

Traitements antirétroviraux : Modules d'information

Module 5

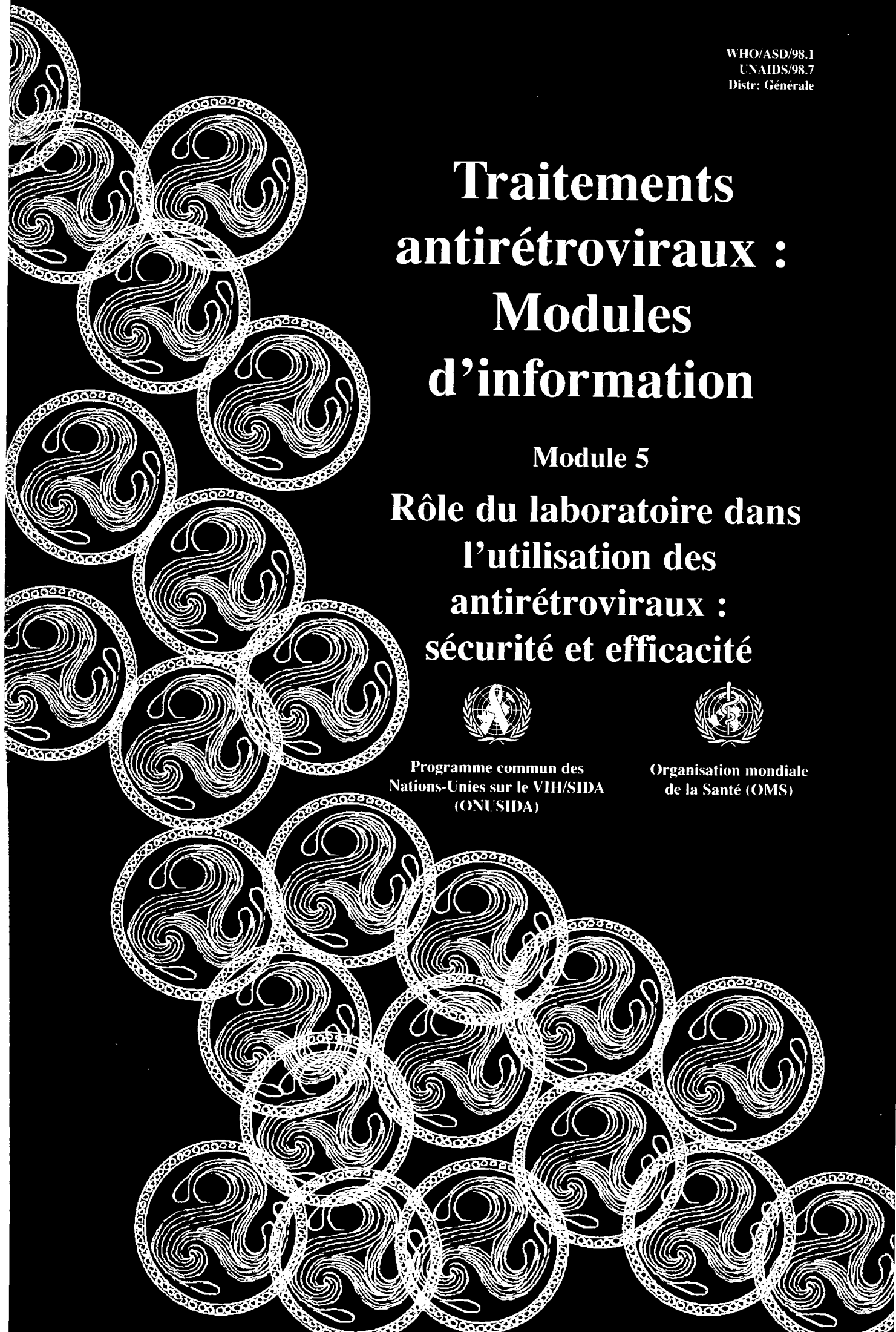
Rôle du laboratoire dans
l'utilisation des
antirétroviraux :
sécurité et efficacité



Programme commun des
Nations-Unies sur le VIH/SIDA
(ONUSIDA)



Organisation mondiale
de la Santé (OMS)



Remerciements

L'Organisation mondiale de la Santé et l'ONUSIDA remercient

le Professeur Gunnel Biberfeld, Institut suédois de Lutte contre les Maladies infectieuses, Stockholm (Suède), qui a rédigé le texte du module;

le Dr Gaby Vercauteren, Sécurité transfusionnelle, OMS, le Dr Frank De Wolf, Université d'Amsterdam (Pays-Bas) et le Professeur Nkandu Luo, University Teaching Hospital de Lusaka (Zambie), qui ont révisé le projet de texte et fait d'utiles propositions;

le Dr Rachel Baggaley, le Dr Susan Fernyak, Mme Alison Martin Katz, Mme Marguerite Nguyen et le Dr Eric van Praag, Bureau du VIH/SIDA et des Maladies sexuellement transmissibles, OMS, ainsi que le Dr Joseph Perriens, Département des Politiques, des Stratégies et de la Recherche, ONUSIDA, qui ont coordonné le projet.

©Organisation mondiale de la Santé et Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA, 1998

Ce document n'est pas une publication officielle de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) ni du Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA) et tous les droits y afférents leur sont réservés. Il peut être cependant librement commenté, résumé, reproduit ou traduit en partie, mais non pour être vendu ou utilisé à des fins commerciales. Il peut aussi être reproduit intégralement par des entités non commerciales à des fins d'information ou d'éducation avec l'autorisation préalable de l'OMS et de l'ONUSIDA.

Les demandes de renseignements et d'autorisation pour la traduction de l'intégralité du document ou pour l'utilisation à des fins commerciales doivent être adressées au Bureau du VIH/SIDA et des Maladies sexuellement transmissibles, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27 (Suisse), qui sera heureux de donner les dernières informations sur tout changement apporté au texte, les nouvelles éditions prévues ainsi que les réimpressions et traductions déjà disponibles.

La mention de firmes et de produits commerciaux n'implique pas que ces firmes et produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'OMS ou l'ONUSIDA de préférence à d'autres, de nature similaire et qui ne sont pas mentionnés. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

Les opinions exprimées dans les documents par des auteurs cités nommément n'engagent que lesdits auteurs.

Module 5

Rôle du laboratoire dans l'utilisation des antirétroviraux : sécurité et efficacité

Introduction

L'introduction des thérapeutiques antirétrovirales associées dans le traitement de l'infection à VIH a considérablement modifié l'aspect clinique de la maladie pour les personnes vivant avec le VIH/SIDA (PVS), pour les soignants responsables, et pour les décideurs. On examinera dans ce module la place du laboratoire dans la sécurité et l'efficacité d'utilisation des associations thérapeutiques antirétrovirales, concernant notamment :

- Le diagnostic de l'infection à VIH par la mise en évidence soit des anticorps, soit du génome viral au moyen de la PCR (polymerase chain reaction : amplification enzymatique d'acides nucléiques).
- La surveillance des effets indésirables des antirétroviraux.
- Le diagnostic des infections opportunistes.
- La numération des lymphocytes T-CD4⁺.
- La surveillance de la charge virale.
- La surveillance de la résistance du VIH.

On souligne combien la fiabilité et l'exactitude des données du laboratoire sont capitales pour le traitement antirétroviral et on fournit des informations de base sur la manière d'obtenir des résultats de grande qualité. La première condition pour obtenir de tels résultats est que le personnel soit convenablement formé. Une formation de base et une réactualisation périodique des connaissances doivent être systématiquement organisées dans les laboratoires dont l'activité est liée à la prise d'antirétroviraux. Les coûts ont été estimés d'après les prix pratiqués dans le commerce par les fabricants. Ils peuvent varier avec le lieu géographique et sont souvent négociables. Le coût de la main-d'œuvre n'est pas pris en compte.

Recherche du VIH

La méthode classique de diagnostic au laboratoire de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) comprend en général une recherche des anticorps spécifiques du virus au moyen d'un test ELISA (titrage avec immunoabsorbant lié à une enzyme) ou d'un test simple et rapide, suivi d'un test de confirmation des prélèvements positifs.¹

Le test de dépistage le plus utilisé est l'ELISA, lequel comporte différentes variantes s'appuyant sur des principes différents : méthode indirecte, par compétition, sandwich et par capture, toutes capables de déceler les anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. La plupart des tests ELISA de première génération utilisaient des lysats de virus comme antigène. Les variantes mises au point par la suite ont recours à des protéines recombinantes et/ou des peptides de synthèse. Elles sont généralement plus sensibles et plus spécifiques, dans la mesure où les produits de contamination, tels que les constituants cellulaires, du lysat viral sont moins abondants. Grâce à une initiative de l'OMS, les méthodes de titrage des anticorps anti-VIH ont subi une évaluation poussée.

Malgré leur sensibilité, leur spécificité et leur reproductibilité élevées, les méthodes de recherche des anticorps donnent parfois des faux positifs et des faux négatifs. La stratégie la plus courante de mise en

¹ Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA)/OMS. Recommandations concernant le choix et l'utilisation des tests de mise en évidence des anticorps anti-VIH - Version révisée. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1997, 72: 81-87.

évidence des anticorps anti-VIH consiste donc à pratiquer un deuxième test plus spécifique (dit de confirmation) sur les prélèvements positifs à plusieurs reprises au test de dépistage. Le Western blot (WB) et/ou les immunotitrages en ligne (LIA, RIBA) sont les tests spécifiquement utilisés en vue de confirmer une sérologie.

Le WB est cher, long à réaliser et a plusieurs inconvénients techniques : pas de standardisation du protocole opératoire ni de l'interprétation, et observation de réactions indéterminées. On a donc évalué d'autres méthodes de confirmation des prélèvements positifs pour les anticorps anti-VIH qui pourraient remplacer le WB classique. L'OMS a formulé un certain nombre de recommandations sur les stratégies du dépistage en fonction de son objectif. Le principe général est le suivant : utiliser une association de tests moins coûteux et moins sophistiqués, deux ou trois ELISA ou tests simples/rapides, par exemple, de manière à ce que la sensibilité et la spécificité soient comparables à celles des stratégies habituelles et notamment du WB. Pour bien faire, ces méthodes de remplacement utilisées pour confirmer une infection à VIH doivent s'appuyer sur une association de tests utilisant des principes différents et des préparations antigéniques différentes. On peut aussi concevoir une autre stratégie de confirmation qui permette de distinguer entre le VIH-1 et le VIH-2. Un autre avantage de cette stratégie utilisée en remplacement est l'économie de temps (de la réception du prélèvement à l'envoi des résultats définitifs). Ainsi peut-on le même jour réaliser le dépistage, confirmer les prélèvements positifs et adresser les résultats au médecin référent.

Outre le matériel de laboratoire habituel, il faut pour pratiquer l'ELISA un spectrophotomètre, dont le coût est voisin de USD 10 000. Les coffrets des tests simples/rapides contiennent souvent tous les réactifs nécessaires; le laboratoire doit posséder le matériel de base, tel que les tubes à hémolyse, les pipettes et une centrifugeuse ordinaire pour la séparation du sérum. Un réfrigérateur est nécessaire pour conserver les coffrets de test. Les prélèvements de sérum peuvent être gardés au réfrigérateur un certain temps, mais une conservation de longue durée exige la congélation à -20°C. On peut se procurer des tests ELISA pour la recherche du VIH au prix d'environ USD 1 par test, tandis que les tests simples/rapides sont en général plus coûteux (USD 3 environ). Le coût du Western blot est de USD 20-30. Un grand nombre de tests de mise en évidence des anticorps anti-VIH peuvent être obtenus à prix réduit en s'adressant à l'OMS qui procède à des achats en gros.

À côté du titrage des anticorps anti-VIH, l'identification du génome viral par amplification des acides nucléiques, comme avec la PCR par exemple (polymerase chain reaction : amplification enzymatique d'acides nucléiques), a sa place dans la confirmation de l'infection à VIH dans certains cas. L'amplification des acides nucléiques est particulièrement utile si l'on veut caractériser les souches virales : sous-typage, surveillance de la résistance aux antirétroviraux et mesure de la charge virale. La PCR est en outre le mode principal de mise en évidence du VIH chez le nourrisson. Quand le laboratoire n'est pas assez bien installé, on peut faire appel à une méthode modifiée de recherche d'antigènes dénaturés par la chaleur en remplacement de la PCR pour diagnostiquer précocement l'infection à VIH chez le nourrisson. Si la recherche de l'antigène repose essentiellement sur les mêmes principes que celle des anticorps, l'amplification des acides nucléiques est une méthode sensible et complexe qui demande des moyens, des instruments et des compétences spécifiques, et un programme bien mené d'assurance de la qualité. Pour plus d'informations sur la PCR et les techniques apparentées d'amplification des acides nucléiques, se reporter aux paragraphes concernant la charge virale et la surveillance de la résistance du VIH.

On notera enfin que, lorsqu'une infection par le VIH est décelée pour la première fois, le diagnostic doit toujours être confirmé sur un deuxième prélèvement de sang, de manière à exclure une erreur, qu'elle soit de laboratoire ou administrative.

En conclusion, le **diagnostic au laboratoire de l'infection à VIH** se fait généralement en recherchant d'abord les anticorps anti-VIH spécifiques dans le sérum ou le plasma. La mise en évidence des anticorps

peut se faire au moyen de tests simples/rapides, qui demandent du matériel et des fournitures de laboratoire minimales. Les stratégies de recherche basées sur les méthodes simples/rapides sont bien adaptées lorsque le nombre de prélèvements est faible. Dans le cas contraire, il est plus pratique et plus économique d'utiliser l'ELISA. Ces méthodes exigent des investissements plus importants en matériel et une alimentation régulière en eau et en électricité. La **recherche du virus lui-même**, par mise en évidence de l'antigène ou amplification de l'acide nucléique, est en général utilisée dans des situations particulières, par exemple au début de l'infection lorsque le titre d'anticorps peut être faible, pour le diagnostic chez le nourrisson né de mère infectée par le VIH, pour le sous-typage des souches virales ou pour la détermination de la charge virale.

Surveillance de la tolérance aux antirétroviraux

Comme la plupart des médicaments puissants, les antirétroviraux sont susceptibles de provoquer des réactions indésirables, dont l'impact doit être mis en balance avec les bénéfices potentiels du traitement. Les effets indésirables varient d'un médicament à l'autre et d'un patient à l'autre. Certains sont d'ordre général et relèvent du suivi clinique : éruptions cutanées, nausées, céphalées et polyneuropathie. Certains effets indésirables diminuent avec le temps. Pour d'autres, la surveillance relève des examens biologiques. On trouvera indiqués au Tableau 1 les principaux antirétroviraux, leurs effets secondaires les plus importants et le mode de recherche et de suivi de ces effets.

Parmi les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse, la zidovudine peut être responsable d'une anémie et d'une neutropénie. La lamivudine a relativement peu d'effets secondaires, tandis que d'autres inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse sont parfois à l'origine d'une pancréatite. Il est donc indispensable de faire régulièrement une numération-formule sanguine et une amylasémie (chez les patients symptomatiques). Parmi les inhibiteurs de protéase, l'indinavir peut entraîner une hyperbilirubinémie et une néphrolithiase clinique s'accompagnant de douleurs lombaires et d'hématurie (chez 3 %-5 % de l'ensemble des patients). Les effets indésirables les plus fréquents rapportés avec les autres inhibiteurs de protéase sont la diarrhée et les troubles digestifs divers. Les antiprotéases entraîneraient également les troubles suivants : élévation des enzymes hépatiques, lipodystrophie et diabète sucré chez un petit nombre de patients.

La fréquence des contrôles dépend de l'état clinique du patient et du traitement suivi. Si le patient tolère bien le traitement et si son état clinique est stable, l'intervalle qui sépare deux contrôles peut être porté à 3-4 mois. Dans le cas contraire, l'intervalle sera réduit en fonction des besoins, conformément à la décision du médecin responsable (pour plus de détails, voir le module 4 sur la sécurité et l'efficacité des antirétroviraux).

En conclusion, le suivi clinique et biologique régulier du patient sous antirétroviraux est indispensable. Les examens biologiques à réaliser dépendent des antiviraux employés, mais incluent généralement une numération-formule sanguine, une bilirubinémie, un dosage des enzymes hépatiques, une amylasémie, une uricémie et une glycémie (la recherche d'une glycosurie par bandelettes urinaires est en général suffisante). On soulignera que des examens biologiques qui serviront de référence doivent être réalisés avant la mise en route du traitement antirétroviral.

Tableau 1. Antirétroviraux, principaux effets indésirables, suivi clinique/biologique

Antirétroviral	Effets indésirables	Suivi clinique/biologique
1. Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse		
1.1. Zidovudine (ZDV, 3 ¹ -azido-2 ¹ , 3 ¹ -didésoxythymidine)	- céphalées et nausées en début du traitement (en général transitoires) - anémie, leucopénie (neutropénie) - myopathie	- examen clinique - numération-formule sanguine - CK
1.2. Didanosine (ddI, 2 ¹ , 3 ¹ -didésoxyinosine)	- troubles digestifs - polynévrite (traitement au long cours) - pancréatite	- examen clinique - examen clinique - amylasémie
1.3. Lamivudine (3TC)	(peu nombreux)	
1.4. Zalcitabine (ddC, 2 ¹ , 3 ¹ -didésoxycytidine)	- polynévrite - ulcérations buccales - pancréatite	- examen clinique - examen clinique - amylasémie
1.5. Stavudine (d4T, 2 ¹ , 3 ¹ -didéshydro-didésoxythymidine)	- neuropathie périphérique (fréquente) - bilan hépatique anormal - pancréatite (rare)	- examen clinique - dosage des enzymes hépatiques - amylasémie
2. Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse		
2.1. Nevirapine	- éruption cutanée (fréquente) - élévation des enzymes hépatiques	- examen clinique - dosage des enzymes hépatiques
2.2. Delavirdine	- éruption cutanée (fréquente) - bilan hépatique anormal	- examen clinique - dosage des enzymes hépatiques
3. Inhibiteurs de protéase		
3.1. Indinavir	- nausées, troubles digestifs, céphalées, sécheresse de la peau - hyperbilirubinémie - lithiase rénale/douleurs lombaires - diabète sucré (rare) - anémie hémolytique (rare) - dysfonctionnement hépatique (rare)	- examen clinique - bilirubinémie - bandelettes urinaires (recherche d'une glycosurie et d'une hématurie) - bilirubinémie, dosage des enzymes hépatiques
3.2. Ritonavir	- nausées, troubles digestifs - parasthésies - augmentation des taux sériques des enzymes hépatiques, de l'uricémie, de la glutamyl-transpeptidase (GT), de la créatine-kinase (CK), des triglycérides - diabète sucré (rare)	- examen clinique - examen clinique - dosages dans le sérum : enzymes hépatiques, acide urique, GT, CK, triglycérides - glycosurie
3.3. Nelfinavir	- troubles digestifs (20 % environ des patients) - hyperglycémie et lipodystrophie	- examen clinique - glycosurie - dosage des enzymes hépatiques

Identification et diagnostic des infections opportunistes

Les infections opportunistes occupent une place importante dans le tableau clinique du VIH/SIDA et leur recherche et leur traitement tiennent un rôle considérable dans la prise en charge des personnes infectées par le virus. L'incidence des infections opportunistes diminue en général avec l'introduction des antirétroviraux. Toutefois, quand l'observance du traitement antirétroviral n'est pas optimale ou qu'une résistance du virus aux molécules utilisées se développe, les infections opportunistes peuvent réapparaître.

Le Tableau 2 résume les données sur les principales infections opportunistes et les complications observées au cours de l'infection à VIH, en indiquant le mode de diagnostic ainsi que le matériel et les réactifs de base nécessaires.

Certaines infections opportunistes, comme la candidose buccale ou œsophagienne, la rétinite à cytomégalovirus et la forme cutanée du sarcome de Kaposi (SK), peuvent être diagnostiquées et suivies sur un simple examen clinique (le sarcome de Kaposi est souvent confirmé par l'anatomopathologie). Un grand nombre de parasitoses peuvent être diagnostiquées par l'examen microscopique de prélèvements appropriés, selles ou tissus par exemple. Les lymphomes sont également diagnostiqués et typés grâce à l'anatomopathologie. La radiographie pulmonaire associée à l'examen microscopique d'un échantillon d'expectoration suffit en général pour confirmer une tuberculose pulmonaire ou une infection à *Pneumocystis carinii*. La tomographie informatisée ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont des outils intéressants pour l'étude des manifestations cérébrales de l'infection à VIH, toxoplasmose, lymphomes et leucoencéphalopathie progressive multifocale, par exemple. La confirmation des infections bactériennes nécessite la mise en culture. La culture du germe de la tuberculose et des virus exige des laboratoires spécialement équipés et des réactifs particuliers.

Ainsi, moyennant de bonnes connaissances et une ample expérience clinique, est-il possible de surveiller convenablement un grand nombre d'infections opportunistes en s'appuyant sur l'examen clinique et des techniques simples, ne serait-ce que la microscopie et la radiographie thoracique. La présence d'un laboratoire de bactériologie augmente les possibilités diagnostiques. Pour bien faire, il est souhaitable de pouvoir cultiver des virus et le bacille tuberculeux, et de disposer de la tomographie informatisée et/ou de l'imagerie par résonance magnétique. Le degré de sophistication sera déterminé localement, en fonction des besoins, des ressources disponibles et du plateau technique.

Tableau 2. Principales infections opportunistes et complications observées au cours de l'infection à VIH : mode de diagnostic, matériel et réactifs de base

Pathologie	Fréquence ^c	Mode de diagnostic	Matériel et réactifs	Priorité ^b
1. Infections à protozoaires				
1.1. <i>Pneumocystis carinii</i>	***	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique^a - examen microscopique d'expectorations (si possible induites) - radiographie pulmonaire - bronchoscopie (avec lavage broncho-alvéolaire par exemple) 	<ul style="list-style-type: none"> - microscopie optique, matériel de coloration - matériel de radiographie - films, et réactifs pour le développement des films - matériel pour bronchoscopie (microscope optique et matériel de coloration en plus pour le LBA) 	<ul style="list-style-type: none"> * * *
1.2. Toxoplasmose	**	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - recherche des anticorps sériques - tomographie informatisée - IRM - anatomopathologie de biopsie cérébrale (exceptionnel) 	<ul style="list-style-type: none"> - matériel pour tomographie informatisée - matériel pour IRM - (chirurgie), microscope optique, matériel de coloration 	<ul style="list-style-type: none"> * * (*)
1.3. Cryptosporidiose	*	<ul style="list-style-type: none"> - examen microscopique des selles 	<ul style="list-style-type: none"> - microscope optique 	<ul style="list-style-type: none"> *
1.4. <i>Isospora belli</i>	*	<ul style="list-style-type: none"> - examen microscopique des selles 	<ul style="list-style-type: none"> - microscope optique 	<ul style="list-style-type: none"> *
2. Infections bactériennes				
2.1. Tuberculose	***	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - examen microscopique d'expectorations - radiographie pulmonaire - culture 	<ul style="list-style-type: none"> - microscope optique, matériel et colorants pour la mise en évidence des bacilles acido-alcoolorésistants - installations adaptées au bacille tuberculeux 	<ul style="list-style-type: none"> * * *
2.2. Complexe <i>Mycobacterium avium</i>	*	<ul style="list-style-type: none"> - culture 		<ul style="list-style-type: none"> *

Pathologie	Fréquence ^c	Mode de diagnostic	Matériel et réactifs	Priorité ^b
2.3. Pneumonie bactérienne	**	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - radiographie pulmonaire - culture (prélèvement nasopharyngé, crachat ou sang) 	<ul style="list-style-type: none"> - laboratoire de bactériologie classique 	<ul style="list-style-type: none"> * *
2.4. Gastro-entérite bactérienne	**	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - coproculture - examen microscopique des selles (pour exclure une infection parasitaire) 	<ul style="list-style-type: none"> - microscope optique 	<ul style="list-style-type: none"> *
3. Infections virales				
3.1. Infection oculaire à cytomégalovirus (CMV)	*	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - examen ophtalmologique 	<ul style="list-style-type: none"> - ophtalmoscope - (microscope ophtalmologique) 	<ul style="list-style-type: none"> *
infection du système nerveux central		<ul style="list-style-type: none"> - PCR sur LCR 	<ul style="list-style-type: none"> - matériel pour PCR 	<ul style="list-style-type: none"> (*)
infection digestive		<ul style="list-style-type: none"> - endoscopie et biopsie - anatomopathologie sur biopsie 	<ul style="list-style-type: none"> - matériel pour endoscopie (rectoscope) - microscope optique, matériel de coloration 	<ul style="list-style-type: none"> * *
3.2. Virus de la varicelle et du zona (VVZ)	*	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - recherche de l'antigène par immunofluorescence (IF) - culture du virus 	<ul style="list-style-type: none"> - microscope à fluorescence, réactifs - laboratoire de virologie 	<ul style="list-style-type: none"> *
3.3. Virus de l'herpès (HSV)	**	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - immunofluorescence - recherche des anticorps - anatomopathologie sur biopsie - PCR - culture du virus 		<ul style="list-style-type: none"> * (*)
3.4. Leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LMP)	*	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - PCR sur LCR (virus JC) - tomographie informatisée - IRM - anatomopathologie sur biopsie cérébrale (exceptionnel) 		<ul style="list-style-type: none"> * * (*)

Pathologie	Fréquence ^c	Mode de diagnostic	Matériel et réactifs	Priorité ^b
4. Infections mycosiques				
4.1. <i>Candida</i>	***	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - examen microscopique du produit de grattage - endoscopie - radiographie (œsophage par exemple) 	<ul style="list-style-type: none"> - microscope optique 	<ul style="list-style-type: none"> * (*) (*) (*)
4.2. <i>Cryptococcus neoformans</i>	**	<ul style="list-style-type: none"> - recherche de l'antigène dans le sérum - présence de l'antigène dans le LCR - culture - anatomopathologie sur biopsie 	<ul style="list-style-type: none"> - laboratoire adapté à la culture de mycophytes - coloration au mucicarmin, coloration à l'encre de Chine 	<ul style="list-style-type: none"> (*) (*)
4.3. <i>Histoplasma capsulatum</i>	*	<ul style="list-style-type: none"> - recherche de l'antigène dans le sérum - examen anatomopathologique de matériel biopsique, de crachats ou de produits de lavage - culture 		<ul style="list-style-type: none"> (*)
4.4. <i>Coccidioides immitis</i>	*	<ul style="list-style-type: none"> - recherche de l'antigène dans le sérum - anatomopathologie sur biopsie - culture 		<ul style="list-style-type: none"> (*)
5. Autres pathologies				
5.1. Sarcome de Kaposi	**	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - anatomopathologie sur biopsie 		<ul style="list-style-type: none"> *
5.2. Lymphomes	*	<ul style="list-style-type: none"> - examen clinique - anatomopathologie sur matériel biopsique ou cellulaire - échographie - tomographie informatisée - IRM 	<ul style="list-style-type: none"> - matériel pour échographie 	

Pathologie	Fréquence ^c	Mode de diagnostic	Matériel et réactifs	Priorité ^b
5.3. Syndrome cachectique du SIDA	**	- examen clinique		*
5.4. Autres complications neurologiques liées au VIH	*	- examen clinique		*

^a L'examen clinique comporte aussi les antécédents cliniques et pour bien faire un prélèvement de sang sur lequel seront faites une numération-formule sanguine et une mesure des paramètres inflammatoires.

^b * Matériel minimal nécessaire.
 (*) Matériel nécessaire complémentaire.

^c *** Fréquente.
 ** Moins fréquente.
 * Rare.

(N.B. : Variable en fonction de la zone géographique et de la population.)

IRM : Imagerie par résonance magnétique.

LBA : Lavage broncho-alvéolaire.

LCR : Liquide céphalorachidien.

PCR : Polymerase chain reaction = amplification enzymatique d'acides nucléiques.

NUMÉRATION DES LYMPHOCYTES T-CD4⁺

Le nombre de lymphocytes T-CD4⁺ sert classiquement depuis de nombreuses années à apprécier l'état immunitaire des personnes infectées par le VIH. Un nombre de lymphocytes T-CD4⁺ peu élevé (<200/mm³) est un indicateur prédictif d'une réduction de la survie et d'une augmentation du risque de contracter des infections opportunistes. Depuis peu, les méthodes de mesure de la concentration plasmatique de l'ARN viral permettent de compléter ou de remplacer la numération des lymphocytes T-CD4⁺. La charge virale plasmatique étant en outre un bon indicateur prédictif de l'évolution clinique de la maladie à VIH, la nécessité de mesurer régulièrement le nombre de lymphocytes T-CD4⁺ pourrait diminuer. La numération des lymphocytes T-CD4⁺ est cependant encore massivement utilisée, souvent parallèlement à la mesure de la charge virale plasmatique. Il reste à déterminer l'importance à donner à chacune de ces deux méthodes et comment elles pourraient se compléter.

Dans les pays industrialisés, la méthode classique de la numération des lymphocytes T-CD4⁺ chez les personnes infectées par le VIH est la cytométrie en flux. L'immunophénotypage par cytométrie en flux sur les prélèvements de sang périphérique au moyen de batteries d'anticorps monoclonaux à deux, trois ou quatre fluorochromes de couleur différente est parfaitement standardisé et les résultats sont en général exacts et fiables. La plupart des laboratoires mesurent le nombre absolu de lymphocytes T-CD4⁺ en associant les résultats de deux (ou trois) techniques de laboratoire différentes : la proportion de lymphocytes T-CD4⁺ est déterminée par la cytométrie en flux et le nombre de lymphocytes (le nombre de globules blancs dans la numération-formule sanguine) est déterminé par l'examen hématologique. Chacune des techniques contribue ainsi à assurer l'exactitude du résultat final.

Plusieurs méthodes ont été récemment mises au point pour obtenir le nombre absolu de lymphocytes T-CD4⁺ directement à partir de l'analyse par cytométrie en flux. La variabilité des résultats ainsi obtenus serait moins grande, mais l'exactitude des mesures doit être validée, en comparant avec les résultats obtenus par les méthodes classiques. Il est souhaitable que les laboratoires qui pratiquent la numération des lymphocytes T-CD4⁺ se conforment aux recommandations publiées ainsi qu'aux instructions des fabricants, et participent à des programmes d'évaluation des pratiques (11).

Les analyseurs pour la cytométrie en flux peuvent aujourd'hui être obtenus auprès de trois fabricants pour un prix voisin de US D40 000-80 000. Ce matériel doit être manipulé par du personnel très bien formé et est donc inadapté à la pratique quotidienne dans les laboratoires ayant des moyens limités. Dans une telle situation, les prélèvements doivent être adressés à un laboratoire central, à condition qu'ils puissent être maintenus à température ambiante pendant le transport et traités dans un délai acceptable. Un prélèvement destiné à être immunophénotypé par cytométrie en flux doit être traité dans les 48 heures qui suivent le recueil. L'analyse hématologique doit être réalisée dans les délais pour lesquels l'appareil a été validé, en général 30 heures maximum après le recueil du prélèvement. L'immunophénotypage et l'examen hématologique peuvent donc être réalisés dans des laboratoires distincts. Si le transport du prélèvement vers le laboratoire qui réalise la cytométrie en flux est impossible à la température exigée ou dans les délais acceptables, par exemple dans les pays en développement, on aura recours à une méthode de numération des lymphocytes T-CD4⁺ de substitution.

Ces méthodes de surveillance de la numération des lymphocytes T-CD4⁺/CD8⁺ sont résumées au Tableau 3. Des méthodes de remplacement ont été réexaminées par l'OMS au cours d'un atelier qui s'est tenu en 1992. Les résultats de diverses études et notamment d'une évaluation multicentrique conduite en collaboration sur le terrain par l'OMS, et concernant les techniques de mesure des CD4 de remplacement, ont mis en évidence leur fiabilité et leur aptitude à être utilisées lorsque les installations sont peu développées. Ces tests reposent sur plusieurs principes, qu'il s'agisse des tests du commerce ou de ceux mis au point par des laboratoires de recherche et utilisant des réactifs immunologiques disponibles dans le commerce. Certaines

méthodes sont conçues pour ne détecter que les cellules CD4⁺, d'autres au contraire pour détecter également les CD3⁺ et les CD8⁺. Les principes de base de ces tests sont notamment : la détection des lymphocytes par marquage avec des anticorps monoclonaux, puis visualisation au moyen de réactifs chromogènes, soit conjugués directement à l'anticorps monoclonal (FACSCount, Cytosphere, phosphatase alcaline), soit indirectement après lyse des cellules marquées par l'anticorps monoclonal (Dynabeads). Dans ce dernier cas, les cellules sont visualisées après coloration au bleu trypan des noyaux cellulaires restant après la lyse. Une autre méthode consiste à détecter les molécules CD4 et/ou CD8 au moyen de l'ELISA, soit directement dans les cellules (Capcellia, Zymune), soit après libération des molécules de surface de la cellule par solubilisation (TRAx CD4). A l'exception du FACSCount, qui exige un instrument spécifique, ces techniques ne font appel à aucun appareillage sophistiqué; la lecture du Cytosphere, du Dynabeads et de la phosphatase alcaline se fait au microscope optique, tandis que celle du Capcellia, du Zymune et du TRAx CD4 exige des lecteurs d'ELISA. La corrélation entre les méthodes de remplacement et la cytométrie en flux est généralement bonne; dans certaines études, on a toutefois observé un coefficient de corrélation variable, en particulier lorsque l'ELISA est utilisé avec des prélèvements recueillis en Afrique. Si le coefficient de corrélation est élevé lorsqu'on compare les diverses méthodes à la cytométrie en flux, il reste que les valeurs obtenues sont systématiquement ou trop faibles ou trop élevées. Il importe donc d'évaluer et de standardiser, dans les conditions locales, la méthode choisie.

Le choix de la méthode est fonction de la situation, chacune correspondant à des caractéristiques techniques différentes (Tableau 3). Par exemple, les méthodes immuno-enzymatiques sur plaque de microtitrage sont adaptées lorsque le laboratoire traite un grand nombre de prélèvements mais dispose de peu de personnel. Ces méthodes conviennent également lorsque les prélèvements sont recueillis dans des sites éloignés car ils peuvent alors être congelés et envoyés par lots pour être testés. Les méthodes qui s'appuient sur la numération microscopique des cellules sont utilisables lorsque le laboratoire traite un petit nombre d'échantillons et a peu de personnel. En général, ces méthodes de substitution nécessitent un investissement initial plus faible et ont un coût de réalisation moindre que la cytométrie en flux classique. Le prix des réactifs nécessaires pour tester un prélèvement par l'une de ces méthodes est d'environ USD 5-10, à l'exception du FACSCount et du Capcellia, qui sont plus coûteuses. Le coût correspondant avec la cytométrie en flux est de USD 10-15. Les méthodes de substitution sont toutefois moins souples et souvent longues, une contrainte dans les investigations à grande échelle.

Si ces méthodes de substitution sont utilisées pour le suivi des patients, on notera que les résultats ont des chances d'être plus cohérents si on utilise la même méthode à chaque examen. Il est par conséquent recommandé que les laboratoires utilisent un seul type de méthode. Si un changement s'avère nécessaire, la nouvelle méthode sera évaluée localement, parallèlement à la précédente, de façon à ce que la comparaison des résultats successifs soit juste. Des programmes de contrôle de la qualité doivent également être mis en place et intégrés dans le protocole opératoire.

En conclusion, la méthode classique et la plus fiable pour la numération des lymphocytes T-CD4⁺, en particulier à grande échelle, est la cytométrie en flux. Si elle ne peut être pratiquée, il existe un certain nombre de méthodes de substitution, qui correspondent à des plateaux techniques différents et sont adaptées à des contextes différents. L'investissement initial et le coût de la maintenance sont considérablement plus élevés pour la cytométrie en flux que pour les autres méthodes. Ces coûts et les dépenses afférentes en réactifs pour chaque prélèvement testé varient ainsi avec la méthode employée, mais diffèrent peu d'un pays à l'autre. La formation du personnel et la charge de travail sont largement fonction de la méthode et, par conséquent, le coût de la main-d'œuvre est différent d'un pays à l'autre. L'exactitude de la méthode doit être contrôlée, et ce contrôle est particulièrement important lorsqu'on choisit une méthode de substitution.

Tableau 3. Principales caractéristiques comparées de la cytométrie en flux et de sept méthodes de substitution pour la numération des lymphocytes CD4/CD8

	Cytométrie en flux	FACSCount™	Cytosphere	TRAX™CD4	Zymune	Dynabeads	Capcellia	Phosphatase alcaline
Fabricant	Becton Dickinson Coulter Corp. Ortho Diagnostic Systems	Becton Dickinson	Coulter Corp.	T Cell Diagnostics	Zynaxis Inc.	Dynal A/S	Sanofi Diagnostics-Pasteur	Test de laboratoire avec des réactifs du commerce
Appareillage	Analyseur-trieur de cellules. Automatisation possible. Compteur de cellules parfois nécessaire.	Automate	Microscope optique ou informatisé et hématimètre	Plaques pour dosage immuno-enzymatique	Plaques pour dosage immuno-enzymatique	Particules magnétiques et matériel de comptage* ou microscope optique	Plaques pour dosage immuno-enzymatique	Microscope optique
Méthode de détection	ACM marqués par un fluorochrome dirigés contre les molécules de surface des cellules	ACM anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD8, marqués par un fluorochrome	* Microbilles conjuguées à un ACM anti-CD4	ACM anti-CD4 et anti-CD8	ACM anti-CD4 et anti-CD8	Microbilles magnétiques conjuguées à un ACM anti-CD4 et anti-CD8	ACM anti-CD4 et anti-CD8	Réaction sur lame avec un ACM anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD8
Type de prélèvement	Sang total avec GR hémolysés	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	MSP	Frottis sanguin
Résultats	Coloration double, triple ou quadruple des marqueurs de la surface cellulaire en présence d'ACM	Numération des CD3, des CD4 et des CD8	Numération des CD4	Equivalent du nombre de cellules CD4	Numération des CD4 et des CD8	Numération des CD4 et des CD8	Picomoles de CD4/litre et de CD8/litre	Numération des CD3, des CD4 et des CD8
Précision (coefficient de variation)	<5 >15 % (en fonction de la méthode)	4 %	<5 %	<8 %	5 %	<10 %		95 % IC ± 8-14
Corrélation avec la cytométrie en flux (coefficient de corrélation)	SO	0,93-0,98 (plusieurs études internationales)	0,74-0,91 (plusieurs études internationales)	0,63-0,91 (plusieurs études internationales)	0,92-0,94 (deux études aux États-Unis d'Amérique)	0,94 (une seule étude)		0,96 (une seule étude)

Coût (appareillage, USD)	40 000-80 000	20 000	2 000	15 000	15 000	2 000	15 000	2 000
Coût/test (réactifs seulement, USD, approximatif)	10-15	20	8	6	6	5	28	3
Avantages	Puissant et flexible. Permet une double, triple ou quadruple coloration. Permet l'examen de prélèvements délicats quand les techniques de substitution ne donnent pas de résultat satisfaisant.	Peu d'étapes, moins d'erreurs humaines. Risque biologique faible. Résultats rapides. Donne la numération des CD3, des CD4 et des CD8.	Simple et rapide.	Simple. Longue durée de conservation du prélèvement. Permet de traiter un grand nombre d'échantillons en même temps.	Simple. Permet de traiter un grand nombre d'échantillons en même temps. Donne la numération des CD4 et des CD8.	Simple et rapide. Donne la numération des CD4 et des CD8. Souplesse de la numération. Prélèvement de faible volume.	Donne la numération des CD4 et des CD8.	Faible coût. Longue durée de conservation du prélèvement. Prélèvement de faible volume.
Inconvénients	Matériel et réactifs coûteux. Complexe, une bonne formation du personnel est nécessaire.	Matériel et réactifs coûteux. Le poste de travail ne permet de traiter que 8 échantillons à la fois.	Faible durée de conservation. Ne donne que la numération des CD4.	Pipettage des prélèvements visqueux difficile. Ne donne que la numération des CD4.	Pipettage à de nombreuses reprises.	Peu de prélèvements traités simultanément. Comptage visuel subjectif. Faible durée de conservation du prélèvement. N'existe pas dans le commerce sous forme de coffret.	Isolement des MSP par centrifugation en gradient de densité. Coûteux.	Comptage manuel long et délicat. Technique de coloration compliquée. N'existe pas dans le commerce sous forme de coffret.

* Analyseur-compleur automatisé ou hématimètre; MSP : mononucléaires du sang périphérique; ACM : anticorps monoclonaux; EIA : dosage immuno-enzymatique; IC : intervalle de confiance; GR : globules rouges; SO : sans objet.

Surveillance de la charge virale

Généralités

Notre connaissance de la pathogénie du SIDA a fortement bénéficié des découvertes thérapeutiques et méthodologiques récentes, à savoir la mise au point et l'usage de thérapeutiques antirétrovirales associées hautement actives et la mesure de l'ARN viral du VIH-1 dans le plasma. On a montré que la charge virale plasmatique diminue très rapidement après la mise en route du traitement antirétroviral. En principe, le logarithme du nombre de copies d'ARN du VIH-1 dans le plasma tombe à environ 2 dans les deux premières semaines du traitement. Cette chute est suivie d'une deuxième phase où la baisse de la concentration est plus lente.

Dans les pays industrialisés, la mesure de la charge virale du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est vite devenue une méthode très utilisée pour suivre les personnes infectées par le VIH. C'est un élément capital de la prise en charge clinique, permettant de faire un pronostic et de surveiller l'efficacité du traitement. On se base sur le fait que le nombre de copies d'ARN du VIH-1 dans le plasma semble atteindre un seuil peu après la primo-infection et que ce seuil est fortement corrélé au risque ultérieur d'évolution clinique. En outre, une modification précoce de la charge virale en réponse au traitement paraît signifier un bénéfice clinique à long terme. Dans les pays industrialisés, la mise au point de tests standardisés vendus en coffret dans le commerce a largement facilité la mesure de la charge virale à grande échelle.

Méthodes disponibles

Il existe actuellement dans le commerce trois tests pour la mesure de la concentration plasmatique de l'ARN du VIH-1, à savoir le HIV monitor assay (Roche), le Nuclisens HIV-1 QT (amplification de séquences d'acides nucléiques, Organon) et le Quantiplex HIV-RNA assay (ADN branché, Chiron). Les principales caractéristiques de ces tests sont résumées au Tableau 4. Ces essais sont en constante évolution et on a entrepris la distribution de nouveaux protocoles qui permettent de mesurer jusqu'à 50 copies environ d'ARN par ml de plasma, et de mieux déceler tous les sous-types génétiques du VIH-1. Le coût par test (pour les trois fabricants) est officiellement un peu inférieur à USD 100. Des méthodes mises au point par les laboratoires pour la mesure de la concentration plasmatique de l'ARN du VIH-1 ont été décrites, mais il est impossible de les recommander systématiquement, la variabilité intra- et intercycle de traitement étant difficile à évaluer. Il existe une nouvelle méthode améliorée de titrage de l'antigène p24 du VIH-1 dans le plasma, mais elle n'a pas été aussi bien évaluée que les méthodes de mesure de l'ARN. Elle pourrait toutefois représenter une solution de remplacement moins coûteuse lorsque les ressources sont limitées.

HIV monitor (Roche)

Le HIV monitor s'appuie sur la PCR. L'ARN viral est extrait à partir de 200 µl de plasma, puis après RT-PCR, le nombre de copies d'ARN du VIH-1 est déterminé par une méthode de type ELISA. La durée d'un cycle opératoire est d'environ 8 heures. Le seuil inférieur de détection est de 200-500 copies par ml de plasma; une variante de la méthode avec un seuil de détection encore plus faible (50 copies par ml) est en cours de mise au point. Avec cette variante, il faut ultracentrifuger 500 µl de plasma avant d'extraire l'ARN. La première version de la méthode (utilisée actuellement) donne des valeurs trop faibles avec nombre de prélèvements provenant de personnes infectées par les sous-types A et E, mais les nouvelles variantes (amorçe additionnelle et version 1.5) qui améliorent la détection des sous-types M du VIH-1 sont en cours de mise à disposition. Toutefois, elles ne repèrent pas le groupe O du VIH-1 ni le VIH-2. Parmi le matériel nécessaire, il faut un thermocycleur (coût approximatif USD 10 000), un photomètre pour la

lecture des tests ELISA (coût approximatif USD 15 000), ainsi qu'une ultracentrifugeuse (coût approximatif USD 25 000) pour la variante ultrasensible.

Nuclisens HIV-1 QT; amplification de séquences d'acides nucléiques (Organon)

Le Nuclisens HIV-1 QT repose sur l'amplification de séquences d'acides nucléiques, qui est une méthode d'amplification isotherme au moyen de trois enzymes (transcriptase inverse, RNase H et ARN polymérase T7). L'ARN viral extrait du plasma est amplifié par cette méthode et on détecte ensuite l'émission de lumière (électro-chimioluminescence) au moyen d'un appareil spécifique. Le cycle opératoire est d'environ 12 heures. Le seuil inférieur de détection exacte est fonction du volume de l'échantillon : avec 200 µl de plasma, la limite de détection se situe à 400 copies/ml. On peut toutefois utiliser jusqu'à 2 ml de plasma, ce qui porte le seuil de détection à 40 copies/ml de plasma. La première version de la méthode (seule utilisée actuellement) donne des valeurs trop faibles avec un grand nombre d'échantillons provenant de personnes infectées par les sous-types A et E. Elle ne permet pas de déceler le VIH-1 groupe O ni le VIH-2. Le matériel se compose d'un bain sec (prix approximatif USD 3000) et d'un appareil de détection spécial (Tableau 4).

Quantiplex HIV-RNA assay; ADN ramifié (Chiron)

La méthode utilisant l'ADN ramifié diffère des deux autres en ce qu'elle repose sur l'amplification du signal et non sur l'amplification de la cible. Cette méthode est conduite comme un ELISA. Le virus est concentré à partir de 1 ml de plasma par ultracentrifugation et l'ARN viral est libéré dans un tampon qui contient un grand nombre de sondes de VIH-1. On laisse reposer l'ARN du VIH-1 (et les sondes qui lui sont accrochées) dans les puits de microplaques sensibilisées par des sondes de capture spécifiques du VIH-1. On ajoute ensuite des sondes de détection (ADN ramifié) marquées par une enzyme et un substrat chimioluminescent; l'émission de lumière est mesurée au moyen d'un appareil spécial. Le cycle opératoire dure environ deux jours. Le seuil inférieur de détection exacte est de 500 copies/ml, et d'environ 100 copies/ml avec une variante. Il semble que la méthode permette de déceler tous les sous-types génétiques au sein du groupe M avec une même efficacité. Le VIH-1 groupe O et le VIH-2 ne sont pas décelés. L'appareillage nécessaire comporte une ultracentrifugeuse (coût approximatif USD 25 000) et l'appareil spécial (Tableau 4).

Comparaison des différentes méthodes

Ces trois méthodes sont tout à fait comparables quant au coût, à la charge de travail, à la sensibilité et à la précision. Aucune d'elles ne peut donc être considérée comme supérieure. Il existe toutefois des petites différences qui peuvent avoir de l'importance dans des cas précis. Le matériel nécessaire pour la méthode commercialisée par Roche existe souvent déjà dans le laboratoire, mais les appareils spécifiques nécessaires pour la réalisation des deux autres tests peuvent probablement être obtenus gratuitement ou à un coût peu élevé auprès des fabricants, tout au moins si des séries importantes d'échantillons sont analysées. En outre, les caractéristiques des tests proposés par Organon et Chiron font qu'ils sont mieux adaptés aux analyses à grande échelle. Le temps de réalisation du test, un peu plus long avec ces deux méthodes, est essentiellement dû à la longueur de l'incubation. De nombreux sous-types génétiques coexistent presque partout, à l'exception peut-être des Etats-Unis d'Amérique : par conséquent, un test qui ne permettrait pas de déceler tous les sous-types avec la même efficacité, à savoir les tests de première génération des laboratoires Roche et Organon, devra probablement être évité.

Il faut noter que la réalisation de ces trois tests exige aussi un environnement informatisé.

Modifications des options en fonction des situations

Il n'existe en réalité que deux options : utiliser ou ne pas utiliser les méthodes de dosage de l'ARN du VIH-1 pour surveiller en routine les personnes infectées par ce virus. Les principaux obstacles sont le coût des tests et du matériel, et la nécessité de disposer d'un laboratoire adapté. En outre, la formation des techniciens est une condition indispensable pour que les tests soient réalisés avec le soin et la rigueur nécessaires. Toutefois, comparé au coût des associations antirétrovirales modernes comportant des antiprotéases, le coût de la mesure de la charge virale est modéré. On peut estimer que le dosage de l'ARN doit être pratiqué quand on administre des traitements associés. Le contrôle de la charge virale avant et pendant le traitement est probablement rentable, car il permet de savoir à quel moment commencer, arrêter ou modifier le traitement. Des recommandations concernant la manière d'utiliser en routine la mesure de la charge virale pour le suivi des patients ont été publiées. Chez un patient non traité, la charge virale est généralement mesurée tous les quatre à six mois. Après la mise en route du traitement, la charge est mesurée en général tous les trois mois et, souvent, mesurée aussi un mois après le début ou le changement de traitement.

La prescription d'un traitement antirétroviral hautement actif doit pour bien faire s'accompagner de la surveillance de la charge virale; toutefois, quand les ressources font défaut, elle ne sera pas faisable et la surveillance de l'évolution de la maladie et de la réponse au traitement se fera sur les critères cliniques et la mesure du taux de CD4.

Méthode	Principe	Seuil de détection	Remarques	Matériel nécessaire	Coût (USD)
HIV Monitor (Roche)	RT-PCR suivie d'une méthode de type ELISA pour déterminer le nombre de copies.	Test classique : 200-500 copies d'ARN du VIH-1/ml de plasma. Méthode ultrasensible : 50 copies/ml.	Le matériel existe en général déjà dans les laboratoires classiques de virologie. Les tests de première génération donnent des valeurs trop faibles avec un grand nombre de prélèvements de sous-type A et E.	- Thermocycleur - Lecteur ELISA - Ultracentrifugeuse	10 000 15 000 25 000
Nuclisens HIV-1 QT; amplification de séquences d'acides nucléiques (Organon)	Amplification isotherme de l'ARN extrait, au moyen de trois enzymes. Détection de l'électrochimiluminescence.	Test classique : (échantillon de 200 µl) : 400 copies d'ARN du VIH-1/ml de plasma. Avec 2 ml de plasma : 40 copies/ml.	VIH-1 groupe O et VIH-2 pas décelés. Les tests de première génération donnent des valeurs trop faibles avec un grand nombre de prélèvements de sous-type A et E.	- Appareil de détection spécial - Bain sec	Négociable 3000
Quantiplex HIV-RNA assay; ADN ramifié (Chiron)	Amplification du signal au moyen de sondes de détection marquées par une enzyme. Détection de la chimiluminescence.	Test classique : 500 copies d'ARN du VIH-1/ml de plasma. Variante : 100 copies/ml.	Appareil spécial de détection. VIH-1 groupe O et VIH-2 pas décelés. Décele toutes les souches de VIH-1 groupe M. VIH-1 groupe O et VIH-2 pas décelés.	- Ultracentrifugeuse - Appareil spécial de détection de la chimiluminescence	25 000 Négociable
			Appareil spécial de détection.		

Module 5

Rôle du laboratoire dans l'utilisation des antirétroviraux: sécurité et efficacité

Surveillance de la résistance du VIH

Généralités

Le VIH se caractérise par une grande variabilité génétique et une capacité d'évolution rapide qui lui confère une aptitude extraordinaire à répondre aux modifications du milieu comme celles qu'induisent les thérapeutiques antirétrovirales. Par conséquent, l'émergence d'une résistance est le principal obstacle à l'efficacité du traitement au long cours.

On connaît des variants résistants à presque tous les antirétroviraux utilisés ou en cours de développement. La résistance peut apparaître dans les semaines qui suivent le début de la monothérapie, par un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse ou la 3TC par exemple, en raison de la rapidité de réplication du VIH-1 *in vivo*. Le délai d'apparition de la résistance est en partie déterminé par le nombre de mutations nécessaires pour que la résistance soit totale. Pour certains médicaments, ceux mentionnés plus haut, il suffit d'une unique mutation ponctuelle pour que la résistance soit complète. Les variants résistants sont alors en général déjà présents dans la population virale avant la mise en route du traitement, quoique à faible concentration. Il faut plusieurs mutations pour que la résistance aux autres médicaments ou aux associations de médicaments puisse s'exprimer. Ces variants ne préexistent généralement pas mais apparaissent au fur et à mesure que le virus subit des mutations de plus en plus nombreuses. Pour éviter la survenue d'une résistance, il est important d'employer des médicaments dont l'effet ne peut pas être annulé par une seule mutation, et qui sont assez puissants pour bloquer la réplication virale, et donc le risque d'accumulation des mutations. On ne peut en principe remplir ces deux objectifs qu'en administrant simultanément une association de trois médicaments au moins, désignée sous le nom de traitement antirétroviral hautement actif.

Il existe plusieurs méthodes de détermination de la sensibilité du VIH aux antirétroviraux, mais aucune méthode simple et standardisée utilisable en routine. Les techniques existantes sont toutes relativement complexes et, en outre, l'interprétation des résultats est difficile. Les conséquences précises de la survenue de la résistance ne sont pas entièrement connues. Ce qui est clair, c'est que la résistance entraîne souvent un échappement thérapeutique, lequel n'est toutefois pas toujours complet.

Si la surveillance des variants pharmacorésistants est importante, en raison notamment de la généralisation des thérapeutiques antirétrovirales, les techniques sont actuellement complexes et coûteuses, et leur emploi sera limité aux centres de référence.

Méthodes disponibles

En gros, les techniques de détermination de la sensibilité aux antiviraux sont de deux types : biologique ou moléculaire. Chacun a ses avantages et ses inconvénients. L'un des avantages de la méthode biologique est que la pharmacosensibilité de l'isolement viral est mesurée directement, alors que pour la technique moléculaire, elle est déduite de la présence ou de l'absence de mutations connues pour être à l'origine d'une pharmacorésistance; ce résultat n'est pas clairement évident chez le patient déjà traité par plusieurs antirétroviraux différents et chez lequel le profil mutationnel est complexe. Toutefois, pour pouvoir réaliser un test biologique, il faut pouvoir disposer d'un isolement viral, ce qui est en soi un problème, car isoler le virus consiste à sélectionner certains variants à partir de la population virale présente *in vivo* (28). En outre, l'isolement utilisé provient en général des mononucléaires du sang périphérique et risque par conséquent de ne pas être totalement représentatif de la population virale qui se réplique activement et qui est mieux représentée dans le plasma. Les tests moléculaires permettent d'éviter ces problèmes car on analyse alors directement les virus plasmatiques.

Méthodes biologiques de détermination de la pharmacosensibilité

La méthode classique de détermination de la sensibilité aux antiviraux consiste à isoler le virus et à tester sa sensibilité en culture, avec les antirétroviraux étudiés, présents à différentes concentrations. On exprime habituellement les résultats en donnant la concentration de médicament nécessaire pour inhiber de 50 % ou de 90 % la réplication du virus (concentrations inhibitrices à 50 % et 90 % : CI_{50} et CI_{90}). Il existe de nombreux protocoles «standardisés» pour la mesure biologique de la sensibilité aux antiviraux tels que le protocole ACTG; ils demandent toutefois beaucoup de manipulations et ne doivent donc pas être considérés comme des tests prêts à l'emploi. La méthode est donc longue et minutieuse et il faut en général au moins un mois pour obtenir les résultats, même si le temps de manipulation réel est bien inférieur. La méthode exige également l'isolement du virus, ce qui n'est pas toujours possible, et un laboratoire parfaitement équipé pour travailler avec un VIH infectieux, c'est-à-dire atteignant le niveau 3 de sécurité biologique, limitant ainsi les possibilités d'utilisation à grande échelle.

Méthodes moléculaires de détermination de la pharmacosensibilité

Un certain nombre de méthodes moléculaires pour la détermination de la pharmacosensibilité ont été publiées; elles peuvent être grossièrement divisées en deux catégories : celles qui reposent sur la mise en évidence de mutations ponctuelles, et celles qui font appel au séquençage.

Mise en évidence de mutations ponctuelles : Les méthodes couramment utilisées pour déceler les mutations ponctuelles connues pour être associées à une pharmacorésistance sont notamment la PCR avec une amorce spécifique et un mini-séquençage. Un test de mise en évidence des mutations ponctuelles basé sur une sonde en ligne (LiPA HIV-1 RT, Innogenetics Murex) vient d'être commercialisé. Le gros avantage de ces méthodes est qu'elles permettent d'analyser la population virale en cours de réplication (les virus plasmatiques) et qu'elles sont relativement faciles à réaliser. Le matériel nécessaire se limite en général à un thermocycleur pour la PCR (coût approximatif, USD 10 000). L'inconvénient est qu'elles ne peuvent servir à déceler que des mutations définies au préalable.

Séquençage de l'ADN : Un certain nombre de méthodes de séquençage permettent de déceler les mutations qui confèrent une pharmacorésistance. Les automates tels que ceux fournis par Applied Biosystems ou Pharmacia-UpJohn sont souvent utilisés. Il est possible d'utiliser des «puces géniques». L'intérêt du séquençage par rapport à la mise en évidence des mutations ponctuelles est qu'il permet d'identifier non seulement des mutations définies à l'avance, mais également des nouvelles mutations, mais c'est une méthode qui demande un travail considérable et nécessite du matériel coûteux.

Recombinaison virale

La méthode qui utilise la recombinaison virale est un troisième type de méthode, associant les procédés biologiques et moléculaires. Les fragments de gène intéressants sont amplifiés à partir du plasma par la PCR, et cotransfectés dans des cellules permissives au moyen d'un plasmide de VIH dans lequel les zones correspondantes du gène étudié ont été éliminées. Le virus infectieux reconstitué par recombinaison homologue est récolté et testé au moyen d'une méthode biologique. La méthode est séduisante car les séquences de la transcriptase inverse et de la protéase obtenues à partir du plasma peuvent être testées biologiquement sur une structure virale neutre. Il faut cependant pouvoir obtenir les virus recombinants et les tester dans un laboratoire adapté, de sécurité biologique niveau 3.

Options en fonction des situations

Comme on l'a indiqué plus haut, il existe plusieurs méthodes pour déterminer la pharmacosensibilité du VIH. Il est impossible actuellement de recommander leur utilisation en routine à grande échelle, l'interprétation étant difficile et les conséquences cliniques de la résistance mal connues. Toutefois, ces techniques d'évaluation de la pharmacosensibilité sont des outils extrêmement importants, tant au plan clinique que pour les laboratoires impliqués activement dans la recherche sur les traitements antirétroviraux. Même dans cette situation, le choix individuel du protocole thérapeutique antirétroviral devient une décision pragmatique, qui doit tenir compte de la mesure de la charge virale plasmatique, des traitements précédemment administrés, des effets secondaires et de l'observance. Par conséquent, contrairement à la mesure de la charge virale, les tests de pharmacosensibilité ne sont pas préconisés dans les recommandations mises à jour concernant le traitement antirétroviral de la Société internationale du SIDA (section des Etats-Unis d'Amérique).

RÉSUMÉ

Le rôle du laboratoire dans l'aide à la décision thérapeutique peut se situer à différents niveaux suivant les conditions locales : situation épidémiologique, ressources disponibles, installations existantes, ainsi qu'effectif et niveau de formation du personnel. L'organisation de services de laboratoire pour garantir la sécurité et l'efficacité des thérapeutiques antirétrovirales impose une certaine centralisation. Si un grand nombre de méthodes sont relativement faciles à réaliser et peu coûteuses, d'autres sont extrêmement spécialisées et exigent des investissements en matériel importants et du personnel bien formé. Un pays ayant une petite population préférera peut-être avoir un seul centre spécialisé dans l'aide à la décision thérapeutique antirétrovirale. Dans un pays plus grand, des centres régionaux seront peut-être nécessaires, éventuellement complétés par un centre de référence national. Dans le cas où ces services n'existeraient pas déjà, il est recommandé de mettre sur pied un système fiable dans un centre unique avant de décentraliser. Les pays de petite taille et/ou manquant de ressources pourront envisager une collaboration internationale pour pouvoir répondre aux besoins en services de laboratoire. Les méthodes de dosage du VIH les plus performantes sont hautement spécialisées et lourdement coûteuses; il importe cependant de ne pas oublier qu'une bonne partie de l'aide à la décision et du suivi des traitements antirétroviraux peut se faire au moyen de méthodes simples et bien connues qui n'exigent qu'un appareillage moyennement sophistiqué.

Il est indispensable de pouvoir correctement diagnostiquer une infection à VIH, surveiller le nombre de CD4 chez le patient, surveiller la tolérance aux antirétroviraux, identifier et diagnostiquer des infections opportunistes, surveiller la charge virale et examiner la résistance du VIH.

Quand les ressources sont limitées, il est recommandé de faire le diagnostic de l'infection à VIH et la numération des lymphocytes T-CD4⁺ au moyen de méthodes de substitution, moins coûteuses en matériel et en réactifs. La réalisation de ces techniques est généralement plus simple et l'analyse moins compliquée. La plupart des effets indésirables des antirétroviraux peuvent être surveillés par un examen clinique attentif et divers examens biologiques : numération-formule sanguine, bilirubinémie, dosage des enzymes hépatiques, amyliémie, uricémie et glycémie (la recherche d'une glycosurie par bandelettes urinaires est en général suffisante). De même, un clinicien expérimenté et bien formé peut assurer convenablement la surveillance des infections opportunistes s'il peut faire des radiographies thoraciques et utiliser un microscope optique. Il faut prévoir les réactifs nécessaires (relativement bon marché) pour la coloration des prélèvements destinés au diagnostic microbiologique : *Pneumocystis carinii*, bacille tuberculeux et parasites intestinaux. La surveillance de la charge virale plasmatique joue un rôle important dans les stratégies thérapeutiques par les antirétroviraux. Dans certains pays en développement on se servira toutefois du chiffre de CD4 pour surveiller l'évolution de la maladie et la réponse aux médicaments. La charge virale

renseigne sur l'observance du traitement et l'apparition d'une résistance. Les méthodes actuelles sont coûteuses et complexes, mais leur prix n'est pas déraisonnable par rapport au coût du traitement. On pourrait bientôt disposer d'autres méthodes plus simples et moins onéreuses. Par exemple, la numération des CD4 par une méthode de substitution pourrait apporter des informations utiles, sans toutefois remplacer entièrement la mesure de la charge virale. L'achat d'appareils donnant une analyse détaillée des profils de résistance ne doit pas être une priorité quand les ressources sont limitées.

Quand les ressources sont plus importantes, on pourra mettre en œuvre des techniques diagnostiques plus détaillées. Par exemple, le matériel d'endoscopie pour les infections digestives, de bronchoscopie pour *Pneumocystis carinii*, de culture bactériologique pour le bacille tuberculeux, la tomographie informatisée pour la toxoplasmose cérébrale, la PCR sur le liquide céphalorachidien (LCR) pour la leucoencéphalopathie progressive multifocale et l'immunofluorescence pour les infections à virus de l'herpès permettraient d'augmenter la spécificité du diagnostic et donc d'améliorer l'efficacité et la rentabilité du traitement de ces complications de l'infection à VIH. La cytométrie en flux, plus puissante et plus souple que les autres méthodes d'analyse des CD4/CD8, serait utile à la détermination des groupes de lymphocytes T. Les méthodes de remplacement peuvent être utilisées par des unités plus petites, centres régionaux par exemple, alors qu'un centre de référence national peut disposer de la cytométrie en flux. Il faut donc que les différentes méthodes aient été évaluées et standardisées l'une par rapport à l'autre. La surveillance de la charge virale doit être intégrée dans les prestations systématiques. Quant à la méthode de mesure de la charge virale, elle est davantage affaire de matériel et d'expérience disponibles localement ainsi que de préférence, plutôt que de différence de qualité. On notera toutefois que les tests de première génération fabriqués par Organon et Roche donnent parfois des valeurs trop faibles avec les prélèvements de sous-type A et E. On pourra envisager la mise en place d'une méthode fine d'analyse de la résistance aux antirétroviraux si l'on ne fait pas appel à la collaboration internationale.

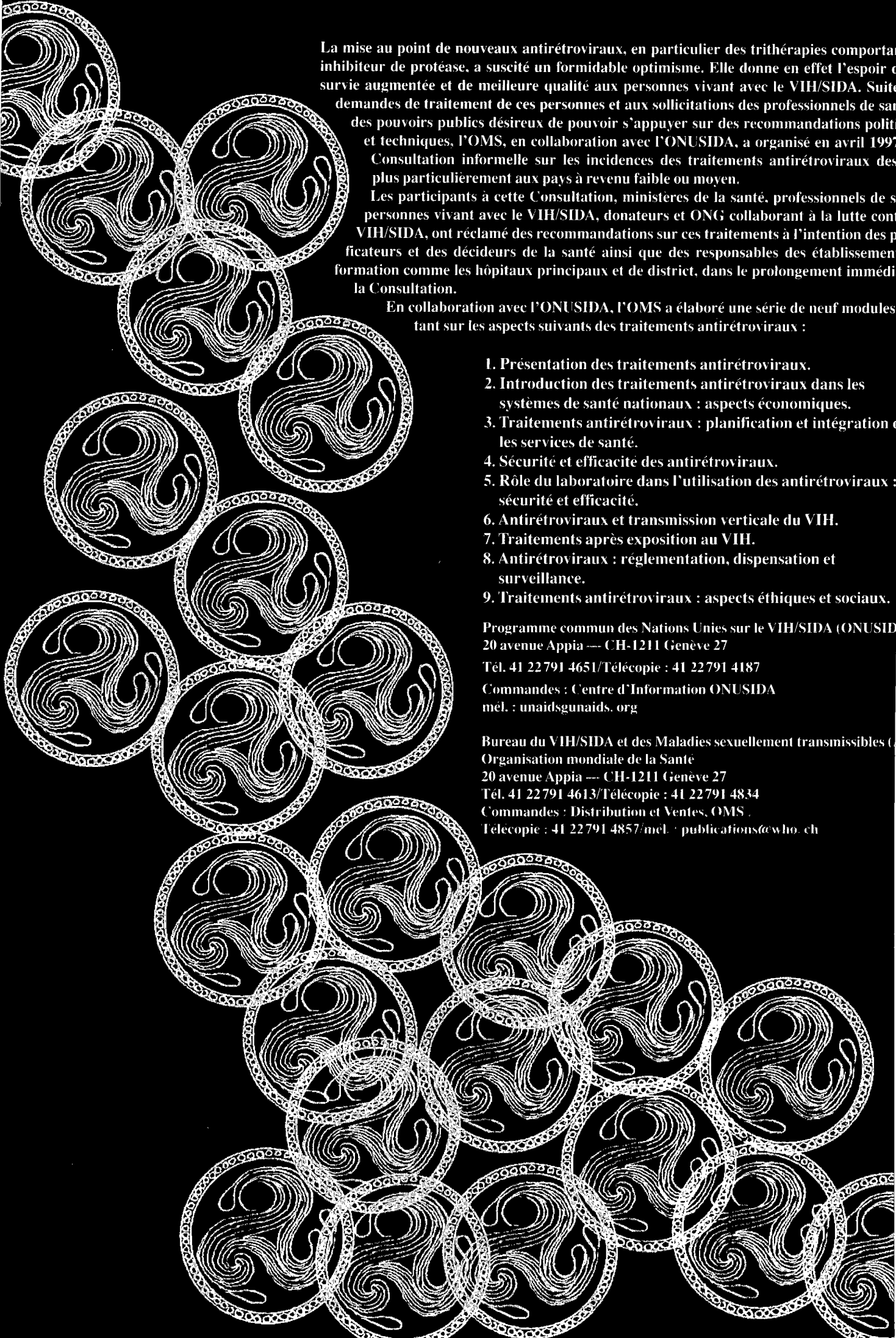
BIBLIOGRAPHIE

1. Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA)/OMS. Recommandations concernant le choix et l'utilisation des tests de mise en évidence des anticorps anti-VIH – Version révisée. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1997, 72:81-87.
2. Andersson S, da Silva Z, Norrgren H, Dias F, Biberfeld G. Field evaluation of alternative testing strategies for diagnosis and differentiation of HIV-1 and HIV-2 infections in an HIV-1 and HIV-2 prevalent area. *AIDS*, 1997, 11:1815-22.
3. Lyamuya E, Bredberg-Råden U, Massawe A et al. Performance of a modified HIV-1 p24 antigen assay for early diagnosis of HIV-1 infection in infants and prediction of mother-to-infant transmission of HIV-1 in Dar es Salaam, Tanzania. *J Acquir Immune Defic Syndr and Human Retrovir*, 1996, 12:421-426.
4. Sninsky J, Kwok S. The application of quantitative polymerase chain reaction to therapeutic monitoring. *AIDS*, 1993, 7(suppl 2):S29-34.
5. De Vita Jr V, Hellman S, Rosenberg S. *AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention*, 4^e éd. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphie, Etats-Unis d'Amérique, 1997.
6. van Praag E, Fernyak S, Martin Katz A. Les incidences des traitements antirétroviraux. Consultation Informelle, avril 1997. Organisation mondiale de la Santé, avec la collaboration de l'ONUSIDA, Genève. WHO/ASD/97.2.
7. Centers for Disease Control and Prevention. 1997 Revised guidelines for performing CD4⁺ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR*, 1997, 46(No.RR-2):1-30.
8. Nicholson JA, Velleca WM, Jubert S, Green T, Bryan L. Evaluation of alternative CD4 technologies for the enumeration of CD4 lymphocytes. *J Immunol Methods*, 1994, 177:43-54.
9. Lyamuya EF, Kagoma C, Mbeni E, Urassa W, Pallangyo K, Mhalu FS, Biberfeld G. Evaluation of the FACSCount, TRAx™ CD4 and the Dynabeads methods for CD4⁺ T lymphocyte determinations. *J Immunol Methods*, 1996, 195:103-112.
10. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, Saag MS, Shaw GM. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 1995, 373:117-22.
11. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 1995, 373:123-6.
12. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 1996, 271:1582-6.
13. Carpenter CCJ, Fischl MA, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Katzenstein DA, Montaner JSG, Richman DD, Saag MS, Schooley RT, Thompson MA, Vella S, Yeni PG, Volberding PA. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. Updated recommendations of the International AIDS Society – USA panel. *JAMA*, 1997, 277:1962-9.

14. Boni J, Opravil M, Tomasik Z, Rothen M, Bisset L, Grob PJ, Luthy R, Schupbach J. Simple monitoring of antiretroviral therapy with a signal-amplification boosted HIV-1 p24 antigen assay with heat-denatured plasma. *AIDS*, 1997, 11:F47-52.
15. Alaeus A, Lidman K, Sönnnerborg A, Albert J. Subtype-specific problems with quantification of plasma HIV-1 RNA. *AIDS*, 1997, 11:859-65.
16. Richman DD, Havlir D, Corbeil J, Looney D, Ignacio C, Spector SA, Sullivan J, Cheeseman S, Barringer K, Pauletti D. Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus type 1 selected during therapy. *J Virol*, 1994, 68:1660-6.
17. Schuurman R, Nijhuis M, van Leeuwen R, Schipper P, de Jong D, Collis P, Danner SA, Mulder J, Loveday C, Christopherson C. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J Infect Dis*, 1995, 171:1411-9.
18. Kaye S, Loveday C, Tedder RS. A microtitre format point mutation assay: application to the detection of drug resistance in human immunodeficiency virus type 1 infected patients treated with zidovudine. *J Med Virol*, 1992, 37:241-6.
19. Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, Louwagie J, Scarcez T, Verhofstede C, Rimland D, Schinazi RF, Rossau R. Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41:284-91.
20. Boucher CA, Keulen W, van Bommel T, Nijhuis M, de Jong D, de Jong MD, Schipper P, Back NK. Human immunodeficiency virus type 1 drug susceptibility determination by using recombinant viruses generated from patient sera tested in a cell-killing assay. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40:2404-9.







La mise au point de nouveaux antirétroviraux, en particulier des trithérapies comportant un inhibiteur de protéase, a suscité un formidable optimisme. Elle donne en effet l'espoir d'une survie augmentée et de meilleure qualité aux personnes vivant avec le VIH/SIDA. Suite aux demandes de traitement de ces personnes et aux sollicitations des professionnels de santé et des pouvoirs publics désireux de pouvoir s'appuyer sur des recommandations politiques et techniques, l'OMS, en collaboration avec l'ONUSIDA, a organisé en avril 1997 une Consultation informelle sur les incidences des traitements antirétroviraux destinés plus particulièrement aux pays à revenu faible ou moyen.

Les participants à cette Consultation, ministères de la santé, professionnels de santé, personnes vivant avec le VIH/SIDA, donateurs et ONG collaborant à la lutte contre le VIH/SIDA, ont réclamé des recommandations sur ces traitements à l'intention des planificateurs et des décideurs de la santé ainsi que des responsables des établissements de formation comme les hôpitaux principaux et de district, dans le prolongement immédiat de la Consultation.

En collaboration avec l'ONUSIDA, l'OMS a élaboré une série de neuf modules portant sur les aspects suivants des traitements antirétroviraux :

1. Présentation des traitements antirétroviraux.
2. Introduction des traitements antirétroviraux dans les systèmes de santé nationaux : aspects économiques.
3. Traitements antirétroviraux : planification et intégration dans les services de santé.
4. Sécurité et efficacité des antirétroviraux.
5. Rôle du laboratoire dans l'utilisation des antirétroviraux : sécurité et efficacité.
6. Antirétroviraux et transmission verticale du VIH.
7. Traitements après exposition au VIH.
8. Antirétroviraux : réglementation, dispensation et surveillance.
9. Traitements antirétroviraux : aspects éthiques et sociaux.

Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA)
20 avenue Appia — CH-1211 Genève 27

Tél. 41 22 791 4651/Télécopie : 41 22 791 4187

Commandes : Centre d'Information ONUSIDA
mél. : unaids@unaids.org

Bureau du VIH/SIDA et des Maladies sexuellement transmissibles (MST)
Organisation mondiale de la Santé

20 avenue Appia — CH-1211 Genève 27

Tél. 41 22 791 4613/Télécopie : 41 22 791 4834

Commandes : Distribution et Ventes, OMS

Télécopie : 41 22 791 4857/mél. : publications@who.ch