

Méthodes alternatives au prélèvement sanguin pour le diagnostic de l'infection par le virus de l'hépatite C

Alternative approaches to venous specimens for the detection of hepatitis C virus infection

Date de soumission : 22/03/2011 Date of submission: 03/22/2011

Stéphane Chevaliez, (stephane.chevaliez@hmn.aphp.fr), Jean-Michel Pawlotsky

Centre national de référence des Hépatites B, C et delta, Laboratoire de virologie & Inserm U955, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France

RÉSUMÉ

Le diagnostic de l'hépatite C repose sur la détection des anticorps anti-VHC totaux, à l'aide de tests Elisa de 3^e génération, et la détection-quantification de l'ARN du VHC à l'aide d'une technique de PCR en temps réel avec un seuil de détection de 10-15 UI/mL. Ces examens s'effectuent classiquement sur sérum ou plasma à partir d'un prélèvement veineux centrifugé par un laboratoire de biologie.

Des alternatives aux techniques Elisa sur sérum ou plasma sont aujourd'hui développées, comme par exemple des tests immunologiques sur carte ou bandelettes permettant la mise en évidence d'anticorps anti-VHC (test rapides d'orientation diagnostique) et des tests non immunologiques sur papier buvard permettant de détecter et éventuellement de quantifier l'ARN du VHC. Ces tests utilisent des matrices biologiques telles que le liquide cravculaire ou le sang total capillaire prélevé au bout du doigt. Ces méthodes permettent une biologie délocalisée auprès du patient, ou "point-of-care testing" (POCT).

Le développement de tests fiables, ainsi que la demande des autorités de santé visant à promouvoir le dépistage de masse dans les pays industrialisés et le diagnostic dans les pays en développement, devraient permettre à ces tests de trouver une place prépondérante en pratique clinique.

Des évaluations prospectives des tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) sont aujourd'hui nécessaires pour établir leurs performances analytiques, leurs indications et connaître leurs avantages et limites dans les stratégies de dépistage. Une standardisation, en particulier par l'automatisation de l'analyse des papiers buvards, est indispensable si ce type de support doit être utilisé à plus large échelle.

ABSTRACT

Hepatitis C virus infection diagnosis is based on the detection of total anti-HCV antibodies (Ab) by means of 3rd-generation EIA, together with HCV RNA detection-quantification with a real-time PCR assay with a lower limit of detection of 10-15 IU/mL. Serological and molecular tests are performed from plasma or serum obtained from whole blood and separated from red blood cells by means of centrifugation.

Alternative methods are currently in development, including immunoassays, such as immunochromatographic and immunofiltration-based tests, that detect anti-HCV Ab, or non-immunological tests based on nucleic acid detection from dried blood spots. Point-of-care (POC) tests can be used in clinical specimens such as oral fluids or fingerstick whole blood. They potentially offer substantial benefits for the diagnosis and the management of HCV infection as they may help promote large-scale screening of HCV-infected patients in both industrialized countries and the developing world. Prospective assessment of rapid POC tests is however warranted in order to assess their analytical performance (specificity, sensitivity) and their clinical utility. Dried blood spots could represent an alternative for the diagnosis of HCV infection and for quantification of viral nucleic acids, pending standardization and better automation.

Introduction

Environ 120 à 130 millions d'individus dans le monde sont porteurs chroniques du virus de l'hépatite C (VHC) [1]. Plus de 250 000 personnes meurent chaque année des conséquences de la maladie chronique du foie liée au VHC, décompensation de la cirrhose ou carcinome hépatocellulaire (CHC). En France, le nombre annuel de décès attribuables au VHC est d'environ 2 600 [2]. L'infection par le VHC est devenue la principale indication de transplantation hépatique et sera très bientôt la principale cause de CHC dans les pays industrialisés [3]. L'hépatite C constitue un véritable problème de santé universelle. L'utilisation de drogues par voie veineuse ou nasale et les actes médicaux ou chirurgicaux invasifs sont les principaux facteurs de risque d'infection par le VHC [4;5]. L'enquête nationale de prévalence des hépatites B et C, réalisée en 2004 auprès de plus de 14 000 individus, a estimé à 0,84% la prévalence des anticorps anti-VHC, soit environ 400 000 individus, dont une grande majorité (65%) étaient atteints d'hépatite chronique [6].

Du fait du caractère asymptomatique de l'infection chronique par le VHC jusqu'à des stades avancés de la maladie, on estime qu'environ 40% à 60% des sujets infectés ignorent leur infection [7]. Cette estimation a été confirmée dans l'enquête de prévalence de 2004 [6]. Le diagnostic tardif de l'infection par le VHC a d'importantes implications cliniques, car la cirrhose est un facteur primordial d'échec thérapeutique et de morbidité-mortalité [8]. Le risque de complications hépatiques chez le sujet cirrhotique est en effet élevé et persiste, même s'il est diminué, en cas de réponse virologique soutenue (RVS) au traitement antiviral [9].

Contrairement aux infections causées par le VHB ou le VIH, l'infection par le VHC est curable. Le traitement de l'hépatite chronique C repose aujourd'hui sur l'administration d'interféron pégylé alpha-2a (Pegasys®, Roche) ou alpha-2b (Viraferonpeg®, MSD) associé à la ribavirine (Copegus®, Roche ou Rebetol®, MSD). L'éradication définitive du virus est obtenue chez 40% à 50% des patients infectés par un VHC de génotype 1, génotype majoritaire en France [10], et chez environ 80% des patients infectés par un VHC de génotype 2 ou 3 [11]. En 2011, de nouveaux traitements seront disponibles pour les patients infectés par un VHC de génotype 1. Ils reposeront sur l'administration d'un inhibiteur spécifique de la protéase du VHC, le telaprevir (Janssen-Cilag) ou le boceprevir (MSD), associé à l'interféron alpha-2a ou alpha-2b pégylé et la ribavirine. Les résultats des essais cliniques de phase 3 récemment présentés ont montré que les trithérapies augmentent significativement les chances de guérison des patients infectés par un VHC de génotype 1, avec des durées de traitement éventuellement plus courtes en fonction de la réponse virologique précoce [12].

Le plan national de lutte contre les hépatites B et C 2009-2012 (<http://www.sante.gouv.fr/plan-national-de-lutte-contre-les-hepatites-b-et-c-2009-2012.html>) a défini plusieurs axes stratégiques, dont le renforcement du dépistage de l'hépatite C chez les personnes à risque, afin de réduire le risque de développement de complications à long terme et de prévenir d'éventuelles transmissions. Ces sujets constituent un groupe hétérogène comprenant les individus transfusés avant 1992, les utilisateurs

de drogues par voie veineuse ou nasale ou ayant fait usage de drogues auparavant, les patients co-infectés par le VIH, les sujets ayant une activité sérique des transaminases élevée sans autre cause, les enfants nés de mères séropositives pour le VHC, les homosexuels masculins et les patients hémodialysés.

“Point Of Care Testing” : la biologie délocalisée auprès du patient

Plusieurs marqueurs biologiques sont à la disposition du clinicien pour le dépistage et le diagnostic précoce de l'infection par le VHC. Les marqueurs virologiques (anticorps anti-VHC totaux, antigène de capsid, ARN du VHC et génotype), biochimiques (activité sérique des transaminases) et histologiques (sévérité de l'atteinte hépatique) sont utilisés en pratique clinique pour le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des infections par le VHC. La détection des anticorps anti-VHC totaux repose sur l'utilisation de tests Elisa de 3^e génération. Les méthodes de détection et de quantification de l'ARN viral font appel aux techniques de PCR en temps réel qui bénéficient d'un seuil de détection de l'ordre de 10 à 15 unités internationales par millilitre (UI/mL). Ces examens s'effectuent classiquement sur sérum ou plasma à partir d'un prélèvement veineux centrifugé par un laboratoire de biologie. Ces approches constituent la méthode de référence pour le diagnostic de l'infection par le VHC.

Des alternatives aux techniques Elisa sur sérum ou plasma sont aujourd'hui développées, comme par exemple des tests immunologiques sur carte ou bandelettes, permettant la mise en évidence d'antigènes ou d'anticorps spécifiques, et des tests non immunologiques sur papier buvard permettant de détecter et éventuellement de quantifier les acides nucléiques. Ces tests représentent une alternative au prélèvement veineux au pli du coude, car ils utilisent des matrices biologiques telles que la salive ou le liquide cravicaire (liquide sécrété entre le sillon antérieur de la gencive et les lèvres) ou le sang total capillaire prélevé au bout du doigt. Le prélèvement sanguin, qui implique seringues, tubes, centrifugeuses, congélation et personnel expérimenté, est ainsi évité. Ces méthodes permettent une biologie délocalisée auprès du patient, ou “point-of-care testing” (POCT). Elles peuvent en effet être utilisées directement auprès du patient, c'est-à-dire dans les cabinets médicaux, les services d'urgences, les unités de soins intensifs, les CIDAG (Centres d'information et de dépistage anonyme et gratuit), les structures de prévention ou les structures associatives, voire au domicile du patient. L'arrêté du 9 novembre 2010 a fixé les conditions de réalisation des tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) de l'infection par le VIH. Cet acronyme conforte le statut de dispositif médical au test rapide délocalisé, qui pourrait être réalisé à domicile à l'instar d'un auto-contrôle de glycémie.

Le développement de tests fiables, ainsi que la demande des autorités de santé visant à promouvoir le dépistage de masse dans les pays industrialisés et le diagnostic dans les pays en développement (PED), devraient permettre à ces tests de trouver une place prépondérante en pratique clinique.

Tests rapides d'orientation diagnostique (TROD)

Les TROD sont souvent résumés aux tests "savonnettes", du même type que les tests de grossesse disponibles en officine. Leur définition exacte est cependant plus complexe. En 2003, le programme de recherche et de formation en maladies tropicales de l'Organisation mondiale de la santé a défini les caractéristiques idéales d'un POCT (tableau 1) [13]. Le test doit être bon marché, sensible, spécifique, facile à réaliser en un maximum de 3 à 4 étapes à température ambiante et ses résultats doivent être disponibles en moins de 30 minutes. Ces tests ne doivent pas nécessiter de matériel spécifique.

Aux États-Unis, l'utilisation de TROD pour le diagnostic de l'infection par le VIH a considérablement augmenté par rapport aux tests classiques au cours des dernières années. Par exemple, le test OraQuick Advance HIV-1/2 Antibody Test® (OraSure Technologies, Inc.) ne représentait que 5,2% de la totalité des diagnostics de VIH réalisés dans une vingtaine d'hôpitaux et de cliniques de New York et de sa région en 2005. Trois ans plus tard, il concerne plus de 85% des diagnostics VIH [14]. En France, le seul dispositif médical qui dispose d'un marquage CE pour le diagnostic de l'infection par le VHC est le test OraQuick HCV Rapid Antibody Test® (OraSure Technologies, Inc.), dont le revendeur est Méridian Biosciences. Le prix du test est d'une dizaine d'euros. Ce test peut être utilisé à partir de cinq matrices différentes (sérum, plasma, sang total veineux, sang total capillaire, fluide buccal) chez des individus de plus de 11 ans à risque d'infection par le VHC et/ou présentant des signes cliniques.

Aux États-Unis, la FDA permet depuis juin 2010 d'utiliser ce test pour la détection des anticorps anti-VHC à partir de sang total veineux chez les individus de plus de 15 ans à risque d'infection par le VHC et/ou présentant des signes cliniques. Les performances analytiques de ce test pour la détection des anticorps anti-VHC semblent satisfaisantes, comme en témoignent deux études récemment publiées [15;16]. La spécificité et la sensibilité variaient en effet respectivement entre 99,8% et 100% et entre 98,1% et 100% selon le type de matrice biologique considérée. La moins bonne performance a été obtenue pour le liquide cravculaire, qui contient moins d'anticorps que le sang. Ces résultats doivent cependant être confirmés dans des études prospectives indépendantes, comme cela a été récemment le cas pour le VIH dans une étude française menée chez plus de 200 adultes séropositifs [17].

Des limites existent à l'utilisation des TROD sur sang total ou salive, qui manquent de sensibilité pour différentes raisons : la nature des antigènes utilisés, l'hémolyse, la dilution entraînée par la présence des globules rouges lors des prélèvements capillaires au bout du doigt, la très faible quantité d'anticorps naturels dans le liquide cravculaire, la liaison des anticorps aux antigènes de synthèse à température ambiante et non à 37°C comme dans les tests immuno-enzymatiques. Le temps de réaction raccourci diminue encore la sensibilité. Enfin, lors d'utilisation en dehors d'un laboratoire de biologie ou d'une structure de santé habilitée, la traçabilité, l'archivage des résultats et la gestion des déchets biologiques potentiellement contaminants posent problème (tableau 2) [18].

Tableau 1. Caractéristiques idéales d'un "Point Of Care Testing" (POCT) : critères ASSURED

- A** = Prix attractif (*Affordable*)
- S** = Sensible (*Sensitive*)
- S** = Spécifique (*Specific*)
- U** = Facile d'utilisation en un minimum d'étapes (*User-friendly*)
- R** = Robuste et rapide (*Robust and rapid*)
- E** = Sans équipement spécifique (*Equipment-free*)
- D** = À disposition de tous ceux qui en ont besoin (*Deliverable*)

Tableau 2. Avantages et inconvénients des systèmes de dépistage des anticorps anti-VHC

Tests rapides d'orientation diagnostique (TROD)	Tests Elisa 3 ^e génération
Avantages	
Facilité d'utilisation	Excellente spécificité
Stockage à température ambiante	Grande sensibilité
Réalisable partout	Automatisation (haut débit)
Spécificité et sensibilité satisfaisantes	Réalisation à 37°C
	Bonne traçabilité (enregistrement informatique des résultats)
Inconvénients	
Absence de traçabilité	Nécessité de chaînes du froid
Lecture subjective (dépendante de l'opérateur)	Matériel (centrifugeuses)
Élimination des déchets infectieux	
Prix élevé (>10 euros)	

Papier buvard : une technique prometteuse

Le recours au papier buvard pour l'analyse de prélèvements sanguins remonte à 1960 avec le test de Guthrie (méthode de dépistage de la phénylcétonurie chez le nouveau-né). Le papier buvard permet de recueillir du sang et de le conserver sous forme desséchée. Une fois séchés à température ambiante, les prélèvements peuvent être acheminés par voie postale puis conservés rigoureusement à -20°C afin de ne pas altérer la qualité des acides nucléiques [19].

Le papier buvard permet la détection des anticorps anti-VHC, ainsi que la détection et la quantification de l'ARN du VHC. Néanmoins, la charge virale VHC est sous-estimée d'un facteur au moins 100 par rapport à celle déterminée sur un prélèvement sérique ou plasmatique [20]. De plus, le seuil inférieur de détection de l'ARN du VHC sur papier buvard est de l'ordre de 500 UI/mL. Ce manque de sensibilité par rapport aux techniques réalisées sur sérum ou plasma pose un réel problème d'utilisation du buvard pour le suivi thérapeutique, car l'objectif du traitement antiviral est d'obtenir une charge virale indétectable (<10-15 UI/mL) le plus précocement possible afin d'augmenter les chances de guérison [11].

Le papier buvard représente néanmoins une alternative au diagnostic prometteuse pour les pays ne disposant pas d'appareillages de biologie moléculaire performants (PED), pour les structures de dépistage ou associatives, et pour le diagnostic précoce de la transmission mère-enfant par recherche de l'ARN viral dans le sang du nouveau-né.

La manipulation des buvards requiert un temps et un savoir-faire réservés à un personnel bien formé. Si les tests de biologie moléculaire réalisés sur papier buvard doivent être optimisés, en particulier automatisés, les travaux déjà publiés et en cours montrent que ce support est fiable à la fois pour des tests de sérologie et de biologie moléculaire. L'étude de Tuaille et coll. [20] récemment publiée a montré que, parmi les 200 patients testés (100 patients séropositifs pour le VHC dont 62 avec un ARN détectable et 100 patients séronégatifs pour le VHC), la sensibilité et la spécificité de détection des anticorps anti-VHC étaient respectivement de 99% (intervalle de confiance (IC) 95% : 97-100%) et 98% (IC95% : 97-99%). Seuls deux résultats de buvard étaient discordants par rapport aux résultats obtenus à partir d'échantillons sériques. Il s'agissait d'un patient co-infecté par le VIH faussement négatif et d'un autre patient faussement positif pour lequel aucun anticorps anti-VHC n'avait été détecté dans son sérum.

Conclusion

Les améliorations continues au cours des dernières années des POCT en terme de sensibilité, de spécificité, et de matrices biologiques utilisables, comme par exemple la salive ou le sang capillaire prélevé au bout du doigt, en font des alternatives prometteuses au prélèvement sanguin. Des évaluations prospectives des TROD sont aujourd'hui nécessaires pour établir leurs performances analytiques, leurs indications et connaître leurs avantages et leurs limites dans les stratégies de dépistage. Une standardisation, en parti-

culier par l'automatisation de l'analyse des papiers buvards, est indispensable si ce type de support doit être utilisé à plus large échelle.

RÉFÉRENCES

- > [1] Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *J Clin Pharmacol*. 2004;44(1):20-9.
- > [2] Marcellin P, Peignot F, Delarocque-Astagneau E, Zarski JP, Ganne N, Hillon P, et al. *Mortality related to chronic hepatitis B and chronic hepatitis C in France: evidence for the role of HIV coinfection and alcohol consumption*. *J Hepatol*. 2008;48(2):200-7.
- > [3] Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide*. *J Hepatol*. 2006 ;45(4):529-38.
- > [4] Santantonio T, Wiegand J, Gerlach JT. *Acute hepatitis C: current status and remaining challenges*. *J Hepatol*. 2008;49(4):625-33.
- > [5] Williams IT, Bell BP, Kuhnert W, Alter MJ. *Incidence and transmission patterns of acute hepatitis C in the United States, 1982-2006*. *Arch Intern Med*. 2011;171(3):242-8.
- > [6] Meffre C, Le Strat Y, Delarocque-Astagneau E, Dubois F, Antona D, Lemasson JM, et al. *Prevalence of hepatitis B and hepatitis C virus infections in France in 2004: social factors are important predictors after adjusting for known risk factors*. *J Med Virol*. 2010;82(4):546-55.
- > [7] Volk ML, Tocco R, Saini S, Lok AS. *Public health impact of antiviral therapy for hepatitis C in the United States*. *Hepatology*. 2009;50(6):1750-5. Erratum in: *Hepatology*. 2010;51(2):725.
- > [8] Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. *Treatment predictors of a sustained virological response in hepatitis B and C*. *J Hepatol*. 2008;49(4):634-51.
- > [9] Bruno S, Stroffolini T, Colombo M, Bollani S, Benvegna L, Mazzella G, et al; Italian Association of the Study of the Liver Disease (AISF). *Sustained virological response to interferon-alpha is associated with improved outcome in HCV-related cirrhosis: a retrospective study*. *Hepatology*. 2007;45(3):579-87.
- > [10] Payan C, Roudot-Thoraval F, Marcellin P, Bled N, Duverlie G, Fouchard-Hubert I, et al. *Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third millennium: The GEMHEP GenoCII Study*. *J Viral Hepat*. 2005;12(4):405-13.
- > [11] McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, et al; IDEAL Study Team. *Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection*. *N Engl J Med*. 2009;361(6):580-93. Erratum in: *N Engl J Med*. 2009;361(10):1027.
- > [12] Pawlotsky JM. *The results of phase III clinical trials with telaprevir and boceprevir presented at the Liver Meeting 2010: A new standard of care for hepatitis C virus genotype 1 infection, but with issues still pending*. *Gastroenterology* 2011;140(3):746-54.
- > [13] Kettler H, White K, Hawkes S. *Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections. Key findings and recommendations*. Geneva: TDR, 2004. <http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/mapping-landscape-sti>
- > [14] Omi J. *Integration of HIV testing within medical care in a large public hospital system*. 2008 National Summit on HIV Diagnosis, Prevention, and Access to Care.
- > [15] Lee SR, Kardos KW, Schiff E, Berne CA, Mounzer K, Banks AT, et al. *Evaluation of a new, rapid test for detecting HCV infection, suitable for use with blood or oral fluid*. *J Virol Methods*. 2011;172(1-2):27-31.
- > [16] Lee SR, Yearwood GD, Guillon GB, Kurtz LA, Fischl M, Friel T, et al. *Evaluation of a rapid, point-of-care test device for the diagnosis of hepatitis C infection*. *J Clin Virol*. 2010;48(1):15-7.
- > [17] Pavie J, Rachline A, Loze B, Niedbalski L, Delaugerre C, Laforgerie E, et al. *Sensitivity of five rapid HIV tests on oral fluid or finger-stick whole blood: a real-time comparison in a healthcare setting*. *PLoS One*. 2010 Jul 19;5(7):e11581.
- > [18] Delaugerre C, Simon F. *Tout sur les tests de dépistage rapide*. *Transcriptases* 2009;(141):35-42.
- > [19] Mitchell C, Jennings C, Brambilla D, Aldrovandi G, Amedee AM, Beck I, et al; Dried Blood Spot Working Group of the Infant Maternal Pediatric Adolescent AIDS Clinical Trials Network. *Diminished human*

immunodeficiency virus type 1 DNA yield from dried blood spots after storage in a humid incubator at 37 degrees C compared to -20 degrees C.
J Clin Microbiol. 2008;46(9):2945-9.

> [20] Tuillon E, Mondain AM, Meroueh F, Ottomani L, Picot MC, Nagot N, et al. *Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing.* Hepatology. 2010;51(3):752-8.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Dr C. Larsen pour son aide à la rédaction de cet article

Comment citer cet article

Chevaliez S, Pawlotsky JM. *Méthodes alternatives au prélèvement sanguin pour le diagnostic de l'infection par le virus de l'hépatite C.* BEHWeb 2011 (1).
www.invs.sante.fr/behweb/2011/01/r-4.htm