



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Canadian Theses Service

Services des thèses canadiennes

Ottawa, Canada
K1A 0N4

CANADIAN THESES

THÈSES CANADIENNES

NOTICE

The quality of this microfiche is heavily dependent upon the quality of the original thesis submitted for microfilming. Every effort has been made to ensure the highest quality of reproduction possible.

If pages are missing, contact the university which granted the degree.

Some pages may have indistinct print especially if the original pages were typed with a poor typewriter ribbon or if the university sent us an inferior photocopy.

Previously copyrighted materials (journal articles, published tests, etc.) are not filmed.

Reproduction in full or in part of this film is governed by the Canadian Copyright Act, R.S.C. 1970, c. C-30. Please read the authorization forms which accompany this thesis.

**THIS DISSERTATION
HAS BEEN MICROFILMED
EXACTLY AS RECEIVED**

AVIS

La qualité de cette microfiche dépend grandement de la qualité de la thèse soumise au microfilmage. Nous avons tout fait pour assurer une qualité supérieure de reproduction.

S'il manque des pages, veuillez communiquer avec l'université qui a conféré le grade.

La qualité d'impression de certaines pages peut laisser à désirer, surtout si les pages originales ont été dactylographiées à l'aide d'un ruban usé ou si l'université nous a fait parvenir une photocopie de qualité inférieure.

Les documents qui font déjà l'objet d'un droit d'auteur (articles de revue, examens publiés, etc.) ne sont pas microfilmés.

La reproduction, même partielle, de ce microfilm est soumise à la Loi canadienne sur le droit d'auteur, SRC 1970, c. C-30. Veuillez prendre connaissance des formules d'autorisation qui accompagnent cette thèse.

**LA THÈSE A ÉTÉ
MICROFILMÉE TELLE QUE
NOUS L'AVONS REÇUE**

ETUDE DE LA DETECTION
DES ANTICORPS CONTRE LE CYTOMEGALOVIRUS
PAR 6 TESTS SEROLOGIQUES

par
Lucie Grégoire

Thèse
présentée à l'Ecole des Etudes Supérieures
pour l'obtention d'un diplôme de
Maîtrise en sciences

Département de Microbiologie et
Immunologie
Faculté de Médecine
Université d'Ottawa
Novembre 1983

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier:

Dr. E. Rossier, et Dr. E. Perry, professeurs au département de Microbiologie et Immunologie, Université d'Ottawa, pour la supervision apportée tout au long du travail tant au niveau expérimental que lors de la rédaction de ce manuscrit.

M. P.H. Phipps, chef au Laboratoire de virologie de l'Hôpital des Enfants de l'Est de l'Ontario, pour les précieux conseils et l'aide apportée tout au long du travail expérimental, sans celle-ci, ce travail n'aurait pas été possible.

Tout le personnel du Laboratoire de virologie de l'Hôpital des Enfants de l'Est de l'Ontario.

Mario, pour toute la patience et le support accordés lors du travail expérimental et de rédaction.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION.	1
REVUE DE LA LITTERATURE	3
Effets pathologiques.	4
A. Population normale.	4
B. Population à risque accru	4
a) Foetus.	4
b) Nouveaux-nés.	5
c) Immunodéprimés par médicaments.	5
d) Transplantés.	6
i) organes transplantés.	6
ii) transfusions sanguines.	6
iii) réactivation.	7
METHODES.	10
1. Réaction d'immunofluorescence indirecte	10
2. Fluorométrie en phase solide.	13
3. Réaction immunoenzymatique.	16
4. Réaction d'hémagglutination indirecte	20
5. Réaction de fixation du complément.	24
RESULTATS	27
EVALUATION DE L'HEMAGGLUTINATION PASSIVE SELON STEWART.	27
VARIABLES	28
1. Variation de sensibilisation des hématies provenant de différents moutons	28
2. Période de vieillissement des hématies.	32
3. Concentration d'acide tannique.	34
4. Concentration de l'antigène cytomégalique	36
5. Cellules de contrôle.	38
6. Spécificité du test d'hémagglutination passive.	42
7. Sérums testés	44
8. Réaction non spécifique en présence des cellules de contrôle.	46
A. Sources de réaction non spécifique.	46
B. Traitements des sérums montrant une réaction non spécifique.	47
a) Centrifugation à 40C.	47
b) Traitement au kaolin 25 %	47
c) Fractionnement des sérums	49
d) Adsorption sur lignées cellulaires.	51
C. Préparation antigénique	54
a) Fractionnement de l'antigène du virus cytomé- galique et de l'antigène normal	54
i) caractéristiques physiques	56

ii) contenu en protéines	56
iii) activité antigénique	60
b) Antigène préparé par congélation - décongélation.	69
COMPARAISON DES METHODES SEROLOGIQUES	70
DISCUSSION.	86
A. Evaluation du test d'hémagglutination passive selon Stewart	86
B. Comparaison des 6 tests sérologiques.	91
ANNEXE.	94
PROCEDURE	94
1. Réaction d'immunofluorescence indirecte	94
2. Fluorométrie en phase solide.	95
3. Réaction immunoenzymatique.	97
4. I. Hémagglutination passive selon Cetus.	99
II. Hémagglutination passive selon Stewart.	100
5. Fixation du complément.	102
6. Production de l'antigène.	104
A. Méthodologie du Laboratoire de la Lutte Contre la Maladie	104
B. Congélation - décongélation	105
7. Fractionnement de l'antigène.	106
A. Matériel à fractionner.	106
B. Gradients	106
C. Centrifugation.	106
D. Collecte des fractions.	106
8. Traitement au kaolin 25 %	107
9. Adsorption des sérums	108
10. Fractionnement des sérums.	109
11. Microscopie électronique.	110
12. Facteur rhumatoïde	111
13. Anticorps hétérophiles.	112
BIBLIOGRAPHIE	113

TABLEAUX

1. Variation de sensibilisation des hématies de différents moutons dans le test d'hémagglutination passive.	30
2. Sensibilisation des hématies dans le test d'hémagglutination passive en fonction de la période de vieillissement	33
3. Titration d'acide tannique dans le test d'hémagglutination passive	35
4. Titration de l'antigène cytomégalique dans le test d'hémagglutination passive	37
5. Réaction d'hémagglutination passive de 35 sérums contre 3 suspensions différentes d'hématies de contrôle.	40
6. Calcul du coefficient de corrélation pour les 3 suspensions d'hématies de contrôle dans le test d'hémagglutination passive	41
7. Spécificité du test d'hémagglutination passive . . .	43
8. Sérums évalués dans le test d'hémagglutination passive	45
9. Traitement au kaolin de sérums montrant une réaction non spécifique avec les cellules de contrôle. .	48
10. Fractionnement de sérums montrant une réaction non spécifique avec les cellules de contrôle dans le test d'hémagglutination passive.	50
11. Adsorption sur des lignées cellulaires de sérums montrant une réaction non spécifique avec les cellules de contrôle dans le test d'hémagglutination passive.	53
12. Caractéristiques en microscopie électronique des pics obtenus du fractionnement de l'antigène cytomégalique.	58
13. Concentration protéique des antigènes cytomégalique et normal avant et après fractionnement.	59
14A. Hémagglutination passive de l'antigène pic no 1. . .	62
14B. Hémagglutination passive de l'antigène pic no 2. . .	63

14C. Hémagglutination passive de l'antigène pic no 3.	64
14D. Activité antigénique dans les tests de fixation du complément et d'hémagglutination passive des antigènes concentrés et fractionnés.	65
15. Sérums à réaction non spécifique évalués contre l'antigène normal dans les tests de fixation du complément (FC) et d'hémagglutination passive (HC)	67
16. Sérums à réaction non spécifique évalués dans le test d'hémagglutination passive contre 2 préparations d'antigène normal.	69
17. Réactions non spécifiques des sérums évalués par les 6 tests étudiés.	73
18. Nombre de sérums étudiés dans la comparaison des 6 tests.	74
19. Distribution des sérums en fonction du nombre de tests positifs	76
20. Distribution des sérums évalués dans les 6 tests d'après le critère de positivité	79
21. Rendement des tests étudiés.	81
22. Evaluation des exigences techniques des tests étudiés.	83
23. Classement des tests en fonction de l'évaluation du rendement et des exigences techniques	85

FIGURE

1. Tracé de protéines des préparations de l'antigène normal et du cytomégalovirus obtenu après fractionnement sur gradient de sucrose. 55

2. Résultats de 20 sérums positifs et 72 sérums négatifs pour la détection des anticorps cytomégali-ques par 4 tests sérologiques. 80

SCHEMA

1. Réaction d'immunofluorescence indirecte	12
2. Fluorométrie en phase solide.	15
3. Réaction immunoenzymatique.	18
4. Réaction d'hémagglutination	22
5. Réaction de fixation du complément.	26

SYMBOLES

1. Réaction d'immunofluorescence indirecte.	11
2. Fluorométrie en phase solide	14
3. Réaction immunoenzymatique	17
4. Réaction d'hémagglutination indirecte.	21
5. Réaction de fixation du complément	25

INTRODUCTION

ETUDE de la DETECTION des ANTICORPS CYTOMEGALIQUES

Afin de dépister et d'identifier de façon fiable le statut immunologique contre le virus cytomégalique des donneurs de sang ou d'organes, une étude sur les techniques rapides disponibles pour la détection des anticorps contre le cytomégalovirus a été effectuée.

Cent vingt et un donneurs de sang ont été évalués par 6 tests sérologiques dont 4 commerciaux:

- test d'immunofluorescence indirecte (Electro-Nucleonics Laboratories)
 - test de fluorométrie en phase solide (International Diagnostic Technology)
 - test immunoenzymatique (M.A. Bioproducts)
 - test d'hémagglutination indirecte (Cetus Corporation),
- ainsi que par un test de fixation du complément et un test d'hémagglutination passive décrit par Stewart.

Vingt-neuf sérums ont été éliminés parce qu'ils montraient des réactions non spécifiques dans un ou l'autre des tests, 20 sérums sont positifs et 72 sérums sont négatifs.

Nous avons étudié les variables affectant le test d'hémagglutination passive selon Stewart. Nous avons pu standardiser la concentration d'acide tannique en sélectionnant un seul mouton donneur d'hématies et en utilisant ses hématies vieillies pour une même période de temps. Aussi en utilisant l'antigène cytomégalique produit au Laboratoire de la Lutte contre la Maladie, Santé et Bien-Etre Social, Canada, les hématies de contrôle doivent être sensibilisées avec l'antigène normal correspondant.

La réaction non spécifique des sérums en présence des hématies de contrôle sensibilisées à l'antigène normal est peut-être due à la présence dans le sérum d'anticorps, dans la classe des immunoglobulines M, dirigés contre des déterminants antigéniques à la surface des cellules non infectées ou contre des composants cellulaires internes; ou encore, cette réaction est peut-être due à une concentration protéique trop élevée dans la préparation d'antigène normal.

Les tests sont classifiés selon leur sensibilité, leur spécificité, leur précision ainsi qu'en fonction de leur taux de

faux positifs et faux négatifs. Le test commercial d'hémagglutination passive produit par Cetus Corporation donne le meilleur rendement suivi du test immunoenzymatique, de fluorométrie, d'hémagglutination passive selon Stewart, de fixation du complément et d'immunofluorescence indirecte.

Quand les tests sont classifiés en fonction des exigences techniques selon les manipulations, le délai, l'équipement nécessaire et la difficulté au niveau de l'interprétation de la réaction finale, le test commercial d'hémagglutination passive produit par Cetus Corporation vient au premier rang; suivi par le test de fluorométrie en phase solide, de la réaction immunoenzymatique, du test d'immunofluorescence indirecte et du test d'hémagglutination passive selon Stewart. Le test de fixation du complément est, au dernier rang.

Parmi les tests étudiés, le test commercial d'hémagglutination passive produit par Cetus Corporation répond le mieux au besoin d'identifier de façon fiable les donneurs positifs pour le virus cytomégalique et permet ainsi d'éliminer ces donneurs afin de minimiser le risque de transmission du virus au receveur.

ETUDE DE LA DETECTION
DES ANTICORPS CONTRE LE CYTOMEGALOVIRUS
PAR 6 TESTS SEROLOGIQUES

REVUE DE LA LITTERATURE

Le cytomegalovirus (Hamilton, 1982) est un virus à ADN double brin, a une capsidie composée de 162 capsomères arrangés dans une structure icosaédrale. Ce virus enveloppé, spécifique à chaque espèce, est fortement associé aux cellules.

Ce virus est responsable d'infections asymptomatiques dans la majorité des cas, mais aussi d'infections cliniques graves pour certains.

Tout comme les autres membres de la famille des Herpesvirus, le virus cytomegalique peut, par un mécanisme encore inconnu, demeurer latent chez l'hôte. Le phénomène de latence est largement discuté dans la littérature. Plusieurs auteurs ont montré le génome viral ou même le virus lui-même présent à l'intérieur de diverses cellules sanguines et autres. En 1975, Joncas et al. (Joncas, 1975) détectent 8 à 10 génomes cytomegaliques dans des cellules lymphoblastoïdes. Pagano et al. (1975) ainsi que Huang et al. (1976,b) montrent in situ, par la technique d'hybridation cARN-ADN, la présence de génomes du virus à l'intérieur des leucocytes périphériques. De 1975 à 1978, les techniques d'hybridation (Huang, 1976 b; Pagano, 1975; Huang, 1976 a; Jordan, 1983) servent à détecter le génome du cytomegalovirus dans les cellules rénales, les leucocytes humains, le sperme ainsi que dans des carcinomes du colon. En 1982, Granett (1982) réussit à isoler le virus cytomegalique à partir de culture de lymphocytes T. Ces faits mettent en évidence la présence du génome viral qui pourra être réactivé par différents processus selon le cas, ex: au cours de la grossesse, lors de la prise de certains médicaments immunosuppresseurs, etc.

Après une infection cytomegalique, toute personne est susceptible de devenir porteur sain. Ces sujets sont des donneurs potentiels de sang ou d'organes. Par leurs dons, des cellules infectées qui contiennent le virus à l'état latent sont susceptibles d'être transmises à un patient suite à une transfusion de sang, de l'un de ses sous-produits ou encore suite à une transplantation d'organes (rein, coeur, foie, moelle, etc.)

Il est à noter cependant, que le donneur peut être négatif pour le virus mais que le receveur de sang ou d'organe peut être porteur sain, c'est à dire avoir été atteint antérieurement d'une infection cytomegalique. Le receveur peut alors subir une infection par réactivation de son propre virus. Le mécanisme de cette réactivation est encore inexpliqué.

Quelle que soit l'origine de l'infection cytomégaly, les infections qui en résultent peuvent varier d'une infection asymptomatique, à un syndrome de mononucléose infectieuse, à une infection systémique fatale. Selon le statut immunologique du donneur et du receveur, certains groupes d'individus présenteront un risque plus élevé. Ces groupes sont discutés en détail dans la section suivante.

EFFETS PATHOLOGIQUES

Les effets pathologiques qu'exerce le cytomégaly varient en fonction de la population affectée selon qu'il s'agisse de

- A. Population normale
- B. Population à risque accru.

A. Population normale.

Lorsque le virus cytomégaly infecte un hôte normal, dans la majorité des cas, il en résulte une infection bénigne asymptomatique (Oncogenic Herpesvirus, 1980 a; Hamilton, 1982 a). Les seuls signes d'une infection sont: l'augmentation du titre des anticorps spécifiques au virus et la présence de lymphocytes sensibilisés spécifiquement au virus.

La manifestation clinique d'une infection au cytomégaly la plus souvent rencontrée est le syndrome de mononucléose infectieuse. De tous les cas de mononucléoses infectieuses, 6.6 % à 12 % (Ho, 1982 a; Hamilton, 1982 c) sont négatifs pour la recherche d'anticorps hétérophiles et sont en fait des infections cytomégaly.

B. Population à risque accru.

a. Foetus.

Le risque de transmission verticale de l'infection cytomégaly est important puisque 20 à 30 % des femmes enceintes sont reconnues excrétrices du virus à un moment quelconque de leur grossesse. Certaines d'entre elles sont atteintes pour la première fois d'une telle infection, d'autres, déjà séropositives, excrètent le virus à la suite d'une réactivation ou d'une surinfection.

Le foetus d'une femme ayant une infection primaire court un risque plus élevé d'être atteint d'une maladie cytomégaly ou d'être infecté comparativement au foetus d'une mère séropositive, quoique Embil et al. (1970), Huang et al. (1980), Krech et al. (Hamilton, 1982) et Stagno et al. (1973) rapportent des cas où des enfants nés de mères séropositives sont aussi atteints de maladie et d'infection cytomégaly.

Le mode de transmission du virus de la mère séropositive au foetus est encore inexpliqué; même en présence d'anticorps maternels, le virus peut passer au foetus à partir de la circulation sanguine maternel. L'infection qui en résultera peut être: asymptomatique et mise en évidence seulement par une virurie; ou apparente et la sévérité variera en fonction des organes affectés. Les symptômes les plus souvent rencontrés, probablement suite à une infection primaire chez la mère, sont le retard mental et la surdité.

Dans une population non-sélectionnée de nouveaux-nés, le pourcentage des bébés excréteurs du virus cytomégalique dans l'urine varie, selon différentes études, de .55 % à 2.54 % (Stern, 1968; Levinsohn, 1969; Starr et Gold, 1969; Birnbaum, 1969; Hanshaw, 1969).

Une étude similaire a été conduite à Hamilton, Ontario (Larke, 1980); les statistiques canadiennes qui montrent que .42 % des nouveaux-nés excrètent le virus, ne sont pas différentes des études citées antérieurement.

b. Les nouveaux-nés:

Les nouveaux-nés qui nécessitent des transfusions sanguines font partie de la population à risque accru.

En 1971, Luthardt (Ho, 1982) et en 1981, Yeager montrent l'importance de sélectionner des donneurs de sang négatifs pour le cytomégalovirus quand cette transfusion est administrée à un nouveau-né, plus particulièrement si l'enfant est né d'une mère séronégative pour le virus. Dans les deux études, aucun des bébés nés de mère négative et recevant une transfusion d'un donneur de sang négatif pour le virus n'a développé d'infection.

Les enfants nés de mère négative qui sont transfusés d'un donneur positif développent une infection cytomégalique sévère et parfois même fatale. D'après l'étude de Luthardt, 53 % du groupe développent une infection. D'après celle de Yeager, 13.5 % de 74 bébés sont infectés et 50 % de ceux-ci souffrent d'une infection clinique sévère et fatale.

Dans les deux études, les enfants nés de mère séropositive transfusés de donneurs soit positif ou soit négatif ont un taux d'infection similaire mais toutes ces infections sont asymptomatiques.

Par ces études, les deux auteurs ont établi une relation directe entre le statut immunologique du donneur et sa capacité de transmettre le virus au receveur. Ils montrent que l'agent infectieux peut persister dans des cellules sanguines en présence d'anticorps circulants.

c) Les immunodéprimés par médicaments:

Des études ont été faites sur les médicaments utilisés pour supprimer l'immunité en vue d'une transplantation d'organes tels que rein, moëlle, coeur, foie, ou de thérapie telle que le traitement pour la leucémie.

En 1976, Dowling et al démontrait que les patients traités à l'azathioprine et au cyclophosphamide avaient un taux de réactivation du virus cytomégalique supérieur au groupe témoin.

En 1979, Cheeseman et al., ainsi qu'en 1981, Pass et al. et Marker et al. (1981) rapportent que les patients traités à la globuline antithymocyte, après une transplantation rénale, sont plus souvent virémiques que le groupe témoin. Par contre, Pollard, en 1978, est incapable de démontrer ce phénomène chez des patients qui ont eu le même traitement de globuline antithymocyte après une greffe cardiaque.

d) Les transplantés:

Chez les patients transplantés, outre les médicaments immunosuppresseurs, d'autres sources (Oncogenic Herpesvirus, 1980; Hamilton, 1982; Ho, 1982) sont à l'origine d'infections cytomégaliqes:

- l'organe transplanté
- les transfusions sanguines
- la réactivation d'une infection latente.

i) Organes transplantés:

Plusieurs auteurs (Ho, 1975; Betts, 1975; Tobin, 1979; Marker, 1981) montrent que l'organe transplanté est la source du virus pour une infection. Un groupe de patients séronégatifs reçoivent une greffe de rein de donneurs séropositifs, le taux d'infectivité est de 57 % (variant de 33 à 83 % selon les auteurs) alors que chez un groupe de patients séronégatifs qui reçoivent un organe d'un donneur séronégatif, 8 % seulement deviennent infectés (variant de 0 à 30 % selon les auteurs).

Aussi, Preiksaitis (1982) incrimine le coeur transplanté comme étant la source du virus. Pour ce qui est des autres organes (foie, moëlle, etc) très peu d'études ont été effectuées.

ii) Transfusions sanguines:

Les transfusions sanguines (ou de sous-produits sanguins tels que leucocytes) ont été l'objet de plusieurs études et ont été reconnues comme représentant un risque élevé pour les immunodéprimés. En 1970, Stevens montre que le pourcentage d'infections observées suite à une transfusion est proportionnel au nombre d'unités sanguines transfusées. Ces résultats sont confirmés par Lang en 1977.

Monif, en 1976, montre que les patients séronégatifs pour le cytomégalovirus qui reçoivent du sang d'un donneur aussi séronégatif ne développent pas d'infection alors que ceux qui en reçoivent d'un donneur séropositif deviennent infectés.

En 1978, Tolkoff-Rubin étudie les patients qui sont transfusés avec des unités de sang préservées de façon conventionnelle comparés à ceux qui sont transfusés avec des unités qui ont été congelées. Elle tire la conclusion que le taux d'infections cytomégaliqes diminue chez les patients qui ont reçu des transfusions de sang congelé puisque les leucocytes ne peuvent survivre. Les recherches de Fiala (1975) et Rinaldo (1979) qui montrent la présence du virus à l'intérieur des leucocytes mononucléaires et polymorphonucléaires corroborent ces résultats.

Deux études distinctes, en 1980, Winston et en 1982, Hersman établissent le lien entre la transfusion leucocytaire et l'incidence d'infections cytomégaliqes chez des patients leucémiques ou des receveurs de greffe de moelle osseuse.

iii) Réactivation:

Suite à une infection primaire, le virus persiste dans certaines cellules chez le patient. Différents stimuli peuvent déranger le système immunitaire de l'organisme et le virus peut à nouveau produire une infection. Cette réactivation ne produit pas nécessairement de manifestations cliniques mais est mise en évidence par une virurie. Dans le livre de Ho (1982), 15 études sur la réactivation du cytomégalovirus suite à une transplantation rénale ont été résumées. Une moyenne de 85 % de tous les cas évalués ont subi une réactivation. Dix des 15 études ont un taux de réactivation variant de 90 à 100 %. Suite à ces études, on peut établir l'hypothèse que tous les patients séropositifs possèdent le génome viral à l'état latent et que la presque totalité de ceux-ci sont activés à la suite d'une transplantation.

Dû à la fréquence et à l'impact des infections cytomégaliqes dans la population à risque accru décrite ci-haut, la nécessité de dépister les donneurs de sang ou d'organes asymptomatiques est évidente.

Pour mettre en évidence la présence du virus lui-même chez les donneurs de sang ou d'organes, il serait préférable d'utiliser les méthodes suivantes: tests d'hybridation de ARN-ADN et culture de différents prélèvements.

La technique d'hybridation peut être effectuée dans un délai de 24 heures, elle peut détecter un titre de 1000 virus / ml, cependant l'utilisation de l'isotope P32 pour marquer le ADN rend

ce test difficilement applicable dans un laboratoire clinique (Chou, 1983)

La culture du virus cytomégalique est longue, il faut souvent attendre environ 10 jours et davantage avant que la culture ne devienne positive.

L'identification des porteurs sains du virus cytomégalique parmi les donneurs de sang ou d'organes est souvent urgente, la transfusion ou la transplantation étant faite dans les heures qui suivent la demande. Les laboratoires d'hôpitaux n'ont pas le temps nécessaire pour attendre les résultats d'une culture et bien souvent, ni l'équipement ni le personnel spécialisé pour effectuer un test d'hybridation.

Le statut immunologique du donneur est le reflet d'une stimulation antérieure par le virus. A défaut d'identifier les porteurs sains en démontrant le génome latent dans leurs cellules, on peut dépister les anticorps cytomégaliqes chez les donneurs de sang ou d'organes. La présence d'anticorps cytomégaliqes est l'indice d'une infection antérieure. Toute personne séropositive est éliminée comme donneur de sang ou d'organe parce qu'elle est susceptible d'être porteur sain.

La méthode à utiliser pour détecter les anticorps cytomégaliqes devrait être étalonnée en fonction d'un standard connu pour la concentration d'IgM ou d'IgG spécifiques au cytomégalo virus, tel que recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé. Actuellement, ces standards ne sont pas disponibles. Il nous faut utiliser les tests commerciaux dont les taux d'anticorps significatifs pour le cytomégalo virus sont définis empiriquement par chacune des compagnies, par corrélation avec les tests sérologiques classiques, tels que le test de fixation du complément.

Nous avons choisi certains tests commerciaux disponibles pour la détection des anticorps cytomégaliqes selon les critères initiaux suivants:

- simplicité
- équipement minimum
- facilité d'exécution
- rapidité.

De plus, le test d'hémagglutination passive selon Stewart a été inclus comme test utilisable pour la détection des anticorps cytomégaliqes de même que le test de fixation du complément, ce dernier étant effectué dans la majorité des laboratoires de virologie.

Les objectifs du travail ont consisté:

A. à mettre au point le test d'hémagglutination passive selon Stewart:

- a) en étudiant les différentes variables du test, soit: le donneur d'hématies, la période de maturation

d'hématies, la concentration d'acide tannique, les hématies de contrôle et

- b) en évaluant la préparation d'antigène cytomégalique produite pour le test de fixation du complément au Laboratoire de la Lutte Contre la Maladie, Santé et Bien-Etre Social, Canada. Nous voulions un test simple: comme Stewart utilise un antigène de fixation du complément, nous avons utilisé celui qui était facilement disponible au Canada.

B. à comparer les tests commerciaux disponibles en fonction:

- a) du rendement: la sensibilité, la spécificité, l'exactitude, la fiabilité et
- b) des exigences techniques: la facilité d'exécution, le délai, l'équipement, la lecture subjective.

METHODES

1. REACTION d'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.

Le test d'immunofluorescence indirecte utilisé est celui produit par Electro-Nucleonics Laboratories, Inc. (Antibody to cytomegalovirus, 1982).

Principe:

La méthode utilisée est la fluorescence indirecte telle que décrite par Weller et Coons (1954). Le test utilise un frottis formé d'un mélange de cellules non infectées et de cellules infectées par le cytomegalovirus AD 169, mis en contact avec un sérum humain. Si le sérum contient des anticorps contre le virus cytomegalique, ceux-ci s'attacheront aux sites réactifs des cellules infectées pour former un complexe antigène-anticorps. S'il n'y a pas d'anticorps présents contre cet antigène dans le sérum, aucun complexe ne se formera.

Le frottis est lavé avec du tampon phosphate afin d'éliminer les constituants du sérum qui ne sont pas attachés.

On ajoute un anticorps anti-gamma-globuline humaine couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine qui réagit avec l'immunoglobuline humaine G déjà fixée sur l'antigène.

Un deuxième lavage est fait pour éliminer l'immunoglobuline marquée non fixée et l'isothiocyanate de fluorescéine dissocié de l'anticorps marqué.

Un résultat positif montre une fluorescence verte associée seulement aux noyaux des cellules infectées et observable au microscope à fluorescence. Une fluorescence verte non associée aux noyaux est non spécifique et peut être due aux récepteurs Fc présents sur la membrane des cellules infectées.

Voir schéma 1: Réaction d'immunofluorescence indirecte.



ANTIGENES CYTOMEGALIQUES



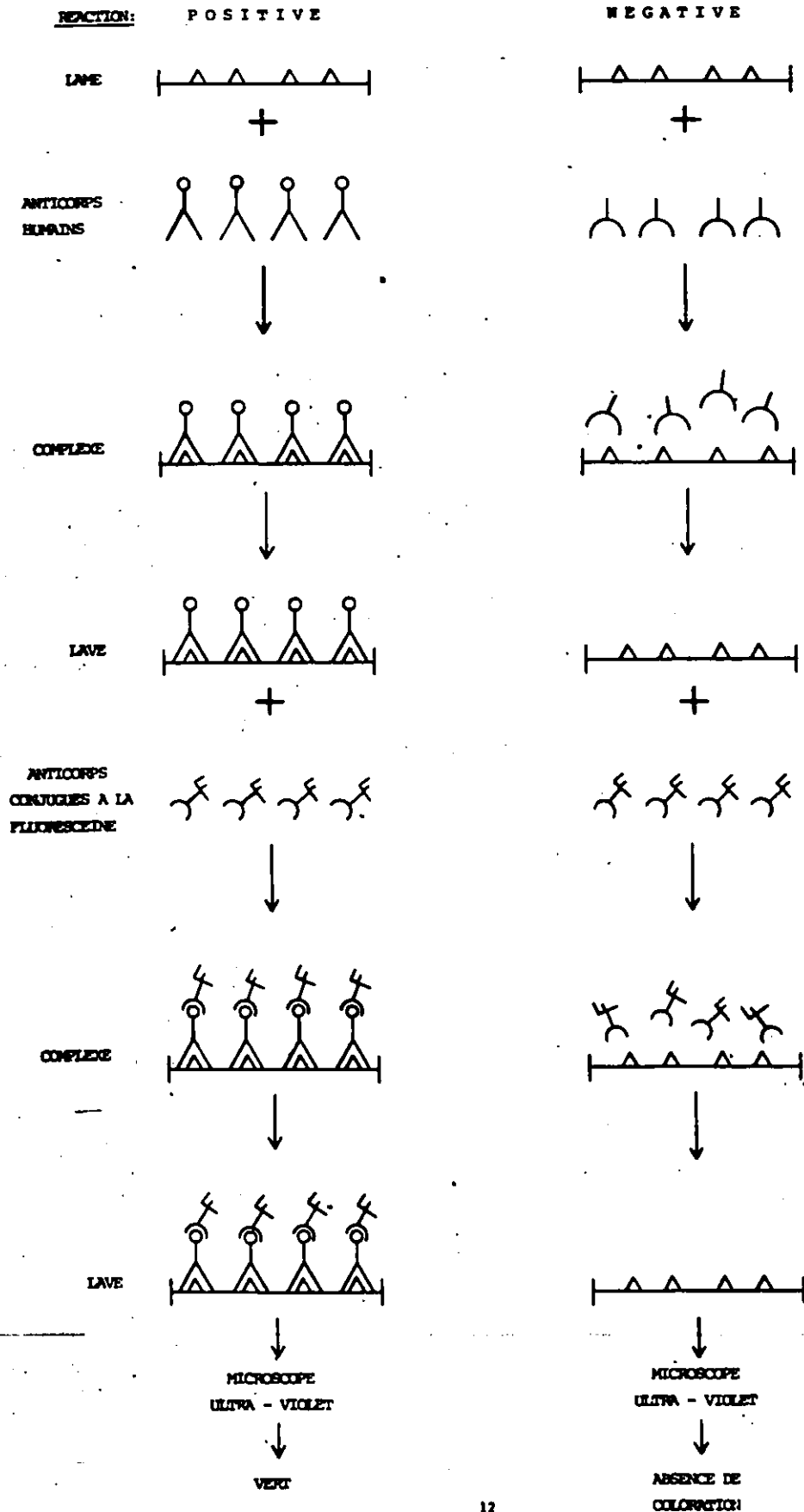
IMMUNOGLOBULINES G SPECIFIQUES
AUX ANTIGENES CYTOMEGALIQUES



IMMUNOGLOBULINES HUMAINES NON SPECIFIQUES
AUX ANTIGENES CYTOMEGALIQUES



ANTICORPS ANTI - GAMMA - GLOBULINES HUMAINES
CONJUGUES A LA FLUORESCENCE ISOTHIOCYANATE



2. FLUOROMETRIE en PHASE SOLIDE

Le test de fluorométrie en phase solide utilisé est le test FIAX(R) pour la détection des gamma-globulines humaines contre le cytomégalovirus. Ce test a été mis au point et produit par International Diagnostic Technology, Inc. (Fiax(R) test kit for cytomegalovirus G antibodies, 1982)

Principe:

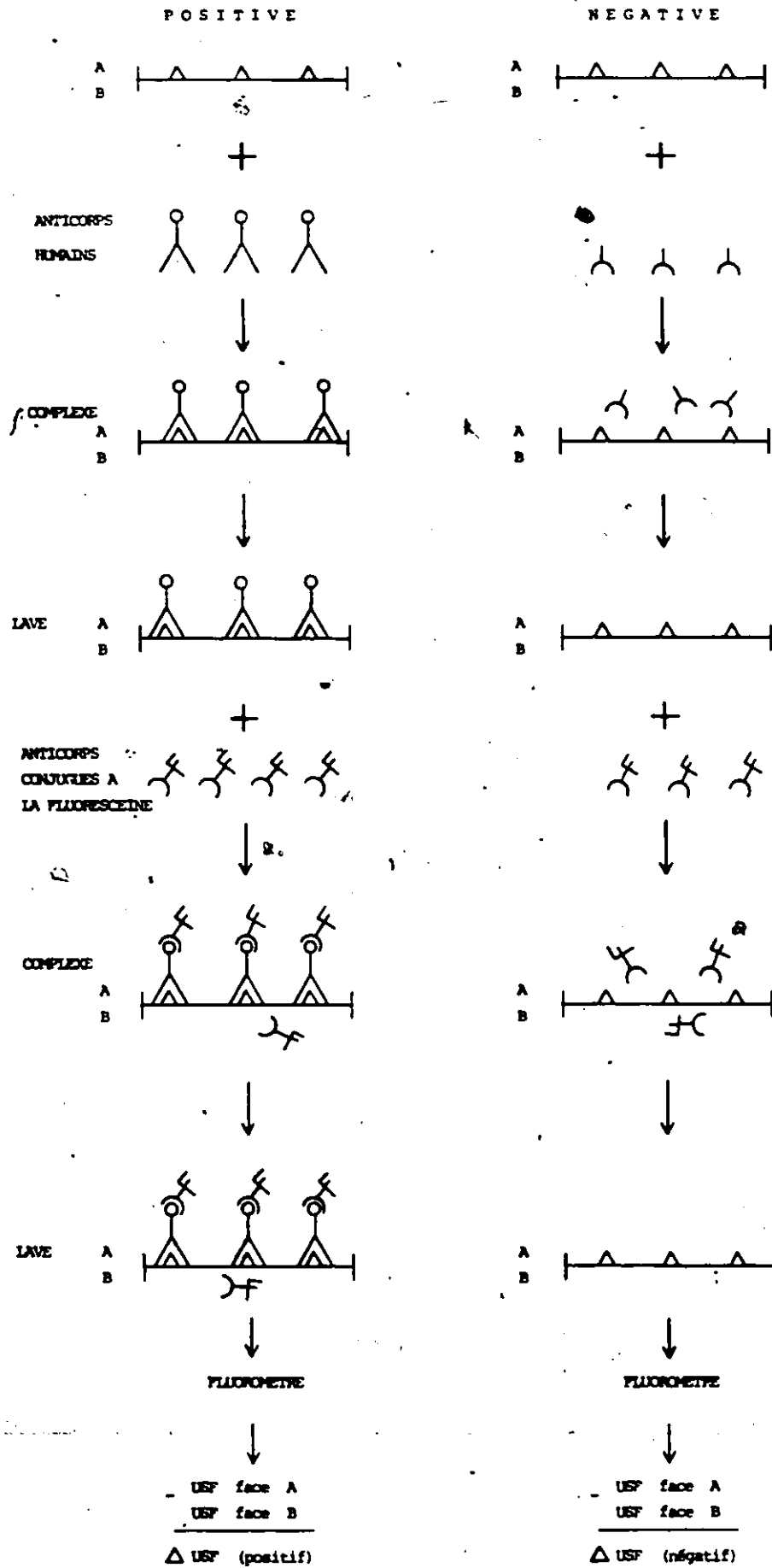
Une préparation d'antigènes cytomégaliqes, souche AD 169, est adsorbée sur une membrane de nitrate de cellulose, sur la face A d'un batonnet. La face B où aucun antigène n'est adsorbé sert à déceler la fluorescence non spécifique.

Les faces du batonnet sont mises en présence d'un sérum humain. S'il y a des anticorps IgG contre le virus cytomégali- que, ils se fixent de façon spécifique. Après un bref lavage dans une solution tampon, les batonnets sont mis en contact avec les anticorps anti-gamma-globulines humaines liés à l'isothiocyanate de fluorescéine. Ceux-ci se fixent de façon spécifique sur le complexe antigène-anticorps, s'il est présent. Un deuxième lavage est effectué pour éliminer les anticorps conjugués qui n'ont pas été fixés.

(R)

Le fluoromètre FIAX est utilisé pour lire la fluorescence obtenue sur la face A (réaction spécifique antigène-anticorps) et sur la face B (réaction non spécifique) et exprime les lectures en unités de signal fluorescent (USF). La différence de USF (USF face A - USF face B) de 4 calibrateurs sert à tracer une courbe standard en fonction de leur titre FIAX(R) connu. La différence de USF des sérums à évaluer est lue sur la courbe standard.

Voir schéma 2: Fluorométrie en phase solide.



3. REACTION IMMUNOENZYMATIQUE

La réaction immunoenzymatique indirecte utilisée est telle que décrite par Voller et al. (1976; 1976 a) et dont les réactifs sont produits par M.A. Bioproducts (Cytomegalisa (TM) test kit).

Principe:

Une préparation d'antigènes cytomégaliqes, souche AD 169, est adsorbée passivement sur une surface solide (ici puits de plaque). On met ensuite cette surface en présence d'un sérum humain. Les immunoglobulines s'attacheront si elles sont spécifiques pour les antigènes adsorbés.

On lave les plaques avec du tampon phosphate pour éliminer les anticorps non attachés.

On ajoute des anticorps anti-globulines humaines G liés à une enzyme. Ces anticorps conjugués se fixent de façon spécifique sur le complexe antigène-anticorps, s'il est présent. Après une période d'incubation, on effectue un deuxième lavage pour éliminer les anticorps conjugués non fixés.

On ajoute un substrat spécifique à l'enzyme. La réaction se produit pour une période de temps déterminée et à la fin de celle-ci, on arrête l'hydrolyse du substrat par l'enzyme en ajoutant du NaOH. La réaction colorimétrique est lue par densité optique.

La même procédure est suivie afin d'adsorber sur des puits une préparation d'antigènes normaux et de faire réagir les sérums avec ceux-ci. Ces réactions du sérum avec les 2 préparations d'antigènes sont effectuées en même temps afin d'éliminer les activités non spécifiques qui pourraient être présentes. La lecture de densité optique du puits où la préparation d'antigène normal est adsorbée soustraite à celle où la préparation d'antigènes cytomégaliqes est présente donnera la lecture de densité optique qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps contre les antigènes du cytomégalo virus.

Voir schéma 3: Réaction immunoenzymatique.

schéma 3

REACTION IMMUNOENZYMATIQUE



ANTIGENES CYTOMEGALIQUES (EPREUVE)



ANTIGENE NORMAL (CONTROLE)



IMMUNOGLOBULINES G SPECIFIQUES
AUX ANTIGENES CYTOMEGALIQUES



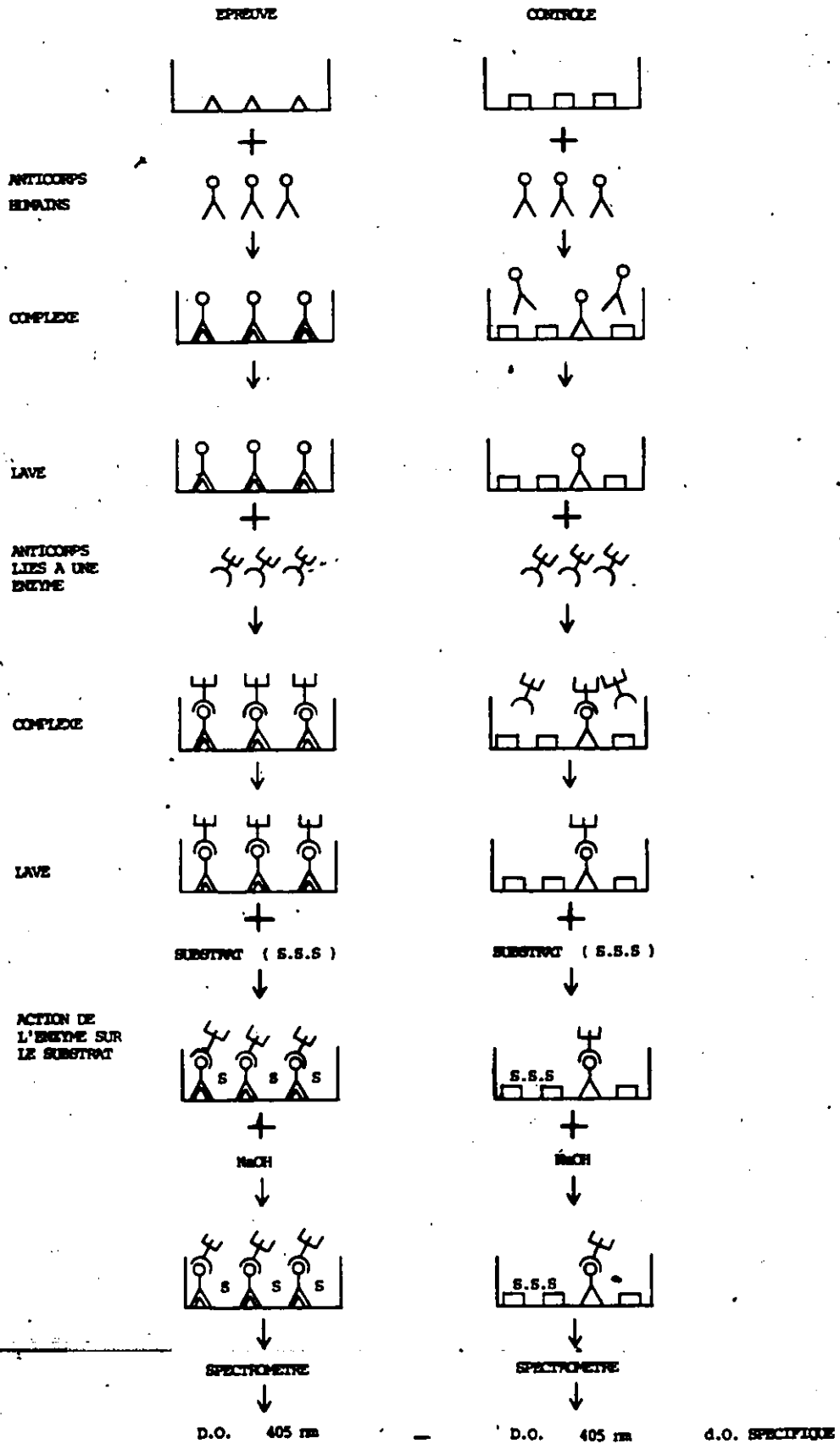
IMMUNOGLOBULINES HUMAINES NON SPECIFIQUES
AUX ANTIGENES CYTOMEGALIQUES



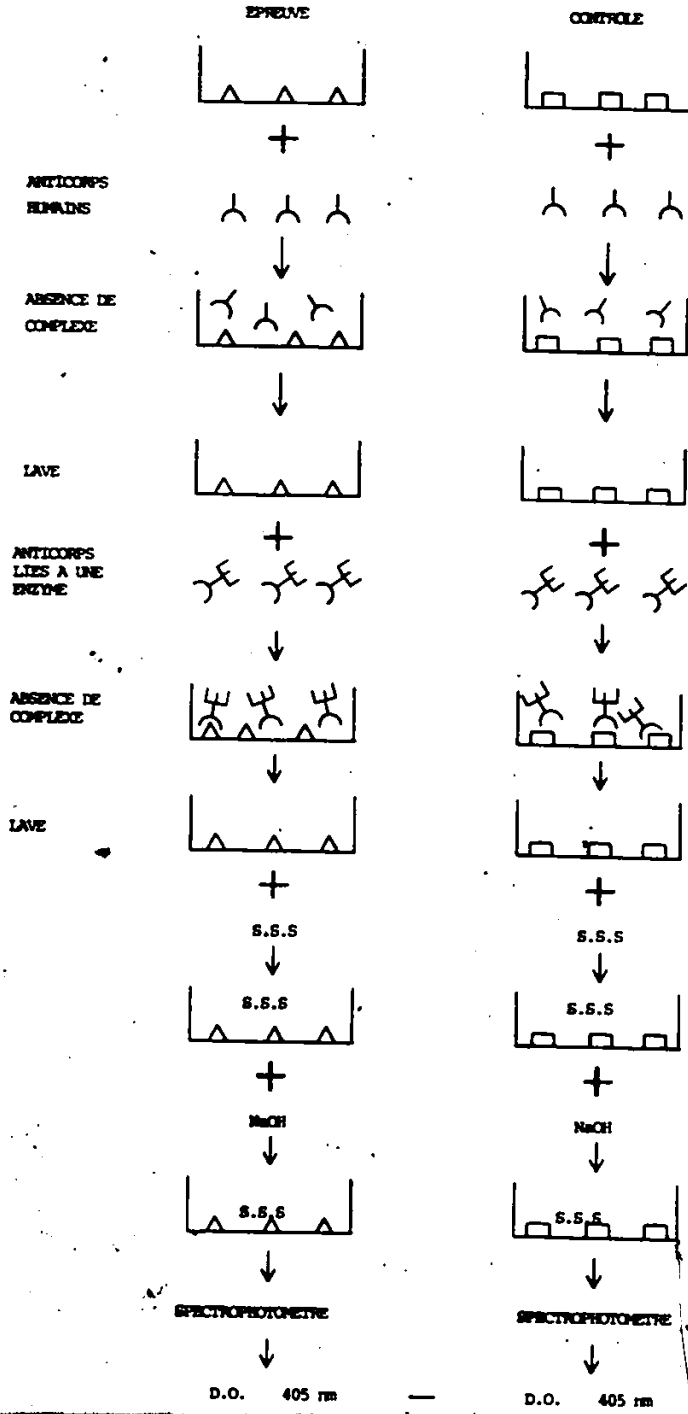
ANTICORPS ANTI - GAMMA - GLOBULINES HUMAINES
LIES A UNE ENZYME

D.O. LECTURE DE DENSITE OPTIQUE

REACTION POSITIVE



REACTION NEGATIVE



4. REACTION d'HEMAGGLUTINATION INDIRECTE

Deux tests d'hémagglutination indirecte ont été utilisés:

- I. le test commercial tel que décrit par Yeager (1979) et produit par Cetus Corporation (Indirect hemagglutination test for cytomegalovirus, 1982).
- II. le test tel que mis au point et décrit par Bernstein and Stewart (1971; Bollew, 1978).

Principe:

L'hémagglutination indirecte consiste à adsorber des antigènes sur la surface de globules rouges. Ceux-ci deviennent les indicateurs de la réaction antigène-anticorps.

L'adsorption des antigènes se fait généralement en altérant la surface des globules rouges par un traitement à l'acide tannique.

Suite à ce traitement, les globules rouges porteurs de la préparation antigénique choisie sont mis à réagir avec le sérum à évaluer. Si le sérum contient les anticorps contre les déterminants antigéniques adsorbés sur les globules rouges, un réseau d'hémagglutination se formera.

Voir schéma 4: Réaction d'hémagglutination indirecte.

I. Hémagglutination indirecte selon Cetus Corporation:

Le test utilise comme indicateur de la réaction des globules rouges humains du groupe O, fixés à la glutaraldéhyde, traités à l'acide tannique et sensibilisés avec une préparation antigénique du virus cytomégalique, souche AD 169.

Les cellules contrôles sont des globules rouges humains du groupe O, fixés et tannés; aucun antigène normal n'a été adsorbé à leur surface.

II. Hémagglutination indirecte selon Bernstein et Stewart:

Le test utilise comme indicateur de la réaction des globules rouges de mouton tannés et sensibilisés avec une préparation antigénique du virus cytomégalique; souche AD 169. Les cellules contrôles sont des hématies tannées seulement, aucun antigène normal n'a été adsorbé à leur surface.

schéma 4

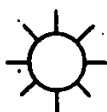
REACTION D'HEMAGGLUTINATION INDIRECTE



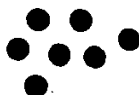
GLOBULES ROUGES



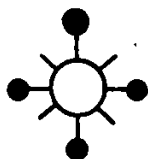
ACIDE TANNIQUE



GLOBULES ROUGES TANNES



ANTIGENES CYTOMEGALIQUES



GLOBULES ROUGES TANNES ET SENSIBILISES
AUX ANTIGENES CYTOMEGALIQUES

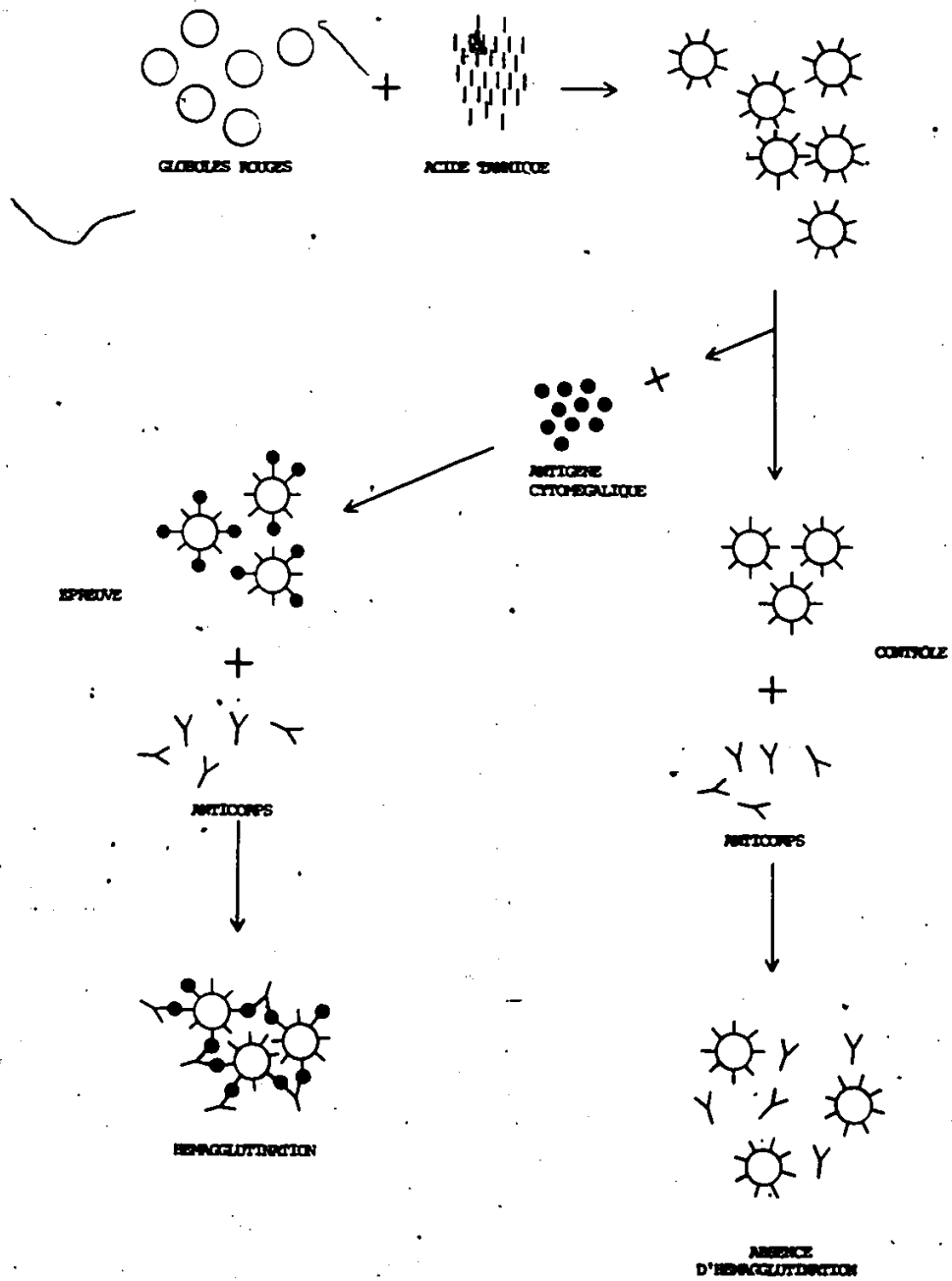


IMMUNOGLOBULINES G et/ou M SPECIFIQUES
AUX ANTIGENES CYTOMEGALIQUES

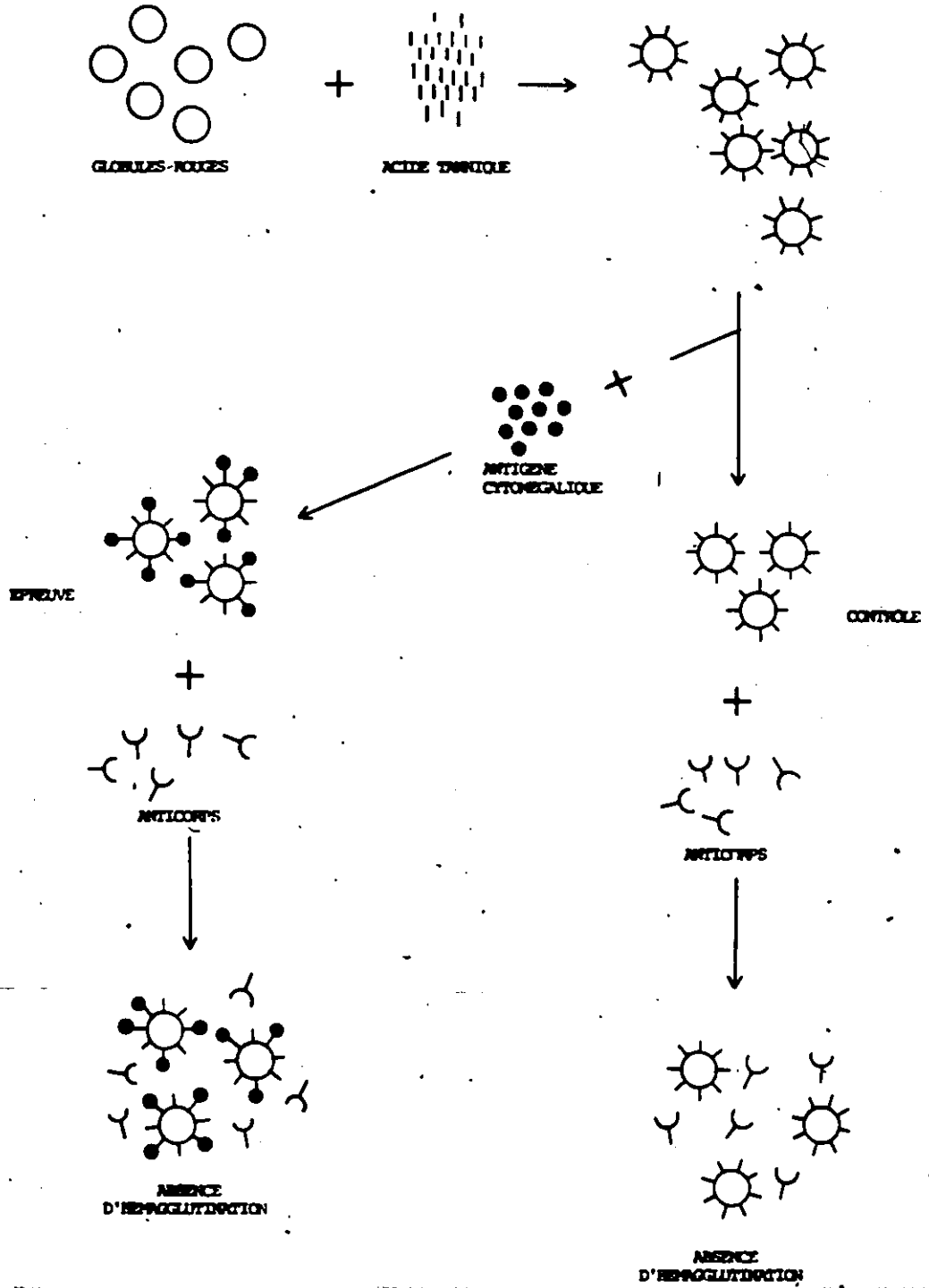


IMMUNOGLOBULINES HUMAINES NON SPECIFIQUES
AUX ANTIGENES CYTOMEGALIQUES

REACTION POSITIVE



REACTION NEGATIVE



5. REACTION de FIXATION du COMPLEMENT

La réaction de fixation du complément (Bradstreet, 1962) est grandement utilisée dans la majorité des laboratoires de virologie. Elle peut servir de moyen d'identifier un virus, mais son principal usage est de montrer la présence d'un anticorps viral dans le sérum.

Cette méthode de détection des anticorps ou des antigènes viraux s'applique à la majorité des virus.

Principe:

La fixation du complément est un test qui met en présence un antigène (connu ou inconnu) et un anticorps (inconnu ou connu). Les immunoglobulines décelées par cette réaction appartiennent, dans le cas du virus cytomégalique, non seulement à la classe des IgG mais probablement aussi aux IgM (Pereira, 1982; Booth, 1980; Cremer, 1978). Un complexe antigène-anticorps se forme s'il s'agit d'antigène-anticorps homologue.

Une source de complément, à une concentration optimale et constante, est ajoutée. Durant une période d'incubation, s'il y a des complexes antigène-anticorps formés, ils fixent le complément. Celui-ci n'est donc plus disponible pour réagir avec le deuxième complexe antigène-anticorps, soit des globules rouges de mouton sensibilisés à l'hémolysine, introduit dans la réaction. Aucune lyse ne se produit et la réaction est positive pour la détection de l'anticorps.

Dependant lors de la réaction antigène-anticorps, s'il ne s'agit pas de l'anticorps homologue à l'antigène, aucun complexe ne se forme. Quand le complément est ajouté, il reste libre dans la suspension. Quand le deuxième système antigène-anticorps est ajouté, le complément libre se fixe sur le complexe et lyse les globules rouges sensibilisés à l'hémolysine. La réaction est négative pour la détection de l'anticorps.

Voir schéma 5: Fixation du complément.

schéma 5

REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT



ANTIGENES CYTOMEGALIQUES



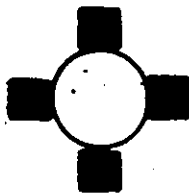
IMMUNOGLOBULINES G et/ou M SPECIFIQUES
AUX ANTIGENES CYTOMEGALIQUES



IMMUNOGLOBULINES HUMAINES NON SPECIFIQUES
AUX ANTIGENES CYTOMEGALIQUES



COMPLEMENT



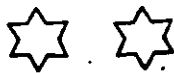
GLOBULES ROUGES SENSIBILISES
A L'HEMOLYSINE

REACTION:

POSITIVE

NEGATIVE

ANTIGENES



+

ANTICORPS



COMPLEXE Ag-Ac

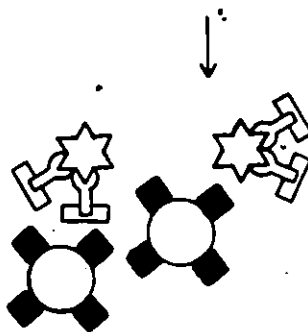
+

COMPLEMENT

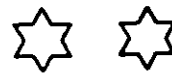


+

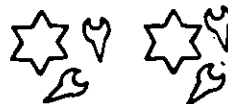
GLOBULES ROUGES
SENSIBILISES A
L'HEMOLYSE



AUCUNE HEOLYSE



+

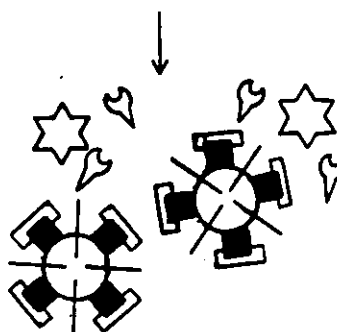


AUCUN COMPLEXE

+



+



HEMOLYSE

RESULTATS

Evaluation de l'HEMAGGLUTINATION PASSIVE selon Stewart

Le test d'hémagglutination passive selon Stewart, utilisant des hématies de mouton, a été choisi par ce laboratoire et inclus dans la comparaison des tests sérologiques disponibles pour la détection des anticorps contre le virus cytomégalytique parce qu'il présente de nombreux avantages. Plusieurs auteurs (Bernstein et Stewart, Fucillo et al., Warner et al., Yeager) rapportent qu'il s'agit d'un test spécifique pour la détection des anticorps cytomégalytiques montrant peu ou pas de réaction croisée avec les différents membres de la famille des herpesvirus. Il permet de détecter les classes d'immunoglobulines G et M. Ils rapportent aussi que la réaction d'hémagglutination est stable, le test pouvant être lu après une incubation de 90 minutes jusqu'à 16 heures (si incubé à 4°C).

Selon ces auteurs, le test présente aussi des avantages techniques. Bien que nécessitant de nombreuses manipulations celles-ci sont faciles à exécuter. De plus, il ne nécessite aucun équipement particulier. Plusieurs sérums peuvent être évalués au même moment, lui permettant d'être utilisé comme test de dépistage.

Ce test d'hémagglutination passive selon Stewart n'étant pas disponible commercialement, il a été standardisé dans notre laboratoire en utilisant:

- comme source d'hématies, des moutons de l'Institut Armand-Frappier, Laval-des-Rapides, Qué.
- comme source d'antigène, la préparation antigénique de cytomégalo-virus AD 169 produit pour le test de fixation du complément au Laboratoire de la Lutte Contre la Maladie (LLCM), Santé et Bien-Être Social, Canada.

Les différentes variables affectant le test d'hémagglutination passive selon Stewart ont été analysées:

1. la variation de sensibilité des hématies provenant de différents moutons.
2. la période de vieillissement des hématies.
3. la concentration d'acide tannique.
4. la concentration de l'antigène cytomégalytique.
5. les cellules de contrôle:
 - a) globules rouges tannés
 - b) globules rouges tannés et sensibilisés avec un antigène normal.
6. la spécificité du test.
7. les sérums testés.
8. les réactions non spécifiques en présence des cellules de contrôle.

VARIABLES

1. Variation de sensibilisation des hématies provenant de différents moutons.

Les prélèvements sanguins de 10 moutons de l'Institut Armand Frappier (IAFP) ont été effectués dans la solution Alsever et conservés à 4°C pendant 10 jours. Ensuite les hématies ont été traitées à l'acide tannique et sensibilisées à l'antigène du virus cytomégalique produit au Laboratoire de la Lutte Contre la Maladie (LLCM), numéro de lot 26 ainsi qu'à l'antigène normal aussi produit au LLCM.

Les hématies sensibilisées ont été évaluées contre: a) un pool de sérums connus comme positifs pour les anticorps cytomégaliqes par fixation du complément et b) un pool de sérums négatifs pour les anticorps cytomégaliqes par fixation du complément et par immunofluorescence indirecte.

La sensibilisation des globules rouges varie en fonction de chacun des moutons. Cette variation de sensibilisation des hématies affecte la sensibilité du test. Afin d'obtenir le maximum de sensibilité, un mouton donneur d'hématies devra être sélectionné selon certaines exigences.

- Un mouton sera donneur d'hématies, si ses hématies
- A. sensibilisées au cytomégalo-virus:
 - a) produisent le titre le plus élevé d'anticorps en présence du "pool" de sérums positifs,
 - b) ne réagissent pas avec le "pool" de sérums négatifs et
 - c) ne s'autoagglutinent pas, c'est à dire ne montrent pas de formation en bouton dans le puits de contrôle des cellules.
 - B. sensibilisées à l'antigène normal (i.e. préparation antigénique à partir de cellules non infectées):
 - a) ne réagissent avec aucun des "pools" de sérums et
 - b) ne s'autoagglutinent pas.

Dans le tableau 1: Variation de sensibilisation des hématies de différents moutons dans le test d'hémagglutination passive, des prélèvements sanguins de 5 moutons ont été sensibilisés à l'antigène cytomégalique après traitement à différentes concentrations d'acide tannique. Le mouton 137 montre le titre le plus élevé d'anticorps en présence du "pool" de sérums positifs; quand il est utilisé après traitement à l'acide tannique à une concentration 1/20000, le "pool" de sérums négatifs ne réagit pas; il n'y a aucune autoagglutination des cellules sensibilisées avec l'antigène cytomégalique et avec l'antigène normal. De tous les prélèvements, c'est celui qui répond aux critères.

Cette sélection a dû être effectuée en 2 étapes:

- a) 3 des 5 premiers prélèvements répondent au traitement de sensibilisation. Du à l'impossibilité d'obtenir davantage de spécimens de ces moutons, une deuxième sélection est effectuée.

b) Le seul prélèvement sanguin de la deuxième série de 5 moutons peut être sensibilisé avec succès.

Les prélèvements sanguins de 4 moutons d'un groupe de 10 moutons ont pu être traités et sensibilisés avec succès avec l'antigène du virus cytomégalique du LLCM.

Tableau 1

VARIATION DE SENSIBILISATION
des HEMATIES de DIFFERENTS MOUTONS
dans le test d'hémagglutination passive

Antigène cytomégalique: 1 / 28

titre ANTICORPS	"pool" POSITIF								"pool" NEGATIF								MOUTON
	acide TANNIQUE								acide TANNIQUE								
	10000	20000	40000	60000	10000	20000	40000	60000	10000	20000	40000	60000	10000	20000	40000	60000	
S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS		
8	+	0	+	0	tr	0	+	0	+	tr	+	0	0	0	0	0	28
16	+	0	+	0	tr	0	tr	0	+	tr	tr	0	0	0	0	0	
32	+	0	+	0	0	0	0	0	tr	tr	0	0	0	0	0	0	
64	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
128	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ctcl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	+	0	+	0	tr	0	tr	0	+	tr	+	tr	0	0	0	0	119
16	+	0	+	0	0	0	0	0	+	tr	+	tr	0	0	0	0	
32	+	0	+	0	0	0	0	0	tr	tr	0	0	0	0	0	0	
64	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
128	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
256	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ctcl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	+	tr	+	0	+	0	0	0	+	+	tr	0	0	0	0	0	137
16	+	0	+	0	+	0	0	0	+	tr	0	0	0	0	0	0	
32	+	0	+	0	tr	0	0	0	tr	tr	0	0	0	0	0	0	
64	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
128	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
256	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
512	tr	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1024	tr	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ctcl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

suite tableau 1

	"pool" POSITIF								"pool" NEGATIF								MOUTON
	acide TANNIQUE				acide TANNIQUE				acide TANNIQUE				acide TANNIQUE				
titre	10000		20000		40000		60000		10000		20000		40000		60000		
ANTICORPS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	
8	+	0	+	0	tr	0	tr	0	+	tr	+	0	0	0	0	0	150
16	+	0	+	0	tr	0	tr	0	+	0	0	0	0	0	0	0	
32	+	0	±	0	0	0	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
64	+	0	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
128	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
256	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ctcl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	+	0	+	0	tr	0	+	0	+	tr	+	tr	0	0	0	0	
16	+	0	+	0	tr	0	tr	0	±	tr	tr	0	0	0	0	0	
32	+	0	+	0	0	0	tr	0	tr	tr	0	0	0	0	0	0	
64	+	0	+	0	0	0	0	0	0	tr	0	0	0	0	0	0	
128	+	0	+	0	0	0	0	0	0	tr	0	0	0	0	0	0	
256	tr	0	tr	0	0	0	0	0	0	tr	0	0	0	0	0	0	
512	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	tr	0	0	0	0	0	0	
1024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	tr	0	0	0	0	0	0	
ctcl	0	tr	0	0	0	0	0	0	0	tr	0	0	0	0	0	0	

ctcl: contrôle des cellules
 S: hématies tannées et sensibilisées avec l'antigène cytomégalique
 NS: hématies tannées et sensibilisées avec l'antigène normal
 0 à +: intensité de la réaction 0 minimum et + maximum
 tr: trace

2. Période de vieillissement des hématies.

La méthodologie de Stewart recommande de laisser vieillir les hématies au moins 3 jours avant de les utiliser dans le test. Une étude a été faite afin de connaître si le rendement du test serait affecté par la durée de la période de maturation des hématies.

Trois prélèvements sanguins obtenus d'un même mouton (sélectionné au préalable comme étant acceptable dans le test) sont vieillis pour une période respective de 11, 18, 39 jours. Les 3 prélèvements ont été manipulés en parallèle, utilisant les mêmes solutions pour le traitement à l'acide tannique (concentration 1 / 40000 établie au préalable) et la même suspension d'antigènes cytomégaliqes pour la sensibilisation des hématies. Les 3 prélèvements ont été évalués en même temps contre le même pool de sérums positifs déjà décrit.

Voir tableau 2: Sensibilisation des hématies dans le test d'hémagglutination passive en fonction de la période de vieillissement.

Dans cette expérience, une maturation de 11 jours n'est pas suffisante, parce que les contrôles de cellules, les cellules sensibilisées à l'antigène cytomégaliqes mises en présence du diluent seulement, montrent une réaction d'autoagglutination après la période d'incubation. Ce prélèvement ne peut pas être utilisé pour évaluer des sérums.

Les prélèvements vieillis 18 et 39 jours ne montrent aucune réaction d'agglutination dans le contrôle des cellules. Le prélèvement utilisé après 39 jours montre cependant une sensibilité supérieure comparativement à celui de 18 jours.

Afin de mieux standardiser le test, une variable est contrôlée si on utilise toujours la même période de maturation pour les hématies originant du même mouton. Les expériences qui suivront utiliseront des prélèvements sanguins vieillis au minimum pour une période de 35 jours.

Tableau 2

SENSIBILISATION des HEMATIES
dans le test d'hémagglutination passive
en fonction de la période de VIEILLISSEMENT
(11-18-39 jours)

Mouton: 597 B IAFF
Acide tannique: 1 / 40 000

titre d' ANTICORPS	réciproque de la dilution de l'ANTIGENE						VIEILLISSEMENT
	4	8	16	32	64	HNS	
4	4	4	4	3	3	0	11 jours
8	3	4	4	3	2	0	
16	3	3	4	3	2	0	
32	2	3	3	3	2	0	
64	2	2	3	3	2	0	
128	1	2	3	2	1	0	
256	1	1	2	2	1	0	
512	1	1	2	2	1	0	
ctcl	tr	tr	1	1	tr	0	
4	3	3	3	3	1	0	18 jours
8	2	2	3	2	1	0	
16	1	2	2	2	tr	0	
32	tr	1	1	1	tr	0	
64	0	tr	1	1	0	0	
128	0	0	tr	tr	0	0	
256	0	0	0	0	0	0	
512	0	0	0	0	0	0	
ctcl	0	0	0	0	0	0	
4	3	3	3	3	2	0	39 jours
8	2	3	3	3	2	0	
16	1	2	3	3	2	0	
32	tr	2	2	2	2	0	
64	tr	1	2	2	1	0	
128	tr	tr	2	1	tr	0	
256	0	tr	1	tr	tr	0	
512	0	0	tr	0	0	0	
ctcl	0	0	0	0	0	0	

ctcl: contrôle de cellules

HNS: hématies tannées non sensibilisées

0 à 4: intensité de la réaction d'hémagglutination,

4 étant le maximum de réaction

0 étant l'absence de réaction

3. Concentration d'acide tannique.

Afin de bien standardiser le test d'hémagglutination passive, la méthodologie de Stewart (méthode 4.II. Hémagglutination passive selon Stewart) recommande de titrer la concentration d'acide tannique avec chaque nouveau prélèvement sanguin.

Voir tableau 3: Titration d'acide tannique dans le test d'hémagglutination passive.

L'acide tannique a été titré à maintes reprises pour différents prélèvements sanguins du mouton 137B IAFP. Ces prélèvements avaient tous été vieillis pour une période minimale de 35 jours.

La concentration optimale d'acide tannique est celle où les hématies tannées et sensibilisées à l'antigène cytomégalique montre:

- a) le maximum de sensibilité pour détecter les anticorps en présence du pool de sérums positifs
- b) une absence de réaction autant avec les cellules tannées non sensibilisées que dans le contrôle des cellules S et NS.

La concentration optimale d'acide tannique obtenue de ces titrations est la même, soit 1 / 20000, pour tous les prélèvements sanguins du mouton 137 B IAFP vieillis pour une période de 35 jours.

Tableau 3

TITRATION D'ACIDE TANNIQUE
dans le test d'hémagglutination passive

mouton: 137B IAFF
Ag cytomégalyque LLCM lot no 26: 1 / 28

Ac	Acide TANNIQUE													
	1/5000		1/10000		1/20000		1/40000		1/60000		1/80000		1/100000	
	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS
B	2	0	4	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
16	2	0	4	0	4	0	tr	0	0	0	0	0	0	0
32	1	0	4	0	4	0	tr	0	0	0	0	0	0	0
64	tr	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	tr	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1024	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ctcl	0	0	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

S: hématies sensibilisées avec la dilution 1 / 28 de l'antigène LLCM.

NS: hématies traitées à l'acide tannique, aucune sensibilisation.

ctcl: contrôle de cellules i.e.

ctcl-S: hématies sensibilisées mises en présence de diluent contenant 1 % de sérum de lapin

ctcl-NS: hématies traitées à l'acide tannique mises en présence de diluent contenant 1 % de sérum de lapin.

0 à 4: intensité de la réaction d'hémagglutination

4 étant le maximum de réaction

0 étant l'absence de réaction

4. Concentration de l'antigène cytomégalique.

Quand les 3 variables (mouton donneur d'hématies, période de vieillissement, concentration d'acide tannique) sont définies et contrôlées, on établit la concentration de l'antigène cytomégalique à utiliser dans ces conditions.

Voir tableau 4: Titration de l'antigène cytomégalique dans le test d'hémagglutination passive.

Une série de dilutions (1/8, 1/16, ..., 1/128) de la préparation d'antigène cytomégalique sert à sensibiliser des hématies traitées à l'acide tannique.

Toutes ces hématies sensibilisées aux différentes dilutions du matériel antigénique sont évaluées en même temps, en présence du même pool de sérums positifs (déjà décrit).

La dilution optimale de l'antigène est celle où les hématies sensibilisées montrent le titre le plus élevé d'anticorps cytomégaliqes (i.e. la plus grande sensibilité), et où les hématies sensibilisées ne montrent pas de réaction d'autoagglutination dans les contrôles de cellules.

Dans cette expérience, aucune des dilutions ne s'autoagglutine et les dilutions 1/8, 1/16 et 1/32 montrent la même sensibilité. Nous avons utilisé la préparation antigénique produite au LLCM, numéro de lot 26, à la dilution 1/24, parce qu'elle est à l'intérieur des limites de dilutions où la sensibilité est maximale, et qu'elle permet d'utiliser une quantité minimale d'antigène.

Toutes les expériences suivantes ont été effectuées en utilisant le mouton no-137B de l'Institut Armand Frappier, Laval-des-Rapides, Qué. Les hématies vieilles au minimum 35 jours sont traitées à une concentration d'acide tannique 1/20000 et sensibilisées à une dilution 1/24 de l'antigène cytomégalique (lot no 26) produit au Laboratoire de la Lutte contre la Maladie, Santé et Bien-Etre Social, Canada.

Tableau 4

TITRATION DE L'ANTIGENE CYTOMEGALIQUE
dans le test d'hémagglutination passive

mouton: 137B IAFP
acide tannique: 1 / 20000

titre ANTICORPS	réciproque de la dilution de l'ANTIGENE					
	8	16	32	64	128	NS
8	4	4	4	3	1	0
16	4	4	4	2	0	0
32	4	4	4	2	0	0
64	4	4	4	1	0	0
128	3	3	3	1	0	0
256	2	2	2	0	0	0
512	tr	tr	tr	0	0	0
1024	0	0	0	0	0	0
ctcl	0	0	0	0	0	0

NS: hématies tannées non sensibilisées

ctcl: hématies ou sensibilisées ou tannées mises en présence du diluent contenant 1 % de sérum de lapin.

5. Cellules de contrôle.

La préparation d'antigène du cytomégalovirus produit au LLCM qui est utilisée dans le test n'est pas une préparation purifiée mais un extrait de toute la couche cellulaire infectée. Les déterminants antigéniques viraux, de structure ou non, sont additionnés de toutes les composantes cellulaires qui peuvent interférer au niveau de la réaction d'hémagglutination passive. C'est pourquoi des cellules de contrôle adéquates doivent comporter des hématies tannées et sensibilisées à l'antigène normal.

L'antigène normal, ou de contrôle, correspond aux cellules non infectées récoltées dans les mêmes conditions que les cellules infectées; l'antigène normal est donc le matériel cellulaire non infecté et l'antigène du virus cytomégalique correspond aux virus plus le matériel cellulaire. Deux préparations différentes d'antigène normal sont utilisées soit:

- a. des fibroblastes humains de poumon extraits au tampon de glycine (produit par Flow Laboratories)
- b. des fibroblastes humains de prépuce récoltés dans du tampon véronal (produit au LLCM).

Afin de vérifier si les sérums réagissent de la même façon en présence des hématies de contrôle a) tannées mais non sensibilisées et b) tannées mais sensibilisées à l'antigène normal (2 préparations distinctes), 35 sérums sont testés dans le test d'hémagglutination passive selon Stewart contre ces 3 suspensions d'hématies de contrôle.

Voir tableau 5: Réaction d'hémagglutination passive de 35 sérums contre 3 suspensions différentes d'hématies de contrôle.

Deux sérums agglutinent les hématies tannées alors que 13 sérums agglutinent les hématies tannées et sensibilisées à l'antigène normal peu importe qu'il s'agisse des fibroblastes humains produit par Flow Lab. ou LLCM.

Les calculs de coefficient de corrélation (r) ainsi que du t -test sont effectués d'après Colton (1974) dans le but de déterminer s'il y a une relation entre la réaction d'hémagglutination des 3 suspensions différentes d'hématies de contrôle.

Le coefficient de corrélation entre les hématies tannées et les hématies tannées et sensibilisées avec Ag normal de Flow est $r: .32$ avec un t -test de 1.94. Le coefficient de corrélation entre les hématies tannées et les hématies tannées et sensibilisées avec Ag normal du LLCM est $r: .07$ avec un t -test de .4.

Le coefficient de corrélation entre les 2 suspensions d'hé-

maties tannées ET sensibilisées à l'antigène normal est $r: .76$ avec un t-test de 6.72.

Voir tableau 6: Calcul du coefficient de corrélation pour les 3 suspensions d'hématies de contrôle dans le test d'hémagglutination passive.

De ces calculs, on peut conclure qu'il n'y a aucune relation entre la réaction d'agglutination des hématies tannées et celle des hématies tannées et sensibilisées à l'antigène normal de Flow ou du LLCM.

Il y a cependant une relation significative entre les réactions d'agglutination montrées par les sérums en présence des 2 suspensions d'hématies tannées et sensibilisées à l'antigène normal. Selon l'interprétation des résultats définie dans la section méthode 4.II. (Hémagglutination passive selon Stewart), un sérum qui montre une réaction d'agglutination avec les hématies de contrôle, ne peut être déterminé par le test d'hémagglutination passive. Si les hématies de contrôle sont inadéquates (ex: ici, les hématies tannées sans sensibilisation avec l'antigène normal) le sérum sera faussement considéré positif. Des cellules de contrôle appropriées sont donc nécessaires au test d'hémagglutination passive.

Comme le taux de réaction d'agglutination non spécifique des sérums en présence des hématies de contrôle sensibilisées à l'antigène normal est significatif, nous avons apporté une modification au test d'hémagglutination passive selon Stewart. Nous avons remplacé les hématies de contrôle (hématies tannées) par des hématies de contrôle qui sont des hématies tannées et sensibilisées à l'antigène normal.

Dû au fait que la préparation d'antigène du virus cytomégalique que nous utilisons est produite au LLCM, nous utiliserons aussi la préparation d'antigène normal produit au LLCM.

Tableau 5

REACTION d'HEMAGGLUTINATION PASSIVE de 35 SERUMS
 contre 3 suspensions différentes
 d'HEMATIES DE CONTROLE

Suspension Hématies de contrôle	Nombre de sérums	
	AVEC AGGLUTINATION	SANS AGGLUTINATION
TANNEES	2 (6 %)	33
tannées ET SENSIBILISEES avec Ag normal (Flow)	13 (37 %)	22
tannées ET SENSIBILISEES avec Ag normal (LLCM)	13 (37 %)	22

Tableau 6

Calcul du COEFFICIENT DE CORRELATION
 pour les 3 suspensions d'HEMATIES de CONTROLE
 dans le test d'hémagglutination passive

	TANNEES	Tannées ET SENSIBILISEES avec Ag Flow	Tannées ET SENSIBILISEES avec Ag LLCM
TANNEES		r: .32 t: 1.94 (.1 < P < .05)	r: .07 t: .4 (P > 0.1)
Tannées ET SENSIBILISEES avec Ag Flow			r: .76 t: 6.72 (P < 0.01)

6. Spécificité du test d'HEMAGGLUTINATION PASSIVE .

Afin de vérifier la spécificité du test d'hémagglutination passive pour la détection des anticorps contre le virus cytomégalique, des sérums à titre élevé pour les membres du groupe Herpesvirus sont sélectionnés et évalués dans le test.

Voir tableau 7: Spécificité du test d'hémagglutination passive.

Des 17 sérums positifs par fixation du complément pour la détection des anticorps contre le virus Herpes simplex, seulement 5 soit 29 %, montrent une réaction avec les antigènes cytomégaliqes.

Parmi 14 sérums positifs par fixation du complément pour la détection d'anticorps contre le virus de la varicelle, 5, soit 36 %, réagissent dans le test d'hémagglutination passive.

Les sérums positifs pour le virus Epstein-Barr ont été évalués par immunofluorescence indirecte pour la recherche d'anticorps dans le sérum contre les antigènes de la capsidie du virus (VCA). Ce test a été effectué au "Virus Reference Laboratory, Central Public Health Laboratories", Toronto. Des 10 sérums positifs, 3, soit 30 %, sont positifs pour la détection des anticorps contre le virus cytomégalique,

Aucun groupe de sérums positifs pour un membre du groupe Herpesvirus ne montre une réaction croisée avec le virus cytomégalique. La réaction mise en évidence dans le test d'hémagglutination passive est donc spécifique pour le virus cytomégalique.

Tableau 7

SPECIFICITE du test
d'HEMAGGLUTINATION PASSIVE

Sérums positifs pour les virus	Méthode	Titre	Nombre testés	Nombre positifs	% de positifs pour le virus cytomégalique
H.S.	FC	20- \geq 640	17	5	29
V.Z.	FC	5- \geq 640	14	5	36
E.B.	IF-VCA	\geq 1280	10	3	30

7. Sérums testés.

Finalement 173 sérums obtenus de donneurs de sang sont évalués dans le test d'hémagglutination passive contre des hématies sensibilisées au cytomégalovirus et contre des hématies sensibilisées à l'antigène normal. Quarante-six sérums, soit 26.5 %, agglutinent et les hématies sensibilisées au virus et celles sensibilisées à l'antigène normal. Si l'antigène normal n'avait pas été ajouté pour sensibiliser les hématies de contrôle, ces 46 sérums auraient été considérés comme positifs. Par contre, ces sérums, dû à leur réaction non spécifique, demeurent indéterminés et ne peuvent être évalués dans le test.

Cent vingt-sept sérums peuvent être déterminés correctement dans le test parce qu'ils ne montrent aucune réaction avec les cellules de contrôle. De ceux-ci 40, soit 31.5 %, sont positifs pour la détection des anticorps contre le virus cytomégalique et 87, soit 68.5 %, sont négatifs.

Voir tableau B: Sérums évalués dans le test d'hémagglutination passive.

Tableau 8

SÉRUMS ÉVALUÉS
dans le test d'HEMAGGLUTINATION PASSIVE

Sérums testés	173	
Sérums montrant une réaction non spécifique	46	(26.5 %)
Sérums pouvant être déterminés	127	
POSITIFS	40	(31.5 %)
NEGATIFS	87	(68.5 %)

8. Réaction non spécifique en présence des cellules de contrôle.

Le phénomène de réaction non spécifique avec les hématies de contrôle est important puisqu'il affecte un peu plus de 25 % des sérums testés. Ces personnes sont éliminées du pool de donneurs de sang ou d'organes parce qu'il est impossible de déterminer, seulement par le test d'hémagglutination passive, si ces sérums sont positifs ou négatifs pour les anticorps cytomégalytiques.

Certaines expériences ont été faites dans le but:

- A. de déterminer la source de la réaction non spécifique.
- B. d'éliminer cette réaction des sérums par différents traitements:
 - a) centrifugation à 40C
 - b) traitement au kaolin 25 %
 - c) fractionnement des sérums
 - d) adsorption sur lignées cellulaires.
- C. de trouver une préparation antigénique qui répondrait davantage aux exigences du test.

Parmi les 46 sérums qui agglutinent les cellules de contrôle, ceux qui montrent cette réaction à un titre élevé et qui sont disponibles en quantité suffisante sont sélectionnés pour exécuter les différents essais.

B.A. Sources de réaction non spécifique.

Certains facteurs sont rapportés dans la littérature (Davis, 1973; Lennette, 1979) comme pouvant être source d'erreur dans l'identification d'anticorps viraux. Ce sont principalement, le facteur rhumatoïde ou certains anticorps hétérophiles, entre autre des agglutinines de globules rouges de mouton, de boeuf ou de cheval.

Le facteur rhumatoïde apparaît normalement chez les gens atteints de maladie rhumatoïde mais peut aussi se trouver chez des gens lors d'infections virales et même chez des gens normaux. Les anticorps hétérophiles peuvent apparaître dans le sérum de patients atteints de maladies virales.

Différents tests sont disponibles pour vérifier la présence des anticorps hétérophiles: le test Mono-spot (voir méthode 13) a été choisi. La présence du facteur rhumatoïde a été évaluée par le test commercial d'ORTHO (voir méthode 12).

Seize des 46 sérums qui montrent une activité non spécifique en présence des hématies sensibilisées avec l'antigène normal ont été testés et ont tous été trouvés négatifs pour la recherche des anticorps hétérophiles et du facteur rhumatoïde.

Les résultats de ces 2 tests nous permet d'éliminer le facteur rhumatoïde ainsi que les anticorps hétérophiles comme agent responsable de la réaction non spécifique des sérums avec

les hématies sensibilisées avec l'antigène normal.

B.B. TRAITEMENTS DES SERUMS MONTRANT UNE REACTION NON SPECIFIQUE.

a. Centrifugation à 4 C.

Six sérums, à réaction non spécifique avec les hématies de contrôle, sont centrifugés à 3200 g / 12 heures à 4°C, afin de vérifier si des particules centrifugeables pourraient être tenues responsables de la réaction non spécifique.

Aucun sérum ne montre une diminution du titre avec les cellules sensibilisées à l'antigène normal. Ce traitement ne réussit pas à éliminer cette réaction non spécifique.

b. Traitement au Kaolin 25 %.

Le traitement au Kaolin est normalement utilisé dans le test d'inhibition de l'hémagglutination afin d'éliminer du sérum des inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination des globules rouges par le virus. Nous avons donc utilisé ce traitement (voir méthode 8. Traitement au Kaolin 25 %) afin d'éliminer ces lipoprotéines et aussi de vérifier s'ils interviennent dans la réaction d'hémagglutination passive.

Une diminution du titre de 2 dilutions ou davantage est considérée comme significative.

Après le traitement au Kaolin de 8 sérums, 4 sérums montrent une diminution d'au moins 2 dilutions mais non une disparition de la réaction alors que 4 sérums ne montrent aucune amélioration.

Voir tableau 9: Traitement au kaolin de sérums montrant une réaction non spécifique avec les cellules de contrôle.

Ces résultats ne nous permettent pas de conclure que le phénomène de réaction non spécifique des hématies de contrôle dans le test d'hémagglutination passive soit dû aux mêmes inhibiteurs que dans le test d'inhibition de l'hémagglutination.

Le traitement au Kaolin n'élimine pas mais plutôt diminue l'intensité de la réaction non spécifique. Ce traitement agit en adsorbant des lipoprotéines du sérum.

Tableau 9

TRAITEMENT AU KAOLIN de sérums
montrant une réaction non spécifique
avec les cellules de contrôle

sérums traités	8
diminution du titre en présence des hématies de contrôle	4
titre inchangé en présence des hématies de contrôle	4

c. Fractionnement des sérums

Afin de vérifier si l'agent ou les agents responsables de la réaction non spécifique avec les hématies de contrôle sont associés préférentiellement avec une classe d'immunoglobulines, 13 sérums sont fractionnés (voir méthode 10. Fractionnement des sérums).

Les fractions purifiées d'immunoglobulines où la concentration est la plus élevée, sont évaluées contre les hématies sensibilisées à l'antigène normal. Les fractions des sérums ne sont pas dialysées, mais les fractions correspondantes obtenues d'un gradient de sucrose servent de contrôle dans le test. Aucune des fractions témoins ne montre une réaction.

Un sérum est éliminé dû à l'absence de réaction après le fractionnement. Dix sérums agglutinent les hématies de contrôle dans la fraction IgM seulement, et 2 sérums réagissent dans les 2 fractions, soit IgG et IgM.

Voir tableau 10: Fractionnement de sérums montrant une réaction non spécifique avec les cellules de contrôle dans le test d'hémagglutination passive.

La chance d'obtenir par hasard (Colton, p. 69) l'activité non spécifique seulement dans la classe des IgM chez 10 sérums est $1 / 37179$, ce qui est relativement faible.

Le fait d'obtenir 2 sérums où l'activité non spécifique se retrouve dans les 2 classes G et M peut s'expliquer de 2 façons:

- i) il s'agit bien de l'activité présente dans les IgG et les IgM, OU
- ii) l'activité pourrait être dans la classe des IgA.

Les conditions de centrifugation lors du fractionnement du sérum situent la bande des IgA entre celle des IgG et des IgM; cette bande peut facilement contaminer, lors de la collecte des fractions, celles contenant les IgG et les IgM. La pureté des fractions a été vérifiée pour les classes d'immunoglobulines G et M, mais non pour celle des IgA.

Afin de vérifier cette hypothèse, les fractions qui ont été utilisées dans le test d'hémagglutination passive devraient être vérifiées par immunodiffusion pour la présence d'IgA. Ceci n'a pu être vérifié dû au volume limité des fractions et à l'absence de sérum pour répéter le fractionnement.

De ces fractionnements il ressort que l'activité non spécifique est surtout associée à la classe des immunoglobulines M.

Tableau 10

FRACTIONNEMENT de sérums
montrant une réaction non spécifique
avec les cellules de contrôle
dans le test d'hémagglutination passive

sérums fractionnés	13
sérum éliminé.	1
sérums évalués	12
<hr/>	
ACTIVITE NON SPECIFIQUE dans la	
- fraction IgM seulement	10
- fraction IgG seulement	0
- fractions IgG et IgM	2

d. Adsorption sur lignées cellulaires

Les hématies de contrôle qui sont agglutinées de façon non spécifique par certains sérums sont recouverts d'une préparation d'antigène normal. De plus on a observé, dans l'étude des variables, une augmentation du nombre de réactions non spécifiques de 6 % à 37 % quand on a ajouté une préparation d'antigène normal sur les cellules de contrôle. L'antigène normal étant une suspension sonifiée d'une couche cellulaire humaine non infectée, nous avons décidé d'adsorber les sérums sur des cultures de cellules vivantes afin de vérifier si l'agent ou les agents responsables de cette réaction non spécifique seraient éliminés. Deux sources de cellules ont été utilisées, des cellules humaines et de singe. Dans le cas où il y aurait adsorption, on voulait vérifier si celle-ci était spécifique aux cellules humaines.

Les cultures cellulaires utilisées sont des lignées primaires diploïdes (fibroblastes humains de poumon "HFL" et des cellules de rein de singe "GMK") et des lignées continues hétéroploïdes (cellules épithéliales humaines "Hep-2" et des cellules de rein de singe "Vero"). Après une double adsorption (voir méthode 9. Adsorption des sérums) sur chacune des lignées, 16 sérums sont évalués dans le test d'héماغglutination passive contre les hématies sensibilisées à l'antigène normal.

Une diminution du titre de 2 dilutions ou davantage est considérée comme une adsorption de l'agent ou des agents responsables de la réaction non spécifique.

Des 16 sérums adsorbés sur les 4 lignées cellulaires, 11 (69 %) montrent une diminution du titre ou une absence de réaction non spécifique après l'adsorption sur toutes les lignées cellulaires utilisées, alors que 5 (31 %) sérums ne montrent aucun changement après l'adsorption.

Voir tableau 11: Adsorption sur des lignées cellulaires de sérums montrant une réaction non spécifique avec les cellules de contrôle dans le test d'héماغglutination passive.

Quand l'adsorption se produit, elle se produit de façon non différenciée avec les 4 lignées de cellules vivantes qu'il s'agisse de cellules humaines ou de singe, de lignées primaires ou continues. Quand un sérum n'est pas adsorbé, il ne l'est par aucune lignée. Ces lignées cellulaires qui sont de 2 primates peuvent avoir des déterminants antigéniques semblables à leur surface.

On peut émettre une hypothèse pour expliquer le phénomène de réaction non spécifique en présence d'hématies de contrôle sensibilisées à l'antigène normal: l'agent ou les agents responsables de la réaction chez ces 11 sérums pourraient être des anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques sur la

surface de cellules non infectées.

Avec l'information obtenue jusqu'à maintenant, la réaction non spécifique des 5 sérums est inexplicée.

Tableau 11

ADSORPTION sur des LIGNEES CELLULAIRES
de sérums montrant une réaction
non spécifique avec les cellules de contrôle
dans le test d'hémagglutination passive

Numéro sérum	Titre avant adsorption	Titre après ADSORPTION sur			
		HFL	Hep-2	GMK	Vero
2362	32	16	16	32	16
404	32	128	64	64	32
427	16	8	16	16	16
640	8	8	8	16	8
2083	32	4	4	4	8
192	64	8	8	16	8
4850	32	32	64	32	32
799	32	<4	<4	<4	<4
2021	32	<4	8	8	4
4122	64	<4	<4	<4	<4
4940	32	<4	8	8	8
2715	32	<4	<4	<4	<4
2722	64	<4	4	<4	<4
2738	32	<4	<4	<4	<4
461	64	<4	4	<4	<4
2367	16	4	<4	<4	<4
Sérums adsorbés		16			
Activité non spécifique éliminée		11 (69 %)			
Activité non spécifique non éliminée		5 (31 %)			

B.C. PREPARATION ANTIGENIQUE.

- a) Fractionnement de l'antigène du virus cytomégalique et de l'antigène normal.

Suite à l'observation faite dans la section B.B.d. où, après adsorption des sérums sur cellules vivantes, il y a disparition partielle de l'activité non spécifique contre l'antigène normal, on a décidé de fractionner la préparation d'antigène cytomégalique et celle d'antigène normal afin d'identifier, si possible, la ou les fractions responsables de la réaction non spécifique, et d'identifier une ou des fractions libres de toute activité non spécifique.

La préparation d'antigène produit au LLCM distribuée aux laboratoires qui en font la demande contient 1 % d'albumine bovine, fraction V. Le même protocole a servi pour produire des préparations d'antigènes cytomégalique et normal sans albumine bovine. Ces préparations d'antigènes sont fractionnées sur gradient de sucrose 7 - 50 % w/w, soit 1.0299 - 1.2296 g / cm cube (voir méthode 7. Fractionnement de l'antigène).

La linéarité du gradient de sucrose est vérifiée par réfractométrie.

Le tracé de l'antigène du virus cytomégalique décèle 3 pics de protéines quand il est comparé à celui de l'antigène normal obtenu dans les mêmes conditions de production et de fractionnement.

Les concentrations de sucrose des pics sont:

- le pic no 1, formé des fractions no 7, 8, 9, 10, 48 à 50 % (1.2186 à 1.2296 g / cm cube)
- le pic no 2, composé des fractions 20 à 31, 27 à 39 % (1.1128 à 1.1713 g / cm cube)
- le pic no 3, formé des fractions à la surface du gradient soient 48, 49, 50, 3.5 à 6.5 % (1.0119 à 1.0239 g / cm cube).

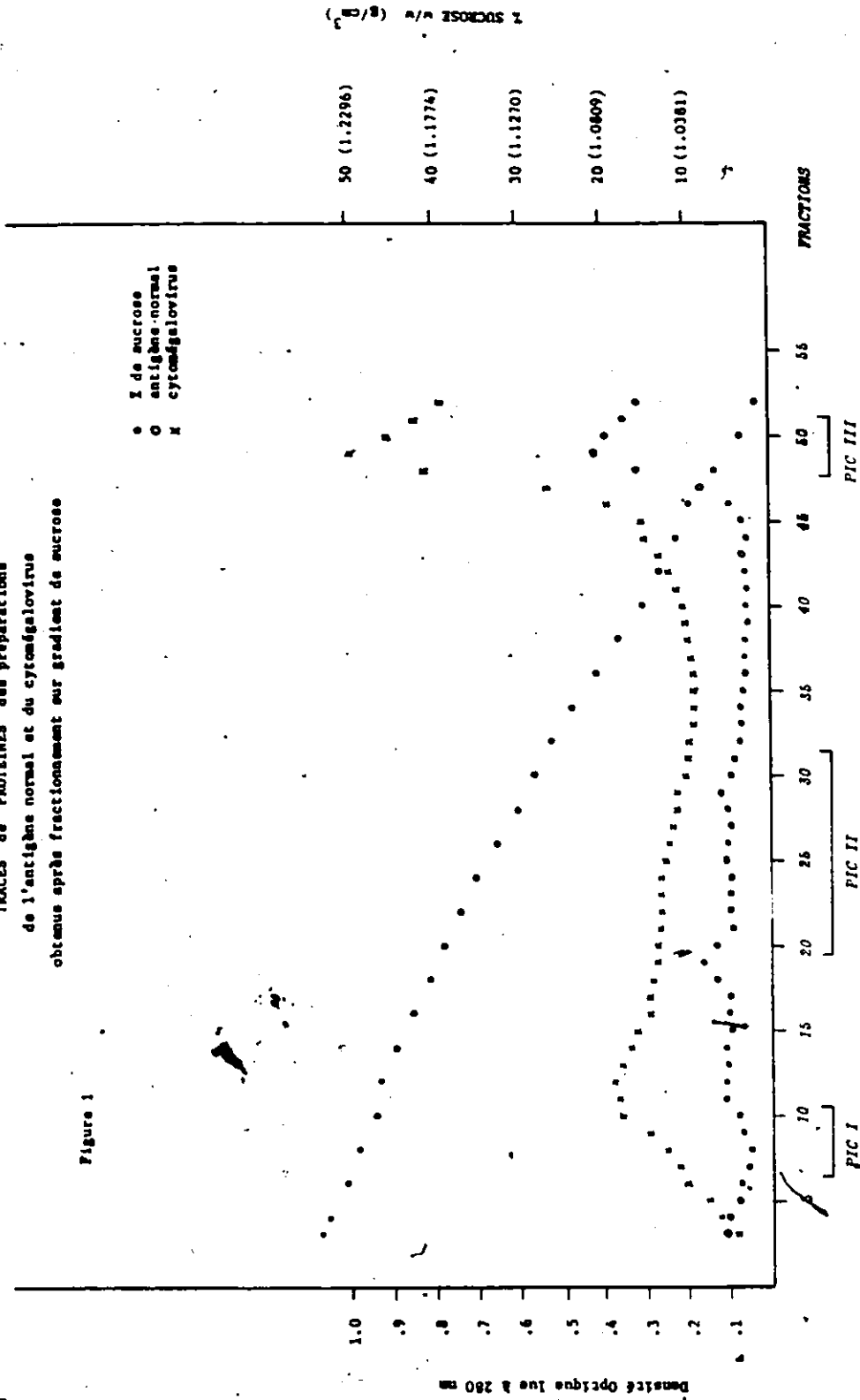
Ces pics de l'antigène cytomégalique ainsi que celui de l'antigène de contrôle sont évalués du point de vue:

- i) de leurs caractéristiques ~~physiques~~ en microscopie électronique.
- ii) de leur contenu en protéines par densité optique à 280 nm
- iii) de leur activité antigénique dans le test de fixation du complément ainsi que dans celui d'hémagglutination passive.

Voir figure 1: Tracé de protéines des préparations de l'antigène normal et du cytomégalovirus obtenu après fractionnement sur gradient de sucrose.

TRACES de PROTEINES des préparations
de l'antigène normal et du cytomégalovirus
obtenus après fractionnement sur gradient de sucrose

Figure 1



i) Caractéristiques physiques:

Les caractères physiques des différents pics ont été lus en microscopie électronique par le personnel du laboratoire régional de virologie de l'est de l'Ontario. La méthode utilisée pour préparer les grilles est décrite dans la section Méthode 11. Microscopie électronique.

Voir tableau 12: Caractéristiques en microscopie électronique des pics obtenus du fractionnement de l'antigène cytomégalytique.

Dans le pic no 1 où la concentration de sucrose est la plus élevée (1.2186 à 1.2296 g / cm cube), on retrouve les particules denses. Elles correspondent à une structure virale plus grande qu'un virus, sans acide nucléique ou avec un acide nucléique incomplet, mais possédant une mosaïque antigénique très similaire au virion.

Dans le pic no 2 (1.1128 à 1.1713 g / cm cube), on retrouve les virions complets.

Dans le pic no 3, où la concentration en sucrose est de 3.5 à 6.5 % (1.0119 à 1.0239 g / cm cube), on retrouve le matériel léger demeuré sur le gradient après centrifugation. Ce matériel représente des débris de membranes.

ii) Contenu en protéines:

Le matériel antigénique qui est produit sans albumine bovine a un contenu en protéines de 8.65 g / l dans la préparation du cytomégalo virus et de 4.19 g / l dans celle de l'antigène normal. Ceux-ci sont concentrés (voir méthode 7. Fractionnement de l'antigène A. matériel à fractionner) d'un volume de 20.0 ml à un volume de 2.0 ml par centrifugation sur un coussin de sucrose 60 % w/w. Avant d'être mis sur un gradient de sucrose, 7 - 50 % w/w, ils sont dialysés.

La concentration en protéines des matériaux concentrés est:

- *) antigène cytomégalytique: 16.0 g / l
- **) antigène normal: 6.75 g / l

Ces matériaux mis sur gradient de sucrose donnent 3 pics dont:

- *) le PIC no 1: contient 0.187 g / l de protéines dans l'antigène cytomégalytique et 0.087 g / l dans le matériel cellulaire non infecté.
- **) le PIC no 2: contient 0.463 g / l de protéines dans l'antigène cytomégalytique et 0.125 g / l dans le matériel cellulaire non infecté.
- **) le PIC no 3: contient 4.875 g / l de protéines dans

l'antigène cytomégalyque et
2.1 .g / l dans le matériel cellulaire non
infecté.

Voir tableau 13: Concentration protéique des antigènes
cytomégalyque et normal avant et après fractionnement.

Suite à la concentration par centrifugation sur coussin de
sucrose 60 % w/w des préparations d'antigènes, on s'attendrait à
ce que la concentration protéique augmente davantage.

Le matériel dit concentré provient du matériel à l'interface
du coussin de sucrose et de la suspension à concentrer.
Certaines particules de la préparation antigénique originale
(i.e. au moment de la récolte) peuvent demeurer en suspension
étant trop légères pour sédimenter. D'autres particules de la
préparation originale (i.e. au moment de la récolte) peuvent
avoir une densité si élevée qu'elles se retrouveraient dans la
solution de sucrose 60 % w/w et peut être même sédimentées au
fond du tube.

L'évaluation protéique dans le coussin de sucrose 60 % w/w
et dans le surnageant, parties non incluses dans le matériel
concentré, montre qu'il y a du matériel protéique présent.

Tableau 12

CARACTERISTIQUES en MICROSCOPIE ELECTRONIQUE
des pics obtenus du
FRACTIONNEMENT de l'ANTIGENE CYTOMEGALIQUE

	DENSITE (g/cm cube)	CARACTERISTIQUE
PIC no 1	1.2186 à 1.2296	particules denses
PIC no 2	1.1128 à 1.1713	virions enveloppés
PIC no 3	1.0119 à 1.0239	particules amorphes

Tableau 13

CONCENTRATION PROTEIQUE des
ANTIGENES CYTOMEGALIQUE et NORMAL
AVANT et APRES fractionnement

ANTIGENE	CONCENTRATION g / l
.....	
CONCENTRE	
Cytomégalyque	16.0
Normal	6.75
.....	
FRACTIONNE	
PIC no 1 Cytomégalyque	0.187
Normal	0.087
PIC no 2 Cytomégalyque	0.463
Normal	0.125
PIC no 3 Cytomégalyque	4.875
Normal	2.1
.....	

iii) l'activité antigénique:

Les 3 pics de protéines des 2 préparations d'antigènes normal et du virus cytomégalique décrits dans la section 8.C.a. (Fractionnement de l'antigène du virus cytomégalique et de l'antigène normal) sont évalués pour leur activité antigénique dans les tests d'hémagglutination passive selon Stewart et de fixation du complément.

Par le test d'hémagglutination passive, tous les pics ont été testés le même jour en utilisant les hématies du mouton 137B IAFP, la même concentration d'acide tannique (1/20000), le même pool de sérums positifs et de sérums négatifs. Ces pools avaient été vérifiés et trouvés sans activité non spécifique en présence des hématies de contrôle.

Le matériel concentré et les 3 pics de protéines ont été utilisés dilués 1/2 à 1/32 et testés contre les dilutions (1/4 à 1/512) des pools de sérums positifs et négatifs dans les tests d'hémagglutination passive et de fixation du complément.

La dilution optimale de l'antigène est celle qui détectera la plus grande concentration d'anticorps i.e. où la dilution du sérum qui réagit sera la plus élevée.

Dans le TEST DE FIXATION DU COMPLEMENT, la dilution optimale de l'antigène concentré est entre 1/4 et 1/8, pour ce qui est des pics obtenus après le fractionnement,

le pic no 1 a une activité faible à la dilution 1/2.

le pic no 2 a une activité optimale à la dilution 1/2.

le pic no 3 a une activité optimale entre 1/2 et 1/4.

L'activité antigénique de fixation du complément dans les fractions de l'antigène est faible. Elle semble associée avec le matériel à faible densité plutôt qu'avec les particules complètes.

Aucune activité n'a été montrée dans aucun des pics de l'antigène normal.

Dans le TEST D'HEMAGGLUTINATION PASSIVE, quand le pic no 1 est testé contre les pools positifs et négatifs, il montre exactement la même activité en présence des hématies sensibilisées à l'antigène cytomégalique qu'avec l'antigène normal. Cette activité non spécifique rend l'utilisation du pic no 1 impossible.

Voir tableau 14A: Hémagglutination passive de l'antigène pic no 1

Le pic no 2 qui correspond aux virions complets montre une activité optimale dans la dilution 1/2 de l'antigène cytomégalique, par contre son contrôle d'hématies (i.e. hématies sensibilisées à l'antigène cytomégalique mises à réagir avec le tampon diluant contenant 1 % de sérum de lapin) montre des traces

d'autoagglutination qui sont aussi visualisées en présence du pool négatif.

Le pic correspondant de l'antigène normal ne montre aucune réaction tant avec le pool positif que négatif que dans les contrôles d'hématies sensibilisées aux différentes dilutions de l'antigène.

Dû à ces traces d'activité non spécifique de l'antigène cytomégalique dans le pic no 2, celui-ci n'est peut-être pas désirable comme antigène de choix pour éliminer la réaction non spécifique du test. Afin de vérifier ceci, le volume du pic no 2 qui est en quantité suffisante, est concentré afin d'améliorer l'activité antigénique. Suite à la concentration (5 fois) sur filtre Amicon, l'activité antigénique a été vérifiée et trouvée identique à celle avant la concentration. Lors de la concentration, le matériel antigénique a probablement été adsorbé sur le filtre.

Après cette concentration du pic no 2, le matériel disponible est insuffisant pour poursuivre les études sur les sérums à réaction non spécifique avec les hématies de contrôle. La production d'un nouveau lot d'antigènes, afin de répéter cette étape et de l'utiliser avec les sérums à réaction non spécifique, aurait nécessité un minimum de 6 mois de travail supplémentaire.

Voir tableau 14B: Hémagglutination passive de l'antigène pic no 2

Le pic no 3 montre une activité antigénique optimale en hémagglutination passive entre les dilutions 1/2 à 1/4. Cependant le pic no 3 de l'antigène normal montre une activité non spécifique avec les pools positif et négatif.

Les contrôles d'hématies (i.e. hématies sensibilisées aux diverses dilutions mises en présence seulement du diluent contenant 1 % de sérum de lapin) ne montrent aucune réaction.

Voir tableau 14C: Hémagglutination passive de l'antigène pic no 3

Le tableau 14D résume l'activité antigénique du matériel concentré et fractionné, dans les tests d'hémagglutination passive et de fixation du complément. La même dilution optimale de l'antigène ou de ses fractions donne une activité optimale dans les 2 tests.

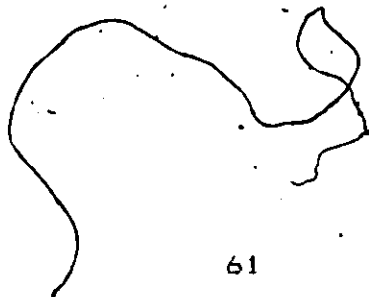


Tableau 14A

Hémagglutination passive
de l'ANTIGÈNE PIC NO 1

titre d' anticorps <u>POSITIF</u>	Hématies sensibilisées au CYTOMEGALOVIRUS					Hématies sensibilisées à l'ANTIGÈNE NORMAL				
	réciproque de la dilution de l'ANTIGÈNE									
	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32
4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
16	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ctcl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>titre anticorps NEGATIF</u>										
4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
16	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ctcl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(ctcl: controle des hématies)

Tableau 14B

Hémagglutination passive
de l'ANTIGENE PIC NO. 2

	Hématies sensibilisées au CYTOMEGALOVIRUS					Hématies sensibilisées à l'ANTIGENE NORMAL				
	réciproque de la dilution de l'ANTIGENE									
titre anticorps POSITIF	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32
4	4	1	tr	tr	tr	0	0	0	0	0
8	4	1	tr	tr	tr	0	0	0	0	0
16	4	tr	0	0	0	0	0	0	0	0
32	4	tr	0	0	0	0	0	0	0	0
64	3	tr	0	0	0	0	0	0	0	0
128	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ctcl	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
titre anticorps NEGATIF										
4	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ctcl	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(ctcl: contrôle des hématies)

Tableau 14C

Hémagglutination passive
de l'ANTIGENE PIC NO 3

titre anticorps	Hématies sensibilisées au CYTOMEGALOVIRUS					Hématies sensibilisées à l'ANTIGENE NORMAL				
	réciproque de la dilution de l'ANTIGENE									
	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32
POSITIF										
4	4	4	4	2	1	2	2	2	1	tr
8	4	4	4	2	1	2	1	1	tr	0
16	4	4	4	2	1	0	0	0	0	0
32	4	4	4	2	1	0	0	0	0	0
64	4	4	3	2	tr	0	0	0	0	0
128	4	4	2	1	0	0	0	0	0	0
256	4	3	2	1	0	0	0	0	0	0
512	2	2	1	tr	0	0	0	0	0	0
ctcl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NEGATIF										
4	0	0	0	0	0	1	1	1	tr	0
8	0	0	0	0	0	tr	tr	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ctcl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(ctcl: contrôle des hématies)

Tableau 14D

ACTIVITE ANTIGENIQUE dans les tests
de FIXATION DU COMPLEMENT et
et d'HEMAGGLUTINATION PASSIVE.
des antigenes concentres et fractionnes

MATERIEL	FC	HP
Concentré	1/4 - 1/8	1/4 - 1/8
Fractionné		
PIC no 1	trace - 1/2	impossible à utiliser
PIC no 2	1/2	1/2
PIC no 3	1/2 - 1/4	1/2 - 1/4

Le pic no 3 qui est en fait le seul pic disponible pour être utilisé comme antigène sert pour évaluer 16 sérums connus comme ayant une activité non spécifique avec les hématies sensibilisées à l'antigène normal dans le test d'hémagglutination passive.

Le titre des sérums avec l'antigène normal non fractionné varie de 8 à 64. La réaction non spécifique des sérums avec le pic no 3 de l'antigène normal sera considérée corrigée quand les sérums montrent une diminution d'au moins 2 dilutions dans la réaction avec les hématies de contrôle et de plus quand ils ont un titre inférieur à 8.

Parmi les 16 sérums testés, 6 sérums, soit 38 %, montrent une diminution d'au moins 2 dilutions dans la réaction avec les hématies de contrôle sensibilisées avec le pic no 3 de l'antigène normal et ont un titre \leq à 4. Dix sérums, soit 62 %, sont positifs pour la réaction non spécifique dont 8 ne montrent aucun changement dans la réaction; deux sérums ont une diminution mais ont un titre égale à 8.

Le pic no 3 de l'antigène normal ne corrige pas entièrement le problème de réaction non spécifique.

Il est à noter que ces mêmes sérums ont été évalués contre l'antigène normal non fractionné dans le test de fixation du complément. La dilution de l'antigène normal utilisé est la même que la dilution optimale de l'antigène cytomégalique établie par titration en échiquier dans le test de fixation du complément.

Aucun des sérums testés ne montrent de réaction non spécifique avec l'antigène normal dans le test de fixation du complément.

Voir tableau 15: Sérums à réaction non spécifique évalués contre l'antigène normal dans les tests de fixation du complément (FC) et d'hémagglutination passive (HP).

Tableau 15

SERUMS à réaction non spécifique EVALUES
 contre l'ANTIGENE NORMAL dans les tests
 de FIXATION du COMPLEMENT (FC) et
 d'HEMAGGLUTINATION PASSIVE (HP)

NUMERO	HP Titre avec antigène normal	HP Titre avec PIC NO 3 antigène normal	FC Titre avec antigène normal
404	32	16	<4
427	16	8	<4
799	32	<4	<4
2021	32	8	<4
4122	64	8	<4
4940	32	4	-
2715	32	<4	<4
2722	64	4	<4
2738	16	4	<4
436	16	16	-
528	8	<4	<4
537	8	4	<4
538	8	8	<4
2648	8	64	<4
2656	8	4	<4
2721	8	8	<4

b) Antigène préparé par congélation - décongélation.

Suite à l'impossibilité d'éliminer entièrement les réactions non spécifiques après fractionnement sur gradient de sucrose de l'antigène cytomégalique produit au LLCM, une préparation d'antigène, produit après un cycle de congélation-décongélation (voir méthode 6.B Congélation-Décongélation) telle que décrite par Yeager (501), est évaluée avec les sérums qui montrent cette réaction non spécifique.

Le matériel récolté après congélation-décongélation contient 8.2 g / l de protéines dans la préparation du cytomégalovirus et 2.52 g / l dans celle de l'antigène normal comparativement à 8.65 g / l pour la préparation cytomégalique tel que produit au LLCM et 4.19 g / l pour l'antigène normal. La concentration protéique de la préparation antigénique du virus cytomégalique produite par congélation-décongélation est sensiblement la même que celle produite par le LLCM. Par contre la préparation par congélation-décongélation libère moins de matériel cellulaire si on compare sa concentration protéique de l'antigène normal qui correspond à la moitié de celle obtenue dans l'antigène normal du LLCM.

Avant d'être utilisé dans le test d'hémagglutination passive, les préparations produites par congélation-décongélation sont concentrées de la même façon que celles produites au LLCM utilisées lors du fractionnement (voir méthode 7.A Matériel à fractionner). La dilution optimale de l'antigène cytomégalique à utiliser a été obtenue par titration en échiquier effectuée au préalable, la dilution de l'antigène normal utilisée correspond à celle de l'antigène cytomégalique.

Sept sérums qui ont montré une réaction non spécifique avec l'antigène normal (préparation de cellules non infectées) produit au LLCM sont testés contre la préparation produite après un cycle de congélation - décongélation.

Parmi les 7 sérums, 5 sérums (71%) montrent une élimination complète de la réaction non spécifique en présence des hématies sensibilisées avec l'antigène normal obtenu par congélation-décongélation. Deux sérums (29%), bien que montrant une diminution du titre de la réaction non spécifique, réagissent toujours avec les hématies sensibilisées à l'antigène normal.

Voir tableau 16: Sérums à réaction non spécifique évalués dans le test d'hémagglutination passive contre 2 préparations d'antigène normal.

Tableau 16

SÉRUMS à réaction non spécifique ÉVALUÉS
 dans le test d'hémoagglutination passive
 contre 2 PRÉPARATIONS d'ANTIGÈNE NORMAL

	Antigène normal du LLCM								Antigène normal après congélation-décongélation							
	Titre d'Anticorps															
	4	8	16	32	64	128	256	512	4	8	16	32	64	128	256	512
NUMERO																
799	4	4	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2021	4	4	4	4	3	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4122	4	4	4	3	1	0	0	0	4	2	tr	0	0	0	0	0
2715	4	4	3	1	0	0	0	0	tr	tr	0	0	0	0	0	0
2722	4	4	4	4	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2738	4	4	4	2	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0
2367	3	1	tr	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ctcl	0								0							

(ctcl: controle des hématies)

COMPARAISON DES METHODES SEROLOGIQUES

POPULATION ETUDIEE

Des spécimens sériques provenant de donneurs de sang de la Croix-Rouge reçus au Laboratoire Régional de Virologie de l'Est de l'Ontario sont analysés par 6 tests sérologiques afin d'évaluer leur statut immunologique contre le virus cytomégalytique.

Ces personnes de la région d'Ottawa sont acceptées comme donneurs de sang selon les critères établis par la Croix-Rouge.

Ces critères sont:

- âgé entre 18 à 65 ans
- être en bonne santé
- avoir aucune histoire de fièvres intermittentes, d'allergies, d'hypertension
- ne pas avoir été atteint d'hépatite, de mononucléose, de tuberculose, de syphilis
- ne pas être sous médication
- ne pas avoir reçu de vaccins durant les 3 derniers mois.

L'étude comparative des méthodes sérologiques comprend les tests suivants:

1. immunofluorescence (IFA)
2. fluorométrie en phase solide (FIAX)
3. immunoenzymatique (ELISA)
4. hémagglutination indirecte (HP): A. selon un test commercial utilisant des hématies humaines de groupe O (Cetus)
B. selon un test décrit par Stewart utilisant des hématies de mouton (Stewart).
5. fixation du complément (FC).

Ces tests représentent 4 méthodes différentes de détection des anticorps. Les tests d'IFA et de FIAX utilisent le même principe de réaction, différant dans la lecture de la réaction finale: dans le test IFA, la fluorescence est évaluée à l'aide d'un microscope à UV, le test FIAX mesure l'intensité de la réaction au moyen d'un fluoromètre.

La même réaction est utilisée dans les tests HP, cependant les cellules indicatrices de la réaction sont différentes: des hématies humaines du groupe O sont utilisées dans le test produit par Cetus alors que dans le test de Stewart les hématies proviennent d'un mouton.

Tous ces tests utilisent comme antigène, le virus cytomégalytique AD-169. Le mode de préparation de l'antigène est connu pour le test d'hémagglutination passive utilisant les hématies de mouton ainsi que pour le test de fixation du complément; ces 2 tests utilisent la préparation antigénique pour la fixation du complément produit au LCCM. Les 4 tests

commerciaux, ne décrivent d'aucune façon leur méthode de préparation de l'antigène, ni de purification si tel est le cas.

Les tests commerciaux sont effectués selon les recommandations des compagnies respectives et leur seuil significatif accepté tel que recommandé, puisque l'objectif de cette étude est de comparer différents tests commerciaux tel qu'ils sont utilisés dans les laboratoires qui les achètent.

Les tests ont été comparés du point de vue de leur sensibilité, de leur spécificité, de leur exactitude, ainsi qu'en fonction du taux de faux résultats, tant positifs que négatifs. Les études de reproductibilité ont été faites seulement pour les tests de FC, HP et IFA.

Les analyses statistiques pour évaluer le rendement des différents tests utilisés ont été faites selon Griner et al. (1981).

^a VRAIS positifs	^c FAUX négatifs
^b FAUX positifs	^d VRAIS négatifs

SENSIBILITE: est la probabilité d'obtenir un résultat positif dans le test en présence de la maladie.
Formule: $a / a + c$

SPECIFICITE: est la probabilité d'obtenir un résultat négatif dans le test en absence de la maladie.
Formule: $d / b + d$

TAUX de faux positifs: est la probabilité d'obtenir un résultat positif dans le test en absence de la maladie.
Formule: $b / b + d$ ou $100 - \text{specificité}$

TAUX de faux négatifs: est la probabilité d'obtenir un résultat négatif dans le test en présence de la maladie.
Formule: $c / a + c$ ou $100 - \text{sensibilité}$

EXACTITUDE: est la probabilité d'obtenir un résultat de détection ou non de l'anticorps qui sera en accord avec la présence ou l'absence de la maladie.
Formule: $a + d / a + b + c + d$

La comparaison des tests sérologiques tient aussi compte des difficultés techniques pour effectuer le test, du délai nécessaire pour compléter le test (du temps de la réception du spécimen au temps où le résultat est disponible), de l'équipement indispensable à la réalisation du test, et finalement des aspects subjectifs de la lecture finale du test.

Cent vingt et un spécimens obtenus de donneurs de sang sont évalués par les 6 tests sérologiques étudiés. Certains sérums montrent une réaction non spécifique dans un ou l'autre des tests.

Voir tableau 17: Réactions non spécifiques des sérums évalués par les 6 tests étudiés.

Dans le test d'IFA, un sérum qui montre de la fluorescence associée avec les noyaux de toutes les cellules infectées et non infectées est l'indice de la présence d'un facteur antinucléaire. Ce sérum doit être éliminé de la comparaison.

Dans le test HP Cetus, 4 sérums sont éliminés parce qu'ils agglutinent les hématies de contrôle rendant impossible la détermination des anticorps cytomégaliqes.

Vingt et un sérums sont éliminés de la comparaison des 6 tests sérologiques parce qu'ils ont une réaction non spécifique en présence des hématies sensibilisées avec l'antigène normal dans le test d'hémagglutination passive selon Stewart.

Finalement, 2 sérums montrent une activité anticomplémentaire dans le test de FC empêchant la détection des anticorps cytomégaliqes.

Voir tableau 18: Nombre de sérums étudiés dans la comparaison des 6 tests.

Ainsi 28 sérums, qui montrent une activité non spécifique dans un ou l'autre des tests sont éliminés. Des 121 sérums testés, 93 sérums servent à faire l'étude comparative des 6 tests sérologiques.

Tableau 17

REACTIONS NON SPECIFIQUES des sérums évalués
par les 6 tests étudiés

TEST	NOMBRE
IFA	1 (a)
FIAX	0
ELISA	0
HP Cetus	4 (b)
HP Stewart	21 (b)
FC	2 (c)

- (a) facteur antinucléaire
- (b) hémagglutination des hématies de contrôle
- (c) activité anti-complémentaire

Tableau 18

NOMBRE de SERUMS ETUDIÉS
dans la comparaison des 6 tests

nombre de sérums testés	121
nombre de sérums éliminés*	28
nombre de sérums étudiés dans la comparaison	93

* dû à une réaction non spécifique dans l'un ou l'autre des tests, tel que décrit dans la table 9.

Nous avons distribué les sérums en fonction du nombre de tests positifs:

- 14 sérums étaient positifs par les 6 tests à la fois
- 5 sérums étaient positifs par 5 tests
- 1 seul sérum était positif par 4 tests
- 1 sérum était positif par 3 tests
- 4 sérums étaient positifs par 2 tests
- 29 sérums étaient positifs par 1 test
- 39 sérums n'étaient positifs par aucun test.

Voir tableau 19: Distribution des sérums en fonction du nombre de tests positifs.

Nous avons établi un critère de POSITIVITE pour la présence d'anticorps cytomégaliqnes:

"Un sérum pour être POSITIF doit montrer une réaction spécifique Ag.Ac selon au moins 4 des 6 tests utilisés." S'il s'agit vraiment d'une réaction spécifique antigène-anticorps, celle-ci ne devrait pas être affectée par le mode de détection de l'anticorps, à moins bien entendu qu'il s'agisse d'une méthode de détection vraiment peu sensible.

Un sérum est éliminé puisque, selon le critère de positivité établi, il ne peut être considéré ni positif ni négatif, étant positif selon 3 tests et négatif selon 3 tests.

Vingt sérums sont considérés vrai positifs puisqu'ils le sont selon 4 tests ou davantage. Soixante-douze sérums sont de vrai négatifs parce qu'ils le sont selon un minimum de 4 tests.

Tableau 19

DISTRIBUTION des sérums
en fonction du nombre de tests POSITIFS

Nombre de tests POSITIFS	Nombre de sérums	TOTAL
6	14	20
5	5	
4	1	
3	1	1
2	4	72
1	29	
0	39	

Pour chaque sérum, chacun des résultats obtenus selon les différents tests sont comparés entre eux. Si le résultat obtenu selon un test est corroboré par au moins 3 autres tests, ce résultat est un VRAI résultat (i.e. correctement évalué); au contraire, s'il n'est pas corroboré, il est un FAUX résultat (i.e. mal évalué).

Suite à cette analyse nous pouvons dire que les tests immunoenzymatique et d'hémagglutination passive selon Cetus donnent un nombre égal de résultats correctement évalués soit 91 sérums.

Les tests de fixation du complément, de fluorométrie en phase solide et d'hémagglutination passive selon Stewart suivent avec un nombre respectif de 86, 85, 84 sérums correctement évalués.

Par le test d'immunofluorescence indirecte, seulement 71 parmi les 92 sérums testés sont correctement évalués.

Voir tableau 20: Distribution des sérums évalués dans les 6 tests d'après le critère de positivité.

Ces résultats sont aussi résumés dans la figure 2. Résultat de 20 sérums POSITIFS et de 72 sérums NEGATIFS pour la détection des anticorps cytomégaliqques par 6 tests sérologiques.

Le rendement des différents tests sérologiques est effectué selon les critères décrits par Griner (1981).

Voir tableau 21: Rendement des tests étudiés.

Les tests ont été classés par rangs selon leur sensibilité, spécificité, exactitude et le taux de faux positifs et de faux négatifs. Ces rangs, de 1 à 6 (1 étant le meilleur rendement), permettent d'analyser les tests et de déterminer le ou les tests qui répondent le mieux aux exigences initiales.

Les tests d'hémagglutination passive de Cetus et de Stewart, ainsi que le test de fluorométrie montrent la plus grande sensibilité (100 %). Le test de fixation du complément a la sensibilité la plus faible (75 %).

Le test immunoenzymatique vient au premier rang en ce qui concerne la spécificité (100 %), suivi par les test d'hémagglutination passive de Cetus (99 %) et de fixation du complément (99 %).

Les tests immunoenzymatique et d'hémagglutination passive de Cetus ont la meilleure exactitude (99 %). L'exactitude la plus

basse est obtenue par le test d'immunofluorescence indirecte.

Le test de fixation du complément a le taux de faux négatifs le plus élevé alors que le test d'immunofluorescence indirecte a le taux de faux positifs le plus élevé.

Tableau 20 .

**DISTRIBUTION des SERUMS EVALUES
dans les 6 tests
d'après le critère de POSITIVITE**

Catégorie	Test	Nombre de sérums		TOTAL	Nombre de VRAIS résultats
		a b POS.	c d NEG.		
POSITIF NEGATIF	IFA	19 20	1 52	20 72	71
POSITIF NEGATIF	FIAX	20 7	0 65	20 72	85
POSITIF NEGATIF	ELISA	19 0	1 72	20 72	91
POSITIF NEGATIF	Cetus	20 1	0 71	20 72	91
POSITIF NEGATIF	Stewart	20 8	0 64	20 72	84
POSITIF NEGATIF	FC	15 1	5 71	20 72	86

- a: vrai positifs
- b: faux positifs
- c: faux négatifs
- d: vrais négatifs

Tableau 21

RENDEMENT des tests étudiés

TESTS	Sensibilité	Spécificité	Taux de faux positifs	Taux de faux négatifs	Exactitude
IFA	95 % (4)	72 % (6)	28 % (6)	5 % (4)	77 % (6)
FIAX	100 % (1)	90 % (4)	10 % (4)	0 % (1)	92 % (4)
ELISA	95 % (4)	100 % (1)	0 % (1)	5 % (4)	99 % (1)
Cetus	100 % (1)	99 % (2)	1 % (2)	0 % (1)	99 % (1)
Stewart	100 % (1)	89 % (5)	11 % (5)	0 % (1)	91 % (5)
FC	75 % (6)	99 % (2)	1 % (2)	25 % (6)	93 % (3)

() rang obtenu parmi les 6 tests.

0

Enfinement on a évalué les tests en ce qui concerne leurs exigences techniques, soit facilité, délai, équipement spécial et lecture objective, en les classant par rang de 1 à 6, 1 étant celui qui répond le mieux aux exigences 6 étant celui qui répond le moins bien aux exigences.

Voir tableau 22: Evaluation des exigences techniques des tests étudiés.

On entend par facilité: les manipulations à faire pour exécuter les tests, l'évaluation subjective de la qualité des réactifs, les limites de temps critiques pour ajouter un réactif ou arrêter la réaction. Le test d'hémagglutination passive de Cetus se place au premier rang.

Le délai le plus court pour l'exécution du test représente un élément favorable puisque, parfois, une transplantation ou une transfusion d'urgence est nécessaire pour une personne à risque élevé. Nous avons comme critère d'un délai satisfaisant un test qui pouvait être exécuté en une journée de travail i.e: inférieur à 8 heures. Tous les tests répondent à ce délai inférieur à 8 heures sauf le test de FC que nous utilisons qui, lui, nécessite une incubation de 12 heures pour fixer le complément.

- L'équipement spécial qui est nécessaire pour les différents tests est: pour le test IFA, un microscope à lumière UV; pour le test FIAX, un fluoromètre; pour le test ELISA, un spectrophotomètre pour microplaques quoiqu'un spectrophotomètre classique équipé d'un système d'aspiration pourrait être satisfaisant. Les tests d'HP selon Cetus et selon Stewart ainsi que FC ne nécessitent aucun équipement particulier.

Le dernier critère pour évaluer les exigences techniques est la difficulté d'interprétation de la réaction finale. Les tests où il y a un lecteur tels FIAX et ELISA ne présentent pas ce problème. Les tests de FC où on évalue le degré d'hémolyse sur une échelle de 0 à 4, ainsi que les tests HP selon Cetus et selon Stewart où on doit interpréter l'intensité du réseau d'hémagglutination, aussi sur une échelle de 0 à 4, sont sujet à l'interprétation des technologistes. Cependant le test IFA est le plus subjectif, puisqu'il faut: a) localiser la fluorescence dans le noyau des cellules infectées et b) évaluer l'intensité de fluorescence sur une échelle de 0 à 4 et c) comparer cette fluorescence à celle des contrôles négatifs.

Tableau 22

EVALUATION des EXIGENCES TECHNIQUES
des tests étudiés

TESTS	Facilité	Délai (hres)	Equipement spécial	Lecture subjective
IFA	3	2 (1)	oui (4)	oui (6)
FIAX	2	2 (1)	oui (6)	non (1)
ELISA	3	3 (1)	oui (5)	non (1)
Cetus	1	2-4 (1)	non (1)	oui (3)
Stewart	5	6-8 (2)	non (1)	oui (3)
FC	5	24 (6)	non (1)	oui (3)

() rang obtenu parmi les 6 tests.

La dernière étape dans le choix d'un ou des tests appropriés est de compiler le classement du rendement de chacun des tests ainsi que celui de leurs exigences techniques.

Voir tableau 23: Classement des tests en fonction de l'évaluation du rendement et des exigences techniques.

Le meilleur test en ce qui concerne le rendement est le test d'HP selon Cetus.

Le test qui obtient le meilleur rang pour ce qui est des exigences techniques est aussi le test d'HP selon Cetus.

En additionnant les rangs obtenus quant à la sensibilité, la spécificité, l'exactitude, la fiabilité, la facilité, le délai, l'équipement, la subjectivité, le test d'HP vient au premier rang, suivi par le test ELISA et par le test FIAX.

Tableau 23

CLASSEMENT des TESTS en fonction
de l'évaluation du RENDEMENT et
des EXIGENCES TECHNIQUES

TEST	Somme des rangs performance	RANG	Somme des rangs practicalité	RANG	TOTAL	Classement
IFA	26	6	14	4	40	6
FIAX	14	3	9	2	23	3
ELISA	11	2	10	3	21	2
Cetus	7	1	6	1	13	1
Stewart	17	4	14	4	31	4
FC	19	5	15	6	34	5

DISCUSSION

Dû à l'importance grandissante du virus cytomégalytique comme agent responsable d'infection ou de maladie à la suite de transfusions sanguines ou de ses sous-produits ou lors de transplantations rénales, cardiaques, de moëlle, etc. la nécessité est de dépister ces donneurs, où le virus latent peut être transmis au receveur.

À l'heure actuelle, bien que certaines techniques, telles que hybridation ARN-ADN, puissent démontrer le génome viral in situ, celles-ci ne sont malheureusement pas applicables dans un laboratoire de diagnostic ou de dépistage parce que ces techniques nécessitent un personnel spécialisé, de l'équipement particulier et du temps.

Il y a une forte corrélation entre le fait d'être porteur du virus latent et le statut immunologique. Aussi la nécessité d'obtenir un test sérologique fiable est très importante. Le but de ce travail consistait à faire une évaluation de tests sérologiques facilement disponibles pour les laboratoires.

Afin d'inclure le test d'hémagglutination passive selon Stewart dans la comparaison des tests sérologiques, il a fallu évaluer le test lui-même et ses différentes variables. En même temps, nous avons évalué l'utilisation, dans le test d'hémagglutination passive selon Stewart, de l'antigène cytomégalytique de fixation du complément produit au LLCM.

A. Evaluation du test d'HEMAGGLUTINATION PASSIVE selon Stewart.

La standardisation des 4 variables dans le test d'hémagglutination passive, soit la source d'hématies, la période de vieillissement des hématies, la concentration d'acide tannique et des cellules de contrôle, est un processus long, surtout pour les 3 premières variables mentionnées; une variation de l'une d'elles entraîne une variation des 2 autres, par exemple, si on change de mouton donneur d'hématies, la période de vieillissement des hématies ne sera pas nécessairement la même et la concentration d'acide tannique changera.

Nous avons sélectionné un seul mouton donneur d'hématies, établi une durée constante de maturation des hématies et avons utilisé une concentration fixe d'acide tannique.

La préparation antigénique produit au Laboratoire de la Lutte contre la Maladie qui est utilisée dans le test d'hémagglutination passive selon Stewart consiste en un extrait de la couche cellulaire infectée. Cette préparation qui n'est pas purifiée contient une concentration importante de matériel cellulaire. Nous avons donc vérifié s'il y avait une différence dans la réaction des sérums en présence de 3 suspensions différentes d'hématies de contrôle.

Les trois suspensions d'hématies de contrôle consistent en :
i) hématies tannées seulement, ii) hématies tannées et sensibilisées à l'antigène normal produit au LLCM, iii) hématies tannées et sensibilisées à l'antigène normal produit par Flow. Celles-ci sont testées contre 35 sérums: six pour cent des sérums testés montrent une réaction non spécifique avec la suspension d'hématies tannées seulement, alors que 37 % de ces mêmes sérums montrent une réaction non spécifique avec une ou l'autre des préparations d'antigène normal. D'après le calcul du coefficient de corrélation, il n'y a aucune différence significative entre les suspensions sensibilisées aux 2 préparations d'antigène normal, quant à la réaction non spécifique de ces sérums. Il n'y a aucune corrélation non plus entre la suspension des hématies tannées et celle des hématies tannées et sensibilisées à l'antigène normal, quant à la réaction non spécifique des sérums. Par conséquent, il faut inclure dans le test un contrôle d'antigène normal approprié.

Des 121 sérums évalués dans le test d'hémagglutination passive, 26 % de ceux-ci montraient une réaction non spécifique avec les hématies de contrôle (hématies sensibilisées à l'antigène normal produit au LLCM). Ces sérums auraient été, à tort, considérés comme positifs en l'absence de ces cellules de contrôle.

Nous avons fait une étude plus approfondie pour déterminer le(s) facteur(s) responsable(s) de ce phénomène.

Après traitement au kaolin, 50 % des sérums traités montrent une diminution mais non une disparition de l'activité non spécifique. Ceci indique que l'activité non spécifique n'est pas causée par des inhibiteurs non spécifiques du test d'inhibition de l'hémagglutination, puisque avec ce traitement la réaction non spécifique demeure même si les inhibiteurs ont été éliminés. La disparition observée peut être due au kaolin, celui-ci peut adsorber des immunoglobulines du sérum, particulièrement s'il s'agit des IgM.

L'activité non spécifique contre l'antigène normal n'est pas démontrée dans le test de fixation du complément mais se retrouve seulement dans le test d'hémagglutination passive. Cette activité est associée principalement à la classe des Immunoglobulines M chez 83 % des sérums.

Si on regarde les résultats des 3 expériences suivantes:

- a) le pic no 3 qui correspond au matériel de membrane montre une réaction non spécifique avec 62 % des sérums évalués
- b) l'absorption des sérums sur des lignées cellulaires vivantes élimine l'agent responsable de la réaction non spécifique dans 69 % des sérums
- c) le fractionnement des sérums montre l'activité non spécifique associée avec la classe des IgM.

L'agent responsable de la réaction non spécifique dans le test d'hémagglutination passive pourrait peut-être être une immunoglobuline M dirigée contre le matériel de surface des cellules.

Afin de vérifier cette hypothèse, un test d'immunoprécipitation de l'antigène normal avec des sérums responsables de réaction non spécifique aurait dû être fait, suivi d'une électrophorèse (Pereira, 1982). Ceci nous aurait permis de démontrer: s'il s'agissait d'une réaction antigène-anticorps et dans de telles circonstances, d'identifier quel(s) antigène(s) étai(en)t responsable(s) de cette réaction.

Un test d'immunofluorescence indirecte aurait pu être utilisé. Après avoir adsorbé les sérums sur des cellules normales vivantes, des anticorps antiglobulines M conjugués à la fluorescéine isothiocyanate auraient pu être mis à réagir. Ceci aurait confirmé ou infirmé la présence, dans le sérum, d'IgM dirigés contre la surface des cellules normales. Cependant, il semble peu probable que l'agent responsable de la réaction non spécifique soit une IgM contre la surface des cellules normales. Comment expliquer la présence de cette immunoglobuline chez un pourcentage aussi élevé d'une population normale?

Dû à une quantité insuffisante d'antigène normal de même que de sérums montrant cette réaction non spécifique, ces 2 tests n'ont pu être exécutés.

Plus de la moitié des sérums à réaction non spécifique montrent cette activité dans le pic non-3 de l'antigène normal produit au LLCM et de plus, la majorité de l'activité antigénique du cytomégalo virus se trouve dans le pic no 3. Quelle que soit la raison de ces réactions non spécifiques, cette préparation antigénique produite pour le test de fixation du complément ne répond pas aux exigences du test d'hémagglutination passive parce qu'un nombre élevé de sérums ne peuvent être examinés à cause de réactions non spécifiques en présence de l'antigène normal.

Les résultats obtenus après le fractionnement des antigènes produits au LLCM montrent une disparition partielle de la réaction non spécifique. La concentration protéique des différentes fractions est aussi diminuée.

Les résultats obtenus quand l'antigène produit après un cycle de congélation-décongélation est utilisé dans le test d'hémagglutination passive selon Stewart montrent une diminution considérable de la réaction non spécifique. Le cycle de congélation-décongélation contribue seulement à ouvrir les cellules afin de libérer le contenu cellulaire, très peu de matériel provenant des membranes cellulaires est mis en suspension.

Les préparations antigéniques sont produites différemment ce qui leur donne des concentrations différentes de protéines totales. La concentration protéique de la préparation d'antigène normal produite au LLCM est le double de celle préparée après un cycle de congélation-décongélation.

Selon Pereira (1982), en changeant la façon de préparer l'antigène, les protéines, qui ont des propriétés électrophorétiques similaires seront présentes à des concentrations différentes dans les suspensions.

Le fait de changer la préparation d'antigène normal diminue grandement le risque de réaction non spécifique. Ceci nous

permet de supposer que la réaction non spécifique, présente chez 26.5 % d'une population normale de donneurs de sang, peut être dépendante de la concentration de protéines présentes.

Dans notre cas, si l'activité de l'antigène cytomégalique avait été supérieure dans le test d'hémagglutination passive, ceci nous aurait permis de diluer davantage la préparation de l'antigène normal, et ainsi de diminuer la concentration de protéines présentes dans l'antigène normal; ceci aurait peut-être conduit à la disparition de cette réaction non spécifique des hématies de contrôle en présence de ces sérums.

La préparation antigénique idéale pour le test d'hémagglutination passive selon Stewart serait celle où il n'y aurait pas de matériel cellulaire. En l'absence de matériel cellulaire en suspension dans la préparation antigénique, les hématies de contrôle pourront correspondre aux hématies tannées non sensibilisées. Cette préparation antigénique pourrait être obtenue en utilisant les virus extra-cellulaires seulement; cependant le virus cytomégalique est fortement associé aux cellules et libéré de celles-ci à très faible concentration, ce qui n'est pas souhaitable pour une production antigénique.

La deuxième possibilité pour la production d'antigène utilisable dans le test d'hémagglutination passive serait un minimum de matériel cellulaire présent. Cette préparation antigénique pourrait être celle produite après un cycle de congélation-décongélation.

Plusieurs études ont été rapportées dans la littérature sur le test d'hémagglutination passive selon Stewart ainsi que sur ses modifications. Selon Horodniceanu, (1981), Cabou, (1981), les hématies de tous les moutons ne peuvent être sensibilisées et de plus la sensibilité du test varie en fonction de chaque mouton,

Aussi Yeager (1979) et Horodniceanu (1981) rapportent que la concentration d'acide tannique varie avec chacun des prélèvements du mouton en même temps qu'avec l'âge des hématies après le prélèvement.

Nous avons pu sensibiliser les hématies de 4 des 10 moutons obtenus. Afin de standardiser le test au point de vue sensibilité, les hématies d'un seul mouton ont servi à faire les tests. De plus nous avons pu standardiser la concentration d'acide tannique en contrôlant tous les autres facteurs (même mouton, même vieillissement).

Yeager rapporte aussi le phénomène d'hémagglutination non

spécifique dans 5 à 20 % des sérums testés quand elle utilise la préparation antigénique décrite par Bernstein (1971). La préparation antigénique consiste à extraire les cellules infectées dans du tampon à la glycine, les sonifier et les clarifier par centrifugation. Cette préparation est semblable à celle du LLCM.

Elle n'a pas étudié comme nous, la cause de la réaction non spécifique mais a tenté de l'éliminer en modifiant la technique de production de l'antigène. En utilisant une préparation antigénique produite après un cycle de congélation-décongélation, elle rapporte n'obtenir que .9 % des sérums testés réagissant avec l'antigène normal. En utilisant cette préparation, nous obtenons une diminution de la réaction d'héماغglutination non spécifique de 26.5 % à 7.5 %.

B. Comparaison des 6 tests sérologiques.

Le deuxième objectif de cette étude était de sélectionner un test sérologique selon différents critères:

- a) au point de vue du rendement du test en fonction de la sensibilité, la spécificité, la précision et de la fiabilité;
- b) au point de vue des exigences techniques en fonction de la facilité d'exécution, du délai, de l'équipement nécessaire et de la lecture subjective de la réaction.

Les résultats sont souvent urgents, d'où la nécessité d'obtenir l'évaluation sérologique la même journée. Cette condition élimine les techniques d'hybridation de l'ARN-ADN de même que les cultures parce qu'elles nécessitent une période de temps supérieur à une journée avant d'obtenir un résultat. Le test de fixation du complément est quand même inclus dans la comparaison même s'il nécessite une incubation de 12 heures parce qu'il s'agit du test le plus largement utilisé dans les laboratoires de virologie comme outil de dépistage et de diagnostic.

Il est important de répéter ici que les tests commerciaux ont été effectués selon les indications fournies par les compagnies respectives.

Le choix d'un test sérologique est essentiel pour dépister de façon fiable les donneurs de sang ou d'organe positifs pour le virus cytomégalique: afin de minimiser la source de virus en provenance des donneurs.

L'importance de ne pas obtenir de résultats faussement négatifs est primordiale. Un test qui aurait un pourcentage élevé de résultats faux négatifs équivaut à accepter des donneurs susceptibles de transmettre une infection cytomégalique. Dans notre étude, le test de fixation du complément fait partie de cette catégorie avec un taux de faux négatifs de 25 %, ceci probablement dû au manque de sensibilité du test.

Les résultats faussement positifs ont moins d'impact puisqu'ils ne causent aucun danger pour le récipiendaire, ceux-là étant exclus du groupe de donneurs. Par contre, quand le pourcentage de faux positifs est élevé, de nombreux donneurs, négatifs pour le cytomégalovirus, sont éliminés; ceci diminue inutilement le nombre de donneurs de sang ou d'organes. Dans notre étude, le test d'immunofluorescence indirecte donne un taux inacceptable de faux positifs, (28 %) suivi des tests d'hémagglutination passive selon Stewart (11 %) et de fluorométrie (10 %).

Selon les analyses statistiques effectuées, le test d'hémagglutination passive selon Cetus vient en tête pour la précision, la sensibilité et le taux de faux négatifs, il a une spécificité de 99 % et un taux de faux positifs de 1 %.

Le test qui a un rendement faible à tous les points de vue est celui d'immunofluorescence indirecte avec un taux de faux positifs de 28 %, une spécificité évaluée à 72 % et une précision à 77 %.

En un deuxième temps, il faut discuter les exigences techniques des tests. Tous les tests sont facilement exécutables; la seule différence est le nombre de manipulations exigées par ceux-ci. Tous les tests sont exécutés dans moins de 8 heures, sauf le test de fixation du complément.

Ce qui a principalement retenu notre attention est l'interprétation du résultat, c'est à dire l'évaluation subjective ou non de la réaction, ainsi que l'équipement spécial nécessaire pour effectuer le test.

Dans notre étude, les tests immunoenzymatique et de fluorométrie en phase solide nécessitent un lecteur pour déterminer l'intensité de la réaction finale. L'interprétation du test d'immunofluorescence indirecte, sujet à l'évaluation de l'intensité de la fluorescence ainsi qu'à sa localisation dans la cellule, peut varier d'un(e) technologiste à l'autre. Seule la fluorescence verte associée aux noyaux des cellules infectées doit être prise en considération pour la détection positive des anticorps cytomégaliqes dans un sérum. Cette lecture peut être compliquée par la présence de fluorescence associée au cytoplasme des cellules infectées quand i) les organelles cytoplasmiques sont impliquées dans la synthèse du virus ii) le virus a commencé à migrer du noyau vers le cytoplasme et iii) des récepteurs Fc des IgG qui sont synthétisés par la cellule infectée fixent de façon non spécifique des IgG.

Les tests d'hémagglutination passive et celui de fixation du complément ne nécessitent aucun équipement spécial mais doivent évaluer l'intensité du réseau d'hémagglutination ou la formation en bouton des hématies.

Dans cette étude, le test qui répond aux critères de sélection mentionnés est le test commercial d'hémagglutination indirecte de Cetus Corporation. Il ne donne aucun résultat faussement négatif, d'où risque minimum de transmettre une infection cytomégalyque au receveur. Il a un taux de faux positifs de 1 % d'où nombre optimal de donneurs disponibles. Il peut être effectué dans un délai de 2 à 4 heures et ne nécessite aucun équipement particulier. Dans notre analyse statistique, il a obtenu le meilleur classement en ce qui a trait aux exigences techniques ainsi que le premier rang en ce qui concerne le rendement du test. De plus, le test hémagglutination passive selon Cetus détecte les classes d'immunoglobulines G et M rendant le test utilisable pour un dépistage hâtif de l'infection.

Cependant, il faut signaler que le test d'hémagglutination passive selon Cetus a certains désavantages, a) l'interprétation du réseau d'hémagglutination est difficile quand lu, après le temps d'incubation de 90 minutes recommandé par la compagnie. Si la période d'incubation est prolongée à 4 heures,

la lecture est facilitée, b) l'élimination de certains sérums de la comparaison parce qu'ils présentent une réaction avec les cellules de contrôle empêche la détermination du statut immunologique. Dans cette étude, les sérums éliminés représentent 3 % des sérums testés, ils sont alors exclus comme donneurs de sang ou d'organes.

Selon Griner et al. (1981), pour sélectionner un test parmi plusieurs disponibles pour dépister ou diagnostiquer une infection, celui qui a la sensibilité la plus élevée sera choisi à moins, bien entendu, que sa spécificité soit inacceptable.

Dans cette étude, les tests d'hémagglutination passive ainsi que celui de fluorométrie ont un taux de sensibilité égal à 100 % mais une spécificité variable soit: HP Cetús 99 %, FIAX 90 %, HP Stewart 89 %. Le test ELISA a un taux de sensibilité de 95 % mais un taux de spécificité de 100 %.

Selon les critères de Griner, le test d'hémagglutination passive de Cetús est le test de choix suivi du test immunoenzymatique.

Les conclusions de cette étude sont en accord avec celles des différents auteurs (Cremer, 1978; Fucillo, 1971; Griffiths, 1978; Waner, 1979) qui rapportent le test de fixation du complément comme étant le moins sensible de tous.

Les résultats rapportés en ce qui concernent le test d'immunofluorescence indirecte sont en conflit. Stagno et al. (1975) rapporte que le test d'immunofluorescence indirecte est plus sensible que le test d'hémagglutination passive alors que Michelson et al. (1979) rapporte le test d'hémagglutination passive plus sensible que celui d'immunofluorescence indirecte. Nos résultats corroborent ceux de Michelson.

Aucune comparaison n'est rapportée dans la littérature en ce qui concerne le test de fluorométrie en phase solide.

Nos résultats sont aussi en accord avec Castellano (1977) qui conclut que le test d'hémagglutination passive est plus sensible pour détecter la présence des anticorps cytomégaliqes que le test immunoenzymatique même si ce dernier obtient des titres d'anticorps plus élevés.

De plus, Horodniceanu (1980) conclut que le test d'hémagglutination passive combine un taux élevé de sensibilité avec des exigences techniques favorables.

ANNEXE

PROCEDURE

I. REACTION d'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Méthode:

1. Reconstituer le tampon phosphate (pH 7.4 ± .2): dissoudre le contenu d'un flacon dans un litre d'eau distillée.
2. Reconstituer les sérums contrôles positif et négatif.
3. Reconstituer le conjugué: ajouter 2.0 ml du tampon phosphate.
4. Diluer le sérum à évaluer: en utilisant le tampon phosphate, faire une série de dilutions (1:2, 1:4, 1:8, ...) du sérum.
5. Inclure un sérum contrôle positif, un sérum contrôle négatif et un contrôle pour le tampon à chaque fois qu'un test est effectué.
6. Les lames ou les frottis de cellules infectées et non infectées ont été préparés sont ramenés de 40C (entreposage) à la température de la pièce.
7. Couvrir un puits de la lame avec le sérum, ou avec une dilution du sérum à évaluer (environ .01 ml / puits).
8. Incuber, à la température de la pièce / 30 minutes, les lames mises dans un contenant à humidité élevée.
9. Rincer les lames pour une période de 15 minutes dans du tampon phosphate, de préférence en agitant constamment avec un agitateur magnétique. Changer le tampon 2 fois durant cette période.
10. Sortir les lames du tampon et les sécher.
11. Couvrir chacun des puits avec l'antiglobuline G conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (environ .01 ml).
12. Incuber id. no. 8.
13. Répéter les étapes no: 9 et 10.
14. Le montage des lames avec du glycérol tamponné (pH 8.0 ± .3) est optionnel.
15. Lire les lames avec un microscope à fluorescence en UV pour la recherche de fluorescence verte associée avec les inclusions nucléaires des cellules infectées.
16. Interprétation des résultats.
Négatif: aucune fluorescence présente.
Positif: le sérum, à la dilution 1:16 ou à des dilutions supérieures à 1:16, montre une fluorescence verte associée avec les inclusions dans le noyau des cellules infectées et aucune fluorescence dans les cellules non infectées.

2. FLUOROMETRIE en PHASE SOLIDE

Méthodes:

1. Toutes les réactions ainsi que les manipulations de la fluorométrie en phase solides se font à la température de la pièce.
2. Agiter les réactifs avant usage.
3. Identifier une série de 4 tubes (12 x 75 mm) pour chacun des spécimens à évaluer:
Tubé 1: dilution du sérum.
Tubé 2: lavage I.
Tubé 3: anticorps marqués.
Tubé 4: lavage II.
4. Diluer, dans les tubes identifiés tube 1, les sérums à évaluer: .005 ml du sérum, du contrôle ou du calibrateur + .5 ml du tampon Tris-HCl (ph 8.0) contenant .5% d'albumine bovine, du surfactant et EDTA.
5. Inclure les 4 calibrateurs chaque fois que le test est effectué.
6. Mélanger les dilutions.
7. Immerger un bâtonnet pour chaque dilution de sérum faite dans les tubes marqués numéro 1.
8. Agiter sans arrêt les tubes sur un agitateur mécanique pour une période de 60 minutes.
9. Durant cette période d'incubation, pipeter:
dans les tubes 2 et 4: .5 ml de tampon Tris-HCl (ph 8.0) contenant .05% de Tween et .002 M d'EDTA.
dans les tubes 3: .5 ml de l'anticorps antihumain marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.
10. Après 60 minutes d'incubation, transférer les bâtonnets des tubes numéro 1 aux tubes numéro 2 correspondants.
11. Agiter continuellement 5 minutes les bâtonnets dans les tubes de lavage I.
12. Transférer les bâtonnets dans les tubes identifiés 3 qui contiennent l'anti-gamma-globuline marquée.
13. Au moyen de l'agitateur mécanique, agiter les tubes sans arrêt / 30 minutes.
14. Après 30 minutes, transférer les bâtonnets dans les tubes numéro 4 pour le deuxième lavage.
15. Agiter continuellement durant 5 minutes et garder les bâtonnets immergés dans la solution de lavage jusqu'au moment de la lecture.
16. Les 2 côtés des bâtonnets sont lus sur un fluoromètre FIAx(R) en unités de signal fluorescent (USF).
17. Les calculs pour tracer la courbe standard peuvent se faire A. de façon manuelle: a) tracée à partir des différences USF (USF face numéro 1 - USF face numéro 2 = différence USF) des 4 calibrateurs en fonction de leur titre FIAx(R) respectif.
b) La différence USF des sérums évalués est rapportée sur la courbe pour obtenir leur titre FIAx(R).

B. de façon automatique: a) avec le Microordinateur FIA^R 110, relié au fluoromètre, qui tracera automatiquement la meilleure courbe standard à partir des différences d'unités de signal fluorescent (USF face 1 - USF face 2) des 4 calibrateurs en fonction de leur titre FIA^R.
b) De la même façon, les batonnets des sérum à évaluer sont lus, leur différence USF, calculée, par le microordinateur et le titre FIA^R obtenu automatiquement par interpolation sur la courbe standard.

48. Interprétation des résultats:

Titre FIA ^R (R)	Détection des anticorps
plus petit que 16	négatif
16 - 24	équivoque
plus grand que 24	positif.

3. REACTION IMMUNOENZYMATIQUE

Méthode:

1. Toutes les étapes de la réaction sont effectuées à la température de la pièce, soit 20 à 25°C.
2. Laver les plateaux CytomégeLisa sensibilisés au cytomégalovirus et à l'antigène normal:
 - a) remplir les puits avec du tampon phosphate (ph 7.4 ±.1), 0.5% Tween.
 - b) ôter les bulles d'air qui pourraient être prises dans les puits.
 - c) éliminer le tampon en inversant le plateau au dessus d'un bassin.
 - d) remplir à nouveau les puits de tampon phosphate (ph 7.4 ±.1), 0.5% Tween.
 - e) éliminer les bulles d'air des puits.
 - f) laisser tremper 3 minutes.
 - g) vidanger le tampon phosphate dans un bassin.
 - h) répéter d, e, f, g encore 2 fois.
 - i) éliminer le tampon phosphate résiduel en inversant le plateau sur un papier essuie-tout et éponger légèrement.
3. Reconstituer le diluent (5x concentré) qui sera utilisé pour diluer les sérums: ajouter 870 ml de tampon phosphate (ph 7.4 ±.1), 0.5% Tween par vial.
4. Préparer la solution de travail (1x concentrée) du diluent pour les sérums:

1 partie de diluent
4 parties de tampon phosphate (ph 7.4 ±.1), 0.5% Tween.
5. Ajouter .25 ml de diluent (1x concentré) à chaque puits.
6. Ajouter .01 ml du sérum dans un puits marqué cytomégalovirus et dans un puits marqué antigène normal.
7. Inclure les 3 calibrateurs et les 2 sérums contrôles à chaque fois que le test est effectué.
8. Quand tous les sérums à évaluer, les 3 calibrateurs et les 2 sérums contrôles sont pipetés, agiter le plateau durant 1-2 minutes.
9. Pour une période de 45 minutes, incuber les plateaux dans un sac de plastique contenant un papier tissu humecté afin de maintenir un taux d'humidité élevée.
10. A la fin de la période d'incubation, jeter les sérums dilués dans le bassin.
11. Répéter le numéro 2 (a à i inclusivement).
12. Préparer la dilution de travail de l'anticorps anti-gammaglobuline humaine lié à l'enzyme phosphatase alcaline:

Solution stock de l'anticorps antihumain: 50x concentrée
Solution de travail, 1x concentrée: 1 partie de la solution de l'anticorps antihumain
49 parties de tampon phosphate (ph 7.4 ±.1), 0.5% Tween.
13. Ajouter .25 ml de la solution de travail de l'anticorps antihumain lié à l'enzyme.
14. Incuber 45 minutes dans le sac de plastique tel que déjà décrit.

15. A la fin de la période d'incubation, jeter dans le bassin la solution d'anticorps anti-gamma-globuline humaine.
16. Répéter le numéro 2 (a à i inclusivement).
17. Préparer la solution de travail (1x concentrée) du tampon diéthanolamine (5x concentré): 1 partie du tampon (5x concentré)
4 parties d'eau distillée.
18. Reconstituer la solution stock (5x concentrée) du substrat, le para-Nitrophényl Phosphate (pNPP) en ajoutant 4.0 ml de tampon diéthanolamine (1x concentré) par flacon.
19. Préparer la solution de travail (1x concentrée) du substrat pNPP: 1 partie du substrat pNPP (5x concentré)
4 parties du tampon diéthanolamine (1x concentré).
20. Ajouter .25 ml du substrat pNPP (1x concentré) à chaque puits.
21. Incuber 45 minutes dans le sac de plastique.
22. A la fin de la période d'incubation, arrêter la réaction en ajoutant à chaque puits .05 ml d'hydroxide de sodium (NaOH) 1N.
23. Mélanger la plaque durant 1-2 minutes.
24. Essuyer délicatement le dessous du plateau avec un papier tissu non abrasif.
25. Lire au spectrophotomètre à 405 nm, la densité optique de la réaction obtenue dans chacun des puits:
 - a) l'ajustement du zéro se fait avec .25 ml de substrat pNPP (1x concentré) mélangé à .05 ml de NaOH 1N.
 - b) chacun des calibrateurs, des sérums contrôles, des sérums à évaluer a 2 lectures de densité optique:
 - i) la première: obtenue de la réaction du sérum en présence de l'antigène cytomégalaïque
 - ii) la deuxième: obtenue de la réaction du sérum en présence de l'antigène normal.
 - c) la différence de densité optique calculée (d.o. i) - d.o. ii) pour les 3 calibrateurs permet de tracer la courbe standard en fonction de leur valeur Cytomégalisa respective. La méthode du calculateur utilisée consiste à effectuer une analyse de régression linéaire en utilisant les densités optiques des 3 calibrateurs (en x) et leur valeur Cytomégalisa respective (en y).
 - d) la différence de densité optique pour les sérums contrôles ainsi que celle des sérums à évaluer servira à définir la valeur Cytomégalisa par régression linéaire.
26. Interprétation des résultats:

Valeur Cytomégalisa	Détection des anticorps
plus grande ou égale à .25	positif
.23 - .24	équivoque
plus petite ou égale à .22	négatif.

4. I. HEMAGGLUTINATION PASSIVE selon CETUS

Méthode:

1. Ramener les réactifs à la température de la pièce (20 à 25°C).
2. Reconstituer les hématies sensibilisées et les hématies contrôles en ajoutant 1.5 ml d'eau distillée par vial. Attendre de 20 à 30 minutes avant d'utiliser ces vials dans le test.
3. Inclure les sérums contrôles, 2 positifs et 1 négatif, chaque fois qu'on effectue le test.
4. Essuyer le plateau de microtitration avec un papier afin d'enlever les charges statiques.
5. Diluer les sérums à évaluer: .1 ml de sérum
.3 ml de tampon contenant 1% de sérum de lapin.
6. Pipetter .05 ml de la dilution du sérum dans 2 puits;
 - a) un servira dans la réaction avec les hématies sensibilisées au cytomégalovirus.
 - b) l'autre servira dans la réaction avec les hématies contrôles non sensibilisées.
7. Pipetter .025 ml de la suspension d'hématies sensibilisées au cytomégalovirus dans les puits appropriés.
8. Pipetter .025 ml de la suspension d'hématies contrôles non sensibilisées dans les autres puits.
9. Durant 5 minutes, agiter le plateau au moyen d'un agitateur mécanique.
10. Couvrir et placer le plateau sur une surface dépourvue de vibrations.
11. Incuber à la température de la pièce durant une période de 90 minutes.
12. Après 90 minutes d'incubation, lire le plateau à la recherche de réseau d'hémagglutination ou de formation en bouton.
13. Interprétation des résultats:
 - Négatif: une formation en bouton avec la suspension d'hématies sensibilisées au cytomégalovirus
ET
une formation en bouton avec la suspension d'hématies non sensibilisées.
 - Positif: un réseau d'hémagglutination avec les hématies sensibilisées au cytomégalovirus
ET
une formation en bouton avec la suspension d'hématies non sensibilisées.
 - Indéterminé: un réseau d'hémagglutination avec les hématies contrôles non sensibilisées
ET
une formation en bouton ou un réseau d'hémagglutination avec les hématies sensibilisées au cytomégalovirus.

4. II. HEMAGGLUTINATION PASSIVE selon STEWART

Méthode:

1. Obtenir du sang de mouton en suspension dans une solution Alsever. Laisser vieillir les globules rouges au moins 3 jours.
2. Centrifuger le sang total, 5 minutes.
3. Enlever le sérum ainsi que la couche de globules blancs.
4. Laver les hématies 3 fois dans du tampon phosphate ph 7.2 (centrifugation de 5 minutes pour chaque lavage).
5. Laver les hématies une dernière fois dans du tampon phosphate, ph 7.2. Centrifuger 10 minutes.
6. Lire le volume du culot cellulaire.
7. Préparer, par densitométrie, une suspension 2.5% de globules rouges dans du tampon phosphate ph 7.2.
8. Préparer une solution d'acide tannique à la concentration optimale établie par une titration faite au préalable (titration d'acide tannique de 1:10 000 à 1:80 000 dilué dans du tampon phosphate ph 7.2).
9. Ajouter un volume de la dilution d'acide tannique égal à celui de la suspension 2.5% d'hématies.
10. Mélanger par inversion.
11. Incuber au bain-marie à 37°C / 30 minutes.
12. Centrifuger immédiatement la suspension d'acide tannique-hématies à 300g. / 10 minutes à la température de la pièce.
13. Décanter le surnageant.
14. Laver un volume de culot cellulaire avec 5 volumes de tampon phosphate ph 7.2. Centrifuger et décanter le surnageant.
15. Rétablir la suspension cellulaire 2.5% avec du tampon phosphate ph 6.7.
16. Garder 1/3 de la suspension cellulaire 2.5% obtenue au numéro 15. Identifier cette suspension: hématies de contrôle (HC).
17. Identifier le 2/3 de la suspension restante: hématies tannées et sensibilisées (HTS).
18. Ajouter à cette dernière suspension d'hématies un volume égal de l'antigène du virus cytomégalique dilué à la concentration optimale (établie au préalable) dans du tampon phosphate ph 6.7.
19. Agiter au vortex cette suspension d'hématies-antigènes.
20. Incuber à la température de la pièce. Agiter la suspension aux 15 minutes pour une période d'une heure.
21. Après une heure, centrifuger à 300g. / 10 minutes, les 2 suspensions cellulaires.
22. Décanter le surnageant.
23. A 2 reprises, laver les culots cellulaires avec du tampon phosphate ph 7.2 contenant 1% de sérum de lapin (sérum de lapin inactivé à 56°C / 30 minutes et adsorbé durant 1 heure avec une suspension de 50% d'hématies de mouton).
24. Ajuster les 2 suspensions cellulaires à une concentration de 1% en utilisant du tampon phosphate ph 7.2 contenant 1% de sérum de lapin.
25. Les suspensions HC et HTS doivent être à la température de la pièce quand utilisées dans le test.

26. Inclure des sérums contrôles positif et négatif à chaque fois que le test est effectué.
27. Diluer les sérums à évaluer: .1 ml du sérum
.1 ml du tampon phosphate ph 7.2 contenant 1% de sérum de lapin.
28. Inactiver les dilutions sériques à 56°C / 30 minutes.
29. Adsorber les dilutions des sérums avec .1 ml d'une suspension à 50% d'hématies de mouton.
30. On ne tient pas compte de la suspension à 50 % d'hématies de mouton pour la dilution des sérums. La dilution initiale des sérums est considérée comme étant 1/2.
31. Ajouter .05 ml de tampon phosphate ph 7.2 contenant 1% de sérum de lapin à chaque puits d'une plaque.
32. Ajouter .05 ml de la dilution initiale du sérum dans la 1ère rangée, 2 puits / sérum;
 - a) un servira dans la réaction avec HC.
 - b) l'autre servira dans la réaction avec HTS.
33. Dans le plateau même, faire une série de dilutions (1:4, 1:8, 1:16,....)
34. Pipetter .025 ml de la suspension HC dans les puits appropriés.
35. Pipetter .025 ml de la suspension HTS dans les puits appropriés.
36. Mélanger durant 5 minutes.
37. Couvrir et incuber à la température de la pièce, sur une surface dépourvue de vibrations, pour une période d'au moins 90 minutes.
38. Les plateaux sont lus en notant les formations en bouton et la présence de réseau d'hémagglutination.
39. Interprétation des résultats:

Négatif:	une formation en bouton avec les HTS ET une formation en bouton avec les HC.
Positif: ✓	un réseau d'hémagglutination avec les HTS ET une formation en bouton avec les HC.
Indéterminé:	un réseau d'hémagglutination avec les HC ET une formation en bouton ou un réseau d'hémagglutination avec les HTS.

5. FIXATION du COMPLEMENT

Méthode:

1. Il faut toujours inclure dans le test des contrôles pour:
 - a) l'antigène pour s'assurer qu'il n'est pas anticomplémentaire.
 - b) le sérum i. pour s'assurer de l'absence de complément résiduel après l'inactivation du sérum.
ii. pour s'assurer de l'absence d'activité anticomplémentaire dans le sérum.
 - c) le complément pour s'assurer de son activité.
 - d) les hématies sensibilisées à l'hémolyse pour s'assurer qu'elles ne s'autolysent pas.
 - e) les sérums contrôles positif et négatif afin de vérifier la réaction.
2. Diluer à la demi les sérums à évaluer: .1 ml de sérum avec .1 ml de tampon véronal (ph 7.2 à 7.4) contenant 1% d'albumine.
3. Inactiver à 56°C / 30 minutes les dilutions de sérums.
4. Pipetter .025 ml de tampon véronal (ph 7.2 à 7.4) contenant 1% d'albumine dans chacun des puits des plateaux de microtitration.
5. Pipetter .025 ml des sérums dilués dans la première rangée.
6. Faire une série de dilutions (1:4, 1:8, 1:16,...) dans les plateaux mêmes.
7. Pipetter .025 ml d'une dilution optimale de l'antigène désiré dans tous les puits (dilution obtenue par titration en échiquier fait au préalable).
8. A chacun des puits, ajouter .025 ml d'une solution contenant 4 unités de complément.
9. Incuber à 40°C / 12 heures.
10. Après cette période, incuber les plaques à 37°C / 60 minutes.
11. Mélanger rapidement une suspension d'hématies de mouton, lavées 3 fois au tampon véronal (ph 7.2 à 7.4), avec une solution d'hémolyse dont la concentration optimale déterminée au préalable par titration donnera le maximum de fixation du complément.
12. Incuber à 37°C / 30 à 60 minutes en agitant continuellement au moyen d'un agitateur magnétique afin de permettre une bonne sensibilisation des hématies.
13. Dans chacun des puits, pipetter .025 ml d'une suspension à 1% d'hématies sensibilisées.
14. Agiter à la température de la pièce / 30 minutes.
15. Incuber à 37°C / 60 minutes.
16. Ramener à la température de la pièce. Avant de lire, laisser aux hématies le temps de se déposer.
17. Vérifier les contrôles pour l'antigène, le sérum, le complément, les hématies sensibilisées, les sérums positif et négatif.
18. Lire les sérums témoins pour la présence ou l'absence d'hémolyse.

19. Interprétation des résultats:

Activité anticomplémentaire:

i) un antigène, en l'absence d'anticorps, réagit avec le complément le rendant non disponible pour se fixer sur les hématies sensibilisées à l'hémolysine

ii) un sérum, en l'absence d'antigène, réagit avec le complément le rendant non disponible pour se fixer sur les hématies sensibilisées à l'hémolysine.

Positif: < 50 % d'hémolyse.

Négatif: > 59 % d'hémolyse.

6. PRODUCTION DE L'ANTIGÈNE.

A. Méthodologie du Laboratoire de la Lutte Contre la Maladie.

a)

L'antigène nécessaire aux tests de fixation du complément et d'hémagglutination passive selon Stewart ainsi que pour le fractionnement de l'antigène est produit d'après la méthode mise au point par le Dr Lang du Laboratoire de la Lutte Contre la Maladie, Santé et Bien-Être Social, Ottawa, Canada.

1. Des bouteilles roulantes qui contiennent une couche confluyente de fibroblastes humains de prépuce sont inoculés avec 20.0 ml d'une suspension de cytomégalovirus AD 169 dont le titre est 10 à la puissance 3 TCID₅₀/ml, la multiplicité d'infection est .001.
2. Inoculum est adsorbé une heure à 36°C.
3. Après une heure, l'inoculum est décanté et remplacé par du milieu de culture enrichi de 2 % de sérum de veau foetal.
4. Incuber à 36°C, en appareil roulant.
5. Quand 90 à 100 % de la couche cellulaire montre un effet cytopathique, l'incubation à 36°C est maintenue 24 heures additionnelles.
6. La couche cellulaire infectée est récoltée dans 20.0 ml de tampon véronal, ph 7.2.
7. Cette suspension est inactivée par gamma-irradiation, une heure à 0.8 mégarads.
8. La suspension virale inactivée est clarifiée par centrifugation, 10 000 g / 10 minutes à 4°C. Le culot obtenu est conservé à 4°C.
9. Le surnageant est concentré 10x par ultrafiltration.
10. Le culot obtenu (au numéro 8) est resuspendu dans le surnageant concentré.
11. Cette suspension virale est sonifiée pour une période de 3 minutes, à une intensité de 4.5, au moyen de l'appareil BRANSON W350.
12. Une centrifugation à 14 000 g / 10 minutes à 4°C élimine les débris cellulaires.
13. Le surnageant auquel on ajoute de l'albumine bovine, fraction V, à une concentration finale de 1 % , est le matériel antigénique utilisé dans les tests.
14. L'antigène de contrôle est préparé selon la même procédure à partir de cellules non infectées.

b)

La même procédure est suivie pour produire un antigène, sans albumine bovine, qui sera fractionné selon la méthode de Huang (voir méthode 7. Fractionnement de l'antigène). Deux éléments sont modifiés:

1. l'inoculum est de 10 à la puissance 4.33 TCID₅₀/ml au lieu de 10 à la puissance 3 TCID₅₀/ml, la multiplicité d'infection est de .01

2. les étapes 8-9-10 de concentration de l'antigène par ultrafiltration sont éliminés, la préparation antigénique, sans albumine bovine, étant concentré ultérieurement sur coussin de sucrose 60 % w/w avant d'être fractionné (voir méthode 7. Fractionnement de l'antigène A. Matériel à fractionner).

B. Congélation - Décongélation.

Cette préparation d'antigène est produite après un cycle de congélation-décongélation en accord avec les modifications de Yeager (1979) dans le but d'améliorer le test d'hémagglutination passive.

1. L'inoculation se fait comme dans la section A, soit : même culture de tissu, même adsorption, même température d'incubation. Le titre de l'inoculum est 10^8 à la puissance 4.33 TCID50 / ml.
2. Quand environ 90 % de la couche cellulaire infectée montre un effet cytopathique, l'incubation est prolongée pour 24 heures.
3. Si aucun changement n'apparaît sur la couche cellulaire infectée, après 24 heures, le surnageant est décanté et la couche infectée est rincée avec du tampon phosphate, pH 7.2.
4. Le tampon est décanté, la bouteille bien égouttée et les traces de liquide résiduel sont pipettées.
5. 20.0 ml de tampon phosphate, pH 7.2, est ajouté sur la couche infectée.
6. Le tampon est alors congelé aussi également que possible sur la couche cellulaire infectée.
7. La congélation doit être maintenue pour une période minimale d'une heure à un maximum de 2 semaines, avant de récolter.
8. Décongeler à la température de la pièce le tampon phosphate. Garder la bouteille roulante bien droite afin de permettre au tampon de glisser le long des parois au fond du contenant.
9. Pipetter le tampon phosphate contenant le matériel antigénique.
10. Inactiver le matériel antigénique par gamma-irradiations, une heure à 0.8 mégarads.
11. Centrifuger à 600 g / 5 minutes pour éliminer les cellules.
12. Diviser en aliquots le surnageant et conserver à -60°C.
13. L'antigène de contrôle est préparé de la même façon.

7. FRACTIONNEMENT de l' ANTIGENE.

La méthode de fractionnement de l'antigène utilisée est une modification que nous avons faite de la méthode de purification du virus cytomégalique décrite par Huang et al. (14)

A. Matériel à fractionner:

1. Le matériel d'antigène cytomégalique et d'antigène normal sont préparés selon la méthodologie utilisée au Laboratoire de la Lutte Contre la Maladie (LLCM) décrite dans la section 6. Préparation antigénique.
2. Avant d'être mis sur le gradient, le matériel est concentré 10x par centrifugation sur un coussin de sucrose 60 % w/w à une vitesse de 40 000 rpm / 17 heures à 40C ou à 280 000 g. (centrifuge IEC B 60, rotor SB 283).
3. Le matériel concentré est dialysé contre du tampon véronal (ph 7.2 à 7.4), au moins 12 heures à 40C.

B. Gradients:

1. Préparer les gradients de sucrose 7 - 50 % w/w, 3.0 ml / concentration, les concentrations étant 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 7 % w/w.
2. Equilibrer au moins 12 heures à 40C.
3. Juste avant d'utiliser les gradients, ajouter un coussin (2.5 ml) de sucrose 60 % w/w.
4. Charger le gradient de 2.0 ml de matériel antigénique concentré dialysé.
5. Centrifuger.

C. Centrifugation:

1. Centrifuger dans IEC B 60, avec rotor SB 110, à une vitesse de 25 000 rpm / 75 minutes à 40C ou à une gravité moyenne de 100 000 g.

D. Collecte des fractions:

1. Collecter les fractions par le bas du tube dans un volume d'environ 0.5 ml avec le collecteur de fraction LKB.
2. En même temps que les fractions sont collectées, elles sont lues à une longueur d'onde de 280 nm afin d'obtenir un tracé de concentration de protéines du gradient.
3. La concentration en sucrose des fractions est évaluée par réfractométrie.
4. La densité optique de chacune des fractions est lue sur le spectrophotomètre Beckman DUB-8B à 280 nm.
5. Les fractions d'un pic de protéines sont réunies, dialysées à 40C contre du tampon véronal et utilisées comme antigène dans les tests de fixation du complément ainsi que de l'hémagglutination passive selon Stewart.

8. TRAITEMENT AU KAOLIN 25 %

Le traitement au kaolin 25 % est utilisé pour éliminer les inhibiteurs non spécifiques dans le test d'inhibition de l'hémagglutination pour la rubéole (Haukenes, 1975). Nous l'utilisons ici pour vérifier si ces inhibiteurs intervenaient dans le test d'hémagglutination passive selon Stewart.

1. Diluer le sérum à traiter: 0.1 ml de sérum avec 0.1 ml de tampon phosphate, pH 7.2.
2. Ajouter 0.2 ml de kaolin 25 % (12.5 gr de kaolin dans 50 ml de tampon phosphate, pH 7.2).
3. A la température de la pièce, agiter au vortex 3 fois durant une période de 15 minutes.
4. Centrifuger à 2000 rpm / 10 minutes à 4°C.
5. Ajouter 0.025 ml d'une suspension 50 % d'hématies de mouton.
6. Adsorber pour 60 minutes à 4°C.
7. Centrifuger à 2000 rpm / 10 minutes à 4°C. (800g)
8. Le surnageant correspond au sérum traité à une dilution 1/4.

9. ADSORPTION DES SERUMS.

L'adsorption des sérums sur des cultures de tissus est utilisée afin d'éliminer du sérum l'agent ou les agents responsables de la réaction non spécifique dans le test d'hémagglutination passive selon Stewart. Les cultures de tissus utilisées sont:

- a) des cellules diploïdes: des fibroblastes humains de poulmon (HFL), et des cellules de rein de singe (GMK)
- b) des cellules hétéroplloïdes de lignées cellulaires établies: des cellules épithéliales de carcinome humain (Hep-2), et des cellules de rein de singe (Vero).

1. Des tubes de culture contenant une couche confluyente de cellules sont lavées dans du tampon phosphate, pH 7.2. Ce lavage dure une heure à 36°C, les tubes sont en agitation constante (appareil roulant).
2. Après une heure, les tubes sont décantés et un deuxième lavage est effectué.
3. Après le deuxième lavage, les tubes sont décantés, inversés sur un papier absorbant et le collet du tube essuyé.
4. Ajouter 0.1 ml de sérum par tube.
5. Incuber à 36°C et agiter durant une heure.
6. Après une heure, une deuxième série de tubes est traitée comme au numéro 3. Le contenu de la première série de tubes est transféré dans la deuxième série afin d'effectuer la deuxième adsorption.
7. Incuber à 36°C et agiter durant une heure.
8. Les surnageants sont utilisés dans le test d'hémagglutination passive selon Stewart.

10. FRACTIONNEMENT DES SERUMS.

Le fractionnement des sérums se fait afin de vérifier dans quelle classe des immunoglobulines l'agent ou les agents responsable de la réaction non spécifique dans l'hémagglutination passive se trouvent. Le fractionnement se fait sur gradient de sucrose 10 - 50 % w/v, dans du tampon phosphate.

1. Préparer un gradient de sucrose:

50 %	0.1	ml
37 %	1.13	ml
23 %	1.13	ml
10 %	1.03	ml
2. Laisser équilibrer à 4°C pour un minimum de 6 heures jusqu'à un maximum d'une semaine.
3. Charger de 0.1 ml du sérum à fractionner.
4. Centrifuger à 35 000 rpm / 16 heures à 4°C (137 000 g).
5. Après 16 heures, ponctionner le fond du tube et collecter les fractions en volume de 0.4 ml par fraction.
6. Vérifier la pureté des fractions du sérum pour les immunoglobulines G et M par immunodiffusion au moyen d'un sérum contenant des globulines antihumaines spécifiques aux IgG et d'un autre spécifique aux IgM.
7. Les IgM sont normalement présentes dans les fractions 3, 4; alors que les IgG se retrouvent dans les fractions 5, 6, 7.

11. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Les lectures de microscopie électronique ont été effectuées par le personnel du Laboratoire de virologie de l'Hôpital des Enfants de l'Est de l'Ontario.

La méthode de coloration négative utilisée est décrite par Parsons (1963). Celle-ci consiste:

1. Déposer une grille utilisée pour la microscopie électronique dans une cupule (d'un plateau de microtitration) contenant de l'agar solidifié.
2. Déposer .01 ml de la suspension virale sur la grille.
3. Laisser sécher à l'air libre environ 10 minutes.
4. Ajouter .01 ml d'une solution d'acide phosphotungstique sur la grille.
5. Examiner la grille au microscope électronique à la recherche des structures: virions complets, virions incomplets, particules denses, matériel amorphe, dans les différents pics.

12. FACTEUR RHEUMATOIDE.

La trousse commerciale produite par la compagnie ORTHO pour la détection des facteurs rhumatoïdes est utilisée.

1. La réaction sera exécutée à la température de la pièce, soit entre 20 à 24 degrés C.
2. Diluer les sérums contrôle positif et contrôle négatif ainsi que les sérums témoins: .4 ml de tampon glycine, ph 8.2, avec .01 ml de sérum.
3. Sous un éclairage direct, déposer une goutte de chacun des sérums dilués dans un des carreaux d'une lame à fond noir.
4. Ajouter une goutte de la suspension de particules de latex dans chaque carreau.
5. Mélanger la suspension de particules de latex au sérum dilué jusqu'à l'obtention d'une distribution uniforme des particules de latex. A ce moment partir un chronomètre.
6. Sans arrêt, agiter lentement la lame par un mouvement de rotation.
7. Surveiller l'apparition d'agglutination pour une minute.
8. Résultats:
 - absence d'agglutination: négatif pour le facteur rhumatoïde
 - présence d'agglutination de 0 à 1 minute : présence du facteur rhumatoïde
 - présence d'agglutination après 1 minute: négatif pour le facteur rhumatoïde.

13. ANTICORPS HÉTÉROPHILES.

La trousse commerciale du MONOTEST produit par Hornet utilise des hématies de cheval pour la détection des anticorps hétérophiles.

1. La réaction est exécutée à la température de la pièce, soit 20 à 24 degrés C.
2. Déposer une goutte de sérum à tester ou de contrôle positif ou négatif au centre d'un carré d'une lame à fond noir.
3. Ajouter une goutte de la suspension d'hématies de cheval.
4. Mélanger les 2 gouttes ensemble afin d'obtenir une suspension homogène. A ce moment, chronométrer pour 2 minutes.
5. Durant la période de 2 minutes, agiter lentement la lame par un mouvement de rotation.
6. Surveiller pour la présence d'héماغglutination.
7. Résultats:

absence	d'héماغglutination:	absence	d'anticorps hétérophiles
présence	d'héماغglutination:	présence	d'anticorps hétérophiles.

BIBLIOGRAPHIE

- Antibody to Cytomegalovirus, Virgo Reagents, Indirect Fluorescent Antibody (IFA) test for Detection of CMV Antibody in Human Sera; Electro-Nucleonics Laboratories, Inc, Bethesda, Maryland, 1982, 9p.
- Bernstein, M.T. and Stewart, J.A., Indirect hemagglutination test for Detection of Antibodies to Cytomegalovirus, *Appl. Microbiol.*, 1971:21:84-89.
- Betts, R.F. et al., Transmission of cytomegalovirus infection with renal allograft, *Kidney Int.*, 1975:8:385-392.
- Birnbaum, G. et al., Cytomegalovirus infections in newborn infants, *J. Pediatr.*, 1969:75:789-795.
- Bollew, H.C. et al, Laboratory Methods for diagnosing herpes virus infections, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Bureau of Laboratories, Atlanta, Georgia, 1978-79, p. 75-92.
- Booth, J.C. et al., Cytomegalovirus complement-fixing Igm antibody, *J. Med. Virol.*, 1980;5:183-193.
- Bradsteet, C.M.P. and Taylor, C.E.D., Technique of complement-fixation test applicable to the diagnosis of virus diseases, *Mon. Bull. Minist. Health Lab. Serv.*, 1962:21:96-104.
- Castellano, G.A. et al, Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination test for detection of antibody to cytomegalovirus, *J. Inf. Dis.*, 1977:136:337-340.
- Cheeseman, S.H. et al., Controlled clinical of prophylatic human-leukocyte interferon in renal transplantation. Effect on cytomegalovirus and herpes simplex infections, *N. Engl. J. Med.*, 1979:300:1345-1349.
- Chou, S. et al., Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization, *N. Engl. J. Med.*, 1983:308:921-925.
- Colton, Theodore, Sc.D., Statistics in Medecine, published 1974, Copyright 1974 by Little, Brown and Company (Inc), first edition, p.64-70; p.129-130.
- Cremer, N.E. et al, Analysis of antibody methods and classes of viral antibodies in serodiagnosis of cytomegalovirus infection, *J. Clin. Microbiol.*, 1978;8:153-159.

TM

- Cytomegelisa Test Kit, an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Cytomegalovirus IgG Antibody in Human Serum, M.A. Bioproducts, Walkersville, Maryland, 28p.
- Dowling, J.N. et al., Cytomegalovirus infection in patients receiving immunosuppressive therapy for rheumatologic disorders, J. Infect. Dis., 1976:133:399-408.
- Embil, J.A. et al., Congenital cytomegalovirus infection in two siblings from consecutive pregnancies, J. Pediatr., 1970:77:417-421.
- Fiala, M. et al., Epidemiology of cytomegalovirus infection after transplantation and immuno-suppression, J. Infect. Dis., 1975:132:421-433.
- FIAX Test Kit for Cytomegalovirus G Antibodies, International Diagnostic Technology, Inc. Santa Clara, California, 1982, 20p.
- Fucillo, D.A. et al., Micro-indirect hemagglutination test for cytomegalovirus, Appl. Microbiol., 1971:104-107.
- Furukawa, T. et al., Demonstration of immunoglobulin G receptors induced by human cytomegalovirus, J. Clin. Microbiol., 1975:2:332-336.
- Garnett, Helen M. et al., Isolation of human cytomegalovirus from peripheral blood T cells, J. Lab.Clin. Med., 1982:99:92-97,
- Griffith, Owen Mitch, Techniques of preparative, zonal, and continuous Flow ultracentrifugation, Applications Research Department, Spinco Division, Beckman Instruments, Inc., p. 6-7.
- Griffiths, P.D. et al., A comparison of complement fixation, indirect immunofluorescence for viral late antigens, and anticomplement immunofluorescence tests in the detection of cytomegalovirus specific serum antibodies, J. Clin. Pathol., 1978:31:827-831.
- Griner, et al., Test Selection and Use, Annals of Internal Medicine, 1981:94:559-600.
- Hamilton, J.D., Cytomegalovirus and Immunity, Monographs in Virology, Editor J.L. Melnick, Houston, Texas, 1982, p.3.
- id. p.27
- ibid. p.28.
- ibid. p.30.

ibid. p.37-38.

Hanshaw, J.B., Congenital cytomegalovirus infection: laboratory methods of detection, J. Pediatr., 1969:75:1179-1185.

Haukenes, G. et al., False positive rubella hemagglutination inhibition reaction: occurrence and disclosure, Med. Microbiol. Immunol., 1975:161:99-106.

Hersman, J. et al., The effect of granulocyte transfusions on the incidence of cytomegalovirus infection after allogeneic marrow transplantation, Ann. Inter. Med., 1982:96:149-152.

Ho, Monto, Cytomegalovirus Biology and Infections, Editor Greenough III, William B. and Merigan, Thomas C., Plenum Publishing Corporation, 1982, p.100-101.

id. p. 151-152.

ibid. p.173.

Ho, Monto et al., The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection, N. Engl. J. Med., 1975:293:1109-1112.

Horodniceanu, F et al, Assessment of human cytomegalovirus antibody detection techniques, Archives of Virology, 1980:64:287-301.

Huang, E.S. et al., Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections in women and their infants, New. Engl. J. Med., 1980:303:958-962.

Huang, E.S. et al., Cytomegalovirus DNA and adenocarcinoma of the colon: evidence for latent viral infection, Lancet, 1978:1:957-960.

Huang, E.S. et al., Detection of human cytomegalovirus and analysis of strain variation, Yale J. Biol. med., 1976:49:29-43.

Huang, E.S. et al., Human cytomegalovirus. I. Purification and characterization of viral DNA, J. Virol., 1973:12:1473-1481.

Indirect Hemagglutination Test for Cytomegalovirus antibody in Human Plasma or Serum, Cetus Corporation, Berkeley, California, 1982, 9p.

Joncas, J.H. et al., Persistence of cytomegalovirus genome in lymphoid cells after congenital infection, Nature, 1975:258:432.

- Jordan, Colin M., Latent infection and elusive cytomegalovirus, Rev. of Infect. Dis., 1983:5:205-215.
- Lang, D.J. et al., Reductions of post-perfusion cytomegalovirus infections following the use of leucocyte depleted blood, Transfusion, 1977:17:391-395.
- Larke, et al., Congenital cytomegalovirus infection in an urban canadian community, J. Infect. Dis., 1980:142:647-653.
- Lennette, E.H. and Schmidt, N.J., Diagnostic procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 5th edition, 1979, p. 35.
- Levinsohn, E.M. et al., Isolation of cytomegalovirus from a cohort of 100 infants throughout the first year of life, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1969:132:957-962.
- Marker, S.C. et al., Cytomegalovirus infection: a quantitative prospective study of 320 consecutive renal transplants, Surgery, 1981:89:660-671.
- Michelson, S. et al, Comparison of occurrence of antyodies to human cytomegalovirus demonstrated by immunofluorescence and indirect hemagglutination techniques, J. Clin. Microbiol., 1979:9:149-151.
- Monif, G.R.G. et al., Blood as a potential vehicle for the cytomegalovirus, Ann. J. Obstet. Gynecol., 1976:126:445-448.
- Oncogenic Herpesvirus, vol. II, CRC Press, Boca Raton; Florida, editor Fred Rapp, 1980, p.48.
- id. p. 92.
- Pagano, J.S. Diseases and mechanisms of persistent DNA virus infection: latency and cellular transformation, J. Infect. Dis., 1975:132:209-223.
- Parsons, D.F., Negative staining of thinly spread cells and associated virus, J. Cell. Biol., 1963:16:620-626.
- Pass, R.F. et al., Impaired lymphocyte transformation response to cytomegalovirus and phytohemagglutination in recipients of renal transplant: association with antithymocyte globuline, J. Infect. Dis., 1981:143:259-265.
- Pereira, L. et al, Electrophoretic analysis of Polypeptides Immune Precipitated from Cytomegalovirus-Infected Cell Extracts by human sera, Infect. Immun., 1982:36:933-942.

- Pollard, R.B. et al., Cell-mediated immunity to cytomegalovirus infection in normal subjects and cardiac transplant patients, *J. Infect. Dis.*, 1978:137:541-549.
- Preiksaitis, J.K. et al., Cytomegalovirus infection in cardiac transplant recipients: the role of the donor heart, *Clinical research*, 1982:30:99A.
- Rahman, A.A. et al., Appearance of IgG (Fc) receptors(s) on cultured human fibroblasts infected with human Cytomegalovirus, *J. Immunol.*, 1976:117:253-258.
- Rinaldo, C.R.Jr. et al., Polymorphonuclear leukocyte function during cytomegalovirus mononucleosis, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1979:12:331-334.
- Stagno, S. et al., Comparative serial virologic and serologic studies of symptomatic and subclinical congenitally and natively acquired cytomegalovirus infections, *J. Inf. Dis.*, 1975:132:568-577.
- Stagno, S. et al., Congenital cytomegalovirus infection: consecutive occurrence xxx to viruses with similar antigenic compositions, *Pediatrics*, 1973:52:788-794.
- Starr, J. et Gold, E., Congenital cytomegalovirus infection associated with low birth weight, *J. Pediatr.*, 1969:74:815-816.
- Stern, H., Isolation of cytomegalovirus and clinical manifestations of infection at different ages, *Br. Med. J.*, 1968:1:665-669.
- Stevens, D.P. et al., Asymptomatic cytomegalovirus infection following blood transfusion in tumor surgery, *J. Ann. Med. Assoc.*, 1970:211:1341-1344.
- Tobin, J. O'H. et al., Cytomegalovirus infection and renal transplantation, *Lancet*, 1979:1:926.
- Tolkoff-Rubin, N.E. et al., Cytomegalovirus infection in dialysis patients and personnel, *Ann. Intern. Med.*, 1978:89:625-628.
- Voller A. et al., Microplate Enzyme Immunoassays for the Immunodiagnosis of Virus Infections, in *Manual of Clinical Immunology*, American Society of Microbiology edited by Rose and Friedman, 1976, p. 506.
- Voller A. et al., Enzyme immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after Rubella vaccination, *Brit. J. Exp. Pathol.*, 1976:57:243.

- Waner, J.L. et al., Antibody reactivity to human and vervet cytomegalovirus early antigen(s) in sera from patients with active cytomegalovirus infections and from asymptomatic donors. J. Clin. Microbiol., 1979;9:134-140.
- Weller, T.H. and Coons, A.H., Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954;86:789-794.
- Winston, D.J. et al., Cytomegalovirus infections associated with leukocyte transfusions. Ann. Intern. Med., 1980;93:671-675.
- Yeager, Anne S., et al., Prevention of transfusion acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. J. Pediatr., 1981;98:281-287.
- Yeager, Anne J., Improved Indirect Hemagglutination Test for Cytomegalovirus Using Human O Erythrocytes in Lysine. J. of Clin. Microb., 1979;10:64-68.