THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

Thèse en vue du

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée sous forme de

MÉMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
EN BIOLOGIE MEDICALE

présentée par

Thibault DEPAIRE

Sérologie du Parvovirus B19 : Etude de signification virologique et clinique de la positivité des IgM

Thèse soutenue à Poitiers
le 24 octobre 2018

devant le jury composé de :

Pierre-Yves DONNIO
PU-PH, Université Rennes 1, CHU de Rennes / Président

Geneviève GIRAUDEAU
PH, CHU de Poitiers / Directeur de thèse

Nicolas LEVEQUE
PU-PH, Université de Poitiers, CHU de Poitiers / *examinateur*

Vincent THIBAULT
PU-PH, Université Rennes 1, CHU de Rennes / *examinateur*

Sandrine MARCHAND
PU-PH, Université de Poitiers, CHU de Poitiers / *examinateur*

ANNEE 2017-2018

Listes des enseignants-chercheurs de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

PROFESSEURS

			Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BOUSTIE	Joël	X	HDR	
2	BURGOT	Gwenola	X	HDR	X
3	DONNIO	Pierre Yves	X	HDR	X
4	FAILI	Ahmad		HDR	
5	FARDEL	Olivier	X	HDR	X
6	FELDEN	Brice	X	HDR	
7	GAMBAROTA	Giulio		HDR	
8	GOUGEON	Anne	X	HDR	
9	LAGENTE	Vincent	X	HDR	
10	LE CORRE	Pascal	X	HDR	X
11	LORANT (BOICHOT)	Elisabeth		HDR	
12	MOREL	Isabelle	X	HDR	X
13	SERGENT	Odile	X	HDR	
14	SPARFEL-BERLIVET	Lydie	X	HDR	
15	TOMASI	Sophie	X	HDR	
16	URIAC	Philippe	X	HDR	
17	VAN DE WEGHE	Pierre		HDR	
18	VERNHET	Laurent	X	HDR	

PROFESSEURS ASSOCIES

			Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BUREAU	Loïc	X		
2	DAVOUST	Noëlle	X		

PROFESSEURS EMERITES

			Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	CILLARD	Josiane	X	HDR	
2	GUILLOUZO	André		HDR	

MAITRES DE CONFERENCES

			Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	ABASQ-PAOFAI	Marie-Laurence			
2	ANINAT	Caroline	X	HDR	
3	AUGAGNEUR	Yoann			
4	BEGRICHE	Karima			
5	BOUSARGHIN	Latifa		HDR	
6	BRANDHONNEUR	Nolwenn			
7	BRUYERE	Arnaud	X		
8	BUNETEL	Laurence	X		
9	CHOLLET-KRUGLER	Marylène	X		
10	COLLIN	Xavier	X		
11	CORBEL	Jean-Charles	X	HDR	
12	DAVID	Michèle	X	HDR	
13	DELALANDE	Olivier			
14	DELMAIL	David			
15	DION	Sarah			
16	DOLLO	Gilles	X	HDR	X
17	GICQUEL	Thomas	X		X
18	GILOT	David		HDR	
19	GOUAULT	Nicolas		HDR	
20	HITTI	Eric			
21	JEAN	Mickaël			
22	JOANNES	Audrey			
23	LECUREUR	Valérie		HDR	
24	LE FERREC	Eric	X		
25	LE GALL-DAVID	Sandrine			
26	LE PABIC	Hélène			
27	LEGOUIN-GARGADENNEC	Béatrice			
28	LOHEZIC-LE DEVEHAT	Françoise	X		
29	MARTIN-CHOULY	Corinne		HDR	
30	MINET	Jacques	X	HDR	
31	NOURY	Fanny			
32	PINEL-MARIE	Marie-Laure			
33	PODECHARD	Normand			
34	POTIN	Sophie	X		X
35	RENAULT	Jacques	X	HDR	
36	ROUILLON	Astrid			

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE (AHU)

			Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BACLE	Astrid	X		X
2	BOUVRY	Christelle	X		X

ATER

1	PALAZZO	Claudio		
2	VICTONI	Tatiana	X	

J’adresse mes sincères remerciements au Professeur Pierre-Yves DONNIO pour avoir accepté de présider mon jury de thèse malgré la sollicitation tardive.

Je remercie également sincèrement le Professeur Vincent THIBAULT et le Professeur Sandrine MARCHAND d’avoir accepté de faire partie de mon jury

Je remercie chaleureusement le Professeur Nicolas LEVEQUE pour son accompagnement, ses conseils et ses remarques au cours de l’élaboration et de la rédaction de ce projet de thèse.

Je remercie vivement le Docteur Geneviève GIRAUDEAU, directeur de thèse, pour son aide et ses conseils au cours de la préparation de cette thèse.

Je remercie le Docteur Céline CHESSA pour son aide dans l’exploitation statistique des résultats de ce travail.

J’adresse également mes remerciements à l’ensemble des biologistes et de l’équipe technique du Laboratoire de Virologie du CHU de Poitiers, où s’est développé ce projet d’étude.

Je remercie plus largement les biologistes et techniciens qui m’ont encadré au cours de mes différents semestres d’internat, au CHU de Poitiers mais également aux centres hospitaliers de Niort et Châtellerault, ainsi que les internes qui m’ont accompagné.

Je remercie enfin ma famille qui m’a soutenu tout au long de ce projet et a su me donner le courage de le mener à bien, y compris lorsque la volonté nécessaire me faisait défaut.

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement,

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Table des matières

I. INTRODUCTION 13

II. LE PARVOVIRUS B19 14

II. 1 Caractéristiques virologiques 14

II. 1. 1 Classification 14

II. 1. 2 Structure 15

II. 1. 3 Variation génotypique 16

II. 2 Physiopathologie 17

II. 2. 1 Cycle de réplication 17

II. 2. 2 Récepteurs cellulaires 19

II. 2. 3 Tropisme cellulaire et permissivité 20

II. 3 Epidémiologie 23

II. 3. 1 Mode épidémique 23

II. 3. 2 Mode de transmission 23

II. 3. 3 Séroprévalence 24

II. 3. 4 Répartition géographique des génotypes 24

II. 4 Pouvoir pathogène 25

II. 4. 1 Infection du sujet immunocompétent 25

II. 4. 2 Infection du sujet porteur d'une pathologie de l'érythrocyte 28

II. 4. 3 Infection du sujet immunodéprimé 28

II. 4. 4 Infection materno-fœtale 29

II. 5 Diagnostic de l'infection par le Parvovirus B19 31

II. 5. 1 Diagnostic virologique 31

II. 5. 1. 1 Diagnostic indirect : Sérologie 31

II. 5. 1. 2 Diagnostic direct 31

II. 5. 2 Diagnostic hématologique : le myélogramme 33

III. SEROLOGIE DU PARVOVIRUS B19 34

III. 1 Objectifs 34

III. 2 Modalités techniques 35

III. 3 Performances diagnostiques 36

III. 4 Interférences et réactivité non spécifique 36

III. 5 Interprétation des résultats 37

IV. OBJECTIFS DE L'ETUDE 39

IV. 1 Contexte de l'étude 39

IV. 2 Objectifs 39

V. PATIENTS ET METHODES 41

V. 1 Sélection des patients 41

V. 2 Méthodologie de l'étude 42

V. 2. 1 Paramètres communs à l'ensemble des patients 43

V. 2. 2 Paramètres additionnels selon le résultat de la PCR 44

V. 2. 2. 1 Paramètres étudiés en cas de PCR positive 44

V. 2. 2. 2 Paramètres étudiés en cas de PCR négative 45

V. 3 Techniques d'analyse 46

V. 3. 1 Technique de détection des IgM 46

V. 3. 2 Technique de détection des IgG 46

V. 3. 3 Technique de détection de l'ADN viral par PCR 47

V. 4 Exploitation statistique des résultats 49

V. 4. 1 Paramètres qualitatifs 50

V. 4. 1 Paramètres quantitatifs 51

VI. RESULTATS 52

VI. 1 Description de l'effectif 52

VI. 2 Statistiques de positivité de la PCR 53

VI. 2. 1 Statistiques globales 53

VI. 2. 2 Critères démographiques 54

VI. 2. 3 Présence d'IgG 54

VI. 2. 4 Répartition en fonction de l'indice de réactivité IgM 54

VI. 2. 5 Présence d'une éruption cutanée 55

VI. 2. 6 Présence d'arthralgies 55

VI. 2. 7 Présence d'une anémie 56

VI. 2. 8 Présence d'une immunodépression 57

VI. 2. 9 Tableau récapitulatif 58

VI. 3 Etude statistique des paramètres biologiques 59

VI. 4 Manifestations cliniques récurrentes 61

VI. 5 Présence de marqueurs d'infections par un agent pathogène autre que le Parvovirus B19 61

VI. 6 Cas cliniques d'intérêt particulier 64

VI. 6. 1 Manifestation atypique de l'infection chez le patient immunocompétent 64

VI. 6. 2 Infections chez le patient atteint d'anémie chronique 64

VI. 6. 3 Infections chez le patient immunodéprimé 65

VI. 6. 4 Infections en cours de grossesse 65

VII. DISCUSSION 67

Références bibliographiques 75

Table des annexes

Annexe 1. Mode opératoire de la sérologie du Parvovirus B19 au CHU de Poitiers (p. 79)

Annexe 2. Mode opératoire de la détection de l'ADN du Parvovirus B19 par PCR au CHU de Poitiers (p. 84)

Table des illustrations

Figures

Figure 1. Représentation générale de la structure du Parvovirus B19 (p. 15)

Figure 2. Cycle de réplication du Parvovirus B19 (p. 18)

Figure 3. Permissivité cellulaire à l'infection par le Parvovirus B19 (p. 21)

Figure 4. Schéma général de l'érythropoïèse (p. 22)

Figure 5. Mégalérythème épidémique (p. 26)

Figure 6. Toxicité du Parvovirus B19 sur les différentes lignées hématopoïétiques (p. 27)

Figure 7. Evolution de l'infection par le Parvovirus B19 en fonction du sujet (p. 30)

Figure 8. Aspect cytologique de l'infection à Parvovirus B19 sur un frottis médullaire (p. 33)

Figure 9. Principe d'une technique ELISA indirecte (p. 35)

Figure 10. Critères d'inclusion des patients dans l'étude (p. 42)

Figure 11. Principe de la détection par fluorescence de l'amplification d'une cible de PCR (p. 48)

Figure 12. Répartition mensuelle des cas de positivité des IgM et de la PCR du Parvovirus B19 (p. 53)

Figure 13. Cinétique des marqueurs biologiques et cliniques de l'infection par le Parvovirus B19 (p. 72)

Tableaux

Tableau I. Interprétation des résultats de la sérologie du Parvovirus B19 (p. 38)

Tableau II. Composition de la population de patients de l'étude (p. 52)

Tableau III. Etiologies des anémies recensées pour les patients de l'étude (p. 56)

Tableau IV. Etiologies des cas d'immunodépression recensés pour les patients de l'étude (p. 57)

Tableau V. Taux de positivité de la PCR du Parvovirus B19 en fonction de la population étudiée (p. 58)

Tableau VI. Indicateurs statistiques des paramètres biologiques en fonction du résultat de la PCR (p. 60)

Tableau VII. Présence de marqueurs sérologiques et moléculaires d'infection active par d'autres agents dans la population de patients avec PCR Parvovirus B19 négative (p. 63)

Tableau VIII. Données virologiques et évolution clinique observées pour les femmes enceintes (p. 66)

Liste des abréviations

(par ordre d'apparition dans le texte)

PVB19	Parvovirus B19
IgM	Immunoglobuline M
IgG	Immunoglobuline G
ADN	Acide désoxyribonucléique
BFU-E	*burst-forming unit of erythroid cells*
CFU-E	*colony-forming unit of erythroid cells*
ARN	Acide ribonucléique
Epo	Erythropoïétine
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
G6PD	Glucose-6-Phosphate déshydrogénase
LCR	Liquide céphalo-rachidien
Ct	*Cycle threshold*
MGG	May Grünwald - Giemsa
EDTA	éthylène diamine tetra-acétique (acide)
ELISA	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
CLIA	*ChemoLuminescence ImmunoAssay*
CMV	Cytomégalovirus
EBV	*Epstein-Barr Virus*
VPP	Valeur prédictive positive
SIL	Système informatique de laboratoire
ALAT	Alanine Aminotransférase
UI	Unité internationale
ASAT	Aspartate Aminotransférase
VCA	*Viral core antigen*
RLU	*Relative light units*
HSV1/2	*Herpes simplex Virus* 1/2
VZV	*Varicella Zoster Virus*
HHV6	*Human Herpesvirus* 6
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
HTLV	*Human T-lymphotropic virus*

I. INTRODUCTION

Le Parvovirus B19 (PVB19), ou Erythrovirus B19, est un virus ubiquitaire chez l'Homme. Il est à l'origine d'infections dont la présentation varie fortement selon l'âge et le statut immunitaire, physiologique et pathologique du sujet infecté.

L'infection par le PVB19 est asymptomatique ou bénigne chez le sujet immunocompétent et responsable de manifestations sévères chez le patient atteint d'une pathologie constitutionnelle de l'érythrocyte ou d'une anémie chronique, chez le sujet immunodéprimé ou chez le fœtus. Parmi les manifestations cliniques les plus fréquentes, on note une éruption cutanée appelée « mégalérythème épidémique » chez l'enfant et des arthralgies chez l'adulte.

La sérologie consiste en la recherche dans le sérum du patient des anticorps spécifiques dirigés contre le PVB19, de type IgM et IgG, dans le but de diagnostiquer une infection, ancienne ou récente, par le virus. La présence des IgM spécifiques est en théorie associée à une infection active ou récente par le PVB19 tandis que la présence isolée des IgG signe un contact antérieur. La sérologie constitue la technique privilégiée de diagnostic des infections à PVB19 chez le sujet immunocompétent. En pratique, elle donne lieu à de nombreuses difficultés d'interprétation, notamment du fait de réactivités non spécifiques au cours d'autres infections microbiennes ou d'interférences analytiques. Son interprétation tient compte du contexte clinique du patient et fait souvent appel à des analyses diagnostiques complémentaires dont la recherche directe du virus par technique moléculaire.

Devant cette situation rencontrée en pratique professionnelle, le but de cette étude a été d'évaluer la signification de la positivité des IgM du PVB19 chez les patients du CHU de Poitiers sur une période de recueil de deux ans et demi. La détection du génome viral par technique moléculaire était utilisée comme marqueur d'une véritable infection active par le PVB19. Son résultat a été confronté aux données analytiques issues de la sérologie ainsi qu'aux données biologiques et cliniques des patients investigués afin de rechercher des critères en faveur de l'infection dans le cas d'une positivité des IgM. L'étude des résultats de sérologies d'autres virus et agents infectieux a en outre permis la recherche d'une possible réaction non spécifique à l'origine de la fausse positivité des IgM du PVB19.

II. LE PARVOVIRUS B19

II. 1 Caractéristiques virologiques

II. 1. 1 Classification

Le Parvovirus B19 (PVB19) humain a été découvert en 1975 à Londres par *Cossart et al.* (1) de manière fortuite lors de la recherche systématique de l'antigène HBs dans des sérums de donneurs de sang qui s'étaient révélés faussement positifs pour ce marqueur. L'examen des particules virales en microscopie électronique évoquait un parvovirus et l'analyse du génome viral a par la suite confirmé son appartenance à la famille des *Parvoviridae* (2). Ce virus fut successivement dénommé SPLV (serum parvovirus-like virus), HPV (Human Parvovirus) puis B19 (3), en référence au numéro identifiant la poche de sang dans laquelle il fut découvert. Actuellement, deux dénominations sont employées : Parvovirus B19 ou Erythrovirus B19.

Le PVB19 appartient à la famille des *Parvoviridae*, à la sous-famille des *Parvovirinae* et au genre *Erythrovirus*.

La famille des *Parvoviridae*, du latin *parvum* « petit », rassemble des petits virus nus à ADN. Au sein de cette famille se distinguent deux sous-familles : les *Parvovirinae*, qui infectent les vertébrés, et les *Densovirinae*, retrouvés chez les insectes (3).

La sous-famille des *Parvovirinae* regroupe trois genres qui se différencient par leur cycle de réplication (2) :

- Le genre *Parvovirus*, qui se réplique de manière autonome et n'est retrouvé que chez l'animal.
- Le genre *Dependovirus*, dont la réplication nécessite la présence d'un virus auxiliaire ou « helper » (*adenovirus* ou *herpesvirus*). Ces virus sont dits défectifs. Ils sont capables d'infecter l'Homme chez qui ils sont retrouvés au niveau des épithéliums respiratoires, génitaux et digestifs mais leur pouvoir pathogène n'est pas établi.
- Le genre *Erythrovirus* dont le PVB19 est l'unique espèce. Ce genre réalise un cycle de réplication autonome mais limité aux précurseurs érythroïdes et doit son nom à ce tropisme cellulaire particulier.

II. 1. 2 Structure

Le PVB19 est un virus nu (non enveloppé) d'une taille de 20 nm (diamètre de 18 à 26 nm au sein de la famille des *Parvoviridae* (2)). Il présente une capside de symétrie icosaédrique composée de deux protéines VP1 et VP2 organisées en 60 capsomères.

La protéine VP2 est le constituant majoritaire de la capside dont elle représente environ 95 % (2). Cette molécule possède les domaines de liaison aux récepteurs et corécepteurs et est ainsi impliquée dans la fixation des particules virales à la cellule cible (4). La protéine VP1, minoritaire, est néanmoins davantage exposée à la surface du virion et donc particulièrement accessible aux anticorps (2). Elle intervient également dans l'entrée du virus dans la cellule cible ainsi que dans le transport de la particule virale vers le noyau, site de la réplication (5).

Le génome du PVB19 est constitué d'une seule copie d'une molécule linéaire d'ADN monocaténaire de 5594 nucléotides dont la polarité est soit positive soit négative avec une fréquence équivalente. Les deux extrémités 3' et 5' auto-hybridées forment une structure dite « en épingle à cheveux ». Ces formations terminales sont indispensables à la transcription, la réplication et l'encapsidation virale (2).

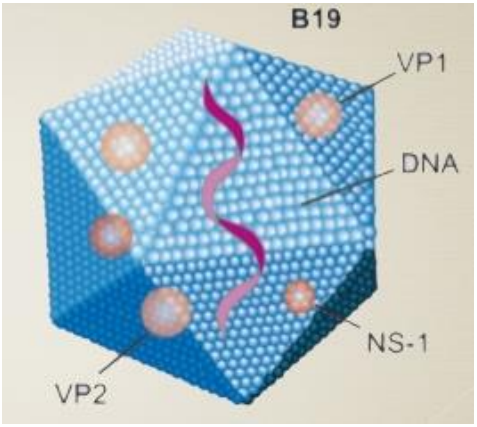


Figure 1. Représentation générale de la structure du Parvovirus B19 (6). La capside icosaédrique constituée des protéines VP1 et VP2 renferme une molécule d'ADN monocaténaire.

La molécule d'ADN du virus code cinq protéines : les deux protéines de capside VP1 et VP2, la protéine non structurale NS1 et deux petites protéines de 7,5 et 11 kDa. La protéine NS1 est une protéine de régulation qui exerce différentes fonctions au cours du cycle de réplication viral, notamment au niveau de la réplication et de l'activation de la transcription. Le rôle des deux protéines de petit poids moléculaire n'est pas entièrement défini mais semble essentiel dans certaines fonctions virales. L'expression de la protéine de 11 kDa s'est ainsi révélée capitale dans la production et l'adressage cellulaire des protéines de capside et il a été démontré qu'une mutation de cette protéine diminuait l'infectiosité *in vitr*o du virus (5).

II. 1. 3 Variation génotypique

La variabilité globale de la séquence nucléotidique entre les différentes souches de PVB19 est d'environ 10 % (4). La région du génome présentant la plus forte divergence est la région VP1 unique (VP1u) qui code pour la partie N-terminale de la protéine de capside VP1 (7) (dotée d'une activité enzymatique de phospholipase A2 (4)).

Une analyse phylogénétique basée sur la région codante 3'NS1 – 5'VP1u (séquence de 994 nucléotides) a permis la différenciation de trois génotypes : 1, 2 et 3. Les génotypes 1 et 3 comprennent chacun deux sous-génotypes, identifiés respectivement comme 1A/1B et 3A/3B (7, 8).

II. 2 Physiopathologie

II. 2. 1 Cycle de réplication

Le cycle réplicatif du PVB19 (Figure 2) s'effectue au sein des progéniteurs de la lignée érythroïde, essentiellement BFU-E (*burst-forming unit of erythroid cells*) et CFU-E (*colony-forming unit of erythroid cells*), qui sont les stades cellulaires précédant les érythroblastes au cours de l'érythropoïèse.

L'entrée de la particule virale dans la cellule s'effectue par liaison au récepteur principal qui est l'antigène P de groupe sanguin ainsi qu'à des corécepteurs puis internalisation et libération dans le cytoplasme. Le virus migre ensuite dans le noyau de la cellule où se produit la décapsidation du génome. Le noyau est le site de la réplication et de la transcription.

La molécule d'ADN viral simple brin, de polarité positive ou négative, est initialement convertie en une forme à double brin par l'action de l'ADN-polymérase cellulaire qui se fixe au niveau de l'amorce constituée par l'extrémité 3' auto-hybridée pour synthétiser le brin complémentaire (2).La transcription du génome viral est alors réalisée par l'ARN-polymérase cellulaire à partir de cette molécule d'ADN bicaténaire. Les transcrits migrent vers le cytoplasme où a lieu la phase de traduction, soit la synthèse des cinq protéines virales par l'intermédiaire des ribosomes de la cellule. La protéine NS1 néosynthétisée rejoint le noyau et joue un rôle d'augmentation de l'efficacité de la transcription par recrutement des facteurs de transcription (4).

La protéine de régulation NS1 intervient également dans le phénomène de réplication du génome. La molécule d'ADN double brin initialement synthétisée présente une liaison covalente entre les deux brins et l'activité endonucléasique de NS1 est nécessaire pour les séparer. La protéine provoque une coupure au niveau du brin source, l'extrémité 3' de ce brin source devenant l'extrémité 5' du brin complémentaire (2). La forme réplicative à double brin est ainsi obtenue. Les extrémités de ces formes réplicatives vont à nouveau s'auto-hybrider, entraînant l'élongation complémentaire de l'un des brins à partir de la nouvelle amorce formée et la libération de l'autre brin qui peut être utilisé pour la formation d'un virion. Ce brin généré peut présenter de manière aléatoire une polarité positive ou négative. Le brin rendu double permet d'amplifier le processus de réplication.

En parallèle, les protéines de structure VP1 et VP2 s'assemblent dans le cytoplasme pour former une procapside. Celle-ci est transportée dans le noyau pour permettre l'encapsidation des molécules d'ADN simple brin nouvellement synthétisées et aboutir ainsi aux particules virales matures. Les brins de polarité positive et négative sont encapsidés isolément en proportions identiques.

L'infection de la cellule cible débouche sur un processus apoptotique dans lequel est à nouveau impliquée la protéine régulatrice NS1 par activation de voies de signalisation cellulaire, en particulier la voie de la caspase 3 (9). Cette destruction de la cellule permet la libération des virions néoformés, qui peuvent ensuite infecter de nouvelles cellules réceptives.

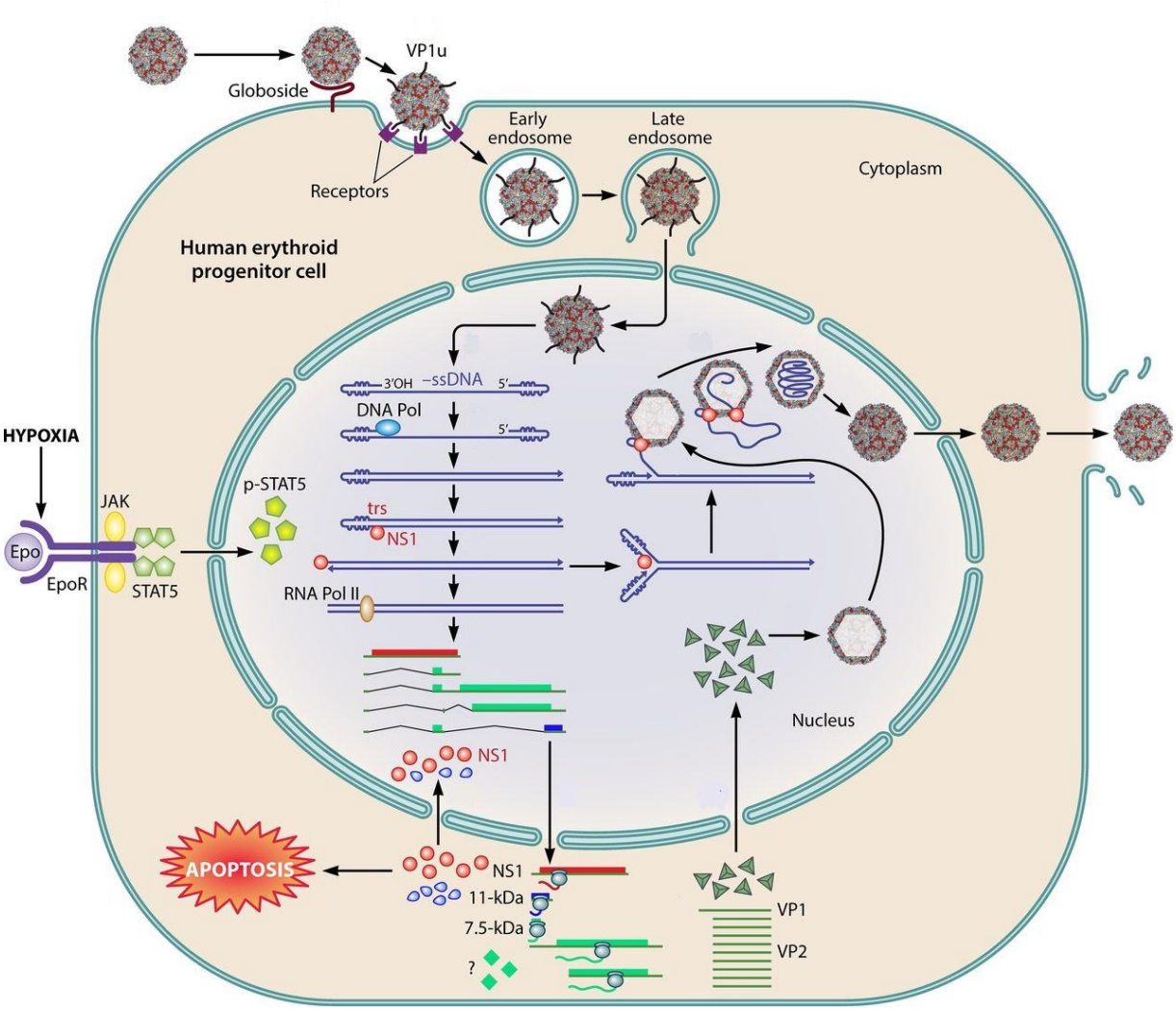


Figure 2. Cycle de réplication du Parvovirus B19 (10). Le virus entre dans la cellule par l'intermédiaire de l'antigène P (globoside) et effectue la réplication de son génome dans le noyau.

II. 2. 2 Récepteurs cellulaires

Le récepteur cellulaire principal du PVB19 est l'antigène P de groupe sanguin, ou globoside, de nature polysaccharidique. Le groupe sanguin P est un système antigénique qui comprend deux antigènes principaux P_1 et P ainsi qu'un troisième antigène P^k de fréquence plus faible.Seul l'antigène P joue le rôle de récepteur pour le PVB19. Différents phénotypes peuvent ainsi s'observer sur les cellules de la lignée érythroïde :

- Phénotype P_1 : les deux antigènes P_1 et P sont exprimés.
- Phénotype P_2 : seul l'antigène P est exprimé.
- Phénotype P_1^k : les antigènes P_1 et P^k sont exprimés.
- Phénotype p : aucun des antigènes du système P (P_1, P, P^k) n'est présent. Il s'agit d'un phénotype rare (fréquence de 1/200000) (3).

Une étude (11) a démontré une résistance à l'infection par le PVB19 chez les sujets de phénotype p liée à l'absence du récepteur cellulaire principal. La séroprévalence de l'infection chez ce groupe de population est ainsi de 0 %.

L'antigène P est fortement exprimé sur les globules rouges ainsi que leurs précurseurs et progéniteurs médullaires mais il est également retrouvé en quantité variable à la surface de nombreux autres types cellulaires : autres lignées hématopoïétiques telles que les lignées mégacaryocytaire et granulocytaire mais aussi les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules synoviales, les hépatocytes ou certains myocytes (2, 3). Cette distribution tissulaire du récepteur est à l'origine de certaines manifestations cliniques de l'infection par le PVB19.

La présence de l'antigène P n'est cependant pas suffisante pour permettre l'entrée du PVB19 dans la cellule cible et la réplication virale (12). Ce processus nécessite également l'intervention de corécepteurs. Deux molécules jouant ce rôle ont été identifiées : l'intégrine α5β1 et l'antigène Ku80.

L'intégrine α5β1 est une protéine transmembranaire hétérodimérique (constituée de deux sous-unités α et β) impliquée dans l'adhésion cellulaire. Elle remplit notamment la fonction de récepteur de la fibronectine. L'interaction entre la particule virale, le récepteur principal et ce corécepteur, qui a été décrite *in vitro* (13), correspond à un processus complexe en différentes étapes. La fixation initiale du virus sur l'antigène P entraînerait une modification de la conformation de la capside par externalisation de la région N-terminale du domaine VP1u qui permettrait alors l'interaction de cette capside avec l'intégrine α5β1 nécessaire à l'internalisation de la particule virale.

L'antigène Ku80 appartient à un complexe de trois protéines dénommé protéine-kinase dépendante de l'ADN. Il a été mis en évidence que certaines lignées cellulaires exprimant cet antigène étaient capables de réaliser la liaison et l'internalisation du PVB19 en l'absence d'antigène P (14). La réduction de son expression ou son blocage sur des cellules permissives est également associé à une inhibition de l'attachement viral. L'antigène Ku80 est présent à la surface des cellules de la lignée érythroïde ainsi que sur d'autres lignées telles que les lymphocytes et les macrophages à l'intérieur desquelles les transcrits et les protéines du PVB19 ont été détectés alors que ces cellules n'expriment pas l'antigène P (14).

II. 2. 3 Tropisme cellulaire et permissivité

Le PVB19 présente un tropisme particulier pour les progéniteurs de la lignée érythroïde BFU-E et CFU-E qui sont les seules cellules permettant la réalisation d'un cycle de réplication complet et la libération de nouvelles particules virales qui s'accompagne d'une destruction de la cellule infectée (15). Ces cellules sont dites permissives au virus (Figure 3). Ce phénomène lytique est à l'origine d'une hypoplasie de la lignée érythroïde avec érythroblastopénie médullaire, réticulopénie (effondrement des réticulocytes) et anémie d'origine centrale.

L'antigène P, récepteur principal du virus, est pourtant exprimé sur différentes autres cellules. Celles-ci permettent la pénétration du PVB19 mais pas sa réplication. Ces cellules sont dites semi-permissives. Il s'y produit une accumulation de la protéine NS1 à l'origine d'une destruction de la cellule par apoptose sans multiplication virale, ce qui n'empêche pas un retentissement clinique de l'atteinte tissulaire.

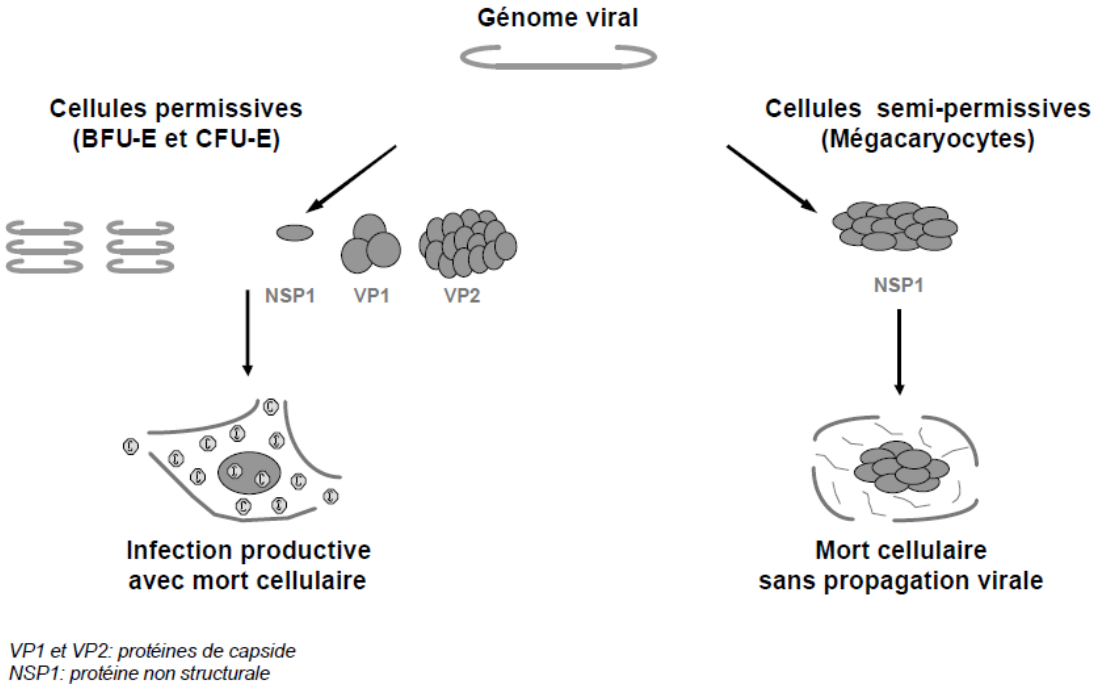


Figure 3. Permissivité cellulaire à l'infection par le Parvovirus B19 (16). L'infection des cellules permissives conduit à une mort cellulaire avec réplication virale tandis que l'infection dans les cellules semi-permissives aboutit à une mort cellulaire sans réplication. (NSP1 = NS1)

Cette différence de permissivité cellulaire à l'infection s'explique en partie par le rôle de l'érythropoïétine (Epo), qui est le facteur de croissance de la lignée érythroïde. Cette cytokine agit sur les cellules qui expriment son récepteur spécifique, correspondant aux stades de BFU-E tardif, CFU-E, proérythroblaste et érythroblaste basophile (3) (Figure 4). Une étude de *Takahashi et al.* (17) réalisant des cultures de PVB19 sur des échantillons de moelle osseuse en présence de différentes cytokines a mis en évidence que la réplication virale n'est détectée qu'en présence d'Epo.

Une autre origine de ces variations de sensibilité des cellules à l'infection pourrait se trouver dans l'expression différentielle des corécepteurs cellulaires du PVB19. L'intégrine α5β1 est présente sur les progéniteurs érythroïdes où elle joue un rôle dans l'interaction avec la matrice extracellulaire du microenvironnement médullaire mais son expression est fortement diminuée au stade d'érythroblaste et de réticulocyte pour disparaître totalement au stade d'érythrocyte mature. Cette perte d'expression du corécepteur pourrait expliquer que les cellules BFU-E et CFU-E soient permissives au virus alors que les stades précoces d'érythroblastes, pourtant sensibles à l'Epo, ne le sont pas.

L'antigène Ku80, dont l'expression est notamment induite par l'hypoxie, est également impliqué dans ce tropisme du PVB19 pour les précurseurs érythroïdes (14).

Ces précurseurs sont les seules cellules pour lesquelles une expression concomitante de l'antigène P, de l'intégrine α5β1 et de l'antigène Ku80 est établie (3). Les autres cellules, non érythroïdes, présentant l'antigène P s'avèrent peu ou pas permissives à l'infection par le PVB19 par défaut d'expression de l'un et/ou l'autre des corécepteurs.

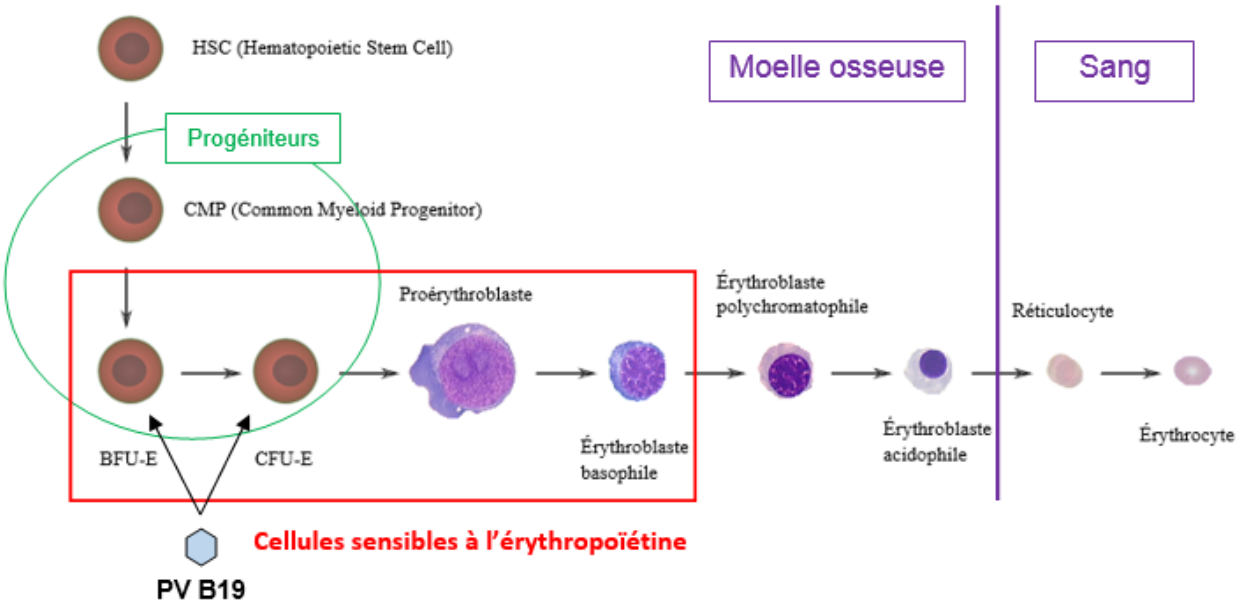


Figure 4. Schéma général de l'érythropoïèse (18). La cellule souche hématopoïétique (HSC) totipotente donne naissance à un progéniteur commun myéloïde (CMP ou CFU-GEMM) pluripotent. Celui-ci engendre les progéniteurs érythroïdes BFU-E puis CFU-E dont la multiplication et la différenciation conduisent aux stades successifs d'érythroblastes. L'érythroblaste acidophile évolue par perte de son noyau en réticulocyte qui passe dans la circulation pour aboutir à l'érythrocyte mature. L'érythropoïèse est sous la dépendance de l'érythropoïétine (Epo).

II. 3 Epidémiologie

II. 3. 1 Mode épidémique

L'infection par le PVB19, virus strictement humain,sévit à l'état endémique mais se manifeste également sous forme de petites épidémies survenant tous les trois à quatre ans environ, en particulier dans les collectivités d'enfants. Ces épidémies présentent une variation saisonnière avec une recrudescence à la fin de l'hiver et au début du printemps (2).

II. 3. 2 Mode de transmission

Le mode de transmission essentiel du PVB19 correspond à la voie respiratoire. Un sujet infecté émet des gouttelettes de sécrétions nasopharyngées qui sont inhalées par un sujet exposé. Le virus est présent dans les sécrétions respiratoires en parallèle d'une phase de virémie (présence du virus dans le sang circulant). La concentration virale la plus élevée dans ces sécrétions, et donc la contagiosité la plus importante, est rencontrée lors de la primo-infection, au cours de laquelle la virémie est très forte (jusqu'à 10^{14} virions par mL de sérum (3)).

La transmission du virus par voie sanguine est possible par l'intermédiaire d'un don de sang de patient virémique. Le risque est faible dans le cas d'un don unique avec une augmentation en période épidémique. Une étude réalisée en France sur une période de huit ans (1996-2004) concernant 18 millions de dons a montré une prévalence du génome viral dans les échantillons de 0,013 % pour un seuil de charge virale de 10^4 UI/mL considéré nécessaire pour provoquer une séroconversion chez le receveur (19).

Le risque de transmission est en revanche majoré lors de l'administration de produits dérivés du plasma, tels que les concentrés de facteurs de coagulation (2), constitués à partir d'un pool réunissant les plasmas d'un nombre important de donneurs. Les procédés physico-chimiques d'inactivation, dont le traitement par solvant/détergent, ne sont pas efficaces contre le PVB19 qui est un virus particulièrement résistant, en raison notamment de son absence d'enveloppe lipidique (2, 6).

La détection du PVB19 par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) n'est pas réalisée sur les dons de sang isolés mais elle est l'est sur les pools de plasmas destinés à la fabrication de médicaments dérivés du sang, le seuil de détection de 10^4 UI/mL étant requis (19).

La transmission peut également avoir lieu lors d'une allogreffe de moelle osseuse (20) ou d'une transplantation d'organes solides (21).

En cas de primo-infection chez la femme enceinte, le PVB19 peut enfin être transmis de la mère au fœtus par voie transplacentaire. L'infection fœtale peut se produire à tout stade de la grossesse (22).

II. 3. 3 Séroprévalence

La prévalence dans la population des anticorps dirigés contre le PVB19, marqueurs d'un contact avec le virus au cours de la vie, augmente avec l'âge :

- Environ 10 % entre 1 et 5 ans
- 40 % entre 20 et 30 ans
- Supérieure à 70 % après 60 ans (2)

La primo-infection se produit ainsi majoritairement chez l'enfant et l'adulte jeune.

II. 3. 4 Répartition géographique des génotypes

Le PVB19 est un virus ubiquitaire présent sur l'ensemble de la planète. La distribution des trois génotypes varie cependant selon les zones géographiques et évolue dans le temps. Actuellement, le génotype 1 prédomine en Europe (22), ainsi que l'a montré une étude menée en France entre 1999 et 2001 dans laquelle les génotypes 2 et 3 se limitent à 10 % de la population séropositive pour le PVB19 (5). Cette prédominance du génotype 1 est confirmée à plus vaste échelle par une étude pratiquée dans différents pays d'Europe, d'Asie et d'Afrique de l'Ouest. Il est ainsi le seul rencontré en Finlande (4).

Le génotype 3 est d'origine africaine et a par la suite connu une propagation plus large. Ce génotype est le seul détecté au Ghana (4). Le génotype 2 affiche une tendance à la disparition. Une autre étude réalisée en Afrique du Sud a retrouvé une circulation des trois génotypes, dont le génotype 2 (8).

II. 4 Pouvoir pathogène

La présentation clinique et l'évolution de l'infection par le PV19 dépendent du statut immunitaire et hématologique du patient (Figure 7). La symptomatologie est également associée à l'âge du sujet. Cette variété de la réponse à l'infection caractérise différentes pathologies.

II. 4. 1 Infection du sujet immunocompétent

La primo-infection par le PVB19 chez le sujet immunocompétent est très souvent asymptomatique. Lorsqu'elle est symptomatique, elle se présente dans sa phase initiale par un syndrome pseudo-grippal pouvant associer de la fièvre, des céphalées ou des myalgies. Les autres manifestations, en particulier cutanées et articulaires, apparaissent dans une seconde phase correspondant à la réponse immunitaire spécifique du patient (22).

Eruption cutanée

La primo-infection chez l'enfant, le plus souvent entre 5 et 10 ans (22), détermine le mégalérythème épidémique (Figure 5), également appelé « cinquième maladie de l'enfant ». Cette affection se caractérise dans sa forme typique par une éruption cutanée maculo-papuleuse débutant au niveau des joues (« en paire de claques ») et susceptible de s'étendre au tronc et aux extrémités sous l'aspect de macules roses pâles confluantes (2). Ces signes se manifestent 18 jours environ après le contage viral. Une éruption cutanée peut également être observée chez l'adulte, de forme plus atypique : morbilliforme, purpurique ou d'allure rubéolique (2). L'évolution de ces manifestations cutanées est toujours bénigne avec une régression spontanée en quelques jours ou semaines (23). Leur apparition est liée à la formation de complexes immuns suite à la synthèse des anticorps spécifiques (2).



Figure 5. Mégalérythème épidémique (23). La forme typique de l'éruption cutanée liée au Parvovirus B19 débute par un rash maculo-papuleux au niveau des joues.

Arthralgies

La manifestation la plus fréquente de l'infection par le PVB19 chez l'adulte et le grand enfant correspond à des arthralgies. Elles prennent la forme d'une polyarthrite d'apparition brutale, de localisation bilatérale et symétrique, débutant au niveau des extrémités avant de s'étendre aux grosses articulations. Ces atteintes cliniques sont retrouvées chez 30 % des adultes infectés et sont plus fréquemment observées chez la femme jeune (2). Ces arthralgies sont généralement spontanément résolutives mais la polyarthrite peut dans certains cas devenir chronique et se manifester de manière cyclique (2).

Ces symptômes articulaires résultent du dépôt de complexes immuns au niveau des articulations mais également de la cytotoxicité directement exercée par le virus. L'ADN du PVB19 a en effet été mis en évidence dans les cellules synoviales qui expriment l'antigène P et s'avèrent semi-permissives au virus.

Manifestations hématologiques

Chez le patient immunocompétent, l'atteinte des progéniteurs érythroïdes de la moelle osseuse entraîne, de manière concomitante à la phase de virémie et au syndrome pseudo-grippal, une réticulopénie sans anémie ou accompagnée d'une anémie très modérée. Ces perturbations biologiques sont transitoires et se corrigent lors de l'apparition de la réponse immune du sujet.

L'infection par le PVB19 est également responsable dans certains cas d'atteintes des autres lignées hématologiques (Figure 6). On peut ainsi observer une thrombopénie et une neutropénie qui sont liées à la présence de l'antigène P au niveau des lignées mégacaryocytaire (16) et granulocytaire (2), rendues semi-permissives et exposées à l'activité cytotoxique de la protéine NS1. Ces cytopénies résultent d'une action centrale sur les précurseurs et progéniteurs médullaires mais ont également une origine périphérique par action au niveau des polynucléaires neutrophiles et plaquettes de la circulation, qui expriment le globoside (16, 24). Une lymphopénie est également décrite dans le cadre de l'infection à PVB19 (21) et pourrait être une conséquence de la présence de l'antigène Ku80 à la surface des lymphocytes alors que ceux-ci sont dépourvus d'antigène P (14).

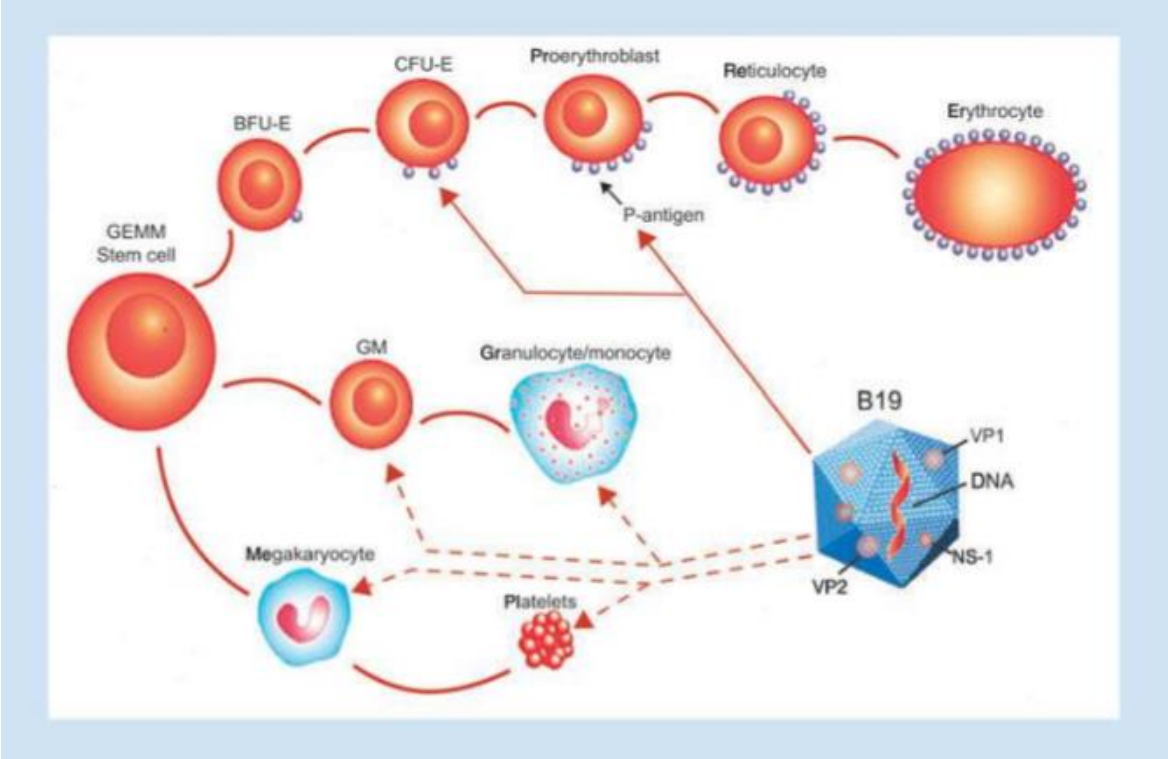


Figure 6. Toxicité du Parvovirus B19 sur les différentes lignées hématopoïétiques (6). Le PVB19 affecte principalement la lignée érythroïde mais cible également les lignées granulocytaire et mégacaryocytaire, au niveau central et périphérique.

De manière exceptionnelle, l'infection par le PVB19 peut être associée à d'autres formes d'atteintes tissulaires. Des manifestations neurologiques, telles que méningite, encéphalite ou neuropathie transitoire, et cardiaques à type de myocardite sont ainsi décrites (2).

II. 4. 2 Infection du sujet porteur d'une pathologie de l'érythrocyte

L'infection par le PVB19 prend une forme beaucoup plus sévère chez certaines catégories de patients particulièrement susceptibles à l'action de ce virus. Parmi ces populations fragiles figurent les sujets porteurs d'une anomalie constitutionnelle de l'érythrocyte. Il s'agit des anomalies de l'hémoglobine, telles que la drépanocytose et les thalassémies, de la membrane globulaire telle que la sphérocytose héréditaire ou de l'équipement enzymatique tel que le déficit en G6PD (Glucose-6-Phosphate déshydrogénase).

Chez ces patients, l'atteinte des progéniteurs médullaires est à l'origine d'une crise d'érythroblastopénie aiguë accompagnée d'une anémie profonde et brutale (2) ou d'une aggravation significative de l'anémie sous-jacente. Cette anémie sévère est transitoire et se corrige suite au contrôle de l'infection par la réponse immunitaire. La survenue d'une telle crise en l'absence d'anomalie connue de l'érythrocyte chez le patient doit faire rechercher cette anomalie (22).

L'infection à PVB19 peut également générer une aggravation d'une anémie hémolytique chronique d'origine acquise, telle qu'une anémie hémolytique auto-immune, ou d'une anémie d'origine hémorragique ou carentielle (2).

II. 4. 3 Infection du sujet immunodéprimé

Le PVB19 est également responsable d'infections sévères chez le patient présentant un déficit immunitaire. Les sujets concernés sont notamment les patients transplantés d'organes solides, en particulier transplantés rénaux (25, 26), sous traitement immunosuppresseur, les patients receveurs d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, sous chimiothérapie (22) ou atteints de déficit immunitaire congénital (2). L'organe ou les cellules transplantés peuvent par ailleurs être le vecteur de la contamination du sujet receveur (27).

Chez le patient immunodéprimé, la multiplication virale est insuffisamment maîtrisée du fait du déficit de la réponse immunitaire spécifique, en particulier la réponse humorale exercée par les anticorps neutralisants. Cette réplication non contrôlée se traduit par l'établissement d'une virémie chronique. L'atteinte des progéniteurs a pour conséquence une érythroblastopénie profonde et persistante sur plusieurs mois ou plusieurs années associée à une anémie chronique (22), chez des patients par ailleurs susceptibles de présenter d'autres causes d'anémie.

Au-delà des manifestations hématologiques, le PVB19 pourrait se trouver impliqué chez l'immunodéprimé dans des atteintes rénales, notamment des glomérulopathies (28), et hépatiques (29, 30). Ces états pathologiques sont décrits dans le cadre de l'infection à PVB19 mais le rôle du virus demeure controversé.

II. 4. 4 Infection materno-fœtale

Dans le cas où la primo-infection par le PVB19 survient chez la femme au cours de la grossesse, la circulation du virus dans le sang maternel peut conduire à son passage transplacentaire et à l'infection du fœtus. Cette transmission materno-fœtale se produit dans un tiers des cas de primo-infection maternelle (2) et peut avoir lieu à tout stade de la grossesse (22). La mère est asymptomatique ou présente les manifestations habituelles du sujet immunocompétent.

La destruction des précurseurs érythroïdes chez le fœtus (localisés dans le foie) est à l'origine d'une anémie fœtale. Le virus détermine également une myocardite fœtale. Ces atteintes peuvent se compliquer d'une anasarque fœto-placentaire qui nécessite de pratiquer une transfusion *in utero*, sans quoi elle entraîne la mort fœtale. Le risque d'anasarque est le plus fort au second trimestre de la grossesse (22). Le PVB19 est responsable d'avortements spontanés mais n'a pas d'action tératogène si le fœtus parvient au terme (22).La mortalité chez le fœtus infecté est estimée à 9 % (2). Les signes d'atteinte fœtale sont recherchés par une surveillance échographique très régulière en cas de séroconversion chez la femme enceinte.

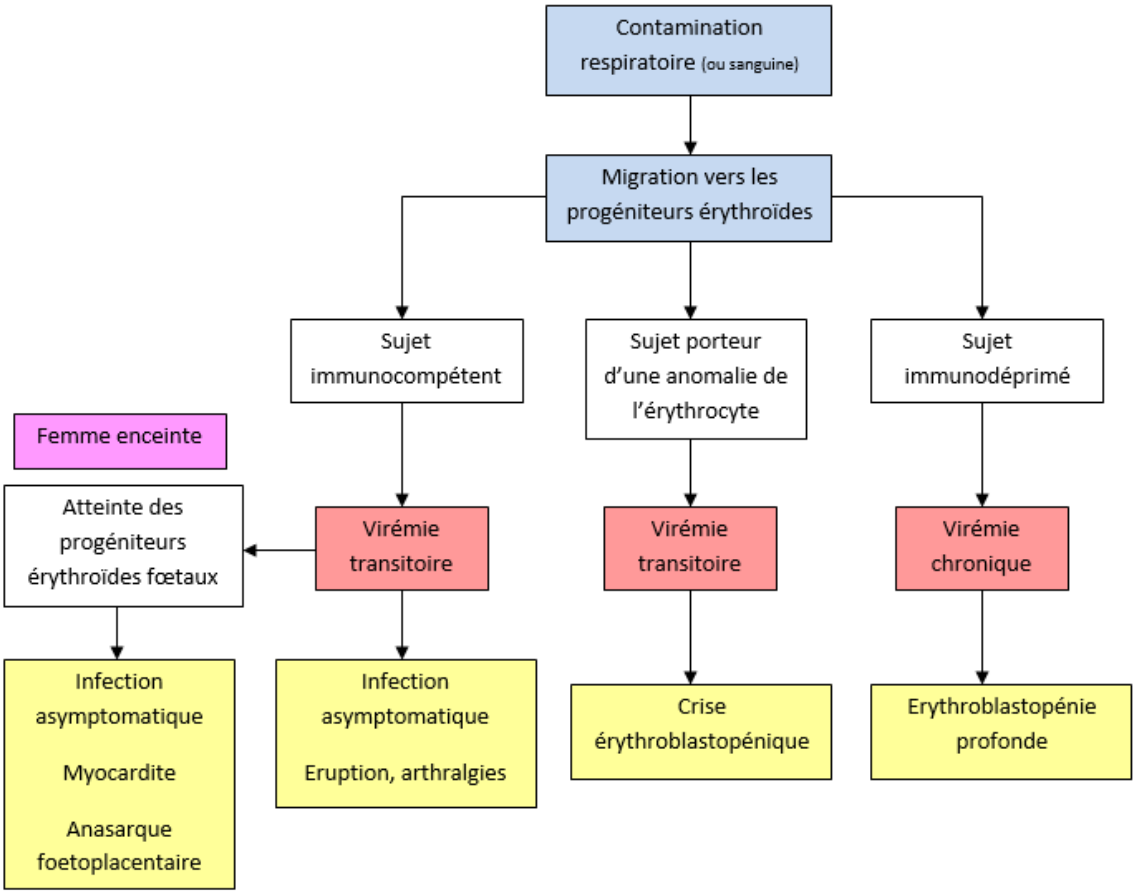


Figure 7. Evolution de l'infection par le Parvovirus B19 en fonction du sujet. D'après (2).
L'infection est bénigne et souvent asymptomatique chez le patient immunocompétent mais peut avoir des conséquences sévères chez le patient porteur d'anomalie de l'érythrocyte, immunodéprimé ou chez le fœtus.

II. 5 Diagnostic de l'infection par le Parvovirus B19

II. 5. 1 Diagnostic virologique

Le choix d'une ou de plusieurs méthodes de diagnostic virologique dépend du profil du patient, en particulier de son statut immunitaire, et du contexte clinique de la recherche d'infection à PVB19.

II. 5. 1. 1 Diagnostic indirect : Sérologie

La sérologie est la méthode de diagnostic de première intention. Elle consiste en la recherche des anticorps spécifiques dirigés contre le PVB19 et synthétisés en réponse à l'infection. Elle est réalisée sur le sérum du patient recueilli sur tube sec (sans anticoagulant). Cette détection distingue deux types d'anticorps :

- IgM (Immunoglobuline M), d'apparition précoce dès la fin de la phase de virémie et de signes aspécifiques et persistant environ deux ou trois mois (22). Les IgM sont en théorie le marqueur d'une infection récente ou active.
- IgG (Immunoglobuline G), d'apparition décalée d'environ une semaine(31) voire simultanée par rapport aux IgM et persistant toute la vie chez le sujet immunocompétent.

Le diagnostic sérologique fait appel à différentes techniques de détection et utilise comme antigènes les protéines de capside VP1 et/ou VP2 sous différentes formes qui sont les cibles des anticorps neutralisants (22).

II. 5. 1. 2 Diagnostic direct

Le diagnostic direct correspond à une mise en évidence du virus sur un prélèvement biologique.Il peut compléter ou remplacer le diagnostic sérologique dans certaines situations telles que l'infection chez l'immunodéprimé ou le diagnostic de l'infection fœtale et peut également apporter une aide à l'interprétation de la sérologie. Il est indépendant de la réponse immunitaire du patient.

Prélèvements

Le diagnostic direct peut être réalisé sur différents milieux biologiques. Lors de la phase virémique, le virus peut être détecté dans le sérum ou le sang total du patient, recueillis respectivement sur tube sec ou tube EDTA (22). Le PVB19 peut également être recherché sur la moelle osseuse, site de persistance du virus, pour affirmer son implication dans un épisode d'érythroblastopénie. La détection du virus est pratiquée sur le liquide amniotique ou le liquide d'ascite fœtal suite à une amniocentèse pour faire le diagnostic d'une infection fœtale en cas de signes échographiques évocateurs. Enfin, le PVB19 peut être recherché sur le liquide céphalo-rachidien (LCR) en cas de manifestations neurologiques ou sur des biopsies.

Détection de l'ADN viral par PCR

La technique essentielle du diagnostic direct est la recherche du génome viral par PCR en temps réel, qui consiste en une extraction des acides nucléiques du prélèvement suivie d'une amplification d'un fragment du génome viral (codant pour les protéines de capside (2)) par des amorces spécifiques couplée à une détection par l'émission d'un signal. Cette analyse peut donner un résultat qualitatif mais certaines techniques de PCR permettent également une quantification de la charge virale dans le sang ou le sérum. Le nombre de cycles d'amplification nécessaire à la détection du signal (Ct : *Cycle threshold*) est en effet relié à la quantité d'ADN présent dans le prélèvement par une courbe d'étalonnage utilisant une fonction logarithmique. Cette charge virale est exprimée selon un standard international en unités internationales par millilitre (UI/mL) (22).

Compte tenu de la variabilité génétique du PVB19 caractérisant trois génotypes, les outils de diagnostic moléculaire ne permettent pas tous une détection (et une quantification) correcte des génotypes 2 et 3 (19). Des amorces consensus, communes aux trois génotypes, existent (22) mais certaines techniques de PCR utilisent des amorces spécifiques à chaque génotype (9).

Les techniques de PCR se caractérisent par une excellente sensibilité, avec un seuil de détection dans le sérum de l'ordre de 10 particules virales par mL (2), et ne font pas l'objet de réactions croisées avec d'autres agents infectieux. En revanche, la mise en évidence du virus sur un prélèvement ne témoigne pas nécessairement de son implication dans un processus infectieux et son rôle dans l'atteinte clinique reste soumis à interprétation.

Autres méthodes de diagnostic direct

L'isolement du virus en culture peut être obtenu par inoculation de prélèvements de sérum ou de moelle osseuse de patients infectés sur des cellules de moelle osseuse humaine issues de donneurs sains (3). Cette technique lourde et délicate est réservée à des laboratoires très spécialisés et n'a pas de place dans le diagnostic virologique.

La mise en évidence du PVB19 dans les prélèvements par immuno-microscopie électronique n'est pas utilisée en pratique courante (2), de même que l'hybridation *in situ* (22).

II. 5. 2 Diagnostic hématologique : le myélogramme

En parallèle au diagnostic virologique, l'examen cytologique de la moelle osseuse participe également au diagnostic dans les cas d'anémies sévères, principalement chez l'immunodéprimé et le sujet atteint d'anémie chronique.

Lors d'une infection sévère par le PVB19, le myélogramme fait apparaître une hypoplasie majeure voire une absence de la lignée érythroblastique (32). Cette érythroblastopénie est associée à des anomalies morphologiques de la lignée (Figure 8). On observe ainsi des proérythroblastes de grande taille (diamètre de 25 à 32 mm (2)) présentant des inclusions nucléaires éosinophiles et des vacuoles cytoplasmiques. Ces anomalies sont pathognomoniques de l'infection à PVB19 (2).

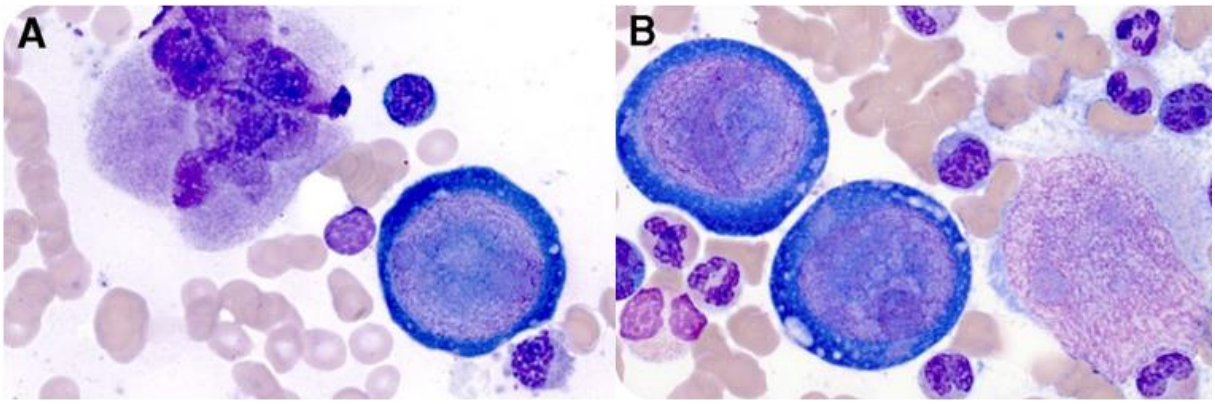


Figure 8. Aspect cytologique de l'infection à Parvovirus B19 sur un frottis médullaire (32).
Coloration de May Grünwald-Giemsa (MGG), Objectif x100. Le frottis montre des proérythroblastes géants présentant des inclusions nucléaires et des vacuoles cytoplasmiques.

III. SEROLOGIE DU PARVOVIRUS B19

III. 1 Objectifs

La sérologie du PVB19 à la recherche des IgM et IgG constitue l'outil central du diagnostic. Elle entre en jeu dans les différentes formes de l'infection et peut orienter vers la réalisation d'autres méthodes de diagnostic.

La sérologie est l'examen essentiel pour établir la responsabilité du PVB19 dans le cas de l'infection symptomatique de l'immunocompétent. Elle est donc fréquemment prescrite dans un contexte de manifestations éruptives, majoritairement chez l'enfant mais aussi chez l'adulte, voire de syndrome viral aspécifique. Cette analyse est également pratiquée dans le cadre d'un bilan étiologique d'arthralgies.

La sérologie est également l'examen privilégié dans les cas d'aggravation d'anémie et d'érythroblastopénie aiguë chez les patients atteints d'anémie hémolytique chronique, constitutionnelle ou acquise, afin de documenter l'implication du virus. Chez le patient immunodéprimé présentant une anémie sévère ou chronique, bien que la sérologie soit moins contributive en raison du déficit de la réponse immunitaire humorale et de la diminution des taux d'anticorps, elle est généralement pratiquée en association au diagnostic direct qui est plus sensible dans un tel contexte. Ces situations demeurent beaucoup moins fréquentes que la recherche de l'infection chez le patient immunocompétent.

Le dépistage de l'infection à PVB19 au cours de la grossesse n'est pas systématique. La sérologie est prescrite chez la femme enceinte en cas de symptômes évocateurs chez cette dernière, en particulier les arthralgies, de notion de contage récent par contact avec un sujet infecté ou présentant des signes d'infection ou en présence d'anomalies fœtales lors d'une échographie systématique. Les résultats de la sérologie pourront conduire à la mise en place d'un contrôle échographique et au recours à des prélèvements invasifs en vue du diagnostic direct.

III. 2 Modalités techniques

La sérologie est réalisée sur le sérum ou le plasma du patient (33, 34) recueilli par prélèvement de sang veineux respectivement sur tube sec ou tube EDTA, puis centrifugation. La législation impose au laboratoire de congeler un aliquote du prélèvement dans une sérothèque et de le conserver au moins un an. Le diagnostic sérologique peut par ailleurs être effectué sur un échantillon de sang fœtal (31).

Différentes techniques immunologiques sont utilisées pour la détection des anticorps de type IgM ou IgG spécifiques du PVB19 :

- Méthode immunoenzymatique ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) (31)
- Immunochimiluminescence (CLIA, *ChemoLuminescence ImmunoAssay*) (33)
- Immunofluorescence (31)

Ces techniques utilisent des antigènes comme cibles destinées à réagir avec les anticorps du patient (Figure 9). Il s'agit des protéines structurales VP1 et/ou VP2 sous forme d'antigènes viraux purifiés ou, le plus souvent, de protéines recombinantes produites en biotechnologie par un *Baculovirus* (31). Les méthodes de type ELISA et chimiluminescence sont automatisables et adaptées à l'analyse en série. Dans le cas d'une méthode automatisée, le système de détection génère un signal quantitatif qui sera considéré en fonction de seuils définis comme une réaction négative, douteuse ou positive.

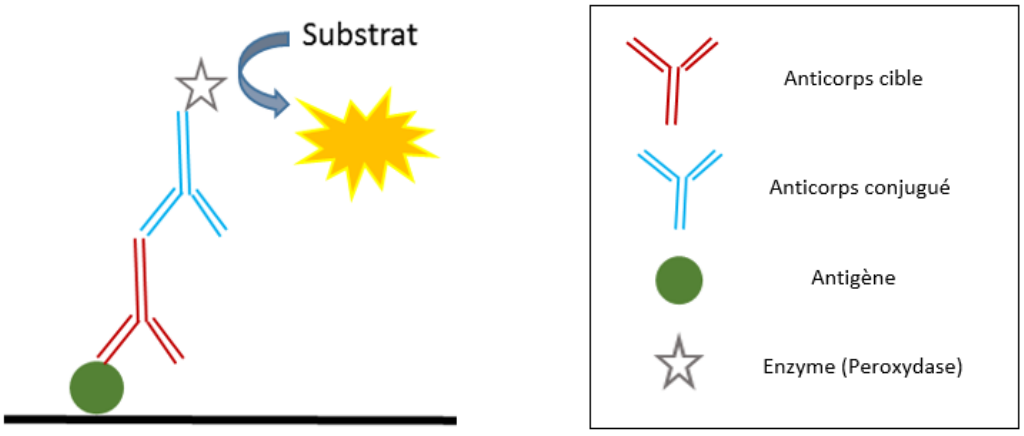


Figure 9. Principe d'une technique ELISA indirecte (35). L'anticorps cible est capté par un antigène fixé sur une phase solide. Après lavage, il est révélé par fixation d'un anticorps conjugué (anti-IgG ou IgM) couplé à une activité enzymatique permettant la mesure d'un signal colorimétrique.

III. 3 Performances diagnostiques

Les techniques de sérologie du PVB19 présentent une excellente sensibilité. Selon les données du fournisseur de la technique d'immunoluminescence, elle s'établit à 93 % et 100 % pour la détection des IgM sur deux études de performance (33) et à 99,5 % pour les IgG (34).

Ces données commerciales affichent également une spécificité très élevée, évaluée à 99,2 % dans le cas des IgM (33) et 99,1 % dans le cas des IgG (34).

III. 4 Interférences et réactivité non spécifique

D'après les études d'influence de différents facteurs liés au prélèvement, la détection des anticorps du PVB19 (technique CLIA) ne présente pas d'interférence avec l'hémolyse, l'ictère ou la lipémie du sérum aux niveaux rencontrés sur les échantillons cliniques (33).

Des réactions non spécifiques sont en revanche décrites pour la détection des IgM. Elles s'observent avec des anticorps dirigés contre d'autres virus ou agents infectieux ainsi que des auto-anticorps produits dans des cas de pathologies du système immunitaire. Les agents pathogènes le plus fréquemment à l'origine de ces réactions sont les virus de la famille des *Herpesviridae*, en particulier le CMV (Cytomégalovirus) et l'EBV (*Epstein-Barr* Virus). Une interférence est également décrite avec le virus de la rubéole (33). Ces micro-organismes sont en outre responsables de manifestations cliniques similaires à celles de l'infection par le PVB19, en particulier l'éruption cutanée.

Les marqueurs d'auto-immunité impliqués sont le facteur rhumatoïde, présent dans diverses pathologies auto-immunes dont la polyarthrite rhumatoïde, et les auto-anticorps antinucléaires, marqueurs de lupus (33). Les atteintes cliniques de ces affections peuvent s'apparenter aux symptômes articulaires causés par le PVB19.

Ces réactions non spécifiques sont donc des sources de fausse positivité des IgM du PVB19. Le fournisseur de la technique CLIA ne renseigne pas de données concernant la valeur prédictive positive (VPP) de l'analyse, qui correspond à la probabilité de présence de la pathologie recherchée en cas de test positif. Aucune réactivité non spécifique n'est en revanche décrite pour la détection des IgG (34).

III. 5 Interprétation des résultats

L'interprétation de la sérologie du PVB19 est basée sur la présence ou l'absence des anticorps de type IgM ou IgG.

L'absence de tout anticorps indique une absence d'infection par le PVB19. Cependant, la sérologie peut être négative en cas de contact récent avec le virus, les IgM apparaissant 12 à 14 jours après la contamination (31). Un contrôle de la sérologie sur un nouveau prélèvement à environ deux semaines d'intervalle est alors nécessaire. C'est le cas lors d'une recherche précoce, au cours de la phase de syndrome pseudo-grippal. Les IgM sont en revanche présentes lors de l'apparition des symptômes cutanés ou articulaires.

Les anticorps IgG sont le marqueur du contact avec le PVB19 au cours de la vie et de l'immunisation contre le virus. La présence isolée des IgG témoigne d'une infection ancienne et écarte *a priori* la possibilité d'une primo-infection. Chez le nourrisson de moins de six mois, la présence d'IgG correspond vraisemblablement à des anticorps transmis par la mère au cours de la vie fœtale qui disparaîtront dans les mois suivants.

Les IgM sont en théorie le marqueur d'une infection active par le PVB19. La présence d'IgM en l'absence d'IgG est en faveur d'une primo-infection. Une nouvelle sérologie après environ une semaine doit, dans ce cas, montrer l'apparition des IgG. La mise en évidence d'IgM et IgG associées évoque une infection active, qui peut être une infection récente ou chronique. Dans les deux cas, la positivité des IgM peut résulter d'une stimulation polyclonale du système immunitaire provoquée par un autre agent infectieux ou d'une fausse réactivité liée à une interférence.

En pratique, la présence d'IgM, isolées ou associées aux IgG, est source de difficultés d'interprétation. En raison des nombreuses réactivités non spécifiques et des interférences, la positivité du test n'est pas toujours associée à une véritable infection active par le PVB19. Une aide à l'interprétation peut être apportée par une seconde sérologie à la recherche d'une séroconversion IgG ou par le recours à la recherche du génome viral par PCR. La valeur de l'indice de réactivité mesuré pour une technique automatisée est également prise en considération. Enfin, le contexte clinique du patient est pris en compte pour évaluer la concordance avec une infection à PVB19.

L'interprétation de la sérologie en fonction des résultats est résumée dans le Tableau I.

Tableau I. Interprétation des résultats de la sérologie du Parvovirus B19

<table>
<tr><td colspan="2"></td><td colspan="3">IgG</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td>NEG</td><td colspan="2">POS</td></tr>
<tr><td rowspan="3">IgM</td><td rowspan="2">NEG</td><td rowspan="2">Absence d’infection
(ou contage datant de moins de 2 semaines)</td><td>Age
> 6 mois</td><td>Infection ancienne
Patient immunisé</td></tr>
<tr><td>Age
≤ 6 mois</td><td>Anticorps d’origine maternelle</td></tr>
<tr><td>POS</td><td>Primo-infection

Stimulation polyclonale

Fausse réactivité IgM</td><td colspan="2">Infection active (récente ou chronique)

Stimulation polyclonale

Fausse réactivité IgM</td></tr>
</table>

IV. OBJECTIFS DE L'ETUDE

IV. 1 Contexte de l'étude

Comme rapporté précédemment, la positivité des IgM du PVB19 est d'interprétation délicate. L'observation des résultats de sérologie dans l'exercice professionnel au laboratoire permet d'appréhender le manque de fiabilité de cette analyse, pourtant essentielle au diagnostic. Au Laboratoire de Virologie du CHU de Poitiers, afin d'aider à l'interprétation, la recherche de l'ADN du PVB19 par PCR dans le sérum est systématiquement ajoutée en cas de première positivité des IgM chez un patient. La positivité relativement peu fréquente de cette recherche confirme les doutes sur la pertinence de la détection d'IgM. Il est en outre observé de nombreux cas dans lesquels l'indice de détection des IgM est très faiblement supérieur au seuil de positivité. Cette situation met en avant l'intérêt d'une évaluation plus précise et plus approfondie de la valeur à donner à la mise en évidence d'IgM du PVB19.

IV. 2 Objectifs

Dans ce contexte, il a été décidé de procéder à une étude dont les objectifs étaient les suivants :

- Tout d'abord, l'étude visait à fournir une estimation de la proportion de véritables cas d'infection à PVB19 parmi les cas de positivité des IgM en utilisant la détection du génome viral sur le sérum comme critère de preuve de l'infection. La pertinence de ce critère sera discutée en conclusion de l'étude.

- L'objectif de l'étude était également d'évaluer différents critères virologiques et cliniques et paramètres biologiques pour définir lesquels sont en faveur d'une véritable infection par le PVB19 devant la présence d'IgM.

- L'indice quantitatif des IgM a également été évalué afin de proposer, si les résultats le permettaient, une stratification de la probabilité d'infection à PVB19 en fonction de cet indice.

- Enfin, l'étude recherchait une possible explication à la fausse positivité des IgM anti-PVB19 en recensant la présence concomitante chez le patient d'IgM dirigées contre d'autres virus et de marqueurs sérologiques ou moléculaires d'autres agents infectieux.

V. PATIENTS ET METHODES

V. 1 Sélection des patients

L'étude a été menée de manière rétrospective en sélectionnant les patients retrouvés positifs pour les IgM du PVB19 au CHU de Poitiers (Figure 10) sur une période de 30 mois du 1er novembre 2015 au 30 avril 2018. La date retenue pour l'inclusion dans l'étude était celle de l'obtention du résultat de la sérologie. La recherche du PVB19 par PCR sur le sérum avait été ajoutée de manière automatique dans chaque cas de positivité des IgM. Il s'est cependant avéré que pour certains patients, en particulier au cours des premiers mois de la période de recueil, cette détection par PCR n'avait pas été effectuée. Un résultat de PCR étant indispensable à la catégorisation des cas, ces patients n'ont pas été inclus dans l'étude.

Les prélèvements provenant de patients de centres hospitaliers périphériques analysés au CHU de Poitiers n'ont pas été inclus. L'ajout de la recherche génomique n'est en effet pas systématique chez ces patients et les renseignements cliniques nécessaires à l'étude n'étaient pas disponibles.

Les dossiers d'analyse entrant dans le cadre de l'étude ont été recueillis par extraction à partir du système informatique du laboratoire (SIL, GLIMS® au CHU de Poitiers) au moyen de filtres de résultats. Les cas de résultat douteux pour les IgM du PVB19 n'ont pas été pris en compte dans l'étude en raison de l'absence de filtre permettant la sélection de ce type de résultat. Lorsque plusieurs résultats successifs de sérologie du PVB19 étaient disponibles, seule la première positivité pour les IgM a été retenue.

Une période de recueil de deux ans était initialement envisagée mais le nombre de patients retenus sur cet intervalle de temps (inférieur à 100) étant jugé insuffisant, le recueil a été étendu à une période de six mois supplémentaires. Pour chaque patient inclus, l'âge (au moment de la détection des IgM), le sexe et la présence d'une grossesse en cours chez la femme ont été enregistrés.

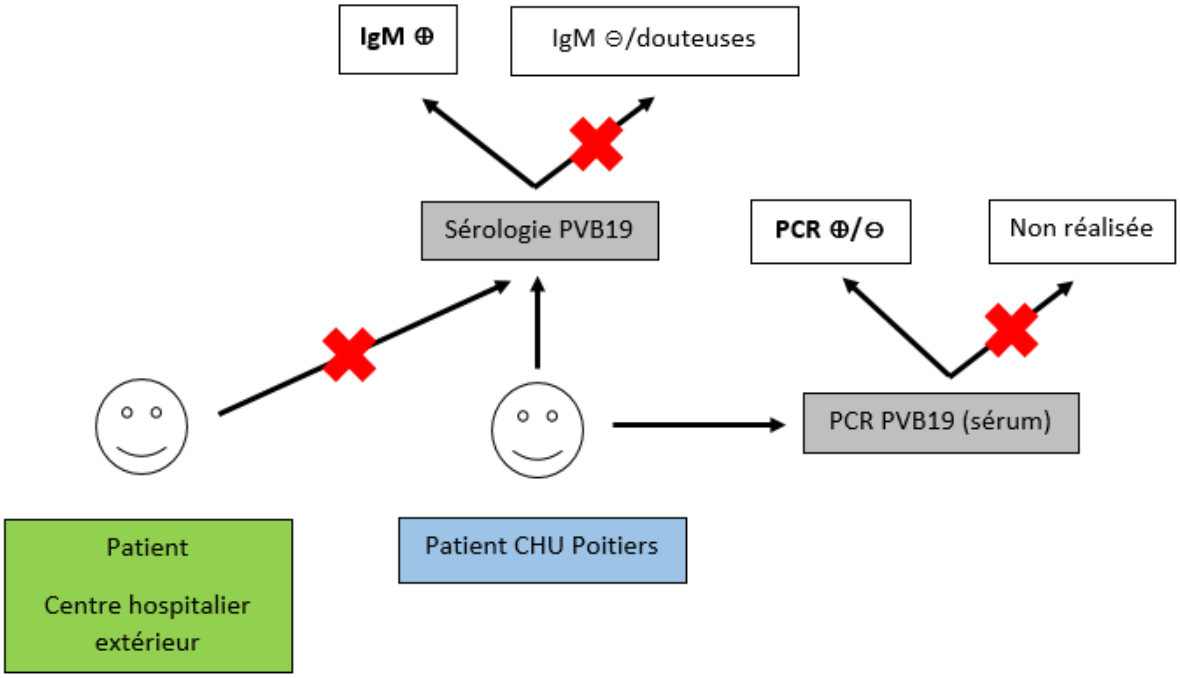


Figure 10. Critères d'inclusion des patients dans l'étude. Ont été inclus les patients du CHU de Poitiers pour lesquels les IgM du PVB19 étaient positives et un résultat de PCR était disponible. Les croix rouges symbolisent les critères d'exclusion.

V. 2 Méthodologie de l'étude

Pour chaque patient inclus dans l'étude, une série de paramètres est renseignée, si l'information est disponible dans le cas concerné.

Les données biologiques sont extraites du système informatique du laboratoire GLIMS® (société MIPS®, Gand, Belgique). Les données cliniques et concernant le statut physiologique et pathologique du patient sont obtenues par consultation des courriers et compte-rendu d'hospitalisation et de consultation par l'intermédiaire du logiciel informatique de gestion des dossiers de patients TELEMAQUE®.

Les signes cliniques sont pris en compte s'ils sont mis en évidence lors de l'hospitalisation ou de la consultation au cours de laquelle est réalisée la sérologie du PVB19, qu'ils soient présents à l'admission du patient ou apparaissent au cours du séjour. Les paramètres biologiques sont enregistrés de préférence à partir d'un prélèvement réalisé le même jour que celui destiné à la sérologie et, à défaut, dans un intervalle maximal de cinq jours précédant ou cinq jours suivant le prélèvement de la sérologie du PVB19.

V. 2. 1 Paramètres communs à l'ensemble des patients

Ces informations sont recherchées, et renseignées si disponibles, pour la totalité des patients de l'étude, indépendamment du résultat de la détection par PCR. Il s'agit des paramètres suivants :

Paramètres sérologiques et virologiques :

Ces données sont disponibles pour la totalité des patients de l'étude.

- **Valeur numérique de l'indice de réactivité des IgM du PVB19**
- **Résultat de la détection des IgG du PVB19** (Positif/Négatif/Douteux)
- **Résultat de la détection de l'ADN du PVB19 par PCR dans le sérum** (Positif/Négatif), utilisé comme critère de preuve d'une véritable infection par le PVB19. Cette analyse est réalisée sur le même prélèvement que la sérologie. Dans le cas où une quantification de la charge virale est effectuée, seul le résultat qualitatif (positivité) de la PCR est considéré.

Paramètres cliniques :

- **Présence d'une éruption cutanée**, signe clinique le plus fréquent chez l'enfant
- **Présence d'arthralgies**, signe clinique le plus fréquent chez l'adulte

Paramètres biologiques :

- **Présence d'une anémie**, caractérisée par une valeur de l'hémoglobine inférieure aux valeurs normales définies pour l'âge et le sexe. Lorsqu'une (ou plusieurs) autre(s) étiologie(s) d'anémie est (sont) présente(s) chez le patient, elle(s) est (sont) recensée(s). Cette information permet également de relever chez les patients la présence d'une pathologie constitutive de l'érythrocyte.
- **Valeur numérique de l'hémoglobine** (g/dL)
- **Numération des leucocytes** (G/L)
- **Numération des plaquettes** (G/L)
- **Numération des réticulocytes** (G/L)
- **Valeur de la créatinine** (µmol/L), marqueur d'une potentielle atteinte rénale
- **Valeur de l'activité enzymatique des ALAT** (Alanine Aminotransférase, UI/L), marqueur d'une potentielle atteinte hépatique.Ce paramètre est choisi car l'atteinte virale au niveau du foie s'exprime davantage par une cytolyse que par une cholestase et en raison d'une meilleure spécificité hépatique de la lyse cellulaire par rapport à l'activité des ASAT (Aspartate Aminotransférase).

Paramètre du statut pathologique du patient :

- **Présence d'une immunodépression**. Si elle est présente, le motif de l'immunodépression est enregistré. La prématurité chez le nourrisson est considérée comme une forme d'immunodépression.

V. 2. 2 Paramètres additionnels selon le résultat de la PCR

V. 2. 2. 1 Paramètres étudiés en cas de PCR positive

Dans le cas où la recherche du génome du PVB19 dans le sérum est positive, attestant d'une véritable infection par ce virus, les manifestations cliniques autres que l'éruption cutanée, les arthralgies ou le retentissement d'une anémie sont répertoriées.

V. 2. 2. 2 Paramètres étudiés en cas de PCR négative

Dans le cas où la détection du génome du PVB19 est négative, des paramètres complémentaires sont renseignés, si disponibles, afin de rechercher une origine possible de la fausse positivité des IgM du PVB19.

- **Résultat de la détection des IgM anti-VCA** (IgM dirigées contre l'EBV)
- **Résultat de la détection des IgM du CMV**
- La présence d'IgM ou de marqueur sérologique d'infection active dirigés contre un autre virus ou un autre agent infectieux est également recensée, ainsi que la détection directe d'un agent pathogène par technique moléculaire. La présence isolée d'IgG pour un micro-organisme n'est pas prise en compte.

V. 3 Techniques d'analyse

V. 3. 1 Technique de détection des IgM

La détection des IgM spécifiques du PVB19 est réalisée par une méthode *sandwich* de capture d'anticorps couplée à une révélation par immunoluminométrie (CLIA) (33). Elle est effectuée par l'automate d'immunoanalyse LIAISON® XL (société Diasorin®, Saluggia, Italie).

Cette technique utilise un anticorps monoclonal murin dirigé contre les IgM humaines fixé sur des particules magnétiques qui constituent la phase solide et un antigène correspondant à la protéine recombinante VP2 lié à un dérivé de l'isoluminol (antigène conjugué). Une première incubation met en présencele sérum du patient et les anticorps anti-IgM, qui vont fixer les IgM anti-PVB19 si elles sont présentes. Une seconde incubation fait réagir l'antigène conjugué avec les IgM anti-PVB19 du patient liées à la phase solide. A la fin de chaque incubation, un cycle de lavage permet d'éliminer le matériel non lié (33).

La révélation s'opère par l'ajout dans le milieu réactionnel d'un réactif d'induction (« starter ») qui déclenche la réaction de chimiluminescence. Le signal lumineux généré, dépendant de la quantité de conjugué antigène-isoluminol et donc d'IgM fixées, est mesuré par un photomultiplicateur. Ce signal est exprimé en unités relatives de luminescence (RLU, *relative light units*). Le résultat est considéré comme positif lorsque cette valeur est strictement supérieure à 1, douteux entre 0,9 et 1 et négatif lorsque la valeur est strictement inférieure à 0,9 (36).

Le mode opératoire de la sérologie du PVB19 utilisé au CHU de Poitiers est présenté en Annexe 1.

V. 3. 2 Technique de détection des IgG

La détection des IgG spécifiques du PVB19 est réalisée par une méthode *sandwich* indirecte couplée à l'immunoluminométrie (34), également effectuée par l'automate LIAISON® XL.

Le principe est similaire à celui de la détection des IgM, à la différence que l'antigène recombinant VP2 est fixé sur les particules magnétiques (phase solide) et un anticorps monoclonal murin dirigé contre les IgG humaines est lié au dérivé de l'isoluminol (anticorps conjugué). La première incubation correspond à la réaction entre les IgG anti-PVB19, si présentes, et l'antigène puis la seconde incubation permet la fixation de l'anticorps conjugué sur les IgG humaines. Le principe de la phase de révélation par chimiluminescence est identique à celui mis en œuvre pour la détection des IgM (34). Les seuils de positivité et négativité sont également identiques (36).

V. 3. 3 Technique de détection de l'ADN viral par PCR

La détection de l'ADN du PVB19 est réalisée par extraction du génome viral puis amplification par une technique de PCR en temps réel utilisant la trousse RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics®, Hambourg, Allemagne) (37). Le mode opératoire de la PCR du PVB19 utilisé au CHU de Poitiers est présenté en Annexe 2.

Extraction des acides nucléiques

Une étape de lyse cellulaire est initialement pratiquée par mélange de l'échantillon avec un tampon de lyse. Un contrôle interne fourni dans la trousse de PCR est ajouté au mélange au cours de cette étape. Il permettra de s'assurer de la bonne réalisation de l'extraction et de l'absence d'inhibiteurs de la PCR. Le protocole d'extraction s'effectue ensuite sur l'automate NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux®, Marcy-l'Etoile, France) ou, en recours, sur l'automate MagNA Pure Compact (Roche Life Science®, Penzberg, Allemagne) (38).

Amplification

L'échantillon d'éluat issu de l'extraction des acides nucléiques est mis en contact avec un mélange (Mastermix) des deux mélanges d'amplification A et B (Master A et Master B) de la trousse qui contiennent le tampon d'amplification, l'enzyme (ADN-polymérase) et les amorces et sondes spécifiques pour la détection de l'ADN du PVB19 et du contrôle interne. Les amorces du kit RealStar® permettent la détection des trois génotypes du virus (38). Le contrôle interne est utilisé en parallèle de l'échantillon comme contrôle négatif. Les étalons fournis dans la trousse sont utilisés comme contrôle positifs.

Le programme de PCR en temps réel est effectué par le thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad®, Hercules, Californie, Etats-Unis) ou 7500 Fast (Applied Biosystems®, Foster City, Californie, Etats-Unis) (38). Il débute par une séquence de 10 minutes à 95 °C suivie de 45 cycles de 15 secondes à 95 °C et une minute à 58 °C (37, 38). Les sondes spécifiques du PVB19 et du contrôle interne sont marquées par un fluorochrome (FAM™ pour PVB19 et JOE™ ou VIC™ pour le contrôle interne). L'instrument de PCR est couplé à un système de spectrofluorimétrie qui détecte l'amplification de la cible en temps réel suite à l'émission d'une fluorescence spécifique lors de la dégradation de la sonde par élongation de la séquence d'ADN, libérant le fluorochrome inhibé par un « accepteur » (« quencher ») sur la sonde intacte.

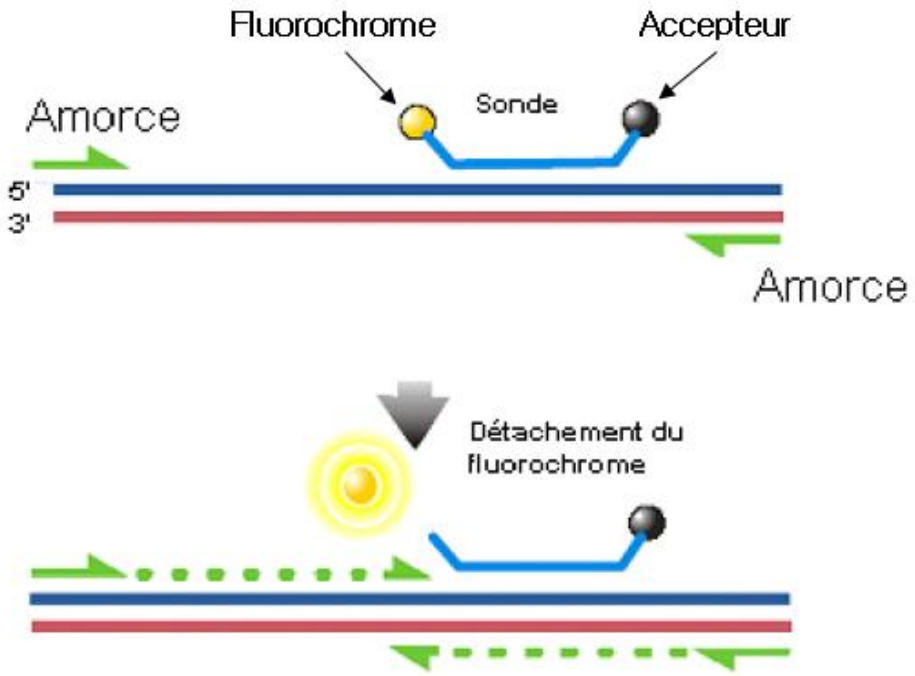


Figure 11. Principe de la détection par fluorescence de l'amplification d'une cible de PCR. D'après (39). La sonde spécifique hybridée sur la séquence cible porte un fluorochrome et un accepteur de photons (« quencher ») qui inhibe l'émission de fluorescence. L'élongation de l'amorce spécifique entraîne la dégradation de la sonde et la séparation du fluorochrome et de l'accepteur, à l'origine d'un signal de fluorescence.

Validation et interprétation

Chaque mise en évidence d'un ADN cible (viral ou contrôle interne) génère une valeur de Ct, correspondant au nombre de cycles nécessaires à la détection du signal de fluorescence. Une positivité de l'ADN du PVB19 est considérée valide (dans le cas d'une détection qualitative). En cas d'absence de signal associé au PVB19, le Ct du contrôle interne dans l'échantillon ne doit pas excéder de plus de trois cycles le Ct du contrôle interne dans le contrôle négatif pour valider la négativité de l'échantillon pour l'ADN du PVB19 (38). Si cette condition n'est pas vérifiée, la présence d'inhibiteurs de PCR est suspectée et l'amplification est renouvelée à partir d'un extrait dilué. Si le résultat de l'échantillon n'est toujours pas valide à l'issue de cette seconde amplification, il est considéré ininterprétable.

V. 4 Exploitation statistique des résultats

Les résultats observés pour les paramètres définis pour la population étudiée sont saisis dans une feuille de calcul du logiciel Excel®. Les fonctions de calcul sont utilisées pour déterminer différents indicateurs.

Dans tous les cas, N désigne le nombre de sujets de l'effectif pris en compte pour le calcul d'un indicateur.

Les tests de comparaison statistique et les calculs associés sont effectués par l'intermédiaire du logiciel GraphPad Prism® (GraphPad Software®, La Jolla, Californie, Etats-Unis). Pour tous les tests, la valeur seuil du degré de signification p est fixée à 0,05.

V. 4. 1 Paramètres qualitatifs

Dans le cas des paramètres qualitatifs, la valeur statistique calculée est une proportion. La valeur de l'indice de réactivité IgM est exploitée comme paramètre qualitatif par définition de trois classes de valeurs.

- Détermination de la **proportion de positivité de la PCR PVB19** sur les effectifs de patients suivants :
  - Population totale
  - Patients adultes / Patients pédiatriques
  - Patients de sexe masculin / Patients de sexe féminin
  - IgG positives / IgG négatives ou douteuses
  - Indice IgM [1,1 – 2] / Indice IgM [2,1 – 4] / Indice IgM > 4
  - Patients avec éruption cutanée / Patients sans éruption cutanée
  - Patients adultes avec arthralgies / Patients adultes sans arthralgies
  - Patients avec anémie / Patients sans anémie
  - Patients immunodéprimés / Patients non immunodéprimés

  Dans chacun des cas, les proportions des deux groupes opposés sont comparées au moyen d'un test de Chi-2 (χ^2).

- Détermination de la **proportion de manifestations cliniques observées de manière récurrente** sur la population de patients avec PCR PVB19 positive.

- Détermination de la **proportion d'IgM anti-VCA positives ou douteuses** et de la **proportion d'IgM CMV positives ou douteuses** sur la population de patients avec PCR PVB19 négative.

V. 4. 2 Paramètres quantitatifs

Dans le cas des paramètres biologiques quantitatifs, la plage de valeurs donne lieu au calcul de la moyenne, l'écart-type et la médiane. Ces indicateurs sont déterminés sur la population de patients avec PCR PVB19 positive et la population de patients avec PCR négative pour les paramètres suivants :

- Hémoglobine
- Leucocytes
- Plaquettes
- Réticulocytes
- Créatinine
- Activité enzymatique ALAT

Pour chacun des paramètres, la moyenne des deux populations de patients est comparée au moyen d'un test t de Student.

VI. RESULTATS

VI. 1 Description de l'effectif

L'application des critères de sélection définis a déterminé un effectif total de 138 patients. Cette population comprend 75 sujets de sexe masculin et 63 sujets de sexe féminin dont 10 femmes enceintes. L'échantillon regroupe également 71 patients adultes et 67 patients pédiatriques définis par un âge inférieur à 15 ans.

Le nombre total de patients du CHU de Poitiers positifs pour les IgM du PVB19 au cours de la période étudiée était de 167, parmi lesquels 29 patients ont été exclus de l'étude en raison de l'absence de résultat de PCR sérique du virus.

La composition démographique de la population étudiée est récapitulée dans le Tableau II.

Tableau II. Composition de la population de patients de l'étude

	Sexe masculin	**Sexe féminin sans grossesse**	**Femmes enceintes**	**Total**
Patients adultes	30	31	10	71
Patients pédiatriques	45	22		67
Total	75	63		**138**

VI. 2 Statistiques de positivité de la PCR

VI. 2. 1 Statistiques globales

Taux global de positivité de la PCR

La détection par PCR du PVB19 dans le sérum est positive pour 35 patients parmi l'effectif (N) de 138 patients. Le taux de positivité de la PCR sur l'ensemble de la population étudiée est donc de **25 %**.

Répartition chronologique des cas d'infection

La répartition mensuelle des cas de patients inclus sur la période étudiée est présentée dans la Figure 12. Cette répartition affichée présente un biais du fait de l'absence dans l'étude des cas de positivité des IgM du PVB19 pour lesquels aucun résultat de PCR n'était disponible, qui sont beaucoup plus fréquents sur les six premiers mois de l'étude et très exceptionnels sur les six derniers mois.

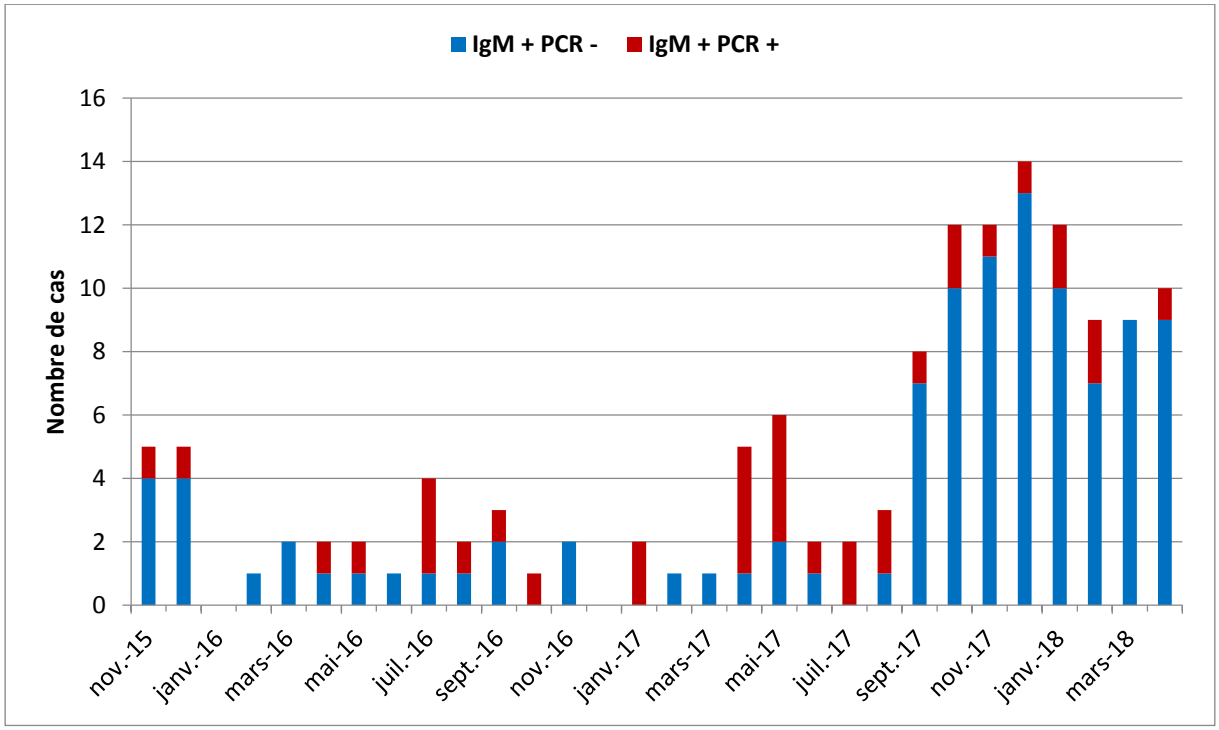


Figure 12. Répartition mensuelle des cas de positivité des IgM et de la PCR du Parvovirus B19

VI. 2. 2 Critères démographiques

Taux de positivité selon le sexe

Le taux de positivité de la PCR est de **20 %** pour les patients de sexe masculin (N = 75) et de **32 %** pour les patients de sexe féminin (N = 63). La différence entre ces deux proportions n'est pas statistiquement significative.

Taux de positivité selon la classe d'âge

Le taux de positivité de la PCR est de **25 %** pour la population de patients adultes (Age ≥ 15 ans ; N = 71) et de **25 %** pour la population de patients pédiatriques (Age < 15 ans ; N = 67). Cette proportion est donc identique dans les deux groupes de patients.

VI. 2. 3 Présence d'IgG

La détection des IgG spécifiques du PVB19 donne un résultat positif pour 68 patients de l'étude, négatif pour 68 patients et douteux pour 2 patients. Pour évaluer la relation entre la présence d'IgG et la positivité de la PCR, les résultats douteux ont été regroupés avec les résultats négatifs.

Le taux de positivité de la PCR du PVB19 est de **43 %** pour la population de cas d'IgG positives (N = 68) et de **8,6 %** pour la population de cas d'IgG négatives ou douteuses (N = 70). La différence entre ces deux valeurs est significative ($p < 0,0001$).

VI. 2. 4 Répartition en fonction de l'indice de réactivité IgM

La détection des IgM du PVB19 est considérée positive pour toute valeur de l'indice de réactivité strictement supérieure à 1. La population de patients de l'étude est répartie en trois classes en fonction de la valeur de cet indice.

- Valeur de l'indice comprise entre 1,1 et 2 (N = 89 patients)
  Le taux de positivité de la PCR est de **13 %**.
- Valeur de l'indice comprise entre 2,1 et 4 (N = 26)
  Le taux de positivité de la PCR est de **23 %**.
- Valeur de l'indice supérieure à 4 (N = 23)
  Le taux de positivité de la PCR est de **74 %**.

VI. 2. 5 Présence d'une éruption cutanée

La présence d'une éruption cutanée est observée pour 45 patients de l'étude, parmi lesquels 28 patients pédiatriques et 17 patients adultes.

Le taux de positivité de la PCR du PVB19 est de **20 %** pour la population de patients présentant une éruption cutanée (N = 45) et de **26 %** pour la population de patients ne présentant pas d'éruption cutanée (N = 88). La différence entre ces deux valeurs n'est pas significative.

VI. 2. 6 Présence d'arthralgies

L'exploitation statistique de la présence d'arthralgies a été limitée à la population de patients adultes de l'étude en raison de la très faible fréquence d'observation de ce symptôme chez l'enfant et de la difficulté de l'objectiver chez l'enfant en très bas âge sans possibilité d'interrogatoire.

Au sein de la population adulte, la présence d'arthralgies est observée pour 18 patients, parmi lesquels 4 patients présentent une pathologie articulaire chronique à l'origine de ces manifestations (polyarthrite rhumatoïde, lupus avec connectivite, psoriasis et spondylarthropathie).

Le taux de positivité de la PCR du PVB19 est de **56 %** pour l'ensemble des patients adultes présentant des arthralgies (N = 18) et de **64 %** pour les patients adultes présentant des arthralgies à l'exclusion des patients atteints de pathologies articulaires chroniques (N = 14).

Le taux de positivité de la PCR est de **12 %** pour la population de patients adultes ne présentant pas d'arthralgies (N = 50).

La différence entre l'une ou l'autre des proportions observées en présence d'arthralgies, incluant ou non les pathologies articulaires chroniques, et la proportion en l'absence d'arthralgies est significative (respectivement $p = 0,0002$ ou $p < 0,0001$).

VI. 2. 7 Présence d'une anémie

La présence d'une anémie est observée pour 59 patients de l'étude. Une étiologie (au moins) d'anémie extérieure à l'action du PVB19 est relevée pour 38 d'entre eux. Les différentes étiologies retrouvées sont répertoriées dans le Tableau III.

Tableau III. Etiologies des anémies recensées pour les patients de l'étude

Etiologie d'anémie	Nombre de patients
Hémopathie	4
Carence martiale	6
Carence en folates	2
Syndrome inflammatoire chronique	9
Insuffisance rénale chronique	6
Hypothyroïdie	1
Grossesse	7
Hémorragie aiguë	2
Anémie hémolytique auto-immune	3
Thalassémie	2
Drépanocytose homozygote	1
Sphérocytose héréditaire	1
Accès palustre	1

Le taux de positivité de la PCR du PVB19 est de **29 %** pour la population de patients présentant une anémie ($N = 59$) et de **23 %** pour la population de patients ne présentant pas d'anémie ($N = 71$). La différence entre ces deux valeurs n'est pas significative.

VI. 2. 8 Présence d'une immunodépression

La présence d'une forme d'immunodépression est relevée chez 20 patients de l'étude. Les différentes étiologies d'immunodépression retrouvées sont répertoriées dans le Tableau IV.

Tableau IV. Etiologies des cas d'immunodépression recensés pour les patients de l'étude

Etiologie de l'immunodépression	Nombre de patients
Traitement immunosuppresseur (dont Transplantation rénale)	11 5
Infection par le VIH	1
Hémopathie	3
Neutropénie (hors hémopathie)	1
Hypogammaglobulinémie congénitale	1
Prématurité chez le nourrisson	3
Splénectomie	1

Le taux de positivité de la PCR du PVB19 est de **50 %** pour la population de patients présentant une immunodépression (N = 20) et de **21 %** pour la population de patients ne présentant pas d'immunodépression (N = 118). La différence entre ces deux valeurs est significative (p = 0,0062).

VI. 2. 9 Tableau récapitulatif

Tableau V. Taux de positivité de la PCR du Parvovirus B19 en fonction de la population étudiée

Nature de l'effectif	Taille de l'effectif	Nombre Patients PCR +	Taux de positivité de la PCR (%)	Degré de signification p
Population totale	138	35	25	
Sexe masculin	75	15	20	0,11
Sexe féminin	63	20	32	
Population adulte	71	18	25	
Population pédiatrique	67	17	25	
IgG +	68	29	43	**< 0,0001**
IgG − (ou douteuses)	70	6	**8,6**	
Indice IgM [1,1 – 2]	89	12	13	
Indice IgM [2,1 – 4]	26	6	23	
Indice IgM > 4	23	17	**74**	
Présence d'éruption cutanée	45	9	20	0,43
Absence d'éruption cutanée	88	23	26	
Patients adultes avec arthralgies	18	10	56	**0,0002**
Patients adultes avec arthralgies (sauf pathologies articulaires)	14	9	**64**	**< 0,0001**
Patients adultes sans arthralgies	50	6	12	
Présence d'anémie	59	17	29	0,41
Absence d'anémie	71	16	23	
Immunodépression	20	10	**50**	**0,0062**
Absence d'immunodépression	118	25	21	

VI. 3 Etude statistique des paramètres biologiques

Les données statistiques des différents paramètres biologiques sont présentées dans le Tableau VI.

Hémoglobine

La valeur moyenne de l'hémoglobine est de **10,9 g/dL** pour la population de cas de PCR du PVB19 positive (N = 31) et de **11,5 g/dL** pour la population de cas de PCR négative (N = 97). La différence entre ces deux valeurs n'est pas significative.

Leucocytes

La valeur moyenne des leucocytes sanguins est de **11,9 G/L** pour la population de cas de PCR positive (N = 31) et de **12,3 G/L** pour la population de cas de PCR négative (N = 97). La différence entre ces deux valeurs n'est pas significative.

Plaquettes

La valeur moyenne de la numération des plaquettes est de **259 G/L** pour la population de cas de PCR positive (N = 31) et de **285 G/L** pour la population de cas de PCR négative (N = 97). La différence entre ces deux valeurs n'est pas significative.

Réticulocytes

La numération des réticulocytes, non intégrée à l'hémogramme standard, n'est disponible que pour un nombre relativement faible de 40 patients.

La valeur moyenne des réticulocytes est de **67 G/L** pour la population de cas de PCR positive (N = 11) et de **55 G/L** pour la population de cas de PCR négative (N = 29). La différence entre ces deux valeurs n'est pas significative.

Créatinine

La valeur moyenne de la créatinine plasmatique est de **60 µmol/L** pour la population de cas de PCR positive (N = 28) et de **65 µmol/L** pour la population de cas de PCR négative (N = 95). La différence entre ces deux valeurs n'est pas significative.

Activité enzymatique ALAT

La valeur moyenne de l'activité enzymatique ALAT est de **25 UI/L** pour la population de cas de PCR positive (N = 28) et de **137 UI/L** pour la population de cas de PCR négative (N = 90). La différence entre ces deux moyennes n'est pas significative.

La valeur médiane, qui n'est pas influencée par les valeurs très élevées, est de **18,5 UI/L** pour la population présentant une PCR positive et de **22 UI/L** pour la population présentant une PCR négative.

Tableau VI. Indicateurs statistiques des paramètres biologiques en fonction du résultat de la PCR

Paramètre (unité)	Résultat de la PCR	Taille de l'effectif	Moyenne	Médiane	Degré de signification p
Hémoglobine (g/dL)	POS	31	10,9	11,5	0,2
	NEG	97	11,5	11,5	
Leucocytes (G/L)	POS	31	11,9	8,9	0,91
	NEG	97	12,3	9,8	
Plaquettes (G/L)	POS	31	259	245	0,35
	NEG	97	285	258	
Réticulocytes (G/L)	POS	11	67	60	0,51
	NEG	29	55	44	
Créatinine (µmol/L)	POS	28	60	49,5	0,72
	NEG	95	65	43	
ALAT (UI/L)	POS	28	25	18,5	0,37
	NEG	90	137	22	

VI. 4 Manifestations cliniques récurrentes

Parmi les manifestations cliniques autres que l'éruption cutanée et les arthralgies relevées chez les patients pour qui la détection de l'ADN du PVB19 dans le sérum est positive, deux symptômes sont retrouvés de manière récurrente. Il s'agit des adénopathies et des céphalées.

Des adénopathies sont observées pour 8 patients sur 35 présentant une infection prouvée par le PVB19, soit **23 %**, et des céphalées sont recensées pour 7 patients sur 35, soit **20 %**.

VI. 5 Présence de marqueurs d'infection par un agent pathogène autre que le Parvovirus B19

Positivité des IgM anti-VCA

L'enregistrement des résultats de détection des IgM anti-VCA, dirigées contre l'EBV, dans les cas de PCR du PVB19 négative retrouve 52 résultats négatifs, 19 résultats positifs et 7 résultats douteux. La proportion de cas d'IgM anti-VCA positives ou douteuses, potentiellement impliquées dans une réaction croisée, est donc de **33 %** pour les patients présentant des IgM anti-PVB19 positives avec PCR PVB19 négative (N = 78).

Positivité des IgM anti-CMV

Le recueil des résultats de détection des IgM spécifiques du Cytomégalovirus (CMV) dans les cas de PCR du PVB19 négative retrouve 66 résultats négatifs et 12 résultats positifs. La proportion de cas d'IgM anti-CMV positives, potentiellement impliquées dans une réaction croisée, est donc de **15 %**pour les patients présentant des IgM anti-PVB19 positives avec PCR PVB19 négative (N = 78).

Autres marqueurs infectieux

Des marqueurs d'infection active sont également observés pour d'autres virus de la famille des *Herpesviridae*. Le recueil fait apparaître six résultats positifs et deux résultats douteux pour les IgM des virus *Herpes simplex* (HSV1 ou HSV2) et deux résultats positifs et un résultat douteux pour les IgM du VZV (Virus Varicelle-Zona), ainsi qu'un diagnostic clinique de varicelle. La détection de ces marqueurs peut résulter de réactions croisées. Un cas de mise en évidence par PCR dans le sang du virus HHV6 est également relevé.

Il est également observé parmi les patients pour qui la PCR du PVB19 est négative cinq cas de rougeole avec présence d'IgM spécifiques et confirmation par détection du génome viral dans la salive.

Cinq cas de Fièvre Q sont recensés, avec présence d'IgM de phase II de *Coxiella burnetii*, ainsi que quatre cas de positivité des IgM dirigées contre *Mycoplasma pneumoniae*. Des réactions positives ou douteuses, très certainement liées à une stimulation polyclonale et une réactivité croisée, sont également retrouvées pour les IgM du virus des oreillons, de *Chlamydophila pneumoniae* ou de la maladie de Lyme (technique ELISA) ainsi que pour la sérologie de dépistage du VIH et la sérologie des virus HTLV (*Human T-lymphotropic virus*).

Le recueil de données pour la population de patients négatifs pour la PCR du PVB19 met par ailleurs en évidence sept cas d'infection par un virus grippal (4 grippes A et 3 grippes B) diagnostiqués par détection de l'ARN viral sur un prélèvement d'origine respiratoire. Il est enfin relevé au sein de cette population deux cas de syphilis et un cas d'accès palustre.

Les différents marqueurs infectieux recensés sont récapitulés dans le Tableau VII.

Tableau VII. Présence de marqueurs sérologiques et moléculaires d'infection active par d'autres agents dans la population de patients avec PCR Parvovirus B19 négative

Marqueur d'infection active	Nombre de cas positifs ou douteux	Proportion de positifs/douteux (%)
Marqueurs sérologiques		
IgM anti-VCA	26	33
IgM CMV	12	15
IgM HSV	8	
IgM VZV	3	
IgM Rougeole	5	
IgM Oreillons	1	
IgM *Coxiella burnetii* Phase II	5	
IgM *Mycoplasma pneumoniae*	4	
IgM *Chlamydophila pneumoniae*	2	
IgM Lyme (ELISA)	2	
Sérologie dépistage VIH	1	
Sérologie HTLV-1/2	1	
Sérologie Syphilis	2	
Marqueurs moléculaires		
PCR EBV (Sang)	8	
PCR CMV (Sang)	7	
PCR HSV1 (Sang)	1	
PCR HHV6 (Sang)	1	
PCR Grippe A (Nasopharyngé)	4	
PCR Grippe B (Nasopharyngé)	3	

La présence d'au moins une étiologie infectieuse systémique autre que le PVB19 a ainsi été recensée pour 52 patients parmi les 103 pour lesquels la PCR du PVB19 est négative.

VI. 6 Cas cliniques d'intérêt particulier

Au-delà des critères définis par l'étude, le recueil de données a conduit à l'observation de différents dossiers cliniques et biologiques de patients présentant un intérêt particulier mais relevant de situations en trop faible nombre pour permettre leur exploitation statistique.

VI. 6. 1 Manifestation atypique de l'infection chez le patient immunocompétent

Une forme atypique d'infection par le PVB19 est observée chez un enfant de 5 ans avec l'apparition, associées à une éruption cutanée, de manifestations neurologiques à type de méningo-encéphalite. La recherche directe du PVB19 par PCR est positive dans le sérum mais également dans le liquide céphalo-rachidien de ce patient. Cet enfant est cependant atteint de manière concomitante d'une infection méningée par le bacille tuberculeux. L'implication du PVB19 dans ces manifestations est donc difficile à établir.

VI. 6. 2 Infections chez le patient atteint d'anémie chronique

Le recensement des étiologies d'anémies a permis d'identifier quatre patients atteints de pathologies constitutives du globule rouge : deux cas de bêta-thalassémie, un cas de drépanocytose homozygote et un cas de sphérocytose héréditaire. Trois de ces patients présentent une véritable infection par le PVB19. Il s'agit d'un enfant de 10 ans atteint de drépanocytose SS et d'un enfant de 8 ans porteur de sphérocytose, qui affichent tous deux une anémie profonde, ainsi que d'un patient thalassémique de 58 ans dont l'anémie est modérée.

Un cas d'infection sévère est également relevé pour un patient atteint d'anémie hémolytique chronique d'origine acquise en la personne d'une femme de 75 ans souffrant d'anémie hémolytique auto-immune à agglutinines froides, chez qui sont diagnostiquées une anémie, une réticulopénie profonde ainsi qu'une érythroblastopénie sur le myélogramme, avec mise en évidence de l'ADN du PVB19 par PCR dans le sérum et la moelle osseuse. Cette patiente est en outre sous traitement immunosuppresseur pour sa pathologie auto-immune.

VI. 6. 3 Infections chez le patient immunodéprimé

Deux cas d'infection sévère par le PVB19 sont observés chez des patients transplantés rénaux sous traitement immunosuppresseur. Le premier concerne un homme de 72 ans présentant une anémie sévère et une érythroblastopénie au myélogramme. Le second cas est celui d'un homme de 27 ans présentant un profil de primo-infection (IgG absentes) avec anémie et réticulopénie très profondes. Une autre infection à PVB19 associée à une érythroblastopénie médullaire et une positivité de la PCR dans le sérum et la moelle osseuse est retrouvée pour une patiente de 63 ans atteinte de myélome.

VI. 6. 4 Infections en cours de grossesse

Parmi les 10 femmes enceintes incluses dans l'étude en raison de la positivité des IgM, la recherche de l'ADN du PVB19 par PCR dans le sérum est positive pour cinq femmes. L'un de ces cas d'infection, marqué par la survenue d'une éruption cutanée et d'arthralgies chez la mère, a conduit à une mort fœtale *in utero*. Un autre cas d'infection fœtale est attesté par la présence de signes échographiques de myocardite fœtale, d'évolution spontanément favorable. Les trois autres cas d'infection maternelle avérée à PVB19 n'ont pas été accompagnés de signes d'infection du fœtus.

Les différentes situations observées pour les femmes enceintes de l'étude sont répertoriées dans le Tableau VIII.

Tableau VIII. Données virologiques et évolution clinique observées pour les femmes enceintes

Age maternel	Indice IgM	IgG	Résultat PCR	Evolution
36	1,1	POS	NEG	
29	1,4	POS	POS	Absence de signes d'infection fœtale
18	1,1	POS	POS	Myocardite fœtale d'évolution favorable
18	1,3	POS	NEG	
31	> 48	POS	POS	Absence de signes d'infection fœtale
32	41	POS	POS	Mort fœtale in utero
26	1,1	POS	NEG	
43	3	POS	POS	Absence de signes d'infection fœtale
35	6,6	POS	NEG	
30	2,4	NEG	NEG	

VII. DISCUSSION

L'infection par le PVB19 est principalement recherchée dans le cadre de manifestations éruptives chez l'enfant, du bilan étiologique d'arthralgies chez l'adulte et en cas de suspicion d'infection en cours de grossesse, mais également lors de l'exploration d'une anémie chez le sujet immunodéprimé ou de l'aggravation d'une anémie chronique. La sérologie occupe une place centrale dans le diagnostic de cette infection. Elle constitue l'examen de première intention qui permet de caractériser le stade de l'infection et guide la réalisation éventuelle d'analyses complémentaires. Les anticorps IgM sont un indicateur d'une infection récente ou active par le virus étudié et permettent la distinction avec une infection ancienne, à la condition que leur détection soit bel et bien reliée à l'implication du PVB19. Or, on constate la mise en évidence fréquente d'IgM dont la valeur diagnostique dans l'infection active, et plus particulièrement la primo-infection, par le PVB19 est incertaine et nécessite d'être mieux définie et de s'appuyer sur des critères annexes.

Cette étude avait donc pour objectif d'évaluer la pertinence de la détection des IgM du PVB19 en fournissant une estimation de la proportion de cas de positivité des IgM associés à une infection avérée par le virus. Elle visait également à étudier la relation entre cette proportion d'infection prouvée et la présence ou l'absence de différents critères cliniques et biologiques, proposer une stratification de cette probabilité en fonction de l'indice quantitatif des IgM et rechercher une étiologie potentielle aux résultats apparus comme faussement positifs.

Interprétation des résultats de l'étude

Conformément aux objectifs définis au début de l'étude, la proportion de véritable infection par le PVB19 devant la positivité des IgM « spécifiques » a été estimée par le taux de positivité de la détection par PCR dans le sérum. De plus, l'intérêt des différents critères cliniques et biologiques dans l'interprétation de cette positivité des IgM a été évalué. Le but premier de l'analyse des résultats obtenus est d'en déduire des principes d'aide à l'interprétation de la sérologie du PVB19.

Le taux global de positivité de la PCR, et donc d'infection prouvée à PVB19, sur l'ensemble de la population de patients présentant des IgM est relativement faible pour un marqueur théorique d'infection active par le virus. Ce résultat confirme le manque de spécificité de cette analyse et l'implication significative d'interférences et de réactions non spécifiques. Les documents du fournisseur de la méthode de sérologie utilisée ne comportent pas de données de valeur prédictive positive, qui est le paramètre estimé par le taux de positivité de la PCR, mais le résultat de l'étude apparaît en discordance avec l'excellente valeur de spécificité revendiquée (supérieure à 99 %) en raison du nombre important de résultats faussement positifs.

Les résultats de l'étude apportent par ailleurs des informations nouvelles sur la valeur à donner à la positivité des IgM du PVB19, en particulier par l'association à la présence d'IgG et l'analyse de la valeur de l'indice de réactivité des IgM. La proportion de PCR positive, et donc d'infection prouvée, est significativement plus élevée en cas de présence simultanée d'IgG anti-PVB19 et s'avère surtout très faible (inférieure à 10 %) en l'absence de ces IgG. Ce résultat peut s'expliquer par la fréquence bien moindre de fausse réactivité concernant la détection des IgG par rapport à la détection des IgM. La mise en évidence d'IgG spécifiques du PVB19 constitue donc une preuve fiable de contact du sujet avec le virus, même si elle n'est pas en soi un marqueur d'une infection récente ou active. Le délai relativement court entre l'apparition des IgM et des IgG lors de la primo-infection (apparition simultanée ou décalage d'une semaine au maximum (2, 31)) rend peu probable une réalisation de la sérologie dans une période de présence d'IgM spécifiques sans présence d'IgG.

Une valeur élevée de l'indice de réactivité des IgM est également associée à une probabilité plus élevée de véritable infection active à PVB19. Les valeurs les plus faiblement supérieures au seuil de positivité (entre 1 et 2) ne correspondent que dans de rares cas à des infections prouvées par détection moléculaire du virus et sont dans leur grande majorité la conséquence d'une fausse réactivité ou d'une stimulation polyclonale. Une proportion très importante d'infections avérées est en revanche associée à une valeur de l'indice supérieure à 4. Cependant un relèvement du seuil de positivité, s'il permettrait une amélioration de la valeur prédictive positive, écarterait un nombre important de cas d'infection qui ne seraient pas détectés et conduirait à une diminution de la sensibilité de l'analyse.

L'analyse des résultats obtenus pour les différents critères étudiés apporte une confirmation de certaines données établies au sujet du PVB19. C'est ainsi le cas concernant la proportion élevée de véritable infection par le virus en présence d'arthralgies chez le patient adulte, manifestation clinique bien connue de l'infection à PVB19 dans cette population. En revanche, d'autres conséquences connues de cette infection ne sont pas associées dans cette étude à une proportion significativement plus élevée d'infection prouvée. C'est le cas de l'éruption cutanée et de la présence d'une anémie chez le patient.

Parallèlement, les valeurs de l'hémoglobine et de la numération des réticulocytes, attendues plus faibles dans la population de patients en cours d'infection active par le PVB19, ne sont pas retrouvées significativement plus faibles dans cet effectif. La thrombopénie et la leucopénie, décrites de manière inconstante dans l'infection à PVB19, ne sont pas non plus confirmées par une numération des plaquettes et des leucocytes significativement plus faibles pour les patients présentant une preuve moléculaire de l'infection.

La valeur de la créatinine plasmatique, prise en compte pour évaluer une potentielle atteinte rénale qui est décrite pour le PVB19 chez l'immunodéprimé (25, 26, 28), ne fait pas apparaître de différence significative pour les patients infectés par le virus. L'enregistrement de l'activité enzymatique ALAT visait à évaluer la relation avec une potentielle atteinte hépatique, qui est soumise à discussion pour le PVB19 mais bien établie pour d'autres virus impliqués dans les stimulations polyclonales, en particulier les *Herpesviridae*. La différence observée selon le résultat de la PCR du PVB19 n'est pas significative. Si la moyenne est sensiblement plus élevée dans le groupe de patients présentant une PCR négative, d'effectif plus important, ce paramètre est soumis à une très forte variabilité, caractérisée par un écart-type extrêmement important. La moyenne est fortement influencée par les valeurs élevées, plus nombreuses en fréquence absolue dans la population de patients avec PCR négative. La présence d'une cytolyse hépatique ne peut donc être retenue comme un critère en défaveur d'une véritable infection à PVB19 mais dans le cadre d'une positivité de multiples IgM, elle évoque davantage l'implication d'un virus à tropisme hépatique connu, tel les *Herpesviridae*. Pour ces deux derniers paramètres biologiques (créatinine et ALAT), la production de statistiques ciblées sur les patients immunodéprimés aurait donné lieu à des effectifs de taille jugée trop faible.

Il apparaît au travers de ces différents résultats que la confrontation des IgM anti-PVB19 détectées aux données cliniques et biologiques des patients ne permet que dans de rares cas de se prononcer sur la validité de ces IgM. Seule la présence d'arthralgies apporte une information significative. Ces données s'avèrent en tout cas moins contributives que les paramètres de la sérologie (présence d'IgG et indice de réactivité IgM), d'autant plus que ces derniers sont disponibles pour la totalité des patients investigués et d'accès plus aisé pour le biologiste que les données cliniques.

Une proportion significativement plus élevée de positivité de la PCR est également retrouvée pour les patients présentant une forme d'immunodépression. Ce résultat est néanmoins observé sur un faible effectif de sujets rassemblant des formes très variées de déficit immunitaire. Le caractère chronique de l'infection à PVB19 chez le patient immunodéprimé et la persistance de la virémie pourraient participer à ce résultat, le risque de réalisation du diagnostic direct en dehors d'une fenêtre de virémie étant moindre que chez l'immunocompétent.

L'analyse des marqueurs infectieux recensés pour les cas de mise en évidence d'IgM du PVB19 avec PCR négative, considérés comme de probables faux positifs, confirme l'implication d'autres agents viraux dans des phénomènes de stimulation polyclonale à l'origine d'une détection d'IgM non spécifiques. L'étude retrouve une présence importante des virus de la famille des *Herpesviridae*, connus pour produire de tels phénomènes. L'EBV et le CMV, pour lesquels la détection des IgM spécifiques montre une fréquence de positivité relativement importante lorsqu'elle est pratiquée, sont tout particulièrement impliqués. Le virus de la rougeole et l'agent de la fièvre Q, *Coxiella burnetii*, dont l'interférence avec les IgM du PVB19 n'a pas été étudiée par le fournisseur de la technique utilisée dans l'étude, semblent également impliqués dans certains cas de réactivité non spécifique.

Les marqueurs d'auto-immunité, tels que le facteur rhumatoïde et les anticorps antinucléaires, qui sont également des origines potentielles de fausse réactivité des IgM du PVB19, n'ont pas été répertoriés dans cette étude. Le recensement de ces marqueurs aurait présenté un intérêt pour une évaluation plus complète des étiologies de fausse positivité.

Pour environ la moitié des patients présentant un résultat de PCR du PVB19 négatif dans l'étude, aucune étiologie potentielle de la positivité des IgM n'est retrouvée. Cette situation résulte en partie d'une insuffisance d'informations disponibles pour le patient considéré et d'un défaut d'analyses complémentaires.

Limites de l'étude

Cette étude présente certains biais et limites dont il est nécessaire de tenir compte dans son interprétation. Si la taille de l'effectif total de patients est relativement importante, l'effectif de certains groupes utilisés pour définir des statistiques s'avère faible. C'est ainsi le cas pour la présence d'arthralgies, l'immunodépression et la numération des réticulocytes. Les deux premiers critères figurent parmi les éléments significatifs de l'étude.

L'absence de résultat de PCR du PVB19 dans le sérum pour certains patients, qui sont exclus de l'étude, ne permet pas d'étudier la totalité des patients affichant des IgM positives sur la période définie, ce qui peut modifier la représentativité de l'échantillon. Cette situation qui conduit à l'exclusion d'un cas est cependant considérée de présentation aléatoire.

Certaines circonstances à l'origine d'une prescription importante de la sérologie du PVB19 sont également susceptibles d'avoir une influence sur les résultats de l'étude. La forte augmentation du nombre de cas de fausse positivité au cours des derniers mois de l'étude (septembre 2017 à avril 2018) pourrait ainsi trouver une explication dans l'épidémie de rougeole présente dans la région Poitou-Charentes lors de cette période, à l'origine de réactivité non spécifique des IgM anti-PVB19 et ayant favorisé la prescription massive de sérologies associées aux infections virales éruptives (Figure 12). Les résultats obtenus pour les proportions de positivité de la détection du génome viral peuvent ainsi s'avérer différents selon la période de recueil définie.

Pertinence de la PCR comme critère de preuve d'infection

La détection de l'ADN viral par PCR dans le sérum est donc utilisée dans cette étude comme critère de véritable infection active par le PVB19, permettant la catégorisation des cas analysés. Il s'agit de l'unique critère objectif disponible pour les patients ciblés, de mise en œuvre relativement aisée car effectuée sur le même prélèvement que la sérologie.

Si la positivité de cette recherche moléculaire apporte une preuve certaine de l'infection en question, un résultat négatif ne peut en revanche écarter avec certitude une véritable infection par le PVB19.L'apparition des IgM spécifiques intervient en effet à la fin de la phase de virémie (Figure 13) et les signes cliniques les plus évocateurs (éruption cutanée et arthralgies), qui amènent à réaliser la sérologie, surviennent après la fin de cette phase au cours de laquelle le virus est présent en concentration élevée dans le sang circulant.On peut donc présumer que l'essentiel des cas de détection d'IgM a lieu en dehors de cette phase de virémie, exception faite du sujet immunodéprimé. Néanmoins, d'après la majorité des sources (2, 40, 41), l'ADN du PVB19 demeurerait détectable dans le sang tout au long de l'infection, et non uniquement au cours de l'épisode virémique, en raison du seuil de détection extrêmement faible des méthodes de PCR (environ 10 copies/mL). Cette caractéristique tend à être confirmée par le taux plus élevé de positivité de la PCR observé en cas de présence associée d'IgG alors que l'apparition des IgG correspond en théorie à une phase de l'infection postérieure à la virémie.

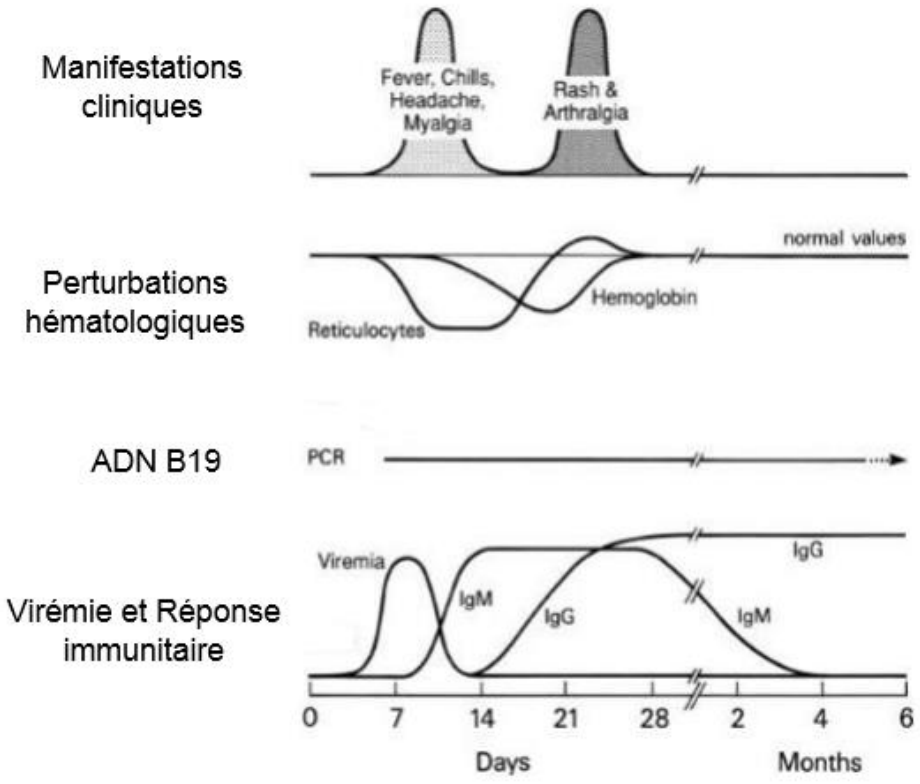


Figure 13. Cinétique des marqueurs biologiques et cliniques de l'infection par le Parvovirus B19 (40). Les IgM apparaissent à la fin de la phase de virémie. L'apparition des IgG est décalée d'environ une semaine. L'éruption et les arthralgies interviennent lors de cette réponse immunitaire, une fois la phase de virémie terminée. L'ADN viral est détectable par PCR tout au long du processus infectieux.

Il n'est cependant aucunement exclu qu'un nombre limité de cas figurant dans l'étude pour lesquels la PCR du PVB19 est négative soient tout de même de véritables infections par le virus concerné mais aucun critère objectif et applicable à l'ensemble des cas ne permet leur mise en évidence. Le résultat d'une seconde sérologie à distance d'au moins deux semaines de la première serait informatif en cas de séroconversion IgG mais cette répétition de l'analyse n'a été pratiquée que pour un très faible nombre de patients de l'étude. Le délai entre la survenue des symptômes et le prélèvement en vue de la sérologie initiale est par ailleurs une donnée difficile à apprécier lors du recueil d'informations par l'intermédiaire des dossiers cliniques de patients.

Conséquences sur l'interprétation de la sérologie du Parvovirus B19

Les résultats de cette étude confirment que la positivité des IgM du PVB19 doit être considérée avec précaution et que le diagnostic théorique de primo-infection par le PVB19 doit être mis en doute dans de nombreux cas. Cette situation doit amener à chercher d'autres éléments associés à l'infection. Le meilleur moyen de conclure sur la pertinence à accorder à une présence d'IgM anti-PVB19 est de recourir à la détection de l'ADN viral par PCR. Cette technique d'analyse n'est cependant pas disponible pour tout centre qui réalise la sérologie et dans le cas d'un laboratoire qui en dispose, la PCR est souvent différée pour permettre une analyse en série. L'envoi du prélèvement pour réalisation de la PCR à un laboratoire sous-traitant implique également un délai d'obtention du résultat de plusieurs jours. Il est donc nécessaire pour émettre un avis initial sur un cas de positivité des IgM de considérer les différents critères biologiques et cliniques associés dont l'intérêt est souligné par cette étude.

Il ressort de cette étude que l'interprétation de la mise en évidence d'IgM du PVB19 fait appel à un faisceau d'arguments en faveur ou défaveur d'une infection active par le virus considéré. Une valeur élevée de l'indice de réactivité des IgM, la présence d'arthralgies chez l'adulte et la présence d'une immunodépression sont fortement en faveur de l'infection à PVB19. La présence associée des IgG spécifiques est un facteur favorable mais, surtout, leur absence est fortement en défaveur de l'implication du PVB19.

Perspectives

Afin de confirmer les résultats de cette étude, de les compléter et d'en améliorer la pertinence en particulier en réduisant les biais qui l'affectent, diverses perspectives peuvent être envisagées.Une étude similaire pourrait être menée à plus grande échelle pour étudier un plus grand nombre de patients en réunissant les données de différents centres d'analyse et sans exclusion de cas pour un recueil plus exhaustif. Des études pourraient également être pratiquées pour les autres techniques de sérologie du PVB19 pour comparer leurs performances diagnostiques et établir les éléments communs de leur interprétation.

Une étude prospective associant la détection du virus par PCR et la réalisation systématique d'une seconde sérologie en l'absence d'IgG spécifiques lors de la première présenterait un intérêt pour définir de manière plus fine les véritables cas d'infection à PVB19. Enfin, la valeur diagnostique à accorder à la positivité des IgM du PVB19 pourrait être évaluée par une analyse comparative de populations d'IgM positives et d'IgM négatives, tandis que la présente étude ne s'intéresse qu'aux cas d'IgM positives.

Références bibliographiques

1. Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D

Parvovirus-like particles in human sera

Lancet 1975; 1 (7898): 72-73

2. Morinet F, Pallier C, Pillet S. Parvoviridae

Dans : Huraux JM, Agut H, Nicolas JC, Peigue-Lafeuille H. Traité de Virologie médicale

Paris: Estem; 2003. p. 283-291

3. Porignaux R

Place du Parvovirus B19 parmi les infections virales opportunistes du patient adulte transplanté de rein [thèse]

Université de Reims; 2011

4. Servant-Delmas A, Lefrère JJ, Morinet F, Pillet S

Advances in human B19 Erythrovirus biology

J Virol 2010; 84 (19): 9658-9665

5. Servant-Delmas A, Laperche S, Mercier M, Lefrère JJ

Genetic diversity of human Erythroviruses

PatholBiol 2009; 57 (2): 167-174

6. Broliden K, Tolfvenstam T, Norbeck O

Clinical aspects of Parvovirus B19 infection

J Intern Med. 2006; 260 (4): 285-304

7. Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Garbarg-Chenon A *et al.*

Genetic diversity within human Erythroviruses : identification of three genotypes

J Virol 2002; 76 (18): 9124-9134

8. Corcoran C, Hardie D, Yeats J, Smuts H

Genetic variants of human Parvovirus B19 in South Africa : cocirculation of three genotypes and identification of a novel subtype of genotype 1

J Clin Microbiol. 2010; 48 (1): 137-142

9. Heegard ED, Brown KE

Human Parvovirus B19

Clin Microbiol Rev 2002; 15 (3): 485-505

10. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS

Human Parvoviruses

Clin Microbiol Rev2017; 30: 43-113

11. Brown KE, Hibbs JR, Galinella G, Anderson SM, Lehman ED, Young NS et *al.*

Resistance to Parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen)

N Engl J Med 1994; 330 (17): 1192-1196

12. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A

Reombinant human Parvovirus B19 vectors : erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells

J Virol 2001; 75 (9): 4110-4116

13. Bonsch C, Zürcher C, Lieby P, Kempf C, Ros C

The globoside receptor triggers structural changes in the B19 virus capsid that facilitates virus internalization

J Virol 2010; 84 (22): 11737-11746

14. Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, Huang J, Kodera T, Sasaki T *et al.*

Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human Parvovirus B19 infection

Blood 2005; 106 (10): 3449-3456

15. Schwarz TF, Serke S, Hottentrager B, Von Brunn A, Baurmann H, Roggendorf M *et al.*

Replication of Parvovirus B19 in hematopoietic progenitor cells generated in vitro from normal human peripheral blood

J Virol 1992; 66 (2): 1273-1276

16. Challine D

Erythrovirus B19 et transplantation [En ligne; cité le 26 août 2018]

Disponible : www.infectiologie.com/site/medias/_documents/GTI/b19-Challine.pdf

17. Takahashi T, Ozawa K, Takahashi K, Asano S, Takaku F

Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 Parvovirus in vitro increases with differentiation

Blood 1990; 75 (3): 603-610

18. D'après : Crauste F, Pujo-Menjouet L, Génieys S, Molina C, Gandrillon O

Adding self-renewal in committed erythroid progenitors improves the biological relevance of a mathematical model of erythropoiesis

Journal of Theoretical Biology 2008; 250: 322-338

19. Servant-Delmas A, Mercier M, Laperche S, Lefrère JJ

Genetic diversity of human Erythroviruses. Consequences on infectious safety of plasma derivatives

Transfus Clin Biol 2009; 16 (5-6): 482-488

20. Heegard ED, Laub Petersen B

Parvovirus B19 transmitted by bone marrow

Br J Haematol 2000; 111 (2): 659-661

21. Yango A, JR, Morrissey P, Gohh R, Wahbeh A

Donor-transmitted Parvovirus infection in a kidney transplant recipient presenting as pancytopenia and allograft dysfunction

Transpl Infect Dis 2002; 4 (3): 163-166

22. Morinet F, Pillet S. Erythrovirus B19

Dans : Référentiel en Microbiologie médicale

2015. p. 689-691

23. Blaise G, Nikkels AF, Piérard GE

Manifestations cutanées de l'infection par le Parvovirus B19

Rev Med Liège 2007; 62 (7-8): 492-495

24. Kurtzman GJ, Gascon P, Caras M, Cohen B, Young NS

B19 Parvovirus replicates in cirulating cells of acutely infected patients

Blood 1988; 71 (5): 1448-1454

25. Zolnourian ZR, Curran MD, Rima BK, Coyle PV, O'Neill HJ, Middleton D

Parvovirus B19 in kidney transplant patients

Transplantation 2000; 69 (10): 2198-2202

26. Cavallo R, Merlino C, Re D, Bollero C, Bergallo M, Ponzi AN *et al.*

B19 virus infection in renal transplant recipients

J Clin Virol 2003; 26 (3): 361-368

27. Rerolle JP, Morelon E

Infection à Parvovirus B19 et transplantation rénale

Néphrologie 2003; 24 (6): 307-313

28. Mougdil A, Shidban H, Nast CC, Bagga A, Aswad S, Jordan SC *et al.*

Parvovirus B19 infection-related complications in renal transplant recipients : treatment with intravenous immunoglobulin

Transplantation 1997; 64 (12): 1847-1850

29. Lee PC, Hung CJ, Lei HY, Chang TT, Wang JR, Jan MS

Parvovirus B19-related acute hepatitis in an immunosuppressed kidney transplant

Nephrol Dial Transplant 2000; 15 (9): 1486-1488

30. Yoto Y, Kudoh T, Haseyama K, Suzuki N, Chiba S

Human Parvovirus B19 infection associated with acute hepatitis

Lancet 1996; 347 (9005): 868-869

31. Parvovirus B19

Dans : Précis de Biopathologie – Analyses médicales spécialisées

Biomnis; 2013

32. Sadigh S, Frank D

Red cheeks to red cell aplasia : Parvovirus B19 in a heart transplant patient

Blood 2017; 130 (8): 1071

33. LIAISON® Biotrin Parvovirus IgM

200/007-925, 06 – 2017-11

34. LIAISON®Biotrin Parvovirus IgG

200/007-925, 06 – 2017-11

35. D'après : Sartorius Stedim BioOutsource Limited

ELISA – Conception and Applications [En ligne; cité le 5 septembre 2018]

Disponible : www.biooutsource.com/elisa-conception-and-applications/

36. Giret L

Sérologie de l'Erythrovirus B19. Liaison XL.

Sapanet CHU Poitiers; Version n°5, 2015

37. Mode d'emploi RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0

01/2017 Altona Diagnostics GmbH

38. Goichon MC

Détection qualitative ou quantitative de l'ADN de l'Erythrovirus B19 par PCR temps réel

Sapanet CHU Poitiers; Version n°6, 2016

39. Marchand G, Lacombe N, Pépin C, Biyeyeme Bi Mve MJ, Villeneuve CA, Gardette M *et al.*

Evaluation de la biomasse mycologique sur les surfaces des réseaux aérauliques des systèmes de ventilation

IRSST 2017

40. Parvovirus B19 [En ligne; cité le 8 octobre 2018]

Disponible : www.wiv-isp.be/matra/Fiches/Parvovirus.pdf

41. Slavov SN, Kashima S, Silva Pinto AC, Tadeu Covas D

Human Parvovirus B19 : general considerations and impact on patients with sickle-cell disease and thalassemia and on blood transfusions

FEMS Immunol Med Microbiol 2011; 62: 247-262

Annexe 1

Mode opératoire de la sérologie du Parvovirus B19 au CHU de Poitiers

CHU de Poitiers VIRO-ANA-MO-031	Biologie Médicale Virologie et Mycobactériologie	Page : 1/4 Date : Avril 2015
Version N° 05	Sérologie de l'Erythrovirus B19. Liaison XL.	

Historique		
Version	**Date**	**Commentaire**
01	17/11/1999	Création
02	11/01/2008	Nouveau format
03	Avril 2012	Corrections suite à révision
04	Juin 2014	Suppression Valdeb
05	Avril 2015	Changement technique

Sommaire

1. Objectifs 1
2. Domaine d'application et personnes concernées 1
3. Définitions 1
4. Description 2
4.1. Prélèvements concernés 2
4.1.1. Nature 2
4.1.2. Etapes pré-analytiques 2
4.2. Réactifs utilisés 2
4.3 Mode opératoire ..... **Erreur ! Signet non défini.**
4.3.1. Méthode automatique sur l'automate LIAISON XL 2
4.3.2. Résultats 2
4.3. Interprétation biologique 3
4.3.1. Interprétation d'une 1ère détection 3
4.3.2. Interprétation tenant compte de résultats antérieurs 4
4.4. Stockage des prélèvements 4
5. Documents de référence 4

1. OBJECTIFS

Décrire la technique de recherche des anticorps IgG et IgM dirigés contre l'Erythrovirus B19 dans le sérum ou le plasma par la technique immunoluminométrique (CLIA) Liaison XL DiaSorin.

2. DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNEES

Cette technique est réalisée à l'aide de l'automate Liaison XL. Elle concerne le secteur d'Immunosérologie.

3. DEFINITIONS

B19G : IgG anti-Erythrovirus B19
B19M : IgM anti-Erythrovirus B19
SIL : Système Informatique de Laboratoire : GLIMS

Rédaction			Vérification			Approbation		
Nom	Prénom	Date	Nom	Prénom	Date	Nom	Prénom	Date
GIRET	Laurence	22/05/2015	CHASSAT GIRAUDEAU BEBY-DEFAUX	Stéphane Geneviève Agnès	19/06/2015 19/08/2015 28/10/2016	LEVEQUE	Nicolas	07/11/2016
Signature: Signé			Signature: Signé			Signature Signé		

VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

4. DESCRIPTION

4.1. Prélèvements concernés

4.1.1. Nature

Sérum (ou plasma sur tube EDTA).

4.1.2. Etapes pré-analytiques

Décantation et aliquotage assurés par la réception centralisée des prélèvements (RCP).

4.2. Réactifs utilisés

Se référer à la notice du coffret sur Sapanet VIRO-ANA-EXT-031 (B19G) et VIRO-ANA-EXT-032 (B19M) et au mode opératoire « Mode d'utilisation quotidienne de l'automate LIAISON XL (DiaSorin) ».
Cf : VIRO-MAT-MO-012.

4.3. Mode opératoire

4.3.1. Méthode automatique sur l'automate LIAISON XL

Se référer au mode opératoire « Mode d'utilisation quotidienne de l'automate LIAISON XL (Diasorin) » VIRO-MAT-MO-012.

4.3.2. Résultats

ANALYSES	RESULTATS	INTERPRETATION
IgM Indice	< 0,9	Négatif
	0,9 << 1,1	Douteux
	> 1,1	POSITIF
IgG Indice	< 0,9	Négatif
	0,9 << 1,1	Douteux
	> 1,1	POSITIF

Re-tester une fois les échantillons douteux :
→ Si Positif : rendre POS
→ Si Négatif : rendre NEG
→ Si Douteux : rendre DTX et demander un autre prélèvement dans un délai d'une semaine

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

4.4. Interprétation biologique

Les résultats transmis au SIL sont à l'état « disponible ». Ils sont ensuite confirmés par les techniciens ce qui entraîne une interprétation programmée dans GLIMS que récapitule le tableau suivant.

4.4.1. Interprétation d'une 1ère détection

Age	SV1		Code résultat spécifique	Interprétation
	IgM	IgG		
	Neg	Neg	SERNEG	Profil sérologique en faveur de l'absence d'infection. Cependant, en cas de contact récent, la sérologie peut être encore négative.
			2C	Envoyer un deuxième sérum dans 2 semaines pour contrôle.
> 6 mois	Neg	POS	B19AN	Profil sérologique en faveur d'une infection ancienne.
≤ 6 mois	Neg	POS	ACMAT	Anticorps probablement d'origine maternelle.
	POS	Neg	PRIMO	Profil sérologique en faveur d'une primo-infection.
			FXPOSM	Cependant une stimulation polyclonale ou une fausse réactivité des IgM ne peuvent être exclues.
			2EVOL	Prière d'envoyer un deuxième sérum pour suivre l'évolution.
			PCR	Recherche génomique par PCR en cours.
	POS	POS	PIARC	Profil sérologique en faveur d'une infection active, récente ou en cours.
			FXPOSM	Cependant une stimulation polyclonale ou une fausse réactivité des IgM ne peuvent être exclues.
			PCR	Recherche génomique par PCR en cours.

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI
LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

4.4.2. Interprétation tenant compte de résultats antérieurs

SV2		SV1		Code résultat spécifique	Interprétation
IgM	IgG	IgM	IgG		
Neg	Neg	Neg	Neg	B19NEG	Profil sérologique en faveur de l'absence d'infection à Erythrovirus B19.
Neg	POS	Neg	Neg	ACTP	Anticorps probablement transmis passivement.
POS	Neg	Neg	Neg	PRIMO	Profil sérologique en faveur d'une primoinfection.
				FXPOSM	Cependant une stimulation polyclonale ou une fausse réactivité des IgM ne peuvent être exclues.
				PCR	Recherche génomique par PCR en cours
POS	POS	POS	Neg	PRIMO	Profil sérologique en faveur d'une primoinfection.
				PCR	Recherche génomique par PCR en cours
POS	POS	Neg	Neg	PRIMO	Profil sérologique en faveur d'une primoinfection.
				PCR	Recherche génomique par PCR en cours

Les autres cas sont interprétés, en fonction du contexte clinique, par les biologistes.

4.5. Stockage des prélèvements

Les sérums ou plasmas sont conservés entre 2 et 4°C, 1 semaine maximum puis congelés à –20°C.

5. DOCUMENTS DE REFERENCE

- Guide de bonne exécution des analyses : arrêtés du 02/12/1994, du 26/11/1999 et du 26/04/2002.
- Norme NF EN ISO 15189.
- Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

Annexe 2

Mode opératoire de la détection de l'ADN du Parvovirus B19 par PCR au CHU de Poitiers

CHU de Poitiers MMS-ANA-MO-531	Biologie Médicale Hématologie Biologique	Page : 1/6 Date : Septembre 2016
Version N° 06	Détection qualitative ou quantitative de l'ADN de l'ERYTHROVIRUS B19 par PCR temps réel	

Historique		
Version	**Date**	**Commentaire**
05	Juillet 2014	Ex VIRO-ANA-MO-531
06	Septembre 2016	Extraction EasyMag Utilisation CFX96

Sommaire

1. Objectifs 1
2. Domaine d'application et personnes concernées 1
3. Définitions 1
4. Description 2
4.1. Prélèvements concernés 2
4.1.1. Nature 2
4.1.2. Conditions de conservation 2
4.2. Réactifs utilisés 2
4.2.1. Dénomination, références et conservations 2
4.3. Mode opératoire 3
4.3.1. Extraction des acides nucléiques 3
4.3.2. Amplification 3
4.4. Résultats 5
4.4.1. Critères de validation technique 5
4.4.2. Interprétation des résultats des échantillons 5
4.4.3. Rendu des résultats des échantillons dans le logiciel Glims 5
4.5. Stockage des échantillons 6
5. Documents de référence 6

1. OBJECTIFS

Décrire la détection et/ou la quantification de l'ADN Erythrovirus B19 par PCR en temps réel.

2. DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNEES

Techniciens de l'Unité de Microbiologie Moléculaire et Séquençage et biologistes de Virologie & Mycobactériologie.

3. DEFINITIONS

LCR :	Liquide Céphalo-Rachidien
Pb :	Paire de bases
Parvo B19 :	Parvovirus B19 ou Erythrovirus B19
QS1 à QS4 :	Standards de quantification
IC :	Contrôle interne
CN :	Contrôle d'extraction-inhibition/contrôle négatif
CP :	Contrôle positif
CT :	Crossing Threshold

Rédaction			Vérification			Approbation		
Nom	Prénom	Date	Nom	Prénom	Date	Nom	Prénom	Date
GOICHON	M CHRISTINE	08/09/2016	BEBY-DEFAUX	Agnès	08/08/2017	LEVEQUE	Nicolas	30/08/2017
			GIRAUDEAU	Geneviève	19/04/2017			
			CHASSAT	Stéphane	08/09/2016			
Signature:			Signature:			Signature:		

VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

4. DESCRIPTION

La trousse RealStar® Parvo B19 PCR Kit permet la détection et la quantification de l'ADN des trois génotypes (I-III) de Parvo B19. La charge virale est mesurée grâce à une gamme de quantification fournie dans la trousse et définie par le 2ème WHO IS (NIBSC 99/802).

La technique employée est celle de la PCR en temps réel après extraction de l'ADN viral.
Les deux mélanges d'amplification A et B de la trousse contiennent le tampon d'amplification, les enzymes, les amorces et les sondes spécifiques pour Parvo B19 et pour le contrôle interne amplifiés simultanément.
La détection de la cible Parvo B19 (FAM) et de IC (JOE/VIC) se fait dans le même puits

Le contrôle interne d'extraction-inhibition (IC) inclus dans la trousse permet de valider l'expérience et de vérifier que chacun des échantillons est extrait correctement et ne contient pas d'inhibiteurs.

4.1. Prélèvements concernés

4.1.1. Nature

- Sérum décanté à partir de sang prélevé dans des tubes secs.
- Plasma décanté à partir de sang prélevé sur tube EDTA.
- Tout liquide biologique (LCR, liquide amniotique...).
- Moëlle osseuse prélevée sur tube EDTA.

4.1.2. Conditions de conservation

- **Sérum, plasma**
  Centrifuger le tube de sang 20 minutes à 2000g et aliquoter le sérum dans des cryotubes de 4 ml.
- **Liquides biologiques (LCR, liquide amniotique...)**
  Aliquoter dans des cryotubes de 1,8 ml.
- **Moëlle osseuse** :
  Homogénéiser par retournement sur un roller pendant 10 minutes puis transférer dans un cryotube 1,8 ml.

Le volume de prélèvement aliquoté doit être supérieur à 200 µl.

Tous les échantillons sont conservés à -80°C si l'extraction des acides nucléiques est différée.

4.2. Réactifs utilisés

4.2.1. Dénomination, références et conservations

Dénomination	Référence	Fournisseur	Conservation avant ouverture	Conservation après ouverture
RealStar® Parvo B19 PCR Kit 1.0 Altona Diagnostics	101013	Biocentric	-15°C/-25°C Pièce des congélateurs	-15°C/-25°C Mix : MM1 IC : MM3 Contrôles : MM4

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

4.3. Mode opératoire

4.3.1. Extraction des acides nucléiques

Microbiologie Moléculaire 3 (préparation et extraction des échantillons)

Lors de l'étape de lyse, un contrôle interne fourni dans la trousse RealStar Parvo B19 **est ajouté.** (10% du volume d'élution). **Ne pas l'ajouter directement à l'échantillon mais au mélange échantillon/TL**

Nature échantillon	EasyMag (Biomérieux) (1) MMS-MAT-MO-006	MagNA Pure Compact (Roche) (2) MMS-MAT-MO-806
Liquides biologiques acellulaires Sérum, plasma PBS (CN)	Protocole : Generic Vol. échantillon : 200 µl Vol. élution : 50 µl	Protocole : Total_NA_Plasma_100_400 Vol. échantillon : 200 µl Vol. élution : 50 µl
Liquides biologiques cellulaires	Protocole : Specific B Vol. échantillon : 200 µl Vol. élution : 50 µl	
Prélèvements cutanés en milieu UTM		
Moëlle osseuse		Protocole : DNA_Blood_100_400 Vol. échantillon : 200 µl Vol. élution : 100 µl

(1) Extraction à privilégier
(2) Autre protocole à utiliser si urgence technique ou panne.

Si l'amplification n'est pas réalisée aussitôt, les produits extraits sont congelés à -80°C.

4.3.2. Amplification

On effectue d'abord une recherche qualitative. Si la détection est positive et que le patient est immuno-déprimé, on procèdera alors à une quantification.

- Le contrôle d'extraction-inhibition/contrôle négatif : CN
  Ce contrôle est préparé avant l'étape d'extraction par ajout de IC à du PBS (en remplacement de la matrice échantillon) afin d'obtenir une référence vis-à-vis de l'amplification de IC concomitante à celle des échantillons.
  Il permet aussi de vérifier l'absence de contamination à l'extraction et à l'amplification.

- Le témoin positif QS3 : recherche qualitative

- La gamme standard : recherche quantitative
  La gamme standard est composée de 4 points (QS4, QS3, QS2 et QS1) compris entre 10 et 10000 UI/µl, soit entre 100 et 100000 UI/PCR.
  La prise d'essai d'un extrait sérum correspond à 1/25ème de ml donc les points de gamme sont compris entre 2500 et 2500000 UI/ml
  La gamme de quantification est linéaire de 1 à 10^9 UI/µl soit de 250 à 250.10^9 UI/ml.

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

Microbiologie Moléculaire 1B (Préparation des MIX)

Utiliser des plaques ou barrettes spécifiques du thermocycleur :
- CFX96 (BIORAD) : disposition en colonnes
- 7500 fast (AB) : disposition en lignes

- Prévoir un puits par échantillon ⇒ + CN et CP (QS3) si détection qualitative
  ⇒ + CN et gamme (4 standards) si détection quantitative
- Décongeler dans l'eau froide les Masters A et B (2 congélations-décongélations maximum) et mettre sur un support réfrigéré (2 heures maximum à l'abri de la lumière).

Nb de puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Master A	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Master B	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150

Nb de puits	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Master A	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Master B	165	180	195	210	225	240	255	270	285	300

- Distribuer **20 µl** de mélange réactionnel dans chacun des puits.

Microbiologie Moléculaire 4 (Distribution des extraits)

- Décongeler dans l'eau froide les échantillons (si nécessaire), le CN, le CP (ou standards) puis vortexer et centrifuger rapidement.
- Ajouter en mélangeant délicatement par pipetage dans les puits correspondants.
  - **10 µl** de CN
  - **10 µl** de QS3 (qualitative) ou de chacun des 4 QS (quantitative)
  - **10 µl** d'extrait échantillon

Microbiologie Moléculaire 4 (CFX96) ou 6 (7500 fast)

Se référer au mode d'utilisation de l'appareil temps réel utilisé.

Programme de la PCR temps réel :
10 minutes à 95°C
15 secondes à 95°C / 1 minute à 58°C 45 cycles

L'acquisition des données s'effectue à +58°C.

La sonde Parvo B19 est marquée FAM-none, celle du contrôle interne est marquée JOE-none (ou VIC sur CFX96)

Le mélange réactionnel contient un fluorochrome de référence passive ROX.

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

4.4. Résultats

4.4.1. Critères de validation technique

Détection		
Contrôles	FAM (B19)	JOE / VIC (IC)
CP ou QS	+	-
CN	-	+

Si recherche quantitative, les standards de la gamme permettent de générer une courbe à partir de laquelle les résultats des échantillons sont quantifiés. (R^2 doit être ≥ 0,98)

Si ces critères ne sont pas remplis, la série sera refaite à partir des échantillons de départ ou des extraits déjà réalisés.

4.4.2. Interprétation des résultats des échantillons

- Chaque échantillon est analysé individuellement.
- Un CT s'affiche pour tous les échantillons positifs
- L'absence de CT correspond à un échantillon négatif ou inhibé et/ou mal extrait

Détection IC (Joe/VIC)	CT IC échantillon ≤ CT IC CN + 3 cycles **Echantillon non inhibé et correctement extrait**		CT IC échantillon > CT IC CN + 3 cycles **Echantillon inhibé et/ou mal extrait**	
Détection B19 (FAM)	CT calculé	CT non calculé	CT calculé	CT non calculé
Interprétation **qualitative**	Echantillon validé positif	Echantillon validé négatif	Echantillon validé positif	Négatif non validé*
Interprétation **quantitative**	Echantillon validé positif Quantification validée 250 à > 250.10^9 UI/ml	Echantillon validé négatif	Echantillon validé positif Quantification à refaire*	Négatif non validé*

*Si résultat non valide, refaire l'amplification :
- soit à partir d'un nouvel extrait du prélèvement dilué au ½ (ou plus selon nature du prélèvement). Utilisation de PBS comme diluant.
- soit à partir du même extrait dilué.

Si l'échantillon est toujours inhibé, le résultat est ininterprétable.

NB : dans le cas d'un échantillon positif pour Parvo B19, le signal du contrôle interne peut être diminué ou absent.

4.4.3. Rendu des résultats des échantillons dans le logiciel Glims

- Renseigner au niveau du paramètre :
  - NEG → code « v_neg » : négative
  - POS → code « v_pos » : positive
  - I → code « inint » : ininterprétable

Si quantification réalisée ; noter la valeur en commentaire interne : 250 à > 250.10^9 UI/ml

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

4.5. Stockage des échantillons

- Le reste des échantillons est conservé dans la biothèque à –80°C (local congélateurs).
- Les produits extraits sont conservés à -80°C (local congélateurs).

5. DOCUMENTS DE REFERENCE

- Guide de bonne exécution des analyses : arrêtés du 02/12/1994, du 26/11/1999 et du 26/04/2002.
- Norme NF EN ISO 15189.
- Ordonnance n°2010-49 du 13 Janvier 2010 relative à la biologie médicale
- Notice de la trousse

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

FACULTÉ DE PHARMACIE

UNIVERSITÉ DE RENNES 1

n° 5

NOM et Prénom : DEPAIRE THIBAULT

TITRE DE LA THESE

SEROLOGIE DU PARVOVIRUS B19 :
ETUDE DE SIGNIFICATION VIROLOGIQUE
ET CLINIQUE DE LA POSITIVITE DES IGM

19 OCT. 2018

Rennes, le 17/10/2018

Le **Président** de thèse :

PIERRE-YVES DONNIO

Le **Directeur** de thèse :

GENEVIEVE GIRAUDEAU

VU et Permis d'imprimer

Le Président de l'Université de Rennes1,

D. Alis

D.ALIS

n° 6

NOM et Prénom : DEPAIRE THIBAULT

DECLARATION SUR L'HONNEUR

Ayant été informé(e) qu'en m'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans mon propre manuscrit de thèse de docteur en pharmacie je me rendais coupable d'un délit de contrefaçon au sens de l'article L335.1 et suivants du code de la propriété intellectuelle et que ce délit était constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics,

Ayant été avisé(e) que le président de l'université sera informé de cette tentative de fraude ou de plagiat afin qu'il saisisse la juridiction disciplinaire compétente,

Ayant été informé(e) qu'en cas de plagiat, la soutenance du mémoire de thèse sera automatiquement annulée ou suspendue dans l'attente de la décision que prendra la juridiction disciplinaire de l'université,

J'atteste sur l'honneur ne pas avoir reproduit dans mes documents tout ou partie d'œuvre(s) déjà existante(s), à l'exception de quelques brèves citations mises entre guillemets dans le texte ou de tableaux et schémas, et référencés dans la bibliographie de mon mémoire.

A écrire à la main : « j'atteste sur l'honneur avoir connaissances des suites disciplinaires ou pénales que j'encours en cas de déclaration erronée ou incomplète »

Signature de l'étudiant(e)

J'atteste sur l'honneur avoir connaissance des suites disciplinaires ou pénales que j'encours en cas de déclaration erronée ou incomplète.

U.F.R. DE PHARMACIE DE RENNES

N°

DEPAIRE, Thibault – Sérologie du Parvovirus B19 : Etude de signification virologique et clinique de la positivité des IgM

90 pages., 13 figures., 8 tableaux.- Thèse : (Microbiologie) ; Rennes 1; 2018 ; N°

Résumé :

Le Parvovirus B19 (PVB19) est un petit virus à ADN ubiquitaire. La sérologie à la recherche des IgM et IgG spécifiques est l'examen central du diagnostic de l'infection par ce virus.
Cette étude rétrospective est menée sur les cas positifs d'IgM du PVB19 au CHU de Poitiers sur une période de 30 mois de novembre 2015 à avril 2018 et utilise la détection de l'ADN viral par PCR dans le sérum comme critère de preuve de l'infection. Le taux de positivité de cette PCR sur l'ensemble de l'effectif est de 25%.
Différents critères associés sont étudiés, parmi lesquels la présence d'IgG spécifiques, une valeur élevée de l'indice de réactivité des IgM, la présence d'arthralgies chez le patient adulte et la présence d'une immunodépression sont associées à un taux de positivité de la PCR significativement plus élevé. Ces critères ont vocation à apporter une aide à l'interprétation souvent délicate de la positivité des IgM du PVB19.

Rubrique de classement : VIROLOGIE

Mots-clés : Parvovirus B19 / Sérologie / IgM / PCR / IgG / Indice de réactivité / Réactivité non spécifique / Eruption cutanée / Arthralgies / Anémie / Virémie

Président : Monsieur le Professeur Pierre-Yves DONNIO

JURY : Assesseurs : Mme le Docteur Geneviève GIRAUDEAU [directeur de thèse]

Mr le Professeur Nicolas LEVEQUE

Mr le Professeur Vincent THIBAULT

Mme le Professeur Sandrine MARCHAND