital of Eastern Ontario
Ottawa, Ontario

Dr Patrick Doyle, FRCPC
Medical Consultant
Canadian Blood Services, Vancouver Centre
Vancouver, British Columbia

Dre Joanne Embree
Associate Professor
Department of Medical Microbiology and
Infectious Diseases
University of Manitoba
Winnipeg, Manitoba

Kevin Fonseca, PhD
Laboratory Virologist
Provincial Laboratory of Public Health for
Southern Alberta
Calgary, Alberta

Pauline George, BSc, MLT, ART
Head Technologist, Special Procedures and
Immunodiagnostics
Central Laboratory, Laboratory Branch
Ministry of Health and Long Term Care
Etobicoke, Ontario

Dr Mark Germain, PhD
Medical Director
Héma-Québec
Sainte-Foy, Québec

Dr Antonio Giulivi, PhD
Associate Director
Bureau of Infectious Diseases, LCDC
Ottawa, Ontario

Steven Jacobson, PhD
Chief, Viral Immunology Section
NINDS/National Institutes of Health
Bethesda, Maryland

Dr Debra Lane, FRCPC
Medical Director
Canadian Blood Service Winnipeg
Winnipeg, Manitoba

Spencer Lee, PhD
Director, Division of Microbiology
Department of Pathology and Laboratory Medicine
QEII Health Sciences Centre
Halifax, Nova Scotia

Philip Pellett, PhD
Chief, Herpesvirus Section
Centers for Disease Control and Prevention
Atlanta, Georgia

Beni Sahai, PhD
Senior Scientist, Virology
Cadham Provincial Laboratory
Winnipeg, Manitoba

Dr Raymond Tellier, FRCPC
Medical Microbiologist
Division of Microbiology
Hospital for Sick Children
Toronto, Ontario

Dr Eva Thomas, PhD, FRCP(C)
Director, Microbiology Laboratory
BC Children's and Women's Health Centre
Vancouver, British Columbia

Graham Tipples, PhD
Meeting co-chair
Head, Viral Exanthemata
Bureau of Microbiology, LCDC
Canadian Science Center for Human and Animal Health
Winnipeg, Manitoba

Observers

Keith Fowke, PhD
Assistant Professor
Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases
Universtity of Manitoba
Winnipeg, Manitoba

Marian Laderoute, PhD
Research Manager, Blood Zoonotics Unit
Bloodborne Pathogens Division
Bureau of Infectious Diseases, LCDC
Ottawa, Ontario