

Tests VIH

Thomas Klimkait

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Basel

Historique

La recherche médicale sur le VIH se distingue par un développement fascinant en médecine diagnostique: après la découverte du nouveau rétrovirus en 1983, il a suffi de deux ans pour établir un lien avec le syndrome du SIDA. En 1985 déjà, la FDA homologuait le premier test ELISA d'anticorps anti-p24 pour la détection du virus afin de sécuriser les dons de sang [1, 2]. Conjointement aux tests rapides Ag p24, caractérisés par une haute sensibilité et un faible coût, celui-ci s'est rapide-

ment imposé dans le diagnostic des offices de consultation anonyme ou en chirurgie d'urgence. La confirmation par le test du Western Blot, qui met en évidence les protéines VIH par les anticorps présents dans le sang du patient, devint obligatoire.

L'utilisation de tests standardisés et commerciaux est déjà ancienne, et la procédure comprenant dépistage, confirmation et répétition au moyen de matériel indépendant, et sous préservation de l'anonymat, est bien rodée. Elle n'est cependant pas encore unifiée dans le contexte

Glossaire

b-DNA

«ADN ramifié»; il s'agit d'une méthode quantitative de détection d'une séquence d'ADN par amplification du signal de l'échantillon; dans la PCR par contre, on multiplie une séquence de l'ADN de l'échantillon: il s'agit là d'une amplification de l'input.

CCR5

Chemokine CC motive receptor 5: récepteur membranaire présent dans les leucocytes servant au déclenchement de la cascade cellulaire de signalisation par les chimiokines telles que MIP-1a, Rantes, etc. Il agit également en tant que récepteur cellulaire prioritaire pour les isolats de VIH «CCR5-tropiques»; ces virus désignés auparavant comme des isolats «macrophages-tropiques» sont les principaux responsables de l'infection primaire du VIH.

CRF

Circulating Recombinant HIV Form ou formes recombinantes du VIH en circulation (comme par exemple CRF01-AE); cette nomenclature classe les formes nouvelles du virus dans lesquelles des parties d'un sous-type du virus se sont croisées avec des parties d'un autre sous-type, constituant ainsi une nouvelle forme recombinante (O1 ΔAE), qui ne peut se décrire ni par l'une (A) ni par l'autre (E) des formes de départ.

CXCR4

ou *C-X-C-Motive Chemokine-Receptor 4*; ce récepteur de leucocytes détourné par le VIH comme second corécepteur répond à son ligand naturel SDF-1 et provoque une activation des cellules souches. Les variantes de VIH «tropiques» au récepteur CXCR4 (précédemment considérés comme des virus «tropiques» aux cellules T) apparaissent en majorité dans une phase tardive de l'infection VIH.

Delta32

(ou CCR5-delta-32) est une anomalie génétique de l'expression du gène CCR5, caractérisée par une délétion à partir de la position de code 32. Les porteurs hétérozygotes et surtout homozygotes de cet allèle présentent une évolution de l'infection VIH fortement ralentie.

ELISA

Enzyme-linked Immunosorbent Assay; test permettant la détection d'anticorps par fixation enzymatique, opéré généralement sur des anticorps spécifiques au pathogène présent dans le sang du patient.

FDA

Federal Drug Administration; autorités des Etats-Unis chargées de l'homologation des médicaments.

HAART

Highly Active Antiretroviral Therapy ou traitement antirétroviral hautement actif; acronyme du traitement combiné du VIH au moyen de trois médicaments antirétroviraux au minimum. Ainsi l'on atteint une suppression parfois complète de l'expression du virus (<50 copies/ml).

VIH de type 0 outier

ou hors catégorie; groupe rare de virus VIH-1, présentant de grandes différences par rapport aux sous-types courants de la catégorie principale M dans leur séquence d'ARN et par conséquent dans l'expression des protéines. Ces différences sont susceptibles de provoquer des résultats faussement négatifs dans les tests de détection et de quantification des VIH.

HLA

Human Leucocyte Antigen ou antigènes leucocytaires humains. Ils déterminent avec une extrême variabilité le complexe majeur d'histo-compatibilité humain; leurs gènes sont regroupés sur le chromosome 6; leur caractérisation sert à rechercher la susceptibilité à certaines maladies.

Ag p24 du VIH

protéine de structure formant la partie immunoréactive (antigène) du virus; elle est contenue dans l'enveloppe entourant l'ARN viral, et elle est également libérée sous forme soluble par les cellules infectées.

RT-PCR

ou *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*: forme particulière de l'amplification en chaîne par polymérisation, partant de l'ARN; par exemple on transcrit d'abord l'ARN viral en ADN afin de pouvoir l'utiliser comme substrat pour une réaction standard de PCR. Cette méthode s'utilise pour la détermination quantitative des virus ARN tels que le VIH dans le plasma.

mondial [3]. En particulier, les tests d'anticorps ne sont pas indiqués dans le cas des primo-infections [4], c'est-à-dire durant les premières semaines suivant l'infection. C'est pourquoi il faut par principe les combiner avec les tests d'antigènes p24.

Tests de détection

Actuellement nous en sommes à la quatrième génération de tests. Les tests ELISA d'antigènes p24 réduisent nettement la brèche diagnostique, ce temps écoulé avant la formation des anticorps lors de l'infection primaire (fig. 1 [6]). La détection de l'Ag p24 est déjà fiable pendant les quatre semaines suivant l'infection. Sitôt après, le test d'anticorps réagit déjà souvent mais, dans certains cas plutôt rares, il peut rester négatif pendant plus de trois mois [5, 6]. La brèche diagnostique entraîne inévitablement un risque résiduel de faux résultat négatif. Selon le matériel à disposition, les méthodes actuelles permettent une sécurité de détection de 99,3 à 100%, avec une spécificité du VIH de 99,1 à 100 % [7], alors que les faux résultats positifs (ou plutôt «réactifs») résultent de l'exigence d'une sécurité maximale par la détection à tout prix d'échantillons *réellement positifs*. Il faut garder à l'esprit que la fiabilité de l'identification négative d'un prélèvement de sang demeure l'objectif premier des tests de détection. Cet objectif exige que les échantillons douteux soient attribués à la catégorie réactive avant d'être confirmés ou non dans une deuxième étape plus précise.

Confirmation de l'infection

Pour qu'un échantillon de sang réactif soit confirmé dans un test de détection, il faut que la méthode de test indépendante, telle que celle des Western Blots, fournisse un résultat identique.

Dans cette méthode, généralement utilisée, on identifie la réactivité aux anticorps de protéines connues du VIH dans le sérum du patient. Toutefois, ce procédé n'est que partiellement indépendant du test d'anticorps, c'est pourquoi on fait parfois appel aujourd'hui à des méthodes basées sur l'analyse des acides nucléiques par RT-PCR, comme par exemple en pédiatrie, à cause de l'interférence d'anticorps maternels.

Limites

Faussement positif/négatif: la spécificité des tests de confirmation Western-Blot est très élevée, ce qui en fait un test fiable d'exclusion du VIH. L'évaluation des bandes positives est nettement plus difficile. Une étude de grande envergure comprenant plus de 5 millions de sujets révéla un pourcentage de résultats faussement positifs du Western Blot atteignant 4,7%. L'analyse ultérieure par PCR a confirmé ensuite un statut d'infection VIH négatif indiscutable pour ces résultats faussement positifs [8].

Accompagnement thérapeutique

L'estimation quantitative des copies de l'ARN viral dans le plasma du patient ou dans d'autres matériaux biologiques représente actuellement une méthode incontestée servant à déterminer la charge virale du patient en traitement. La quantification de l'ARN viral transcrit en ADN s'opère soit par amplification du signal (test b-ADN), soit par multiplication de l'échantillon par PCR. Les deux systèmes atteignent une sensibilité de moins de 40 copies/ml, ainsi qu'une spécificité réactive et une sensibilité élevées pour divers sous-types du VIH [9, 10].

Au-delà de ces méthodes, un test quantitatif d'un nouveau type et fort avantageux basé sur le p24 donne quelques espoirs pour certains pays d'Afrique et de l'Asie [11].

Limites

La grande variabilité du VIH rend la détermination de la sensibilité absolue et de la spécificité difficile, et elle se limite aux échantillons standardisés. Certains rapports actuels décrivent encore des déterminations faussement positives [12]. La grande diversité du VIH, rencontrée sous forme de sous-types de virus et de virus recombinants, présente pour le moment un problème potentiel de dimension inconnue. Exemple: une charge virale continuellement positive mais basse serait d'abord classée dans les catégories cliniques peu dangereuses. Ce n'est qu'une chute rapide des cellules CD4, inattendue par rapport à ce qui précède, qui rend le médecin traitant attentif à un problème éventuel de quantification, effectivement connu dans les variantes «exotiques» du virus (recombinants CRF01-AE; VIH-1 de type O, etc.). D'un point de vue purement technique, la PCR fournit

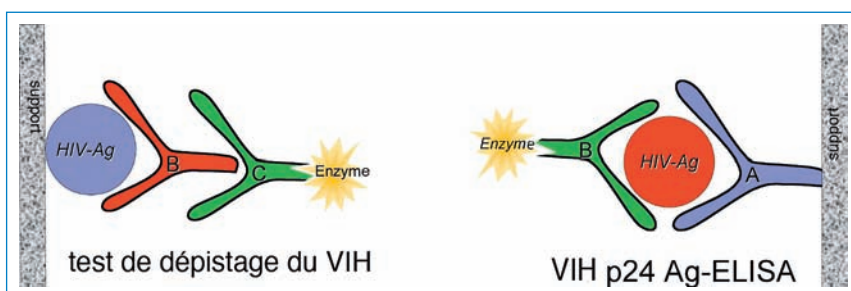


Figure 1

Principe du test ELISA VIH. Lors du test de détection, on utilise la protéine p24 elle-même comme substrat (en bleu). Par contre lors du test ELISA d'antigène, on utilise un anticorps spécifique du VIH : la protéine recherchée du patient (en rouge) est soit un anticorps p24 montrant une réponse immunitaire à une infection VIH (test de détection), soit la protéine virale p24 présente chez le patient infecté (ELISA Ag). Pour la détection, on utilise un anticorps caractérisé lié à l'enzyme (en vert), et spécifique soit de l'anticorps humain, soit de l'antigène p24 (ELISA Ag).

1,9 à 3 % de résultats faussement positifs ou faussement négatifs [13].

Echec de la thérapie/ détermination de la résistance

Génotypisation et phénotypisation

La preuve impressionnante de l'extraordinaire succès du traitement par combinaison d'antirétroviraux établi depuis 1995 se lit dans les courbes de mortalité par-delà les années. Toutefois, depuis que nous disposons de concepts puissants de thérapies (HAART), un nouveau risque croissant est apparu dans le quotidien clinique: les résistances des VIH. Actuellement, on en trouve des descriptions pour chaque médicament anti-VIH, et les nouveaux moyens thérapeutiques présentent déjà des taux d'échecs avant même d'arriver sur le marché. Comme l'efficacité de tous les éléments est la condition «sine qua non» d'une thérapie de combinaison efficace, il est indispensable de s'en assurer par les tests de résistance. Ce concept en soi logique a été suffisamment confirmé en microbiologie et se trouve bien ancré dans la bibliographie standard. Depuis quelques années, diverses études peinent cependant à démontrer l'efficacité des thérapies de combinaison sur le VIH [14-18]. Ces études de résistances ont été pratiquées au moment où une série de nouveaux inhibiteurs atteignait le marché, constituant ainsi une alternative thérapeutique. Il est possible que le gain d'efficacité obtenu par l'étude des résistances soit alors demeuré peu évident.

Pour tester la résistance du VIH, deux concepts principaux s'affrontent: la génotypisation à partir des acides nucléiques et la phénotypisation fonctionnelle (fig. 2 [6]). Le premier concept, celui de la génotypisation, se base sur l'identification des mutations dans le gène-cible de la thérapie du VIH, puis sur l'interprétation des modifications génétiques observées au moyen d'algorithmes établis. Les banques de données internationales ont accumulé de l'expérience et fournissent d'excellents résultats. Pour de nombreux médicaments, les plus importantes mutations mettant en danger le traitement sont ainsi bien décrites. Toutefois, l'évaluation de nouvelles mutations et de nouveaux médicaments, pour lesquels il existe encore peu de descriptions, ainsi que les situations où le patient est infecté par plusieurs variantes de virus à la fois, montrent les limites de la génotypisation. Néanmoins la rapidité de réponse en laboratoire avec un équipement standard et les coûts relativement faibles (720 francs) de ce test constituent un net avantage.

L'autre concept est la phénotypisation, qui évalue en culture de cellules, et séparément pour chaque inhibiteur, la multiplication d'un échantillon du virus du patient, soit en un seul cycle infectieux, soit en un nombre défini de cycles de multiplication. La méthode de la phénotypisation présente l'avantage de ne pas nécessiter d'informations préalables sur les médicaments ou les mutations virales, puisque le «traitement in vitro» s'en charge implicitement. Ainsi réussit-on à séparer avec sensibilité les mélanges de virus et à déterminer les virus minoritaires tout au début d'un échec de traitement. Inconvénients: un coût sensiblement plus élevé (environ 1500 francs) et une analyse de laboratoire nettement plus complexe.

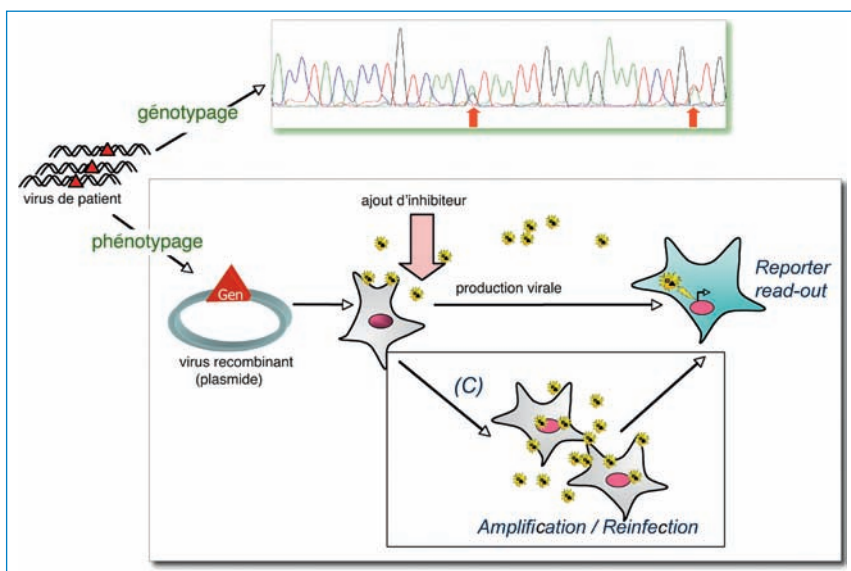


Figure 2

La résistance du virus peut être établie soit génotypiquement, par détermination de sa séquence (voir le schéma du haut), soit phénotypiquement (par la fonction, voir le schéma du bas). Dans cette dernière méthode, on inocule un virus avec le gène d'intérêt (triangle rouge) et on analyse son action sur des cellules humaines, sous traitement; parfois après plusieurs cycles de multiplication, dans le cas de systèmes plus sensibles (détour par l'encadré (C)). Grâce à un gène rapporteur présent dans les cellules, on peut lire le résultat ainsi établi au moyen d'un virage de colorant.

Tests spéciaux

Tests de tropisme

La toute dernière classe d'inhibiteurs du VIH vise les récepteurs de chimiokine CCR5 et CXCR4 situés à la surface des lymphocytes-T. Ce sont des corécepteurs essentiels pour l'infection du VIH, nécessaires à l'arrimage et à la pénétration des particules du VIH. Celsentri®, un inhibiteur de CCR5, a été récemment autorisé en médecine clinique en tant que première substance inhibitrice de cette classe, toutefois sous la restriction d'un test préalable pour savoir si le virus trouvé chez le patient utilise bel et bien le CCR5 comme corécepteur et qu'il est donc «CCR5-tropique». Ce test peut s'effectuer soit par voie phénotypique, soit par analyse de la séquence. Provenant des États-Unis, le premier test de phénotypisation validé (*trofile-assay*) demande encore une énorme logistique et sa durée de plus de quatre semaines pose problème. Un autre type d'examen, suisse cette fois, a été développé à Bâle. Cette analyse d'une très grande sensibilité s'appuie sur la caractérisa-

tion de la séquence virale déterminant le tropisme (dans le gène de l'enveloppe) en rapport à une référence connue. Ce test, remboursé par les caisses maladie, demande six jours d'analyse.

Prédisposition génétique (delta32, antigènes HLA) et détermination de la concentration de médicaments pendant le traitement

Au-delà des méthodes de détection du VIH décrites plus haut, ce sont les tests servant à l'analyse des paramètres du patient en vue d'une thérapie qui ont pris de l'importance dans les traitements. Il faut se préoccuper de plus en plus des déterminants HLA et analyser ceux-ci, ainsi que les anomalies génétiques (comme par exemple l'anomalie «delta-32» du gène du corécepteur), puisqu'ils prennent un rôle grandissant dans la thérapie. Autre innovation, on peut maintenant vérifier l'observance du patient par analyse du taux de médicaments présents dans le plasma [19].

Remarque finale

Dans l'intervalle de vingt-cinq ans nous séparant de la découverte du pathogène humain VIH, nous avons mis au point des méthodes d'analyse extrêmement sensibles servant à sécuriser les banques de sang, une méthode de détection spécifique de l'infection et un accompagnement thérapeutique optimal. Il ne fait pas de doute que ce savoir pourra s'étendre encore à d'autres virus, en particulier ceux des hépatites. Il s'agira probablement encore une fois d'une thérapie à succès qui, rencontrant un nouveau cycle de résistances virales, fera naître de nouvelles classes d'inhibiteurs et lancera de nouveaux défis pour le diagnostic de laboratoire.

Références

- 1 <http://aidshistory.nih.gov/home.html>; <http://www.cdc.gov/mmwr>.
- 2 Montagnier L. Historical Essay, *Science*. 2002;298:1727–8.
- 3 Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents. Bethesda, Md, Department of Health and Human Services, 1999.
- 4 Busch MP, et al. Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors. *Transfusion*. 1995;35:91–7.
- 5 Daar ES, et al. Transient high levels of viremia in patients with primary HIV type 1 infection. *N Engl J Med*. 1991;324:961–4.
- 6 Schacker TW, et al. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med*. 1998;128:613–20.
- 7 Greenwald JL, et al. A rapid review of rapid HIV antibody tests. *Current Infectious Disease Reports*. 2006;8:125–31.
- 8 Kleinman S, et al. False-Positive HIV-1 Test Results in a Low-Risk Screening Setting of Voluntary Blood Donation. *JAMA*. 1998;280:1080–5.
- 9 Perrin L, et al. Multicenter Performance Evaluation of a New TaqMan PCR Assay for Monitoring Human Immunodeficiency Virus RNA Load. *J Clin Microbiol*. 2006;44:4371–5.
- 10 Espy MJ, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Reviews*. 2006;19:165–256.
- 11 Brinkhof MWG, et al. Evaluation of p24-based antiretroviral treatment monitoring in pediatric HIV-1 infection: Prediction of the CD4+ T cell changes between consecutive visits. *Journal A.I.D.S* 2006;41:557–62.
- 12 Owens DK, et al. Polymerase chain reaction for the diagnosis of HIV infection in adults: a meta-analysis with recommendations for clinical practice and study design. *Ann Intern Med*. 1996;124:803–15.
- 13 Rich JD, et al. Misdiagnosis of HIV Infection by HIV-1 Plasma Viral Load Testing: A Case Series. *Ann Intern Med*. 1999;130:37–9.
- 14 Baxter JD, et al. Both baseline HIV-1 drug resistance and antiretroviral drug levels are associated with short-term virologic responses to salvage therapy. *AIDS*. 2002; 16:1131–8.
- 15 Meynard JL, et al. Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial. *AIDS*. 2002; 16:727–36.
- 16 Durant J, et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet*. 1999;353:2195–9.
- 17 Cohen CJ, et al. A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy (VIRA3001 Study Team). *AIDS*. 2002; 16:579–88.
- 18 Tural C, et al. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS*. 2002;16:209–18.
- 19 Marzolini C et al. Nelfinavir plasma levels under twice daily and three-times daily regimens: high interpatient and low inpatient variability. *Ther Drug Monit*. 2001;23:394–8.

Correspondance:
Dr Thomas Klimkait
Institut für Medizinische
Mikrobiologie
Universität Basel
Petersplatz 10
CH-4003 Basel
thomas.klimkait@unibas.ch