



HAL
open science

Dépistage de l'infection par le virus de l'hépatite C : adaptation et évaluation d'un test sérologique combiné sur prélèvement de sang capillaire et prélèvement oral

Cécile Bourdon

► **To cite this version:**

Cécile Bourdon. Dépistage de l'infection par le virus de l'hépatite C : adaptation et évaluation d'un test sérologique combiné sur prélèvement de sang capillaire et prélèvement oral. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00705973

HAL Id: dumas-00705973

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00705973>

Submitted on 8 Jun 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2011

N°

**Dépistage de l'infection par le virus de l'hépatite C : adaptation
et évaluation d'un test sérologique combiné sur prélèvement de
sang capillaire et prélèvement oral**

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Travail effectué dans le Laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble
(Chef de service : Professeur P.Morand)
Sous la direction de Madame le Docteur S. Larrat

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Cécile BOURDON

Née le 03 décembre 1984 à Lille (59)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE GRENOBLE

Le 18 Novembre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury : Monsieur le Professeur Patrice Faure

Membres :

Monsieur le Professeur Vincent Leroy

Madame le Docteur Sylvie Larrat

Monsieur le Professeur Patrice Morand

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Doyen de la Faculté : M. Christophe **RIBUOT**

Vice - doyen et Directeur des Etudes : Mme Delphine **ALDEBERT**

Année 2010-2011

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n=18)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC IMAG)
BOUMENDEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC, IMAG, PU PH)
CORNET	Muriel	Parasitologie-Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU, PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2, PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH)
PEYRIN	Eric	Chimie analytique (D.P.M)
SEVE	Michel	Biochimie-Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne –Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M)

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché - CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier - CHU)

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n=34)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie clinique (ThEMAS TIMC-IMAG, MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire, Biochimie (L.C.I.B-LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et Génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I, MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC, IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Médicale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
PINEL	Claudine	Parasitologie-Mycologie Médicale (GIN, MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Organique (D.P.M)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M)

ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

COLLE	Pierre Emmanuel	Maitre de conférence
FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	Professeur Certifié

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

BUSSER	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
MONNERET	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

ATER (n=5)

DEFENDI	Frédérica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
GRATIA	Séverine	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (LBFA)
REGENT	Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)
ROSSI	Caroline	ATER	Anglais Master ISM (JR)
RUFFIN	Emilie	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC)
SAPIN	Emilie	ATER	Physiologie-Pharmacologie

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)

BOUCHET	Audrey (01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN, ESRF)
DUCAROUGE	Benjamin (01-10-2008 au 30-09-2011)	Laboratoire HP2 (JR)
FAVIER	Mathieu (01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle (01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
HAUDECOEUR	Romain (01-10-2009 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
LESART	Anne Cécile (01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
POULAIN	Laureline (01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »

IBS : Institut de Biologie Structurale

JR : Jean Roget

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

PAST : Professeur Associé à Temps Partiel

PRAG : Professeur Agrégé

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition

UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interaction

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Patrice Faure, président du jury

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail en tant que président du jury. Je tiens à vous témoigner tous mes remerciements, ainsi que mon profond respect.

A Madame le Docteur Sylvie Larrat, ma directrice de thèse

Merci de m'avoir fait confiance pour porter ce projet ambitieux. Ta grande disponibilité, ton dynamisme, ta rapidité dans les corrections, ainsi que tes conseils m'ont permis de mener à bien ce travail.

A Monsieur le Professeur Patrice Morand,

Merci de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Virologie et d'avoir accepté de participer à ce jury pour juger ce travail. Je vous adresse mon respect et ma plus grande reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Vincent Leroy,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail en temps que clinicien et à travers votre regard de spécialiste. Merci pour le temps que vous m'accordez en faisant partie de ce jury.

A Cécile Garnaud,

Je tiens à te remercier tout particulièrement pour le temps que tu as consacré à ce projet. L'entière confiance que j'avais en toi ainsi que ton investissement m'ont permis de terminer sereinement ce travail.

A Monsieur Jean-Louis Quesada,

Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à la réalisation des statistiques de cette étude et pour votre aide dans la rédaction de notre article. Merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.

Merci à Sophie pour avoir choisi ce projet et pour ton investissement.

Je te remercie sincèrement Monique pour tout le temps que tu m'as accordé et pour tes précieux conseils.

Merci à Nathalie et Michel qui m'ont accueilli en Hépatogastro avec toute la gentillesse et l'humour qui les caractérisent. J'ai beaucoup appris à leurs côtés.

Merci aux infirmières du CISIH pour leur investissement dans ce projet et leur gentillesse.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de Virologie, pour votre disponibilité, votre gentillesse, vos compétences aussi bien professionnelles que culinaires. Ce fut un super semestre pour moi !

Merci au laboratoire de l'hôpital de Voiron pour m'avoir accueilli lors de mon dernier semestre, et pour m'avoir aménagé avec compréhension et gentillesse le temps nécessaire à la rédaction de ma thèse.

A mes parents, un immense merci pour votre soutien tout au long de ces années et pour tout votre amour. Merci maman pour ta disponibilité et pour le temps passé à relire ma thèse. Papa, merci pour tes compiles qui ont rythmées toutes ces années jusqu'à l'écriture de ma thèse.

A ma sœur, Lili, et à Mathieu merci pour vos conseils avisés et votre soutien sans faille.

A mon frère, Toto, merci pour ton soutien et pour le champagne !

A mon Loup, merci pour ta patience, ton écoute, ton amour. Tu m'as épaulée tout au long de ce travail et soutenu au quotidien.

A mes amies de fac, Anouk, Claire, Cécile, Hélène, Amélie et Mathilde merci pour votre amitié si précieuse.

A mes co-internes : Laeti et Caro, pour toutes nos courses/papotages si précieux, Mag', Lydvine, Bérangère, Julie, Clem', David et les autres pour tous les supers moments passés ensemble.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	5
Table des Matières	7
Liste des Figures	10
Liste des Tableaux	11
Liste des Abréviations	12
Introduction	14
Partie 1 : Synthèse bibliographique	16
A L'hépatite C	17
1 Le virus de l'hépatite C	17
1.1 Historique	17
1.2 Structure	17
2 Physiopathologie	18
2.1 L'hépatite C aiguë	18
2.2 L'hépatite C chronique	19
3 Prise en charge thérapeutique des infections par le VHC	20
B Épidémiologie de l'hépatite C	23
1 Sa prévalence	23
1.1 Une maladie endémique dans le monde	23
1.2 En France	24
1.3 Chez les usagers de drogues	25
2 Les différents génotypes	26
3 Modes de transmission	27
3.1 Les pays industrialisés	28
3.2 Les pays en voie de développement	28
4 La mortalité liée à l'hépatite C chronique	29
C Problématiques liées au dépistage de l'hépatite C	30
1 Le dépistage en France	30
1.1 Son évolution	30
1.2 Les recommandations de l'HAS	31
1.3 Le plan national hépatites 2009-2012	31
2 Diagnostic virologique d'une hépatite C	31
3 Évolution des tests sérologiques	33
3.1 Historique	33
3.2 Le test de 4 ^{ème} génération commercialisé en France : Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra (BioRad)	34
3.3 Les prélèvements alternatifs	35
3.3.1 Intérêt des prélèvements alternatifs	35
3.3.2 Études déjà réalisées	36
3.4 Les tests rapides	42
3.4.1 Intérêt	42
3.4.2 L'OraQuick® HCV	43

Partie 2 : Données expérimentales.....	47
Objectifs de l'étude.....	48
Matériels et Méthodes.....	49
A Mise au point des techniques utilisées dans l'étude DIAGVHC	49
1 Technique de référence.....	49
2 Le prélèvement de sang capillaire	50
2.1 Réalisation du prélèvement.....	50
2.2 Le test combiné sur sang capillaire	51
2.2.1 Éluion des buvards	51
2.2.2 Adaptation du test combiné au sang capillaire.....	52
2.3 La PCR VHC sur sang capillaire	53
3 Le prélèvement oral	53
3.1 Réalisation du prélèvement.....	53
3.2 Adaptation du test combiné au fluide gingival créviculaire	55
3.3 La PCR VHC sur fluide gingival créviculaire	56
B Conditions d'utilisation et caractéristiques du test combiné.....	57
1 Conditions de conservation des prélèvements.....	57
1.1 Conservation du fluide gingival créviculaire	57
1.2 Conservation des buvards	57
1.2.1 Le test combiné sur buvard	57
1.2.2 La PCR VHC sur buvard.....	58
2 Validation des méthodes.....	58
2.1 Répétabilité.....	58
2.1.1 Répétabilité du test combiné	58
2.1.2 Répétabilité de la PCR VHC sur sang capillaire.....	59
2.2 Reproductibilité.....	59
2.2.1 Reproductibilité du test combiné.....	59
2.2.2 Reproductibilité de la PCR VHC sur sang capillaire	60
C L'étude DIAGVHC	61
1 Les patients inclus.....	61
2 Les prélèvements réalisés	62
2.1 Les prélèvements de sang capillaire.....	62
2.2 Les prélèvements oraux.....	63
3 Les techniques utilisées	63
3.1 Le test combiné : Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra	63
3.1.1 Le test combiné sur sérum.....	63
3.1.2 Le test combiné sur sang capillaire	63
3.1.3 Le test combiné sur fluide gingival créviculaire	64
3.2 L'OraQuick® HCV.....	64
3.3 La quantification de l'ARN du VHC	65
3.3.1 La quantification de l'ARN du VHC sur plasma	65
3.3.2 La quantification de l'ARN du VHC sur sang capillaire	65
Présentation des Résultats.....	67
A Mise au point des techniques utilisées dans l'étude DIAGVHC	67
1 Le prélèvement capillaire	67
1.1 Réalisation du prélèvement.....	67
1.2 Le test combiné sur sang capillaire	67

1.2.1	Élution des buvards	67
1.2.2	Adaptation du test combiné au sang capillaire.....	68
1.3	La PCR VHC sur sang capillaire	70
2	Le prélèvement oral	71
2.1	Réalisation du prélèvement	71
2.2	Adaptation du test combiné au fluide gingival créviculaire	72
2.3	La PCR VHC sur fluide gingival créviculaire	75
B	Conditions d'utilisation et caractéristiques du test combiné.....	76
1	Conditions de conservation des prélèvements.....	76
1.1	Conservation du fluide gingival créviculaire	76
1.2	Conservation des buvards	77
1.2.1	Le test combiné sur buvard	77
1.2.2	La PCR VHC sur buvard.....	78
2	Validation des méthodes.....	79
2.1	Répétabilité.....	79
2.1.1	Répétabilité du test combiné	79
2.1.2	Répétabilité de la PCR VHC sur sang capillaire.....	80
2.2	Reproductibilité.....	80
2.2.1	Reproductibilité du test combiné.....	80
2.2.2	Reproductibilité de la PCR VHC sur sang capillaire	80
C	L'étude DIAG VHC	81
1	Performance du dépistage de l'hépatite C sur sang capillaire et fluide oral ..	81
1.1	L'OraQuick® HCV.....	82
1.2	Le test Monolisa HCV Ag-Ab Ultra® (Bio-Rad).....	82
2	Détection de l'ARN viral dans le sang capillaire	85
3	Facteurs influençant le dépistage de l'hépatite C	85
	Discussion.....	92
	Conclusion.....	98
	Bibliographie.....	100
	Serment de Galien	149

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation du génome du VHC et maturation de la polyprotéine du VHC	18
Figure 2 : Estimation de la prévalence du VHC dans le monde.....	24
Figure 3 : Séroprévalence du VIH et du VHC par classe d'âge dans la population toxicomane	26
Figure 4 : Test rapide d'orientation diagnostic OraQuick® HCV	44
Figure 5 : Principe du test OraQuick® HCV	44
Figure 6 : Principe du test combiné	50
Figure 7 : Le dispositif OraSure®	54
Figure 8 : Schéma des prélèvements effectués par patient.....	66
Figure 9 : Courbe ROC obtenue par le passage des 201 sangs capillaires avec le test combiné	70
Figure 10 : Courbe ROC obtenue avec les résultats du passage des 201 FGC avec le test combiné	75
Figure 11 : Évolution des densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC au cours du stockage (J0, J6, et J12) à TA, +4°C et -20°C.....	76
Figure 12 : Évolution des densités optiques obtenues avec le test combiné sur sang capillaire au cours du stockage (J0, J3, J6, J9, et J12) à TA, + 4°C et - 20°C.	78
Figure 13 : Évolution de la charge virale sur sang capillaire au cours du stockage (J0, J5, J9, et J13) à TA, +4°C et -80°C.	79
Figure 14 : Densités optiques obtenues avec le test combiné sur sang capillaire chez les patients Ac anti-VHC+ et Ac anti-VHC-.....	83
Figure 15 : Densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC chez les patients Ac anti-VHC+ et Ac anti-VHC-.....	84
Figure 16 : Densités optiques observées avec le test combiné sur sang capillaire en fonction de la sérologie VIH	86
Figure 17 : Densités optiques observées avec le test combiné sur FGC en fonction de la sérologie VIH	86
Figure 18 : Densités optiques observées avec le test combiné sur sang capillaire chez les sujets Ac anti-VHC+ en fonction de la sérologie VIH.....	87
Figure 19 : Densités optiques observées avec le test combiné sur FGC chez les sujets Ac anti-VHC+ en fonction de la sérologie VIH.....	87
Figure 20 : Densités optiques observées avec le test combiné sur sang capillaire en fonction de la sérologie VHB	88
Figure 21 : Densités optiques observées avec le test combiné sur FGC en fonction de la sérologie VHB	89
Figure 22 : Densités optiques observées avec le test combiné sur sang capillaire en fonction de l'ARN viral.....	90
Figure 23 : Densités optiques observées avec le test combiné sur FGC en fonction de l'ARN viral.....	90
Figure 24 : Densités optiques observées avec le test combiné sur sang capillaire chez les sujets anticorps anti-VHC+ en fonction de l'ARN viral	91
Figure 25 : Densités optiques observées avec le test combiné sur FGC chez les sujets anticorps anti-VHC+ en fonction de l'ARN viral	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Résultats des études réalisées sur l'utilisation du prélèvement oral pour le dépistage des anticorps anti-VHC	38
Tableau II : Performances de l'OraQuick® HCV sur les différentes matrices	45
Tableau III : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné après élution d'un disque de sang capillaire (Ac anti-VHC positifs) dans 100 µl de tampon versus deux disques dans 130 µl de tampon.....	68
Tableau IV : Résultats en densités optiques du test combiné sur sérum et ses dilutions en fonction de la durée d'incubation avec le conjugué 1 (1h30 ; 3h ; 15h).....	69
Tableau V : PCR VHC sur sang capillaire et sur plasma de 4 patients avec ARN VHC positif	70
Tableau VI : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC pour 0,4 et 0,8 ml de liquide de conservation	71
Tableau VII : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné sur sérum en fonction de la prise d'essai (100 µl versus 50 µl)	72
Tableau VIII : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC en fonction de la prise d'essai (100 µl versus 50 µl)	72
Tableau IX : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC en fonction de la prise d'essai (150 µl et 200 µl)	73
Tableau X : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC en fonction de la durée de l'incubation du FGC avec le conjugué 1 (1h30 versus 15h).....	74
Tableau XI: Résultats du passage des FGC des témoins VHC négatifs (= patients négatifs en Ac anti-VHC sur sérum).....	74
Tableau XII : Performances de l'OraQuick® et du test combiné sur sang capillaire et fluide oral	81

LISTE DES ABREVIATIONS

AFSSAPS : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

ARN : Acide ribonucléique

AUC : Aire sous la courbe

CDAG : Centre de dépistage anonyme et gratuit

CHC : Carcinome hépato-cellulaire

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CO : Cut-off

CV : Charge virale

DO : Densité optique

FDA : Food and drug administration

FGC : Fluide gingival créviculaire

GR : Globule rouge

IC : Intervalle de confiance

IV : Intra-veineuse

INF : Interféron

INVS : Institut de veille sanitaire

PCR : Polymérase chain reaction

RT-PCR : PCR en temps réel

RVS : Réponse virologique soutenue

Se : Sensibilité

Sp : Specificité

TA : Température ambiante

TROD : Test rapide d'orientation diagnostic

UD : Usagers de drogues

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

INTRODUCTION

En 2011, on estime que 130 à 170 millions d'individus sont porteurs de l'hépatite C dans le monde [1]. Ces sujets constituent un réservoir de dissémination et sont à risque de développer une cirrhose et un carcinome hépato-cellulaire (CHC). Dans les pays industrialisés, le mode de contamination majeur est l'usage de drogues par voie intraveineuse (IV). En effet, en France, où la prévalence est estimée à 0,84%, 60% de la population toxicomane serait touchée par le VHC [2] [3]. Les usagers de drogues (UD) constituent donc aujourd'hui le principal réservoir du virus, mais malheureusement ils méconnaissent souvent leur statut puisque 27% se déclarent séronégatifs à tort [3]. Ces dernières années, des progrès thérapeutiques majeurs ont eu lieu, permettant d'obtenir un taux de guérison de l'hépatite C atteignant plus de 70%. L'absence de connaissances sur cette infection est ainsi associée à une perte de chance pour le patient. Il est donc important de promouvoir le dépistage de l'hépatite C chez les usagers de drogues afin de leur permettre d'accéder aux traitements et de réduire le risque de contaminations secondaires. Cette population, chez qui un dépistage répété devrait être proposé, est en général peu intégrée dans les circuits de santé. De plus, en raison d'un accès veineux parfois rendu difficile, la ponction veineuse présente souvent un frein à l'acceptabilité du dépistage.

Le plan national hépatites 2009-2012 [4] qui rappelle la nécessité de créer les conditions d'un recours accru au dépistage des personnes à risque, incite au développement de méthodes alternatives qui pourraient être réalisées lors de consultations délocalisées. La réalisation de sérologies VHC sur des prélèvements de sang capillaire déposés sur buvard ou des prélèvements oraux pourrait constituer une bonne alternative à la ponction veineuse. En effet, de nombreuses études portant sur des tests de 3^{ème} génération ont déjà montré de bons résultats et une meilleure acceptabilité de ces prélèvements alternatifs.

Aucune étude n'a encore été réalisée sur les tests de 4^{ème} génération, qui permettent à la fois la détection des anticorps anti-VHC et de l'antigène de capsid. En effet, ces tests permettent un diagnostic entre 20 à 50 jours plus précoce qu'avec les tests de 3^{ème} génération [5] [6]. Ils sont également plus performants dans les populations où l'apparition des anticorps peut être retardée, comme chez les sujets infectés par le VIH ou les hémodialysés [6].

Ces tests combinés, adaptés au prélèvement de sang capillaire et au prélèvement oral pourraient permettre, à la fois un dépistage plus facile chez les patients réfractaires à la prise de sang et une meilleure détection des infections récentes dans une population exposée de manière répétée au VHC.

Dans un premier temps, nous avons cherché à adapter le test combiné, Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra (BioRad), sur prélèvement de sang capillaire déposé sur buvard et sur fluide gingival crévulaire (FGC). La détection de l'ARN viral dans ces prélèvements a également été mise au point. La robustesse de la sérologie et de la PCR en temps réel (RT-PCR), ainsi que les conditions de stockage des prélèvements, ont ensuite été étudiées.

Dans un second temps les performances du test combiné et de la PCR sur ces prélèvements alternatifs seront évaluées, en parallèle d'un test rapide d'orientation diagnostique (TROD) du VHC de 3^{ème} génération l'OraQuick® HCV. Ce test rapide, marqué CE, agréé par l'AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) et par la FDA (Food and drug administration), réalisable sur sang capillaire et fluide oral, semble permettre également un accès plus facile au dépistage.

Les résultats de ce travail financé par un contrat d'initiation ANRS, ont été présentés en communication orale aux « 69^{èmes} journées scientifiques de l'Association Française d'Etude du Foie » (28 septembre-01 octobre 2011, Paris, France) et en poster au « 62nd annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases » (4-8 novembre 2011, San Francisco, USA). Ils ont également été soumis comme article (annexe 1) au « Journal of Hepatology ».

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Après quelques brefs rappels sur le virus de l'hépatite C et la pathologie associée, nous nous intéresserons à l'épidémiologie de cette infection virale puis nous nous focaliserons sur les techniques permettant d'en faire le diagnostic ainsi que sur les politiques de dépistage mises en œuvre.

A L'hépatite C

1 Le virus de l'hépatite C

1.1 Historique

En 1975, suite à l'arrivée des tests sérologiques pour les virus des hépatites A et B, il a été mis en évidence qu'un grand nombre de sujets souffrant d'hépatites post-transfusionnelles n'avaient aucun marqueur d'hépatites A ou B, et l'existence d'un nouvel agent infectieux a alors été soupçonnée [7] [8]. Plus tard cette pathologie sera identifiée chez des sujets n'ayant pas reçu de transfusion sanguine ou de produits sanguins [9].

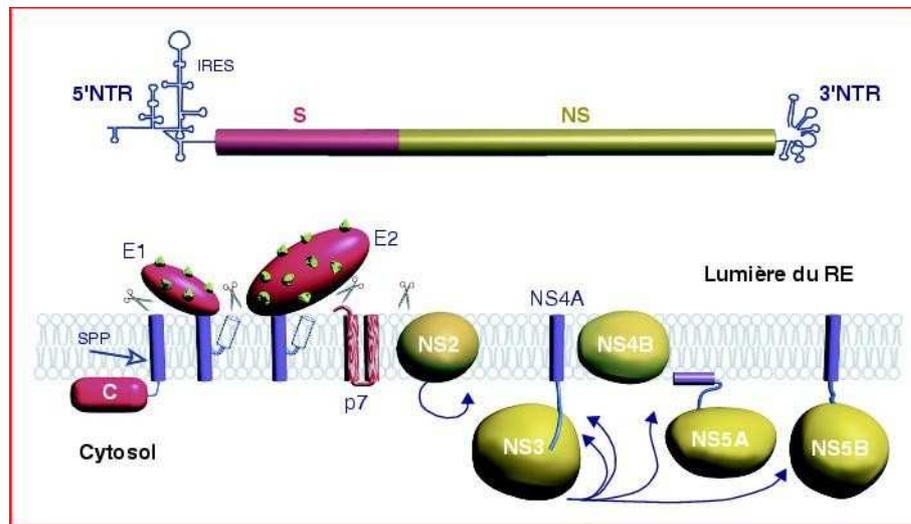
Le virus de l'hépatite C a ainsi été identifié pour la première fois en 1989 par l'équipe de Michael Houghton grâce à des techniques de biologie moléculaire [10]. Le clonage de l'intégralité de son génome a permis de le classer, par comparaison avec les autres séquences virales connues, au sein de la famille des *Flaviviridae* dans un nouveau genre, celui des *Hepacivirus*.

1.2 Structure

Le virus de l'hépatite C est un petit virus enveloppé mesurant 55 à 65 nm de diamètre. Il est constitué, de l'extérieur vers l'intérieur :

- d'une enveloppe lipidique au sein de laquelle sont ancrées deux glycoprotéines d'enveloppe ;
- d'une capsid protéique icosaédrique formée par la polymérisation de la protéine de capsid C ;
- du génome viral.

Le génome du VHC est constitué d'un ARN monobrin linéaire de polarité positive d'environ 9.6 kb. Il comprend deux régions non codantes aux extrémités 5' et 3' délimitant un cadre de lecture ouvert. La région 5' non codante comportant 341 nucléotides, possède 50% d'homologie avec les Pestivirus et constitue la partie la plus conservée du génome. Le cadre de lecture ouvert comporte 9 024 à 9 111 nucléotides et code pour une polyprotéine de 3000 à 3010 acides aminés. Celle-ci sera secondairement scindée en au moins 10 protéines virales distinctes : les protéines structurales C, E1, E2 et p7 situées dans le premier tiers du génome et les protéines non structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B dans les deux derniers tiers (Figure 1) [11] [12] [13].



(D'après Cahour, 2006 [11])

Figure 1 : Organisation du génome du VHC et maturation de la polyprotéine du VHC

Le VHC présente une importante variabilité génétique. En fonction des séquences nucléotidiques, le VHC a été subdivisé en génotypes eux-même subdivisés en sous-types. Il existe ainsi 6 génotypes et plus de 80 sous-types du VHC.

2 Physiopathologie

2.1 L'hépatite C aiguë

L'hépatite C aiguë est le plus souvent asymptomatique (50% à 90%) ou s'accompagne d'une symptomatologie modérée. La période d'incubation est variable, de l'ordre de 2 à 12 semaines et les principaux symptômes sont : la fatigue, des myalgies, des nausées ou plus

rarement un ictère. Étant donné le caractère non spécifique des symptômes, l'hépatite C est rarement diagnostiquée lors de la phase aiguë.

Dans 20% à 30% des cas seulement, l'évolution se fera spontanément vers la guérison sans séquelle, le plus souvent dans les trois mois suivant les signes cliniques [14] [15] [16].

L'hépatite C est responsable de 10% des hépatites aiguës en Europe [17]. L'incidence des hépatites C aiguës est de 1/100 000 sujets par an, mais est probablement sous-estimée en raison de son caractère asymptomatique [18].

2.2 L'hépatite C chronique

Le passage à la chronicité s'observe dans 55% à 85% des cas [19]. L'hépatite C chronique est souvent de découverte fortuite lors d'une consultation pour asthénie, une élévation des transaminases ou la mise en évidence d'anticorps anti-VHC lors d'un dépistage systématique. La progression de la maladie se fait sur plusieurs dizaines d'années et peut être accélérée en présence de co-facteurs tels que la consommation d'alcool, la co-infection VIH/VHB, l'âge de la contamination ou encore la résistance à l'insuline.

Une étude rétrospective publiée en 2007 reprenant les décès liés à l'hépatite C en France en 2001 [19] montre que certains facteurs sont fortement associés à une surmortalité chez les patients porteurs d'une hépatite C chronique. En effet, les sujets atteints d'une hépatite C chronique et consommant de façon excessive de l'alcool auraient un âge moyen de décès beaucoup plus faible, 58 ans versus 70 ans, que les sujets porteurs d'une hépatite C chronique mais ne consommant pas d'alcool avec excès. Il en va de même pour les sujets co-infectés par le VIH qui représentent 10,5% des décès associés au VHC. Ainsi d'après cette étude, le sexe masculin, un âge supérieur à 50 ans, et surtout la consommation excessive d'alcool ainsi que la co-infection VIH, seraient associés à une progression accélérée de la fibrose et une augmentation de l'incidence de la cirrhose et du carcinome hépato-cellulaire.

Les patients atteints d'hépatite C chronique développeront une cirrhose dans 10% à 40% des cas en fonction des facteurs de risque associés [20] et 4% à 5% par an développeront un carcinome hépato-cellulaire [21]. Le traitement de l'hépatite C permet de diminuer le risque de CHC chez les sujets avec une réponse virologique soutenue (RVS) mais les patients pour lesquels un CHC est diagnostiqué ont 33% de risque de décéder dans l'année [22] [21].

3 Prise en charge thérapeutique des infections par le VHC

Le but du traitement de l'hépatite C est d'éradiquer le virus afin de prévenir les complications liées à l'atteinte hépatique telles que l'inflammation, la fibrose, la cirrhose, le carcinome hépato-cellulaire, voire le décès. L'objectif premier est d'obtenir une réponse virologique soutenue, c'est-à-dire un ARN viral indétectable 24 semaines après l'arrêt du traitement. Quand le virus est éradiqué chez les patients non cirrhotiques, la progression de l'inflammation et de la fibrose est généralement stoppée. Une amélioration de l'état hépatique est souvent observée. Cependant, chez les sujets cirrhotiques le risque de survenu d'un CHC persiste [18].

Aujourd'hui, le traitement standard comprend de l'interféron α pegylé associé à de la ribavirine. La durée du traitement et son efficacité varient en fonction du génotype viral. Chez les patients infectés par les génotypes 2 et 3, 24 semaines de traitement sont nécessaires pour obtenir une RVS chez plus de 75% des patients. Une étude récente montre un taux de RVS meilleur pour le génotype 2 en comparaison au génotype 3 [23]. Le génotype 1, plus difficile à traiter, nécessite quant à lui 48 semaines de traitement et une RVS est obtenue chez environ 40% à 50% des patients seulement [24] [25]. La réponse aux traitements est influencée par de nombreux facteurs liés au patient, comme le sexe, l'indice de masse corporelle, la résistance à l'insuline, le degré de fibrose, la co-infection par le VIH ou d'autres virus hépatotropes. Des facteurs liés au virus tels que le génotype viral et la charge virale en début de traitement influencent également cette réponse. Plus récemment d'autres facteurs prédictifs apportant une aide à la décision thérapeutique ont été identifiés [26].

Un polymorphisme situé sur le chromosome 19, en amont du gène IL28B qui code pour l'INF- λ 3 a été montré comme étant fortement lié à la RVS chez les sujets porteurs du génotype 1. En effet, les sujets de génotype CC traités par interféron α pegylé et ribavirine auraient deux fois plus de chance d'obtenir une RVS que les sujets de génotype TT. La fréquence de l'allèle C est variable en fonction de l'origine du patient, ce qui pourrait expliquer la différence de fréquence de RVS observée entre les groupes de populations. Ainsi, les sujets d'origine asiatique présentent majoritairement le génotype CC (> 90%). En Europe la fréquence de l'allèle C est intermédiaire et en Afrique elle est faible (< 50%) [27]. Ce polymorphisme serait également lié à la clairance spontanée du virus, les patients de génotypes CC ayant trois fois plus de chance d'éliminer leur virus spontanément que les

autres génotypes [28]. Les effets de ce polymorphisme sur la réponse au traitement semblent toutefois être atténués pour les génotypes 2 et 3 [29].

La protéine 10 (IP-10) produite par de nombreuses cellules dont les hépatocytes, sous l'influence de l'interféron γ , serait également un facteur prédictif de RVS chez les patients VHC positifs traités par bithérapie. En effet, chez les sujets porteurs du génotype 1, la quantité d'IP-10 avant traitement serait en moyenne plus faible chez les sujets répondeurs en comparaison aux sujets non répondeurs. Un taux faible d'IP-10 (< 600 pg/mL) aurait une valeur prédictive positive de RVS de 69% [30] [31]. La combinaison des deux marqueurs que sont le génotype de l'IL28B et le taux d'IP-10 aurait une meilleure valeur prédictive de RVS que chacun des deux critères pris séparément. Dans l'étude de Darling *et al* [31], 89% des sujets avec un génotype de l'IL28B CC et un taux d'IP-10 faible obtiennent une RVS contre 79% chez ceux avec un taux élevé en IP-10. Une étude réalisée chez des patients autrichiens co-infectés VHC/VIH montre que chez les sujets associant le type CC de l'IL28B et un taux faible d'IP-10, 97% avaient une RVS contre 59% de ceux avec uniquement un taux faible en IP-10 et 25% de ceux avec uniquement le génotype CC de l'IL28B [32].

Il a également été montré une association entre un polymorphisme au niveau du gène ITPA et l'anémie hémolytique induite suite au traitement par la ribavirine. Le gène ITPA code pour une protéine (ITPase) qui hydrolyse l'inosine triphosphate (ITP). Certaines mutations de ce gène seraient responsables du déficit en ITPase et donc de l'accumulation d'ITP au niveau des globules rouges (GR) [33]. Il a été montré que deux variants du gène ITPA, entraînant ce déficit enzymatique, protégeraient contre l'anémie induite par la ribavirine et permettraient de diminuer la nécessité de réduction de la dose de ribavirine [34].

Avec les connaissances acquises ces dernières années sur le cycle viral, de nombreux antiviraux agissant directement sur le virus ont été développés. Ainsi, la protéase du virus de l'hépatite C constitue une des nouvelles cibles de ces traitements. Le Télaprévir (Incivo®, Janssen Cilag) et le Bocéprévir (Victrelis®, Merck-Schering-Plough) sont deux inhibiteurs de la protéase NS3/4A qui viennent d'obtenir leur autorisation de mise sur le marché. En raison d'un risque élevé de développer des résistances virales, ces deux molécules ne peuvent pas être utilisées en monothérapie mais doivent être associées à l'interféron et la ribavirine. Les études de phase II puis celles de phase III ont montré des résultats très prometteurs dans le traitement des hépatites C chroniques de génotype 1. Les études de phase III chez les patients

naïfs, ADVANCE [35] et ILLUMINATE [36] pour le Téléprévir et SPRINT II [37] pour le Bocéprévir, montrent des taux de RVS allant de 67% à 75%. Chez les patients en échec d'un traitement antérieur, l'étude REALIZE [38] pour le Téléprévir et RESPOND2 [39] pour le Bocéprévir, permettent d'obtenir une RVS chez 65% des sujets (versus 17%) soit 86% des rechuteurs (vs 24%), 57% des répondeurs partiels (vs 15%) et 31% des non répondeurs (vs 5%) pour la première et 66% pour la seconde avec 75% de RVS chez les patients antérieurement rechuteurs (vs 29%) et 52% chez les non répondeurs (vs 7%).

Tout comme la bithérapie classique peut entraîner une fatigue sévère, une dépression, une irritabilité, des réactions cutanées, des troubles hématologiques, ces deux molécules rajoutent leurs effets indésirables en tri-thérapie. Le Téléprévir utilisé en trithérapie est souvent associé à la survenue de manifestations cutanées. En effet, il est responsable de prurit chez 40% à 50% des patients et de rash chez 30% à 40% des patients. Le Téléprévir peut également entraîner une anémie dans environ 40% des cas, ainsi que des nausées et des diarrhées [35]. Le Bocéprévir est responsable d'anémie dans presque la moitié des cas et l'administration d'érythropoïétine sera nécessaire dans plus de 40% des cas [37]. La dysgueusie est le deuxième effet secondaire principal du Bocéprévir [39]. Ces études ont été réalisées chez des sujets porteurs du virus de génotype 1, celui étant le plus difficile à traiter, et l'activité du Téléprévir et du Bocéprévir sur les autres génotypes reste à évaluer [38].

D'autres drogues sont également en développement, telles que d'autres inhibiteurs de protéase (Danoprévir, TMC435), des inhibiteurs de polymérase (nucléosidiques ou non nucléosidiques), ainsi que des associations de ces molécules [40].

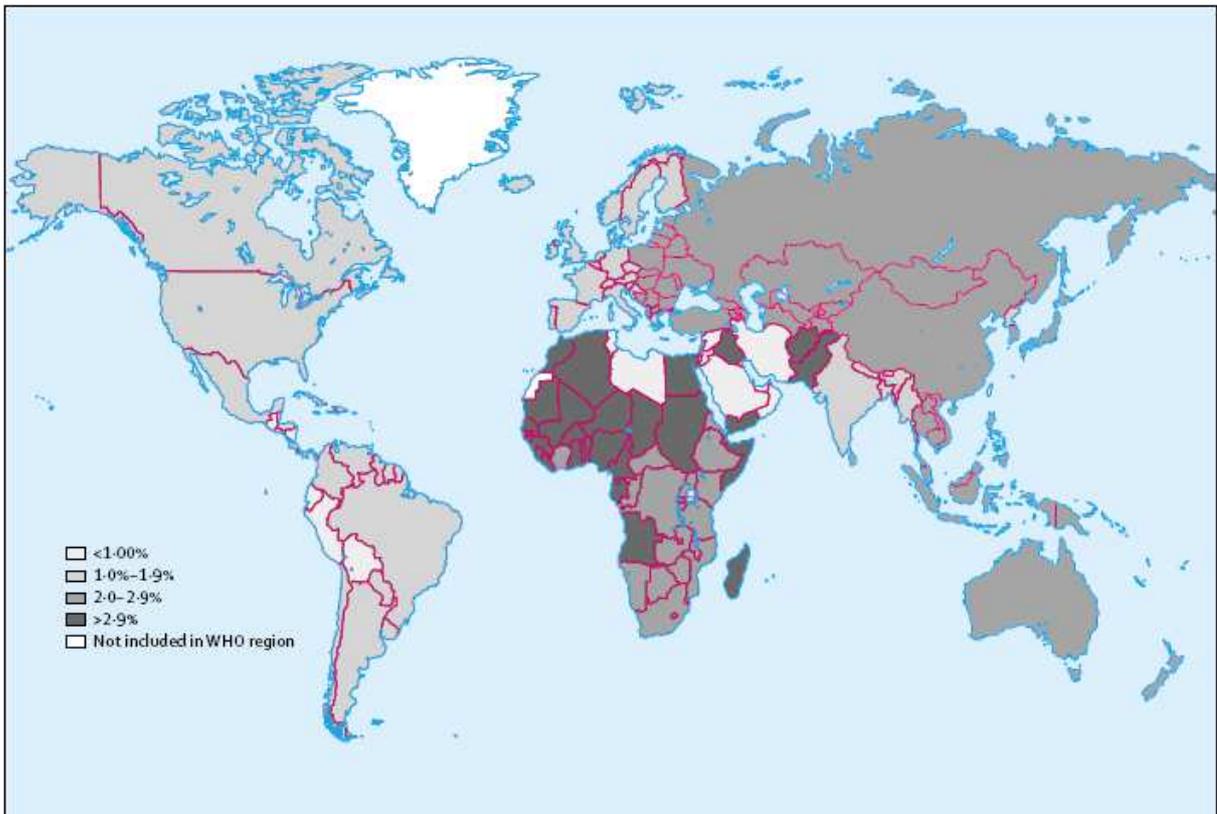
Les nombreux nouveaux traitements arrivant sur le marché permettent aujourd'hui d'obtenir un pourcentage de guérison nettement supérieur pour le génotype 1. Ces dernières avancées thérapeutiques incitent davantage au dépistage et mettent en avant la perte de chance liée à une hépatite C chronique méconnue.

B Épidémiologie de l'hépatite C

1 Sa prévalence

1.1 Une maladie endémique dans le monde

On estime qu'environ 130 à 170 millions d'individus soit 2,2% à 3% de la population mondiale, sont porteurs d'une hépatite C chronique [1]. La distribution géographique de cette infection varie beaucoup d'un pays à l'autre (Figure 2). On retrouve des pays avec une prévalence élevée essentiellement en Afrique et en Asie. L'Égypte avec ses 73 millions d'habitants est le pays le plus touché par l'hépatite C avec une prévalence des anticorps anti-VHC atteignant 15% à 20% de la population générale. Ces contaminations ont été attribuées à l'utilisation de seringues contaminées lors de la campagne de traitement de masse de la bilharziose de 1960 à 1987 [41]. Des prévalences plus faibles sont enregistrées en Amérique du Nord, en Europe de l'Ouest et du Nord, et en Australie. Ainsi, en Allemagne, la prévalence est de 0,6% [42], au Canada [43] et en France [2] de 0,8%, et en Australie de 1,1% [44]. La prévalence reste faible mais légèrement supérieure aux USA (1,6%) [45], au Japon (1,5-2,3%) [46], et en Italie (2,2%) [47].



(D'après Shepard 2005 [46])

Figure 2 : Estimation de la prévalence du VHC dans le monde

1.2 En France

En 2004, la prévalence de l'hépatite C a été estimée à partir d'un échantillon de 14 416 assurés sociaux âgés de 18 à 80 ans [2]. La prévalence des anticorps anti-VHC est de 0,84%, soit 367 055 personnes ayant été en contact avec le VHC. La prévalence est plus élevée chez les personnes bénéficiant de la CMU et elle varie selon les inter-régions de résidence et le continent de naissance. Sur ces 367 055 personnes, seules 57,4% connaissaient leur statut. L'ARN du VHC est détecté chez 65% des sujets présentant les anticorps anti-VHC, soit 0,53% de la population générale.

Les facteurs indépendants associés à la présence d'anticorps anti-VHC sont : un âge supérieur à 30 ans, la naissance dans un pays d'endémicité moyenne ou élevée, l'usage de drogues (IV ou pernasale), et un antécédent de transfusion avant 1992.

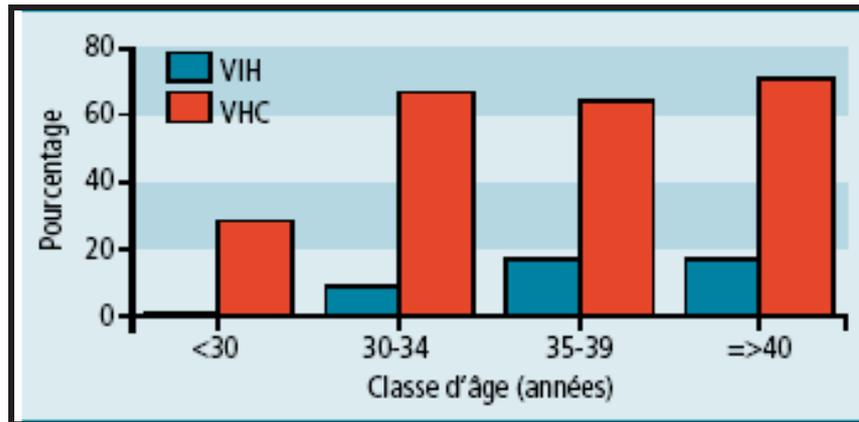
Ainsi en France, en 2004, une personne sur deux ignorait sa positivité en anticorps anti-VHC. Etant donné la réelle perte de chance pour ces sujets non dépistés, un effort important reste à faire sur le dépistage.

1.3 Chez les usagers de drogues

En France, le nombre d'usagers de drogues (UD) est estimé entre 170 000 et 190 000, dont plus de la moitié pourrait être des injecteurs actifs [3].

Une étude prospective a été réalisée dans une cohorte d'usagers de drogues IV du Nord-Est de la France entre 1999 et 2000 [48]. Le but était d'évaluer l'incidence et les facteurs de risque de l'infection par le VHC dans cette population. 165 toxicomanes ayant au moins une fois utilisé la voie IV dans leur vie et ayant une sérologie VHC négative à l'inclusion ont pu être suivis pendant 12 mois ou jusqu'à séroconversion VHC. L'incidence de la séroconversion VIH était nulle alors que celle du VHC était de 9% personnes années voire 11% personnes années chez les injecteurs actuels. Les partages de seringue et du coton étaient des facteurs prédictifs indépendants de séroconversion VHC. Le risque relatif de séroconversion était de 16,4 parmi les UD qui partageaient le coton et 6,3 chez ceux qui partageaient la seringue.

En 2004, une étude de séroprévalence auprès des UD de cinq villes françaises a été mise en place par l'institut de veille sanitaire (INVS) pour estimer les prévalences du VIH et du VHC dans cette population. Cette enquête appelée « enquête Coquelicot » a été réalisée chez 1462 UD volontaires ayant injectés et/ou sniffés « au moins une fois dans leur vie ». Un auto-prélèvement de sang au doigt déposé sur buvard a été effectué, sur lequel ont ensuite été recherchés les Ac anti-VIH et anti-VHC. La séroprévalence du VHC est élevée puisqu'elle atteint 59,8% alors que celle du VIH est de 10,8%. La co-infection VIH-VHC est de 10,2%. La séroprévalence du VHC croît avec l'âge mais contrairement au VIH, elle est déjà élevée chez les moins de 30 ans puisqu'elle est de 28% alors que pour le VIH elle n'est que de 0,3% avant 30 ans. A 40 ans et plus, 71% des UD ont été contaminés par le VHC (Figure 3) [3].



[3]

Figure 3 : Séroprévalence du VIH et du VHC par classe d'âge dans la population toxicomane

91% des UD déclarent avoir déjà été dépistés au moins une fois dans leur vie pour le VHC et 95% pour le VIH. Cependant 27% des UD se déclarent à tort séronégatifs pour le VHC.

Le niveau de connaissance des UD vis-à-vis des principaux modes de transmission du VHC et du VIH est globalement élevé. Malgré cela, les pratiques à risque persistent. En effet, 13% des UD déclarent avoir partagé la seringue, 38% le petit matériel lié à l'injection, 73% la pipe à crack, et 25% la paille de snif dans le dernier mois. Les UD semblent moins connaître le risque lié au partage du petit matériel [3].

Les actions et les messages de réduction des risques ont eu un impact sur les comportements des UD puisqu'on observe une quasi-absence de contamination par le VIH chez les UD de moins de 30 ans. Par opposition, la séroprévalence du VHC chez les moins de 30 ans reste quant à elle importante (28%). Elle résulte probablement d'une combinaison de deux facteurs : une prévalence globale du VHC beaucoup plus élevée dans la population des UD et une transmissibilité plus élevée du VHC comparée à celle du VIH.

Ainsi, en considérant qu'il y a entre 80 000 et 100 000 injecteurs actifs dont environ 40% sont indemnes du VHC, on peut estimer que 3500 à 4400 nouvelles infections surviennent par an du fait de l'injection de drogues.

2 Les différents génotypes

On considère que deux souches virales appartiennent au même sous-type lorsque l'homologie des séquences nucléotidiques entre elles est supérieure à 90%. Quand elle est de l'ordre de 80%, les souches appartiennent au même type mais à des sous-types différents.

Lorsque l'homologie est inférieure à 70%, les souches appartiennent à des types différents. Il existe ainsi 6 types majeurs du VHC subdivisés en plus de 80 sous-types.

En Europe de l'Ouest [49], aux Etats-Unis [50], en Australie, et au Japon [51], les types 1, 2 et 3 sont responsables de la majorité des hépatites alors que les types 4 et 5 sont plus rarement rencontrés. Une répartition différente est observée dans les autres zones géographiques. Ainsi, le génotype 3 prédomine en Asie du Sud (Inde, Thaïlande) [51] et une hétérogénéité importante du génotype 4 a été rapportée en Afrique centrale, Afrique du Nord, ainsi qu'au Moyen Orient [52]. Le génotype 5 prédomine en Afrique du Sud [52] et le génotype 6 peut atteindre une prévalence de 50% dans certaines régions du sud-est asiatique [53].

La répartition des différents génotypes varie en fonction des facteurs de risques associés et donc selon la source de contamination [54]. En France, le génotype 1b prédomine chez les sujets plus âgés et/ou ayant comme facteur de risque la transfusion. Les génotypes 3a et 1a sont retrouvés chez les sujets jeunes et ayant comme facteur de risque la toxicomanie intraveineuse (63% de génotype 3a et 33% de génotype 1a) [55]. Avec les mesures qui ont été prises en matière de sécurité transfusionnelle, une décroissance du génotype 1b est aujourd'hui observée en France [54]. En Egypte, la prévalence importante du génotype 4a (85%) a été étroitement associée aux campagnes de traitement de la bilharziose [41].

La répartition mondiale des génotypes est fortement liée aux facteurs de risques et donc aux modes de transmission prédominants dans les différents pays en voie de développement ou industrialisés.

3 Modes de transmission

La transmission du virus de l'hépatite C se fait essentiellement par voie parentérale. Dans les pays développés, suite à la réduction constante du risque de transmission par la transfusion de sang contaminé, la source principale des nouvelles contaminations est l'injection de drogues. Dans les pays en voie de développement, ce sont les transfusions et les injections à visées thérapeutiques qui constituent les principaux modes de transmission.

3.1 Les pays industrialisés

Aujourd'hui dans les pays développés l'usage de drogues par voie intraveineuse reste le mode de contamination majeur du virus de l'hépatite C, à cause du partage de seringue ou du petit matériel de préparation. L'usage de drogues par voie nasale ou par voie fumée peut aussi être à l'origine d'une transmission du VHC. Aux Etats-Unis et en Australie, l'injection de drogues est respectivement responsable de 68% et 80% des nouvelles contaminations durant ces 30 dernières années [46]. En France, chez les donneurs de sang dépistés positifs en anticorps anti-VHC, le facteur de risque principalement retrouvé est également l'injection de drogues [56].

3.2 Les pays en voie de développement

Dans les pays en voie de développement, la transmission nosocomiale reste un problème majeur avec la réutilisation de seringues et d'aiguilles contaminées ou mal stérilisées lors de soins médicaux, paramédicaux ou dentaires. Cette voie de contamination serait responsable de 2,3 à 4,7 millions de nouvelles infections par an et pourrait en partie s'expliquer par le fait que les injections sont souvent réalisées par des non professionnels et en dehors des structures de soins [46]. L'Egypte constitue aujourd'hui un réservoir d'hépatites C chroniques important suite à l'utilisation de seringues contaminées lors du programme de traitement de la bilharziose [41]. De plus, Mohamed *et al* soulèvent dans une étude publiée en 2005 le risque de transmission intra-familiale de l'hépatite C en Egypte [57].

La transfusion sanguine reste une des sources majeures de transmission du VHC. En effet en 2005, la « Global database on blood safety » rapporte que sur 174 pays étudiés, seulement 110 dépistent 100% des donneurs de sang pour l'hépatite C alors que les 64 pays n'effectuant pas correctement ce dépistage sont principalement constitués de pays à faible index de développement [58].

Le risque de transmission sexuel est considéré comme pratiquement nul chez les couples hétérosexuels mais peut être augmenté en cas de partenaires multiples, de présence d'autres infections sexuellement transmissibles, de rapports traumatiques, et chez les homosexuels masculins.

Le risque de transmission transversale varie de 0% à 20% des enfants nés de mères positives pour le VHC avec une moyenne à 5% dans la plupart des études. Les facteurs de risques étant : une charge virale maternelle élevée, un travail prolongé, et la co-infection VIH-VHC. En effet, les mères co-infectées ont 3,8 fois plus de chance de transmettre le VHC au fœtus. L'allaitement n'est pas contre-indiqué chez les mères porteuses de l'hépatite C [59].

Dans un tiers des cas aucun mode de transmission n'a pu être rapporté.

4 La mortalité liée à l'hépatite C chronique

Les hépatites B et C sont responsables de la majorité des cirrhoses et des cancers primitifs du foie dans le monde. En effet l'hépatite C serait responsable d'environ 30% des cas de cirrhose, 25% des cas de CHC [60] et 30% des transplantations hépatiques [61]. D'après l'étude sur les décès en France en 2001 [19], 3618 décès sur 531 072 seraient associés à l'hépatite C chronique et 2646 seraient attribuables à cette infection. Soit un taux de mortalité pour l'hépatite C chronique de 4,5 pour 100 000 habitants. La moyenne d'âge des décès chez les sujets atteints d'hépatite C chronique est de 65 ans soit plus de 10 ans plus jeune que la moyenne d'âge des décès dans la population générale.

L'hépatite C est donc un problème de santé publique. Les récents traitements arrivés sur le marché permettent aujourd'hui d'atteindre un taux de guérison approchant les 80% et la surveillance des patients cirrhotiques permettrait de dépister précocement et donc de traiter plus efficacement les CHC. Le dépistage de l'hépatite C permettrait donc de réduire l'incidence des cirrhoses et des CHC.

C Problématiques liées au dépistage de l'hépatite C

1 Le dépistage en France

1.1 Son évolution

L'incitation au dépistage de l'hépatite C a été initiée en 1993 puis renforcée par la mise en place du premier plan de lutte contre l'hépatite C en 1999 et du plan national hépatites virales C et B 2002-2005.

Dans le cadre du premier plan, l'INVS a mis en place deux réseaux afin de suivre l'évolution de l'activité de dépistage et les caractéristiques des personnes positives [62]. Le premier, appelé Rena-VHC est constitué de laboratoires d'analyses de biologie médicale hospitaliers ou privés, et le second de pôles de référence. Ces systèmes de surveillance ont fourni des données sur l'évolution de l'activité de dépistage du VHC en France sur la période de 2000 à 2007. L'activité a augmenté de 45% entre 2000 et 2005 pour diminuer depuis. Cette évolution à la hausse pourrait s'expliquer par l'impact des campagnes d'information et de dépistage menées entre 2000 et 2005 dans le cadre des plans de lutte contre l'hépatite C. Cependant, l'augmentation de l'activité de dépistage s'est accompagnée d'une diminution de l'activité de contrôle de dépistage. La baisse de l'activité de contrôle de dépistage, correspondant au nombre de tests de contrôle sur un deuxième sérum, réalisés après un premier test de dépistage positif, témoigne d'une évolution vers un dépistage moins ciblé.

L'analyse des caractéristiques des patients nouvellement diagnostiqués pour le VHC montre que l'hépatite C est principalement découverte fortuitement au cours d'un bilan de santé (56,8% en 2007) et ce malgré l'existence d'une exposition à risque retrouvée dans environ 78% des cas. En outre, plus de 10% des nouveaux patients présentent un stade avancé témoignant d'un retard au dépistage. Ces deux dernières constatations confirment qu'une proportion importante de patients infectés ignorait leur statut sérologique.

En 2004, seules 57% des personnes connaissent leur statut VHC positif. Ce qui est encore trop peu sachant que l'objectif du premier plan était d'atteindre 75% avant 2002. Il y a donc un réel progrès à réaliser au niveau du dépistage de l'hépatite C notamment en ciblant les personnes à risque.

1.2 Les recommandations de l'HAS

Les recommandations de l'HAS [63] maintiennent le principe de dépistage ciblé des personnes à risques. En France, le dépistage de l'hépatite C doit donc être principalement proposé aux usagers de drogues et aux populations migrantes originaires des pays de forte endémie.

Il est recommandé de dépister par la détection des anticorps anti-VHC. S'ils sont négatifs, on peut conclure à une absence de contact avec le VHC sauf si une infection récente est probable ou en cas d'immunodépression sévère. Dans ces deux derniers cas, la recherche de l'ARN du VHC est recommandée compte tenu de la fenêtre sérologique et de la baisse du taux d'anticorps. Si les anticorps anti-VHC sont positifs, il est d'abord recommandé de contrôler cette sérologie avec un test immuno-enzymatique différent et sur un second prélèvement. Si ce contrôle confirme le résultat, il y a alors eu contact avec le VHC. Il faudra ensuite rechercher l'ARN du VHC sur ce second prélèvement afin d'évaluer la chronicité de la maladie.

1.3 Le plan national hépatites 2009-2012

En 2009, un plan national hépatites 2009-2012 a été lancé par le ministère de la santé [4] [64]. Ce nouveau programme de lutte contre les hépatites B et C s'articule selon cinq grands axes stratégiques, l'un d'entre eux concernant l'amélioration du dépistage. La pratique du dépistage doit être aujourd'hui plus spécifiquement orientée vers des groupes non ciblés au départ et chez lesquels les études ont montré une prévalence élevée de l'infection (Plan national hépatites 2009-2012, « incitation des usagers de drogues au dépistage des hépatites B et C »). Chez les usagers de drogues, des dépistages réguliers doivent être proposés tant que l'exposition au risque persiste.

L'objectif de ce plan concernant le dépistage de l'hépatite C est d'atteindre 80% de personnes dépistées contre 57% actuellement.

2 Diagnostic virologique d'une hépatite C

En début d'infection, les anticorps anti-VHC ne sont pas encore détectables, on se trouve alors dans la phase dite de « fenêtre sérologique ». Ils n'apparaissent qu'au bout de 7 à 8 semaines après la phase aiguë de l'infection [65].

L'ARN du VHC peut quant à lui être détecté 1 à 3 semaines après l'infection soit en moyenne un mois avant l'apparition des anticorps.

Chez les patients suspectés d'hépatite C aiguë, il faut donc rechercher à la fois les anticorps anti-VHC, détectés par des techniques immuno-enzymatiques de 3^{ème} génération, et l'ARN viral, détecté par des techniques de biologie moléculaire. La mesure de la charge virale est idéalement réalisée par PCR en temps réel et permet de quantifier le virus de 10 à approximativement 10⁷ UI/ml. La présence de l'ARN du VHC en l'absence des anticorps anti-VHC est très fortement en faveur d'une infection aiguë. Celle-ci devra être confirmée par la séroconversion quelques semaines plus tard.

Lors de l'infection aiguë, il peut être mis en évidence à la fois l'ARN viral et les anticorps anti-VHC. Dans ce cas il est difficile de faire la différence entre une hépatite C aiguë et une autre cause d'hépatite aiguë chez un porteur chronique de l'hépatite C. Le test de « 4^{ème} génération » détectant l'antigène de capsid virale et les anticorps anti-VHC permet de réduire la fenêtre sérologique d'un mois environ [66].

Une hépatite C aiguë peut être exclue en l'absence à la fois des anticorps anti-VHC et de l'ARN viral, ou lorsque seuls les anticorps anti-VHC sont présents. Cependant, il existe quelques cas d'hépatites aiguës avec ARN temporairement indétectable du fait d'un contrôle partiel de la réplication. Il faudra alors refaire la recherche de l'ARN viral afin de s'assurer qu'il ne s'agissait pas d'une hépatite C aiguë qui pourrait évoluer vers une hépatite C chronique. En dehors de ces cas, la présence d'anticorps anti-VHC en l'absence d'ARN viral signe une hépatite C ancienne guérie [12].

Le diagnostic de l'hépatite C chronique repose sur la présence simultanée des anticorps anti-VHC et de l'ARN du VHC chez des patients présentant des signes d'hépatite chronique. Suite à une hépatite C aiguë diagnostiquée, la persistance de l'ARN du VHC au-delà de six mois définira l'hépatite C chronique. Une réplication virale en l'absence d'anticorps peut être occasionnellement observée chez les sujets profondément immunodéprimés (VIH) [67] ou hémodialysés [68].

Une fois le diagnostic d'hépatite C chronique posé, le géotype viral doit être déterminé car il conditionne la décision thérapeutique de même que l'évaluation de l'atteinte hépatique.

La quantification de l'ARN viral sera essentielle au suivi du traitement de l'hépatite C chronique.

3 Évolution des tests sérologiques

3.1 Historique

Les anticorps anti-VHC sont détectés grâce à des techniques ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays), en général de 3^{ème} génération, dans le sérum ou le plasma. L'utilisation d'antigènes et plus récemment d'anticorps spécifiques permet de capturer respectivement les anticorps et les antigènes viraux sériques correspondants sur une microplaque. Ces complexes antigène-anticorps seront ensuite révélés grâce à une réaction enzymatique colorée.

En 1990, le dépistage de l'hépatite C des donneurs de sang était effectué avec des tests ELISA dits de 1^{ère} génération. Ces tests reposaient sur une seule protéine recombinante localisée au niveau de la région NS4 (c100-3) du génome du VHC [69]. Ils étaient responsables de nombreux faux positifs et faux négatifs [70]. Afin de gagner en sensibilité et spécificité, des protéines à la fois structurales et non structurales ont été utilisées.

Ainsi en 1992, des tests de 2^{ème} génération, permettant la détection des anticorps dirigés contre des protéines recombinantes des régions NS4 (c100-3), C (c22-3) et NS3 (c33c) du génome du VHC, ont fait leur apparition et ont permis d'augmenter nettement la sensibilité [71]. Ortho-Clinical diagnostics introduit en 1994 une troisième version qui contient un peptide de plus que les tests de deuxième génération, localisé au niveau de la région NS5. Les tests de 3^{ème} génération ont apportés un réel gain de sensibilité et de spécificité [72].

Une étude américaine réalisée entre Juin 1999 et Juillet 2000 sur des donneurs de sang compare un test de 2^{ème} génération et un de 3^{ème} génération. Elle a montré qu'avec le test de 2^{ème} génération, 17 sujets avec ARN viral positifs étaient dépistés négatifs en anticorps anti-VHC mais que le test de 3^{ème} génération permettait d'en récupérer 10 sur les 14 qui ont pu être testés [73]. Plus récemment, des tests de 4^{ème} génération permettant la détection simultanée d'anticorps et d'antigènes ont fait leur apparition.

3.2 Le test de 4^{ème} génération commercialisé en France : Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra (BioRad)

Afin de réduire la fenêtre sérologique lors d'une infection récente par le VHC, une alternative à la PCR, qui reste coûteuse, est la détection simultanée des anticorps et des antigènes du VHC comme cela se fait déjà pour le dépistage du VIH.

Le test Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra est un test de 4^{ème} génération permettant la détection combinée des anticorps anti-VHC et de l'antigène de capsid du VHC. Une étude réalisée en 2005 sur un panel d'échantillons provenant de 10 séroconversions VHC montre que ce test permet de réduire la fenêtre sérologique de 27 jours environ [5]. Il présente une grande utilité dans le dépistage des patients à risque, d'une part pour traiter rapidement l'hépatite C aiguë et d'autre part pour réduire le risque de transmission secondaire par la détection précoce de l'infection.

Les tests combinés présentent également un intérêt certain pour les sujets infectés par le VIH. Du fait de leur difficulté à développer rapidement une réponse immunitaire spécifique du VHC, les patients infectés par le VIH présentent un délai de séroconversion plus long [74]. Les usagers de drogues IV qui constituent le principal groupe à risque d'hépatite C dans les pays industrialisés, sont pour 10% environ co-infectés par le VIH [3]. Une étude réalisée sur un panel de 95 échantillons provenant de 20 patients positifs pour le VIH avec une hépatite C aiguë compare le test de 3^{ème} génération Monolisa® anti-HCV plus v2 au Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra [6]. L'hépatite C est détectée plus tôt chez 65% des sujets avec le test combiné par rapport au test de 3^{ème} génération. En effet, alors que le test de 3^{ème} génération se positive 77 jours après la PCR VHC, le test de 4^{ème} génération permet une détection seulement 27 jours après la PCR.

Concernant le dépistage du sang de donneurs, les tests de 4^{ème} génération ne peuvent pas remplacer la détection de l'ARN viral qui reste plus sensible. Cependant, ils constituent une bonne alternative dans les pays en voie de développement où la recherche de l'ARN viral ne peut pas être effectuée pour des raisons d'organisation, de coût, ou encore de difficultés logistiques [75].

De par la forte prévalence de l'hépatite C chez les toxicomanes IV et la proportion relativement importante de co-infectés par le VIH, les tests de 4^{ème} génération présentent un réel intérêt dans cette population. Mais il faut bien noter que dans le cas d'une suspicion clinique d'hépatite C aiguë le test de 4^{ème} génération ne remplacera pas la recherche de l'ARN viral.

3.3 Les prélèvements alternatifs

Le diagnostic de l'hépatite C repose sur la détection des anticorps anti-VHC totaux et la détection-quantification de l'ARN du VHC. Ces analyses sont réalisées sur plasma ou sérum à partir d'un prélèvement veineux. Des alternatives sont aujourd'hui développées, comme par exemple la réalisation de prélèvements oraux ou de sang total capillaire permettant la détection des anticorps anti-VHC voire de l'ARN viral. Plus récemment, des tests rapides immunologiques mettant en évidence les anticorps anti-VHC ont été développés [76].

3.3.1 Intérêt des prélèvements alternatifs

Dans les pays industrialisés, la première cause de transmission du VHC est l'usage de drogues IV. Il est donc primordial de cibler cette population avec une stratégie de dépistage adaptée. Or, la ponction veineuse peut décourager les toxicomanes IV à se faire dépister car l'accès veineux est souvent rendu difficile suite aux injections répétées et peut ainsi être un frein à l'acceptabilité du dépistage.

A Sydney, en Australie, il a été proposé à 229 UD avec antécédents d'injection de drogues de se faire dépister en comparant trois types de prélèvements : le prélèvement oral, le prélèvement de sang capillaire, et la ponction veineuse. Suite à ces trois prélèvements, ils ont rempli un questionnaire et la méthode qui a été préférée est le prélèvement oral pour 53%, bien devant la ponction veineuse (26%) et le prélèvement de sang capillaire (20%) [77]. De plus, une étude réalisée dans des centres de soins aux toxicomanes et dans des prisons en Angleterre a montré que l'introduction du prélèvement de sang capillaire permettait d'augmenter le taux de dépistage de l'hépatite C de 14,5% en moyenne [78].

La prise de sang, qui nécessite du matériel adapté (seringues, tubes, centrifugeuse), un personnel qualifié et expérimenté, ne peut pas être réalisée n'importe où. A l'inverse, les prélèvements oraux ou de sang capillaire sont faciles à réaliser et présentent moins de risques

pour le préleveur. En effet, les lancettes utilisées pour le prélèvement de sang capillaire se rétractent automatiquement et de façon irréversible, ce qui minimise le risque de piqûres. Ces prélèvements alternatifs permettent donc une biologie délocalisée, c'est-à-dire dans les cabinets médicaux, les centres de dépistage anonyme et gratuit (CDAG), les structures de prévention, les structures associatives, ou encore les prisons.

3.3.2 Études déjà réalisées

- Les prélèvements salivaires

Dès les années 1987 pour le VIH [79] et 1992 pour l'hépatite C [80], des essais de dépistage salivaire ont été réalisés. Depuis, plusieurs études sur l'utilisation de ces prélèvements oraux ont été publiées et les plus importantes sont présentées dans le Tableau I.

Différents modes de prélèvement ont été utilisés dans ces études : la salivette® (Sarstedt), l'Omni-sal® (Saliva diagnostic Systems, Singapour), l'OraSure® (OraSure Technologies, USA), et l'Oracol®. Ces dispositifs permettent soit d'obtenir de la salive (salivette®, Omni-sal®) qui est riche en IgA sécrétoire mais assez peu en IgG et IgM, soit ce qu'on appelle le fluide gingival crévulaire (FGC) (OraSure®, Oracol®) qui contient plus d'IgG et d'IgM car il s'agit d'un exsudat sérique [81]. Le dispositif de prélèvement comprend des sels créant un environnement hypertonique qui permet l'exsudation à partir des tissus gingivaux. Six études utilisant l'OraSure® pour réaliser le prélèvement oral et différentes techniques de dosage des Ac ont obtenu des sensibilités allant de 87% à 100% et des spécificités de 99% à 100% [80] [82] [83] [84] [81] [85].

Six autres études ont estimé la sensibilité et la spécificité de différentes méthodes avec la salivette® comme mode de recueil. La sensibilité variait de 72% à 100% et la spécificité de 98% à 100% [86] [87] [88] [89] [84] [90].

Une de ces études, celle de Cameron *et al* réalisée sur 167 patients, 115 anticorps anti-VHC positifs et 52 anticorps anti-VHC négatifs, estime la sensibilité à 85% et la spécificité à 100% avec la technique Monolisa® anti-VHC modifiée. Cependant, pour les patients avec un ARN viral positif, la sensibilité augmente à 98%, ce qui semble très intéressant étant donné que ce sont principalement les sujets virémiques que l'on cherche à dépister [88].

Judd *et al* comparent la salivette® et l'OraSure® pour la détection des Ac anti-VHC avec le test Ortho VHC 3.00 modifié [84]. Cette étude réalisée sur un grand nombre de sujets (645

pour l'OraSure® et 641 pour la salivette®) montre une supériorité de l'OraSure® sur la salivette® avec des sensibilités de 91,7% et 74,1% respectivement. Comme montré par Cameron *et al*, la sensibilité augmente nettement avec l'OraSure® chez les sujets avec un ARN viral positif puisqu'elle est de 77,8% chez les sujets non virémiques et passe à 98,3% chez les sujets virémiques.

Lucidarme *et al* [90] rapportent également des densités optiques (DO) significativement plus basses chez les sujets avec un ARN négatif et une différence de sensibilité de plus de 15% entre les sujets virémiques et les non virémiques. Une bonne sensibilité chez les patients virémiques est d'une grande importance en pratique courante puisque ce sont ces personnes qui doivent être dépistées pour pouvoir être traitées.

L'étude de Bello [87] réalisée sur des prélèvements avec salivette® chez 270 sujets, 161 Ac anti-VHC positifs dont 46 co-infectés VIH, met en évidence des DO plus faibles chez les sujets co-infectés par le VIH par rapport aux mono-infectés. La sensibilité estimée chez les mono-infectés est de 95,1% alors qu'elle passe à 91,9% chez les co-infectés VIH. Cette plus faible sensibilité chez les sujets VIH pourrait poser un problème pour le dépistage des populations avec un taux important de VIH positifs comme chez les UD IV.

Les résultats des différentes études réalisées montrent des sensibilités et des spécificités permettant l'utilisation du prélèvement oral pour des études épidémiologiques. Cependant, les performances obtenues ne sont souvent pas suffisantes pour que le prélèvement oral soit utilisé pour du dépistage individuel.

Auteurs	Année	Journal	Recueil	Technique	Nombre	Se	Sp
Thieme et al	1992	J Clin Microbiol	Orasure®	Abbott	13	100,0%	100,0%
Sherman et al	1994	Am J Gastroenterol	Orasure®	Abbott 2.00	216	98,2%	99,1%
McIntyre et al	1996	Eur J Clin Microbiol Infect Dis	Salivette®	Ortho 3.00	67	72,0%	98,0%
				Monolisa anti-VHC	67	100,0%	100,0%
Bello et al	1998	Eur J Clin Microbiol Infect Dis	Salivette®	Abbott 3.00	270	94,4%	99,1%
Elsana et al	1998	J Med Virol		Abbott 2.00	193	90,0%	100,0%
Cameron et al	1999	J viral Hepat	Salivette®	Monolisa anti-VHC	167	85,0%	100,0%
Allwright et al	2000	BMJ	Orasure®	Ortho 3.00	534	87,0%	100,0%
Van Doornum et al	2001	J Med Virol	Salivette®	Ortho 3.00	152	77,5%	98,0%
				Monolisa anti-VHC	152	76,5%	98,0%
			Omni-sal®	Ortho 3.00	152	76,5%	98,0%
				Monolisa anti-VHC	152	76,5%	94,0%
Judd et al	2003	J Med Virol	Salivette®	Ortho 3.00	641	74,1%	99,0%
			Orasure®		645	91,7%	99,2%
Lucidarme	2003	Gastroenterol Clin Biol	Salivette®	Monolisa anti-VHC	108	74,5%	98,0%
De Cock et al	2004	J Virol Methods	Oracol®	Ortho 3.00	146	89,0%	100,0%
Cameron et al	2005	J Clin Virol	Orasure®	Abbott 2.00	215	94,0%	
				Abbott 3.00	213	92,0%	
				Murex 4.0	216	96,0%	
				Ortho 3.00	171	95,0%	
Moorthy et al	2008	IJMN	Omni-sal®	Hepanostika®	142	81,6%	92,5%
Gonzales et al	2008	Eur J Clin Microbiol Infect Dis	Orasure®	Ortho 3.00	90	86,7%	100,0%

[80] [82] [86] [87] [91] [88] [83] [89] [84] [90] [92] [81] [93] [85]

Tableau I : Résultats des études réalisées sur l'utilisation du prélèvement oral pour le dépistage des anticorps anti-VHC

Étant donnée la proportion importante d'hépatites C pour lesquelles aucun mode de transmission n'a pu être retrouvé, de nombreuses études ont cherché à mettre en évidence la présence d'ARN du VHC dans la salive.

Il a ainsi été montré la présence de l'ARN viral dans la salive, dans la plupart des études menées, avec des prévalences très variables. Mariette *et al* [94] (1995), Roy *et al* [95] (1998), Fabris *et al* [96] (1999), et Hermida *et al* [97] (2002) ont rapporté des prévalences similaires de 61%, 58%, 56% et 52,4% respectivement.

D'autres études comme celle de Goncalves *et al* [98] (2005) ou Maticic *et al* [99] (2001) ont montré des prévalences beaucoup plus faibles de l'ordre de 20,5% et 35% respectivement.

Une étude publiée en 2005 [100], réalisée sur 75 patients, 50 positifs en Ac anti-VHC et 25 négatifs en Ac anti-VHC rapporte une sensibilité et une spécificité de 100%. L'utilisation d'une PCR nichée, donc très sensible pourrait expliquer ces excellents résultats.

Seul Van Doornum *et al* [89] n'ont pas mis en évidence l'ARN viral parmi leurs 40 salives prélevées chez des patients virémiques.

Certaines études ont montré que la présence d'ARN dans la salive était corrélée à la charge virale dans le sérum [97] [94]. A l'inverse d'autres ont montré que la détection de l'ARN dans la salive ne dépendait pas de la CV [100] [101].

Les informations sur la prévalence du VHC dans le FGC sont plus limitées. En 2001, Maticic *et al* [99] montrent que le VHC est détecté dans 59% des fluides gingivaux crévicaux et 35% des salives, et que les salives n'ont été trouvées positives que lorsque le FGC l'était. Suzuki *et al* [101] sont les premiers à quantifier la charge virale dans la salive et le FGC. Pour cela, ils réalisent une extraction avec le kit QIAamp viral RNA (Qiagen®) puis une PCR en temps réel avec le kit Taqman EZ RT-PCR Core (Biosystems). L'ARN est plus souvent retrouvé dans le FGC que dans la salive. La plupart des patients (77%) avaient une CV supérieure dans le FGC par rapport à la salive. Ces résultats laissent penser que le FGC pourrait être une des sources de l'ARN retrouvé dans la salive. Liou *et al* [102] et Komiyama *et al* [103] montrent que lorsqu'il y a présence de sang dans la salive cela n'est pas corrélé avec la présence de l'ARN dans ce même prélèvement.

Les résultats de ces différentes études mettent en évidence le fait que la recherche de l'ARN viral dans le fluide oral ne peut pas être utilisée à des fins diagnostiques ou épidémiologiques. Cependant, il faut clarifier la signification clinique de la présence d'ARN dans la salive et le FGC, ainsi que le rôle potentiel de ces fluides dans la transmission du virus.

- Les prélèvements de sang capillaire

Contrairement aux prélèvements oraux, les études sur le dépistage de l'hépatite C sur prélèvement de sang capillaire déposé sur buvard sont peu nombreuses.

Parker *et al* [104] sont les premiers, en 1997, à utiliser une technique maison pour rechercher les Ac anti-VHC dans des dépôts de sang total. Ils montrent des résultats très

prometteurs avec des moyennes de DO obtenues permettant de clairement distinguer les sujets positifs des sujets négatifs.

Un peu plus tard McCarron *et al* [105] utiliseront le test Monolisa anti-VHC modifié sur le sang capillaire de 108 sujets positifs en Ac anti-VHC et 112 négatifs. Ils estiment alors la sensibilité à 100% et la spécificité à 87,5%. Puis après augmentation du seuil de positivité à un ratio DO/cut-off (CO) à 2, la spécificité augmente à 100% et la sensibilité est à 97,2%. Ils observent également que lorsque la DO est élevée, les sujets ont plus de chance d'avoir un ARN viral positif, bien que, contrairement à la salive, la détection des Ac dans le sang capillaire ne semble pas permettre de prédire la virémie.

Croom *et al* [106] obtiennent de meilleurs résultats en utilisant le test Monolisa® anti-VHC sur 117 sujets négatifs en Ac anti-VHC et 80 sujets porteurs d'Ac anti-VHC. En prenant comme seuil de positivité un ratio DO/CO égal à 1, ils estiment la sensibilité et la spécificité à 100%.

Cette différence de spécificité avec l'équipe de McCarron pourrait s'expliquer par le tampon utilisé pour éluer les buvards. En effet, Croom *et al* ont testé quatre tampons d'élution différents : le diluant Genetic Systems Specimen® ; le diluant Monolisa® ; un diluant composé de 0,3% de lait et de chlorure de sodium, et un diluant composé de chlorure de sodium, de phosphate et de Tween 20. Même si les quatre tampons ont une bonne capacité à éluer les Ac contenus dans le buvard, c'est le tampon Genetic Systems Specimens qui permet d'obtenir le moins de réactions non spécifiques chez les sujets négatifs en Ac anti-VHC. Croom *et al* ont donc choisi ce tampon d'élution alors que McCarron *et al* ont élué leurs buvards dans du PBS. Cette étude montre l'importance du choix du tampon d'élution notamment pour optimiser la spécificité du test. Elle montre également que les DO obtenues pour les buvards sont en moyenne plus faibles que celles obtenues sur le plasma sans pour autant avoir d'impact sur la sensibilité et la spécificité.

Une autre étude [84] réalisée sur 634 sujets, 381 sujets négatifs en Ac anti-VHC et 253 positifs, avec le test Ortho® VHC 3.00 estime la sensibilité à 99,6% et la spécificité à 100%. Contrairement à la salive, chez les sujets avec ARN positif, la sensibilité n'est pas meilleure.

L'étude la plus récente, datant de 2010, est celle de Tuailon *et al* [107]. En plus d'investiguer la sérologie VHC sur buvard, elle quantifie l'ARN viral et étudie les conditions de stockage des buvards. Jusqu'à cette étude, on se basait notamment sur celles réalisées pour le VIH

montrant que les buvards pouvaient être stockés à température ambiante pendant plusieurs semaines sans que les résultats des sérologies des patients positifs ou négatifs ne soient altérés [108]. 100 sujets positifs en Ac anti-VHC dont 62 en ARN viral également et 100 sujets négatifs en Ac anti-VHC ont été inclus dans l'étude de Tuailon. La sérologie sur sang capillaire a été effectuée avec le test de 3^{ème} génération Ortho® VHC 3.00, l'extraction de l'ARN avec le kit Cobas Ampliprep® TNAI : Total Nucleic Acid Isolation (Roche Diagnostics) et la PCR avec le kit Cobas Taqman® HCV test sur le COBAS Taqman® 48 (Roche Diagnostics). En utilisant le CO du fabricant, la sensibilité et la spécificité de la sérologie sur buvards étaient respectivement de 99% et 98%. Le seul faux négatif obtenu était chez un sujet co-infecté par le VIH avec un faible taux d'anticorps anti-VHC et un ARN viral négatif. Cette étude est la première qui quantifie l'ARN du VHC sur des spots de sang capillaire avec une extraction et une PCR en temps réel réalisées sur des automates à l'aide de kits commerciaux. Abe et Konomi avaient précédemment montré à l'aide d'une PCR maison que la détection de l'ARN viral dans des spots de sérum était possible. Ils avaient également étudié la stabilité de ces spots à TA et avaient montré une charge virale divisée par 10 au bout d'un mois [109]. Dans l'étude de Tuailon *et al*, l'ARN viral étant recherché et quantifié uniquement chez les sujets positifs en ARN dans le sérum, seule la sensibilité a pu être étudiée. Elle a été estimée à 97% et seulement deux patients avec des charges virales faibles (178 et 331 UI/ml) n'ont pas été détectés [107].

Tuailon *et al*. définissent également une équation qui, en partant du logarithme de la charge virale observée sur buvard, permet de retrouver celle du plasma avec une bonne concordance. Ils observent également que la sensibilité décroît sur les spots lorsque la charge virale sur sérum est inférieure à 1000 UI/ml, mais soulignent qu'une telle charge virale reste très rare chez les patients non traités. Les tests de stockage des buvards montrent que les DO obtenues pour les sujets négatifs en Ac anti-VHC augmentent au fur et à mesure du stockage à TA pour se positiver chez 4 des 5 patients au bout de 6 jours. Aucune variation significative n'est observée pour les sujets positifs en Ac. Pour la charge virale sur buvards, celle-ci diminue nettement après un stockage à TA pendant 6 jours mais reste stable à -20°C. Ils recommandent donc de stocker les buvards à -20°C dans les 48 heures suivant le prélèvement [107].

Les différentes études réalisées sur sang capillaire montrent des résultats très prometteurs, laissant envisager l'utilisation de ce prélèvement pour dépister l'hépatite C. Le sang capillaire, en plus d'être plus fiable que le fluide oral pour la détection des anticorps anti-VHC, permet la quantification de l'ARN viral et également le génotypage du virus [107] [110]. L'ensemble des études, que ce soit sur fluide oral ou sur sang capillaire, étaient réalisées sur des tests sérologiques de 3^{ème} génération uniquement. Aucune étude sur des tests combinés n'a encore été réalisée sur ces prélèvements alternatifs

3.4 Les tests rapides

3.4.1 Intérêt

Aux Etats-Unis, l'utilisation des tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) pour le VIH a considérablement augmenté par rapport aux tests classiques. Par exemple, le test OraQuick® Advance HIV-1/2 Antibody test représentait en 2008 85% des diagnostics de VIH réalisés dans une vingtaine d'hôpitaux et cliniques de New York [76].

En effet ces tests rapides présentent certains avantages. Stockés à température ambiante, ils sont faciles d'utilisation, réalisables partout (CDAG, structures non médicales), et permettent l'obtention de résultats en moins de 30 minutes. De plus ils sont utilisables sur différentes matrices : sérum, plasma, sang total veineux, sang total capillaire, et fluide oral.

Cependant ces tests rapides, qui sont essentiellement des tests de 3^{ème} génération, restent moins sensibles que les tests immuno-enzymatiques notamment au moment de la primo-infection [111]. Cette perte de sensibilité peut être due à leur réalisation à température ambiante, ou encore au temps de réaction court. Il existe de plus des limites à leur utilisation sur sang total ou sur fluide oral, où les performances sont moins bonnes en raison de la dilution des anticorps par les GR sur sang total et la faible quantité d'anticorps contenue dans les fluides oraux. Une étude française [112] sortie récemment, réalisée sur 200 patients VIH positifs et 20 patients VIH négatifs, avait pour but d'évaluer la sensibilité et la spécificité de cinq tests rapides pour le diagnostic du VIH, dont le test OraQuick® Advance HIV-1/2 Antibody test. Elle a montré que ces TROD étaient plus sensibles sur sérum en comparaison au sang capillaire ou au fluide oral et donc que l'utilisation de ces tests sur prélèvements alternatifs avait ses limites. Pour l'OraQuick® HIV, les sensibilités sur fluide oral et sur sang capillaire n'étaient que de 86,5% et 94,5% respectivement contre 97,5% sur sérum. De plus

les performances retrouvées pour l'OraQuick® HIV étaient bien inférieures aux données initiales du fabricant.

L'utilisation de l'OraQuick® HIV pour le dépistage du VIH de 2005 à 2008 dans certaines cliniques de New York a également montré une quantité non négligeable de faux positifs. En effet, la spécificité, très variable d'un mois à l'autre, est descendue jusqu'à 98,88% certains mois alors que le fabricant annoncé une spécificité de 99,7% [IC95=99,6 – 99,9%] [113].

Ces études montrent l'importance de confirmer les performances analytiques avancées par les fabricants lors d'études prospectives indépendantes.

En plus d'un manque de sensibilité et de spécificité sur certaines matrices, se présentent les problèmes liés au passage des contrôles de qualité et d'archivage des résultats. En effet l'automatisation des tests Elisa, en plus d'un débit important permet également une traçabilité des résultats par leur enregistrement informatique, ce qui n'est pas possible avec les tests rapides. Un autre problème lié à ces tests est la subjectivité de la lecture, qui dépend de l'interprétation de l'opérateur. De plus leur coût unitaire n'est souvent pas négligeable.

Ainsi, le principal intérêt de ces tests rapides d'orientation diagnostic réside dans l'augmentation des opportunités de dépistage qu'ils apportent. En France, le seul TROD pour le dépistage de l'hépatite C disposant du marquage CE et de l'agrément de l'AFSSAPS sur les cinq matrices que sont le sérum, le plasma, le sang total veineux, le sang total capillaire et fluide oral, est le test OraQuick® HCV Rapid Antibody Test (OraSure technologies, Bethlehem, USA). Il vient également de recevoir l'agrément de la FDA sur ces cinq matrices.

3.4.2 L'OraQuick® HCV

L'OraQuick® HCV est un test de diagnostic rapide du VHC de 3^{ème} génération (Figure 4). Il permet la détection des anticorps anti-VHC dans cinq matrices différentes : sérum, plasma, sang total veineux, sang total capillaire, et fluide oral.



Figure 4 : Test rapide d'orientation diagnostic OraQuick® HCV

La bandelette de dosage contient des peptides synthétiques et des protéines recombinantes issues des régions centrales, NS3 et NS4 du génome du VHC (ligne de test) et une anti-IgG humaine de chèvre (ligne de contrôle) immobilisés sur une membrane de nitrocellulose. La ligne de contrôle, assurant que l'échantillon a bien été collecté et a bien migré le long du test, doit être présente. Ce test doit être interprété au bout de 20 à 40 minutes (Figure 5).

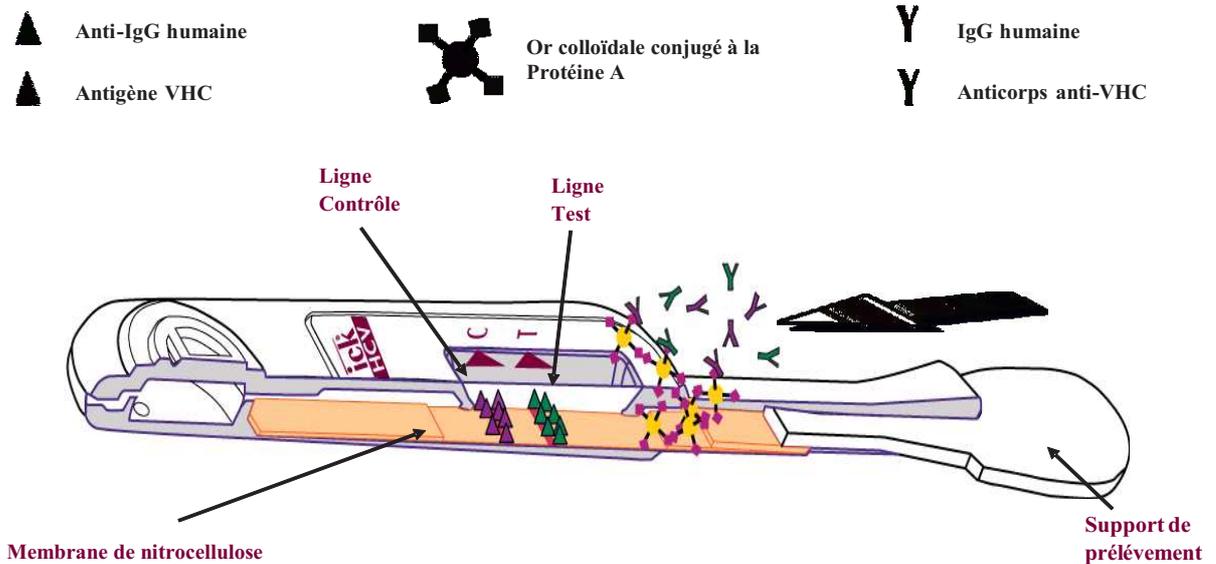


Figure 5 : Principe du test OraQuick® HCV

Une première étude réalisée en 2010 par l'équipe de Lee, qui appartient à la société fabriquant l'OraQuick®, a rapporté une sensibilité de 100% sur sérum, de 100% sur sang capillaire et de 99,2% sur fluide oral. La spécificité était de 99,8% sur sérum et 100% sur sang capillaire et sur fluide oral [114].

Puis récemment, les performances analytiques de ce TROD ont été réévaluées par le fabricant. On retrouve des sensibilités légèrement inférieures, notamment pour le fluide oral, mais qui restent très satisfaisantes (Tableau II) [115].

Type de prélèvement	Sensibilité	Spécificité
Fluide buccal	98.1% (95% CI: 96.9-99.9%)	99.6% (95% CI: 99.2-99.9%)
Sang total (ponction digitale)	99.7% (95% CI: 99.0-100.0%)	99.9% (95% CI: 99.6-100.0%)
Sang total (ponction veineuse)	99.7% (95% CI: 99.0-100.0%)	99.9% (95% CI: 99.5-100.0%)
Plasma	99.9% (95% CI: 99.3-100.0%)	99.9% (95% CI: 99.5-100.0%)
Sérum	99.9% (95% CI: 99.3-100.0%)	99.9% (95% CI: 99.6-100.0%)

(D'après Lee, 2011 [115])

Tableau II : Performances de l'OraQuick® HCV sur les différentes matrices

Les performances de ce test rapide ont récemment été évaluées lors d'une étude indépendante. L'équipe de Smith [116] a évalué les performances sur sérum de trois tests de diagnostic rapide, l'OraQuick® HCV Rapid antibody test, le Chembio® DPP HCV test (Chembio diagnostic system, Inc) et le Multiplo Rapid HIV/HCV antibody test (MedMira). Réalisés sur 1100 sérums, les performances retrouvées pour les trois tests vont de 86,8% à 99,3% pour la sensibilité, et de 99,5% à 99,8% pour la spécificité. L'OraQuick® HCV semble être le plus sensible des trois (Se=97,8%) et avoir une spécificité équivalente aux deux autres (Se=99,6%). Son pourcentage de faux positif varie de 0,4% à 0,6% et de faux négatifs de 0,7% à 2,2%. Cependant, les performances retrouvées pour l'OraQuick® HCV sur sérum sont bien inférieures à celles annoncées par le fabricant (Se=97,8 versus 99,9% et Sp=99,6 versus 99,9%). La séropositivité VIH est associée à de faux résultats pour les tests Chembio et MedMira mais pas pour l'OraQuick® HCV. Le genre féminin serait négativement associé aux faux résultats pour l'OraQuick® HCV. Dans cette étude, l'interprétation des résultats est réalisée par trois opérateurs différents afin d'évaluer la subjectivité de l'interprétation, une des

difficultés majeures de ces tests rapides. Un excellent coefficient de concordance est observé pour l'OraQuick® HCV et Chembio® révélant une interprétation facile de ces deux tests.

Aucune étude réalisée indépendamment du fabricant n'a encore été effectuée sur le sang capillaire et le fluide oral avec l'OraQuick® HCV.

Partie 2 : Données expérimentales

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Actuellement, le dépistage de l'hépatite C est basé sur la recherche des anticorps anti-VHC, par des techniques de 3^{ème} génération, dans le sérum ou le plasma prélevé par ponction veineuse au pli du coude.

L'objectif principal de cette étude est d'adapter la technique immuno-enzymatique de détection combinée de l'antigène de capsid du VHC et des anticorps anti-VHC (Monolisa® Ag-Ab HCV Ultra, BioRad) aux prélèvements alternatifs que sont le sang capillaire et le fluide oral.

Les caractéristiques de la technique adaptée, ses performances par rapport à la même technique sur sérum, ainsi que les conditions de conservation des échantillons seront également étudiées.

Les objectifs secondaires de cette étude sont :

- L'évaluation des performances du test rapide d'orientation diagnostic OraQuick® HCV (Orasure Technologies, Bethlehem, USA) sur sang capillaire et sur fluide oral.
- La quantification de l'ARN viral dans le sang capillaire et dans le fluide oral par une technique de RT-PCR commerciale, Cobas® Ampliprep Taqman, extraction TNAI® et HCVHPS® (Roche diagnostics, Meylan, France) afin d'évaluer leurs intérêts dans le dépistage du VHC. La sensibilité et la spécificité de la technique seront estimées pour ces deux prélèvements avec pour référence la technique Cobas® Ampliprep/Cobas® Taqman HCV Test (Roche diagnostics, Meylan, France) utilisée en routine sur plasma.

MATERIELS ET METHODES

A Mise au point des techniques utilisées dans l'étude DIAGVHC

Afin d'adapter la technique immuno-enzymatique de détection combinée de l'antigène de capsid du VHC et des anticorps anti-VHC (Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra) aux prélèvements alternatifs que sont le sang capillaire et le fluide oral, il a été nécessaire de travailler sur les conditions d'obtention des échantillons et sur la technique afin de la rendre la plus performante possible sur ces types de prélèvements.

1 Technique de référence

La technique de référence utilisée dans cette étude est le test combiné Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra (BioRad, Marnes la coquette, France) réalisé sur sérum.

Brièvement (Figure 6), la microplaque est coatée avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de capsid du VHC, deux protéines recombinantes de la région NS3 (génotype 1 et 3a), un antigène recombinant de la région NS4 et un peptide muté de la capsid virale. La prise d'essai est de 50 µl de sérum. Il est déposé pur dans la microplaque puis 100 µl de conjugué 1 (anticorps monoclonaux biotinilés de souris dirigés contre l'antigène de capsid du VHC) sont rajoutés. Si des anticorps anti-VHC sont présents dans le sérum, ils se fixeront aux antigènes de la plaque et si des antigènes de capsid du VHC sont présents, ils se fixeront aux anticorps de la plaque et seront fixés à leur tour par les anticorps biotinilés (conjugué 1). Après une incubation de 90 minutes à 37°C, cinq lavages seront effectués et 100 µl de conjugué 2 (anticorps de souris anti-IgG humaines couplés à une peroxydase et de la streptavidine couplée à une peroxydase) seront ajoutés dans chaque puits. La streptavidine/ peroxydase réagira avec les anticorps monoclonaux biotinilés dirigés contre l'antigène de capsid s'ils sont présents. Les anticorps anti-IgG humaines réagiront avec les anticorps anti-VHC s'ils sont présents. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la plaque est de nouveau lavée cinq fois et les complexes antigènes-anticorps seront révélés par l'ajout de 80 µl de substrat. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, 100 µl d'acide

sulfurique (1N) sont rajoutés pour arrêter la réaction. Quatre minutes après, la densité optique sera lue à 450 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps et d'antigènes fixée sur la plaque.

Des contrôles sont passés en parallèle des sérums de patients : un contrôle négatif, un contrôle positif contenant des anticorps anti-VHC passé en double, et un contrôle positif contenant un peptide synthétique de capsid. Ces contrôles sont traités de la même façon que les sérums. Le contrôle positif en anticorps permettra de déterminer le cut-off d'après la formule suivante :

$$CO = \frac{\text{Moyenne_des_DO_du_contrôle_positif}}{4}$$

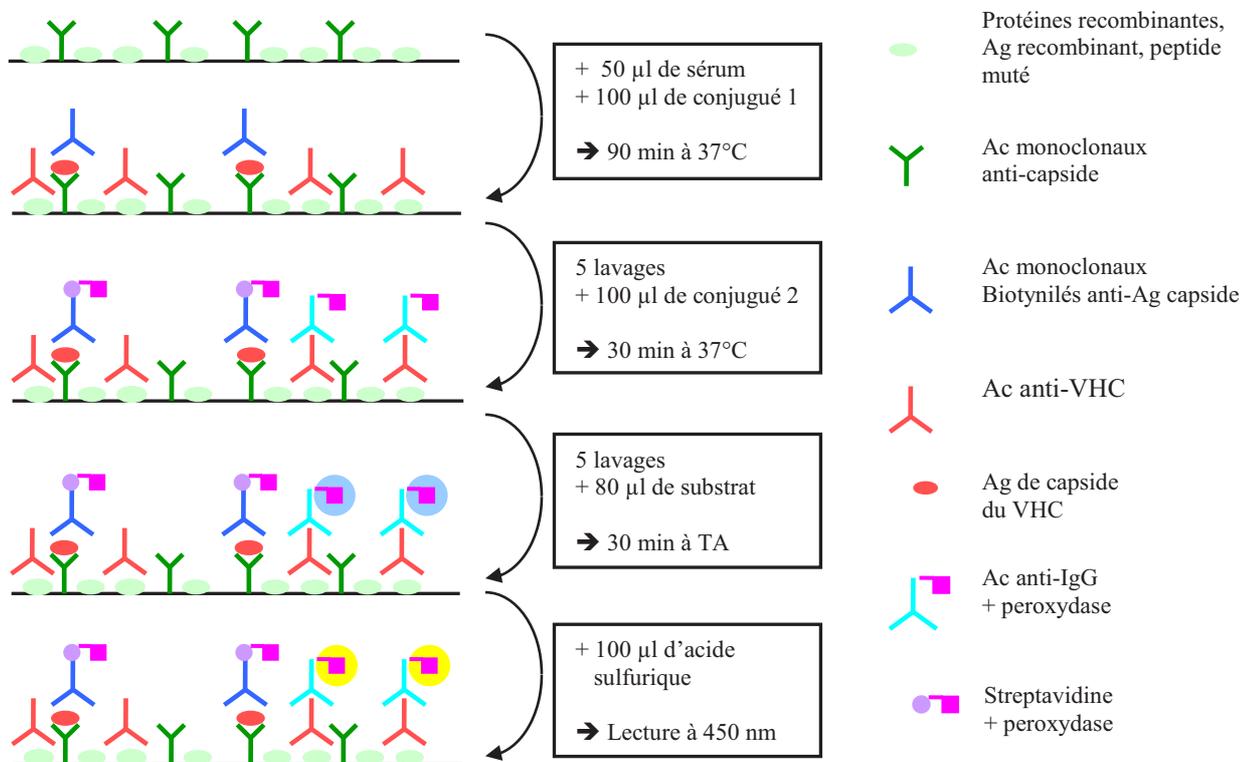


Figure 6 : Principe du test combiné

2 Le prélèvement de sang capillaire

2.1 Réalisation du prélèvement

Le sang capillaire a été prélevé au bout du doigt. Afin de réaliser la piqûre, trois lancettes avec des tailles d'aiguille différentes ont été testées à l'aveugle chez trois sujets différents. Le

choix de la lancette a été guidé par la volonté de trouver un compromis entre la douleur de la piqûre et la quantité de sang obtenue.

Afin de permettre l'identification facile des prélèvements, les gouttes de sang capillaire ont ensuite été déposées sur des cartes de Guthrie (papier buvard Protein saver-card, Wathman 903, Dassel, Allemagne).

2.2 Le test combiné sur sang capillaire

Après avoir déterminé comment éluer le sang capillaire absorbé sur les buvards, nous avons fait varier certains paramètres du protocole standard afin de gagner en sensibilité. Nous avons ainsi joué sur la prise d'essai, la durée d'incubation de l'éluat sur la microplaque, et le cut-off.

2.2.1 Éluetion des buvards

Les buvards ont été découpés à l'aide d'une perforeuse nous permettant d'obtenir des disques de 6 mm de diamètre, cette taille étant adaptée à celle des puits d'une microplaque ELISA 96 puits.

- Choix du tampon

Afin de déterminer le tampon dans lequel les buvards allaient être élués, deux tampons ont été comparés : un tampon Behring (Tampon TRIS/HCl, Tween 20, sérum bovin) et un tampon maison composé de PBS (Tampon salin/phosphate), de 0,05% de Tween 20 et de 1% de SAB (sérum albumine bovine).

Un sérum positif en anticorps anti-VHC a été dilué au 1/10, 1/100, 1/1000, et 1/10000 avec les deux tampons. Le sérum pur, les tampons purs, ainsi que les dilutions du sérum ont été passés avec la technique combinée BioRad. Le but étant de trouver le tampon qui permettait d'obtenir le moins de réactions non spécifiques et la meilleure sensibilité.

- Volume du tampon

Afin de déterminer le volume de tampon nécessaire à l'éluetion des spots de sang, du sang total de patients connus porteurs d'anticorps anti-VHC a été prélevé sur tube EDTA puis déposé sous forme de gouttes de 30 µl sur des buvards. Différents volumes d'éluetion (50, 75,

100, et 150 µl) ont été testés pour un disque dans le but de trouver le plus petit volume possible permettant une élution correcte du prélèvement tout en évitant de trop diluer les anticorps anti-VHC.

L'élution simultanée de deux disques a également été testée afin de voir si on gagnait en sensibilité. Pour ce faire, il a été élué en parallèle et pour le même patient, un disque dans 100 µl de tampon et deux disques dans 100 µl ; pour un autre patient, un disque dans 100 µl de tampon et de deux disques dans 130 µl de tampon.

2.2.2 Adaptation du test combiné au sang capillaire

- Choix de la durée d'incubation

Différents temps d'incubation du sérum sur la microplaque ont été testés (90 minutes, 3 heures, et 15 heures environ). Pour cela, un sérum positif a été dilué et passé en technique combinée avec ces trois temps d'incubation.

- Choix de la prise d'essai

Une prise d'essai de 50 µl d'éluat a été testée, identique à celle utilisée pour réaliser la sérologie sur sérum.

- Choix du cut-off

La technique décrite par le fabricant donne comme positifs tous les échantillons permettant d'obtenir $DO/CO \geq 1$ et comme négatifs ceux avec un $DO/CO < 1$.

Cependant les essais ont été effectués sur des sangs totaux contenant des taux élevés d'anticorps et des spots réalisés artificiellement, donc de ce fait de bonne qualité. En pratique, les prélèvements au bout du doigt ne permettront pas toujours d'obtenir des spots de bonne qualité. En effet, ce type de prélèvement peut parfois être délicat et la quantité de sang obtenue pourra ne pas remplir totalement le disque de 6 mm. Pour ces raisons le cut-off sera réajusté en réalisant une courbe ROC à partir des résultats obtenus par le passage en technique combinée des 201 patients prélevés dans l'étude.

2.3 La PCR VHC sur sang capillaire

La deuxième étape du dépistage de l'hépatite C chez un patient tout juste diagnostiqué séropositif est la RT-PCR VHC afin de savoir s'il a une infection chronique nécessitant une prise en charge médicale ou s'il a spontanément éliminé le virus.

Pour cela nous avons réalisé des RT-PCR VHC sur sang capillaire séché sur buvard en suivant le protocole décrit par l'équipe montpelliéraine de Tuailon *et al* [107]. Brièvement deux disques de buvard sont élués dans une plaque ELISA 48 puits non coatée en les recouvrant de 400 µl de tampon maison (PBS, 0.05% de Tween 20 et de 10% SAB) et avec une agitation de la plaque 2h00 à +4°C. Après une brève centrifugation (20 secondes), 330 µl de surnageant sont prélevés et l'ARN est extrait avec le kit Cobas® Ampliprep TNAI sur l'automate COBAS® Ampliprep (Roche diagnostics, Meylan, France).

Un standard interne est rajouté dans chaque échantillon (50 µl) avant son extraction. Celui-ci sert de contrôle interne d'extraction et son amplification permet de quantifier l'ARN viral. L'amplification est réalisée avec le kit Cobas® Taqman HCV test (HCVHPS) sur l'automate de PCR en temps réel COBAS® Taqman 48 (Roche diagnostics, Meylan, France). La limite de quantification est 15 IU/ml. Les échantillons pour lesquels l'ARN est détecté en dessous de ce seuil sont considérés positifs mais non quantifiables.

Afin de mettre en place le protocole au laboratoire, quatre gouttes de 30 µl de sang total, prélevé sur tube EDTA chez quatre patients porteurs chroniques de l'hépatite C, ont été déposées sur buvard. La charge virale plasmatique a été déterminée en parallèle avec la même technique que pour le sang capillaire afin de déterminer le rapport entre CV plasmatique et CV dans le sang capillaire.

3 Le prélèvement oral

3.1 Réalisation du prélèvement

Différentes études montrent que le dispositif OraSure® (Figure 7) (Orasure Technologies, Bethlehem, USA) permettrait d'obtenir de meilleurs résultats pour la sérologie VHC sur fluide oral que les classiques prélèvements salivaires sur salivette® [84]. L'OraSure® permet

en effet de récupérer du fluide gingival crévulaire (FGC). Il s'agit d'un ultrafiltrat du sang, qui contient donc un rapport IgG/IgA plus important que la salive simple.



Figure 7 : Le dispositif OraSure®

Ce dispositif se compose d'un écouvillon et d'un tube contenant un liquide de conservation.

- L'écouvillon est constitué d'un coton imprégné de tampon salin (0,1% gélatine, 3,5% de chlorure de sodium, 0,3% d'acide citrique ; 0,1% de sorbate de potassium et 0,1% de benzoate de sodium), de pH 7,2. Ces sels créent un environnement hypertonique qui permet de réaliser un transfert passif du fluide interstitiel.
- Le tube contient 800 µl de liquide de conservation dans lequel sera immergé l'écouvillon une fois le prélèvement réalisé. Ce liquide est constitué d'eau stérile, de 0,5% de Tween et de 0,01% de Chlorhexidine digluconate [81].

D'après la notice explicative, pour réaliser le prélèvement l'écouvillon doit être introduit dans la bouche, au niveau de la mâchoire inférieure, entre la joue et la gencive pendant 2 et 5 minutes. Deux prélèvements pouvant être effectués simultanément en introduisant un écouvillon de chaque côté de la bouche.

Contrairement à ce qui était prévu au départ, le dispositif OraSure® n'a pas été utilisé tel qu'indiqué sur la notice. Suite aux premiers essais peu concluants, quelques adaptations ont été réalisées, dans le but de gagner en sensibilité. En effet, les FGC des deux premiers patients

prélevés et passés en technique combinée selon le protocole standard ont donné des densités optiques faibles ne dépassant pas 0,300 même avec une prise d'essai de 100 µl. Ce manque de sensibilité peut être expliqué par deux facteurs : tout d'abord, ce dispositif ne permet pas de récupérer suffisamment de prélèvement notamment chez les patients traités pour leur hépatite C et ayant une hyposialorrhée. Deuxièmement, les anticorps étaient dilués par les 800 µl du liquide de conservation.

Afin de pallier à la sécheresse buccale, nous avons demandé aux patients de mâcher une salivette® (Starsted) contenant de l'acide citrique ayant la propriété de déclencher la salivation, en même temps que le prélèvement était réalisé avec le dispositif Orasure®.

Afin de limiter l'effet de dilution, le volume de liquide conservateur a été réduit. Pour cela, plusieurs volumes : 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ml de liquide de conservation ont été testés. Les volumes ont été comparés deux à deux chez plusieurs patients sur lesquels deux écouvillons étaient prélevés simultanément puis immergés dans deux volumes différents et passés en technique combinée. Nous avons également essayé de remplacer le liquide de conservation par le tampon maison (PBS, 0.05% Tween 20, 1% SAB).

3.2 Adaptation du test combiné au fluide gingival créviculaire

- Choix de la prise d'essai

Les résultats obtenus avec une prise d'essai de 100 µl de sérum connu positif en anticorps anti-VHC ont été comparés à la prise d'essai standard de 50 µl. Le sérum a été passé dilué au 1/10 et au 1/100 car lorsqu'il était passé pur il saturait la plaque et le gain de sensibilité ne pouvait pas être évalué. Un sérum négatif en anticorps anti-VHC a également été testé en parallèle afin de voir si l'augmentation de la prise d'essai n'augmentait pas les réactions non spécifiques.

Deux FGC de patients ont ensuite été passés en technique combinée selon le protocole standard mais avec des prises d'essai de 50 et 100 µl, puis des prises d'essai de 150 et 200 µl. Un FGC provenant d'un patient négatif en anticorps anti-VHC a été passé en parallèle afin de voir si l'augmentation de la prise d'essai n'augmentait pas les réactions non spécifiques.

- Choix de la durée d'incubation

La durée d'incubation du FGC sur la microplaque a été augmentée afin de voir si cela augmentait la sensibilité. Ainsi, les FGC de sept patients positifs en anticorps anti-VHC et de trois patients négatifs en anticorps anti-VHC ont été incubés 1h30 et 15h sur la microplaque en contact avec le conjugué 1.

- Choix du cut-off

Le cut-off a été déterminé avec la moyenne + 3 écarts type des passages de 12 FGC négatifs en anticorps anti-VHC. Mais comme pour le sang capillaire, le passage en technique combinée des 201 FGC des patients de l'étude nous permettra de réajuster le cut-off à l'aide d'une courbe ROC.

3.3 La PCR VHC sur fluide gingival créviculaire

Pour la PCR VHC sur FGC, plusieurs techniques d'extraction et de quantification de l'ARN viral ont été testées sur des FGC provenant de patients avec des charges virales VHC élevées dans le plasma.

Nous avons d'abord essayé d'extraire et de quantifier selon le même protocole que celui utilisé pour le sang capillaire en remplaçant les 330 µl d'éluat de sang capillaire par 330 µl de FGC.

Puis nous avons essayé l'extraction automatique avec l'EasyMag® associée à la technique de quantification décrite pour le sang capillaire.

Enfin, nous avons tenté d'extraire et d'amplifier l'ARN viral avec la même technique que celle utilisée en routine pour la PCR VHC sur plasma (Cobas® Ampliprep/Cobas® Taqman HCV Test).

B Conditions d'utilisation et caractéristiques du test combiné

1 Conditions de conservation des prélèvements

Nous avons déterminé à quelles températures devaient être stockés la salive, en vue de réaliser la technique combinée, et les buvards, en vue de réaliser la technique combinée et la PCR VHC.

1.1 Conservation du fluide gingival crévulaire

En vue de la réalisation du test combiné, la stabilité du FGC a été évaluée à trois températures différentes : température ambiante (TA), +4°C et -20°C sur 12 jours. Le stockage à -20°C servant de température de référence.

Deux pools de FGC ont été constitués, un négatif en anticorps anti-VHC et un positif. Ils ont chacun été stockés à TA, +4°C et -20°C. Le test combiné a été effectué sur les deux pools stockés aux trois températures à J0, J6 et J12. N'ayant pas assez de volume de FGC disponible, nous n'avons pas pu réaliser les dosages à J3 et J9.

1.2 Conservation des buvards

1.2.1 Le test combiné sur buvard

Comme pour le FGC, la stabilité du sang total sur buvard a été testée à température ambiante, +4°C et -20°C, pendant 12 jours.

Du sang total de trois sujets négatifs pour le virus de l'hépatite C a été prélevé sur tube EDTA puis déposé sur buvard. Pour les trois niveaux positifs, du sang total d'un patient connu positif en anticorps anti-VHC a été dilué dans le tampon maison pour sérologie au 1/20 et 1/100. Le sang total pur et ses dilutions ont ensuite été déposés sur papier buvard.

Les six échantillons (3 négatifs et 3 positifs) ont été stockés aux trois températures et la technique combinée a été effectuée à J0, J3, J6, J9 et J12.

1.2.2 La PCR VHC sur buvard

Pour tester la stabilité du sang capillaire déposé sur buvard, 11 échantillons de sang total ont été utilisés : 3 échantillons provenant de sujets connus négatifs pour l'hépatite C, 4 provenant de sujets avec ARN du VHC positifs, et 4 provenant de ces mêmes sujets positifs en ARN viral mais dilués dans le tampon maison pour PCR au 1/100. La température de référence pour le stockage des plasmas en biologie moléculaire étant de -80°C , chacun des échantillons a été stocké à TA, $+4^{\circ}\text{C}$ et -80°C et a été dosé à J0, J3, J5, J9 et J13.

2 Validation des méthodes

Le kit Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra et les kits Cobas® Ampliprep Taqman TNAI/HCV HPS sont des kits validés sur sérum et plasma.

Ces kits ayant été adaptés au sang capillaire et au fluide oral, il a donc été nécessaire de les valider sur ces deux nouveaux prélèvements. D'après le document SH-GTA-04 « Validation des méthodes en Biologie Médicale » [117], ces méthodes peuvent être assimilées à des techniques d'analyse quantitative. Il a donc fallu valider certains paramètres tels que la répétabilité et la reproductibilité.

2.1 Répétabilité

2.1.1 Répétabilité du test combiné

- Sur fluide gingival crévulaire

Pour tester la répétabilité du test combiné sur FGC, un pool de FGC a été réalisé à partir de plusieurs prélèvements stockés à -80°C . Ce pool a été passé en technique combinée pur et dilué au demi avec le tampon pour la sérologie, 8 fois dans la même série.

- Sur sang capillaire

Pour évaluer la répétabilité du test combiné sur sang capillaire, du sang total prélevé sur un tube EDTA chez un patient connu positif pour le VHC a été dilué dans le but d'obtenir trois niveaux : un fort, un moyen et un faible.

- Pour le niveau fort, 30 gouttes de 30 µl de sang total ont été déposées pur sur papier buvard.
- Pour le niveau intermédiaire, le tube EDTA a été centrifugé puis le sérum a été dilué au 1/10 avec du tampon maison pour sérologie puis au demi avec les GR récupérés dans le culot de centrifugation. Au finale une dilution au 1/20 a été obtenue et 30 gouttes de 30 µl ont été déposées sur papier buvard.
- Pour le niveau faible, une dilution au 1/100 a été effectuée en procédant de la même façon que précédemment (dilution au 1/50 du sérum puis au demi avec les GR) puis 30 gouttes ont été déposées sur buvards.

Chacune des dilutions (pur, 1/20, 1/100) a ensuite été passée 15 fois dans la même série.

2.1.2 Répétabilité de la PCR VHC sur sang capillaire

La répétabilité de la PCR VHC sur le prélèvement de sang capillaire a été évaluée à partir de sang EDTA d'un patient porteur du VHC avec une charge virale de 5,6 log UI/ml. En procédant de la même façon que pour la répétabilité de la sérologie, deux dilutions ont été faites, au 1/20 et au 1/200 avec le tampon maison pour PCR.

Chaque dilution a été passée 7 fois dans la même série.

2.2 Reproductibilité

2.2.1 Reproductibilité du test combiné

- Sur fluide gingival créviculaire

Un pool de FGC provenant de patients porteurs d'anticorps anti-VHC a été réalisé afin de tester la reproductibilité de la technique combinée sur le FGC.

Ce pool a été passé 1 fois par jour pendant 5 jours.

- Sur sang capillaire

La reproductibilité du test combiné sur sang capillaire a été évaluée, tout comme pour la répétabilité, à partir du sang total contenu dans un tube EDTA sur lequel deux dilutions ont été effectuées : au 1/20 et au 1/200.

Le sang total a été déposé pur, au 1/20, et au 1/200 sur buvard puis passé 1 fois par jour pendant 4 jours.

2.2.2 Reproductibilité de la PCR VHC sur sang capillaire

Tout comme pour l'étude de la répétabilité sur la PCR VHC, deux dilutions ont été réalisées à partir d'un tube EDTA prélevé chez un patient atteint d'une hépatite C chronique non traitée ayant une CV de 5,6 log UI/ml.

Le sang total pur, au 1/20, et 1/200 a été déposé sur buvard et passé 1 fois par jour pendant 5 jours.

C L'étude DIAGVHC

1 Les patients inclus

Les patients inclus dans cette étude ont été ceux venant en consultation externe au Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Grenoble dans le service d'hépatogastroentérologie ou au CISIH, d'Avril à Juillet 2011. Ils devaient être majeurs, affiliés à la sécurité sociale, avoir lu la fiche d'information (annexe 2), et avoir signé le consentement (annexe 3).

Le nombre de patients et leurs critères virologiques ont été choisis pour refléter les proportions retrouvées lors du dépistage de l'hépatite C dans la population toxicomane IV.

Il a donc été inclus 88 patients avec une sérologie VHC négative et 113 patients avec une sérologie VHC positive, sélectionnés sur la base de résultats sérologiques VHC antérieurs. La présence ou l'absence des anticorps anti-VHC a été confirmée sur le sérum prélevé le jour de l'étude avec le test Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra (BioRad).

Parmi les 113 patients avec une sérologie VHC positive, 17 étaient co-infectés par le VIH et 2 par le VHB. 12 des 17 sujets co-infectés VIH-VHC avaient un ARN du VIH indétectable. Les 5 autres co-infectés avaient une charge virale VIH de 43 copies/ml en moyenne.

Parmi les 88 patients négatifs pour l'hépatite C, 22 étaient mono-infectés par le VIH et 16 par le VHB. La moyenne des charges virales des 8 sujets avec ARN VIH détectable était de 8150 copies/ml. 14 mono-infectés VIH avaient des charges virales indétectables. Parmi les 16 mono-infectés VHB, 11 avaient un ARN viral indétectable et 5 une charge virale moyenne de 1329800 UI/ml.

Sur les plasmas collectés le jour de l'étude, 63 des 113 sujets porteurs d'anticorps anti-VHC avaient une charge virale VHC quantifiable, 7 une charge virale détectable mais non quantifiable (<15 UI/ml), et 43 un ARN indétectable par les techniques Cobas® Ampliprep/Cobas® Taqman HCV Test (Roche diagnostics, Meylan, France). Parmi les 43 sujets porteurs d'anticorps anti-VHC mais indétectables en PCR VHC, 16 étaient sous thérapie anti-VHC au moment de l'étude. La répartition des génotypes du VHC était la suivante : 73% de génotype 1, 3% de génotype 2, 11% de génotype 3, et 14% de génotype 4.

2 Les prélèvements réalisés

Les résultats de la phase de mise au point décrite ci-dessus nous ont permis de valider le protocole suivant :

Il a été réalisé chez chaque patient :

- Un prélèvement de sang capillaire permettant de récupérer huit gouttes de sang total déposées sur buvard et une goutte directement déposée sur le test OraQuick® HCV.
- Deux prélèvements oraux : l'un avec le dispositif OraSure® puis l'autre avec la spatule reliée directement à l'OraQuick® HCV.
- Un prélèvement veineux, au pli du coude de 5 ml de sérum et 5ml de plasma.

2.1 Les prélèvements de sang capillaire

Le sang capillaire a été prélevé au niveau de la pulpe du bout du doigt après réalisation d'une légère incision avec une microlancette (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) de taille moyenne (0,81mm).

Pour chaque patient, huit spots de 30 µl environ ont été déposés sur un papier buvard (Whatman 903, Dassel, Allemagne), qui est également celui des cartes de Guthrie utilisées pour les dépistages néonataux. Pour le prélèvement de sang capillaire destiné au test OraQuick® HCV, après avoir déposé les huit gouttes sur le buvard, une goutte a été récupérée à l'aide de l'anse calibrée fournie avec l'OraQuick® HCV. L'anse a ensuite été immédiatement insérée dans la solution révélatrice du test OraQuick® HCV.

Les buvards ont séché à température ambiante durant 18 à 24 heures et une fois secs, huit disques de 6mm ont été perforés. Les températures optimales de stockage des prélèvements n'ont pas pu être déterminées avant les premiers prélèvements de patients. Les températures de référence étant de -20°C en sérologie et de -80°C en PCR, il a été décidé de stocker la moitié des disques à -20°C et l'autre moitié à -80°C.

2.2 Les prélèvements oraux

Un des prélèvements oral a été effectué avec le tampon OraSure®. Celui-ci a été glissé entre la joue et la gencive du bas, une minute de chaque côté, tout en mâchant une salivette®. Puis la salivette® a été jetée et le tampon cassé dans le tube OraSure® contenant 0,4 ml de liquide de conservation.

Le prélèvement a été mis dans un sac plastique puis transporté au laboratoire de Virologie à température ambiante. Il a été stocké dans les 6 heures suivant le prélèvement.

Le FGC absorbé sur le tampon a ensuite été récupéré comme indiqué par le fabricant (centrifugation 10 minutes à 1000 g). 450 µl du prélèvement destiné à la sérologie ont été stockés à -20 °C. Le reste du prélèvement a été stocké à -80°C.

L'autre prélèvement oral a été directement effectué avec la spatule reliée au test rapide OraQuick® HCV en la passant une fois le long des gencives du haut et du bas.

3 Les techniques utilisées

3.1 Le test combiné : Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra

3.1.1 Le test combiné sur sérum

La sérologie VHC a été réalisée sur le sérum avec le test combiné Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra selon le protocole standard utilisé en routine au laboratoire de virologie du CHU de Grenoble.

Le test combiné sur sérum est la méthode de référence à laquelle le test combiné sur sang capillaire et sur fluide oral seront comparés.

3.1.2 Le test combiné sur sang capillaire

- Éluion des spots de sang total

Afin de réaliser la technique combinée à partir du sang capillaire déposé sur buvard, le sang total contenu dans les disques préalablement stockés à -20°C a été élué la veille du test.

Pour chaque patient, deux disques ont été déposés dans un puits d'une microplaque ELISA 96 puits non coatée puis recouverts par 130 µl de tampon maison (PBS, de 0,05% Tween et de 1% sérum albumine bovine).

La plaque ELISA a ensuite été mise sous agitation lente, à température ambiante, toute une nuit.

- Réalisation du test combiné

Après la nuit d'éluion, la technique combinée a été réalisée avec le kit Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra selon le protocole standard utilisé pour le sérum, en remplaçant celui-ci par 50 µl d'éluat.

3.1.3 Le test combiné sur fluide gingival crévulaire

La technique combinée sur FGC stocké à -20°C a également été réalisée avec le kit Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra.

Hormis une prise d'essai augmentée à 200 µl de FGC, le protocole a été le même que celui utilisé pour le sérum.

3.2 L'OraQuick® HCV

Le test rapide OraQuick® HCV a été réalisé, chez tous les patients, sur fluide oral et sur sang capillaire.

Le prélèvement oral a été effectué directement avec la spatule reliée au dispositif test puis celle-ci a été insérée dans la solution révélatrice (0,75 ml de tampon phosphate contenant des polymères et un agent antimicrobien) fournie dans le kit OraQuick® HCV.

Pour le sang capillaire, une fois le prélèvement mélangé à la solution révélatrice, la spatule reliée au dispositif test a été insérée dans ce mélange.

Pour le prélèvement oral comme pour le sang capillaire, les résultats ont été lus entre 20 à 40 minutes suivant l'introduction de la spatule dans la solution révélatrice.

3.3 La quantification de l'ARN du VHC

3.3.1 La quantification de l'ARN du VHC sur plasma

La PCR VHC a été réalisée sur le plasma avec la technique utilisée en routine au laboratoire de virologie du CHU de Grenoble, Cobas® Ampliprep/Cobas® Taqman HCV test (Roche diagnostics, Meylan, France).

C'est la méthode de référence à laquelle la PCR VHC sur sang capillaire sera comparée.

3.3.2 La quantification de l'ARN du VHC sur sang capillaire

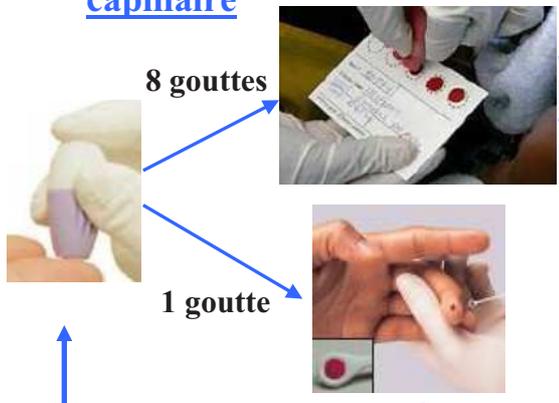
Pour effectuer la PCR VHC sur le sang capillaire, les disques de sang total stockés à -80°C ont été élués le jour de la technique.

Pour l'éluion des buvards, l'extraction et la quantification de l'ARN viral, nous avons suivi le protocole de Tuillon *et al*, détaillé précédemment.

En hépato-gastro, au CISIH ou au centre de prélèvement

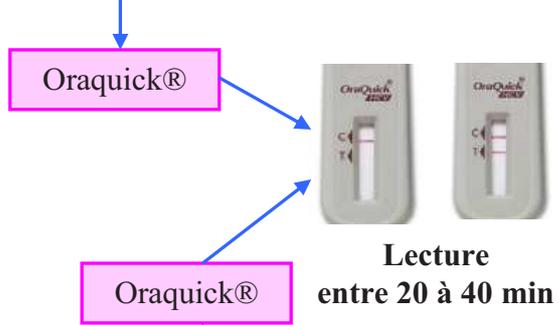
Au laboratoire

Prélèvements de sang capillaire



RT-PCR

Sérologie Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra



Le patient



Sérologie Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra



Prélèvement veineux



Plasma : RT-PCR

Sérum : Sérologie Monolisa® Ag-Ac HCV Ultra

Figure 8 : Schéma des prélèvements effectués par patient

PRESENTATION DES RESULTATS

A Mise au point des techniques utilisées dans l'étude DIAGVHC

1 Le prélèvement capillaire

1.1 Réalisation du prélèvement

De façon générale, la douleur est restée minimale avec les trois lancettes. La lancette de petit calibre ne nous permettant pas d'obtenir suffisamment de sang total, nous avons choisi la lancette de moyen calibre qui permettait de prélever sans problème jusqu'à huit gouttes de sang total d'environ 30 μ l.

1.2 Le test combiné sur sang capillaire

1.2.1 Éluion des buvards

- Choix du tampon

Les anticorps anti-VHC ont été détectés jusqu'à la dilution au 1/100^{ème} avec les deux tampons. Le bruit de fond était de 0,053 en DO pour le tampon maison et de 0,048 pour le tampon Behring, soit sensiblement identique pour les deux tampons. Cependant les DO moyennes obtenues sur le sérum dilué avaient tendance à être supérieures avec le tampon maison (DO=0,75 versus DO=0,68).

Nous avons donc choisi d'éluier les buvards avec notre tampon maison.

- Volume de tampon

50 μ l de tampon se sont avérés insuffisants pour recouvrir parfaitement et éluier correctement le disque. A partir de 75 μ l, la quantité de tampon était suffisante pour bien recouvrir le disque mais le disque de buvard absorbant une partie du tampon, ce volume

restait insuffisant pour assurer une prise d'essai d'au moins 50 µl. Un volume de 100 µl permettait d'éluer correctement un disque.

Pour l'élution de deux disques, 100 µl de tampon se sont avérés justes pour assurer une prise d'essai de 50 µl. Cependant la DO observée avec deux disques était significativement supérieure (différence > 3 fois DO témoin négatif) à celle observée avec un disque. L'élution de deux disques dans 130 µl de tampon a permis un net gain de sensibilité (Tableau III).

Sang capillaire VHC+	Densité Optique	
	1 disque dans 100 µl	2 disques dans 130 µl
Pur	2,111	2,255
1/10	0,658	0,976

Tableau III : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné après élution d'un disque de sang capillaire (Ac anti-VHC positifs) dans 100 µl de tampon versus deux disques dans 130 µl de tampon

Il a donc été décidé d'éluer deux disques de 6 mm de diamètre dans 130 µl de tampon maison.

1.2.2 Adaptation du test combiné au sang capillaire

- Choix de la durée d'incubation

La variation du temps d'incubation ne permet pas de gagner une dilution par rapport à l'heure et demie standard préconisée par le fabricant. Les densités optiques sont en moyennes légèrement plus élevées avec 3h00 d'incubation (DO=1,2 versus 1,1) ou 15h00 d'incubation (DO=1,2 versus 1,1) mais le gain de sensibilité est faible en comparaison au temps technique rajouté (Tableau IV). Il a donc été décidé de passer les buvards avec le test combiné en conservant une durée d'incubation de 1h30.

Sérum VHC+	Durée d'incubation		
	1h30	3h00	15h00
Pur	2,47	2,55	2,30
1/10	2,23	2,37	2,25
1/100	0,63	0,89	1,18
1/1000	0,09	0,11	0,17
1/10000	0,06	0,07	0,08

(Sérum VHC+ : Sérum positif en anticorps anti-VHC passé pur, dilué au 1/10, 1/100, 1/1000, et 1/10000)

Tableau IV : Résultats en densités optiques du test combiné sur sérum et ses dilutions en fonction de la durée d'incubation avec le conjugué 1 (1h30 ; 3h ; 15h)

- Choix de la prise d'essai

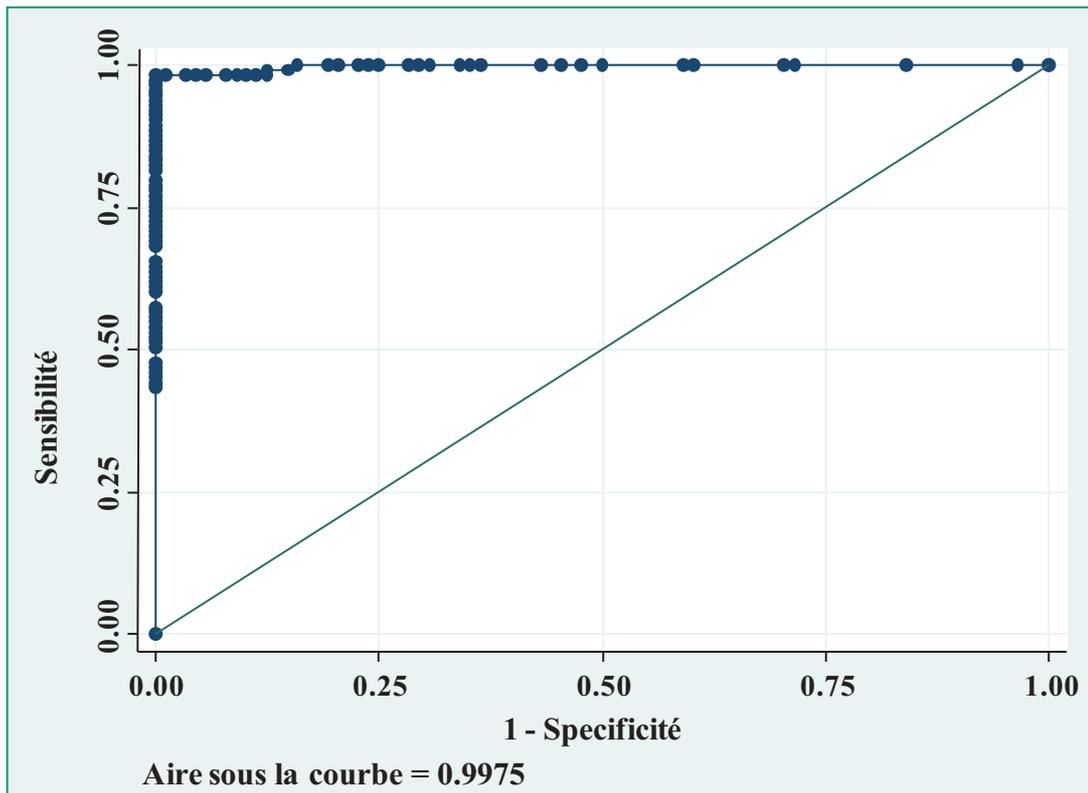
Une prise d'essai de 50 µl d'éluat a permis d'obtenir des DO proches de celles obtenues avec 50 µl de sérum, ce volume a donc été retenu pour la suite des expériences.

Au final, pour la réalisation du test combiné sur sang capillaire déposé sur buvard, il a été décidé de n'augmenter ni la prise d'essai ni la durée d'incubation par rapport à la méthode standard sur sérum.

- Choix du cut-off

Le cut-off établi au départ était le même que pour le sérum, c'est-à-dire placé à DO/CO=1.

Le passage des 201 patients en technique combinée a donné une moyenne des DO de $5,70 \pm 1,45$ pour les sérums positifs en Ac anti-VHC versus $1,73 \pm 0,51$ pour les sangs capillaires ; et de $0,16 \pm 0,07$ pour les sérums négatifs en Ac anti-VHC versus $0,08 \pm 0,02$ pour les sangs capillaires. Etant données les DO nettement inférieures sur sang capillaire par rapport au sérum, le cut-off a été réajusté à 0,20 de DO à l'aide d'une courbe ROC (Figure 9). Un cut-off à 0,20 de DO permet d'obtenir une sensibilité de 98,23% et une spécificité de 100% (Annexe 4).



(La courbe ROC représente l'évolution de la sensibilité d'un test en fonction de 1- spécificité quand on fait varier le cut-off ; Technique de référence = technique combinée sur sérum)

Figure 9 : Courbe ROC obtenue par le passage des 201 sangs capillaires avec le test combiné

1.3 La PCR VHC sur sang capillaire

Les résultats obtenus en PCR VHC sur le sang capillaire de quatre patients montrent que l'on retrouve le même rapport entre la PCR VHC sur plasma et sur sang capillaire que dans l'article de Tuailon *et al* : $\log(\text{ARN}_{\text{plasma}}) = 1,426 + 1,208 \times \log(\text{ARN}_{\text{sg capillaire}})$ (Tableau V).

	PCR VHC (log UI/ml)		
	Plasma	Sang capillaire	$1,426 + 1,208 \times \log \text{ARN}$
Patient 1	4,2	2,2	4,0
Patient 2	5,3	3,3	5,4
Patient 3	5,4	3,4	5,5
Patient 4	DNQ	TND	

(TND= target not detected c'est-à-dire absence d'ARN VHC détecté ; DNQ : détectable non quantifiable c'est-à-dire ARN VHC détecté mais < 15UI/ml)

Tableau V : PCR VHC sur sang capillaire et sur plasma de 4 patients avec ARN VHC positif

La PCR VHC sur sang capillaire n'a pas nécessité d'adaptation par rapport au protocole de Tuailon *et al.*

2 Le prélèvement oral

2.1 Réalisation du prélèvement

Les problèmes de sensibilité rencontrés au départ nous ont amenés à modifier la réalisation du prélèvement avec le dispositif OraSure®. Nous avons donc joué sur la quantité de FCG récupérée et sur le volume de liquide de conservation.

La mastication de la salivette® pendant tout le temps où l'écouvillon OraSure® était dans la bouche a permis d'augmenter la quantité de prélèvement obtenu.

Le fait de laisser l'écouvillon OraSure® d'un côté de la bouche pendant une minute puis de l'autre pendant encore une minute a également permis d'obtenir plus de prélèvement qu'en le laissant deux minutes d'un même côté.

Les volumes de liquide de conservation de 0 et 0,2 ml étaient insuffisants pour obtenir assez de prélèvement. La comparaison chez quatre patients de 0,4 ml versus 0,8 ml de liquide de conservation a montré que les DO obtenues étaient significativement supérieures avec 0,4 ml de liquide (Tableau VI).

	Volume de liquide conservation	
	0,8 ml	0,4 ml
Patient 1	0,65	1,40
Patient 2	0,40	0,75
Patient 3	0,19	0,19
Patient 4	0,46	1,30

(Patient 1, 2, 3, et 4 : FGC de patients positifs en anticorps anti-VHC sur sérum)

Tableau VI : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC pour 0,4 et 0,8 ml de liquide de conservation

Les essais réalisés avec notre tampon maison ayant donné des résultats similaires, nous avons décidé de rester sur 0,4 ml de liquide de conservation. Ces adaptations ont permis de gagner en sensibilité tout en collectant suffisamment de prélèvement pour l'analyse et en garantissant sa bonne conservation.

2.2 Adaptation du test combiné au fluide gingival crévulaire

Pour adapter la technique combinée au FGC, nous avons essayé d'augmenter la prise d'essai, la durée d'incubation du FGC sur la plaque, et de jouer sur le CO.

- Choix de la prise d'essai

Pour le sérum, la dilution au 1/10 sature encore la plaque cependant au 1/100 l'augmentation de la prise d'essai permet de gagner nettement en DO pour le patient VHC positif sans pour autant augmenter la DO du patient VHC négatif (Tableau VII).

		Volume de la prise d'essai	
		50 µl	100 µl
Sérum VHC+	1/10	2,22	2,22
	1/100	1,11	1,64
Sérum VHC-		0,04	0,03

(Sérum VHC+ : sérum positif en Ac anti-VHC ; Sérum VHC- : sérum négatif en Ac anti-VHC)

Tableau VII : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné sur sérum en fonction de la prise d'essai (100 µl versus 50 µl)

Pour les FGC, aux vues des résultats, objectivant un manque de sensibilité même avec une prise d'essai de 100 µl (Tableau VIII), nous avons décidé d'augmenter encore la prise d'essai.

FGC	Volume de la prise d'essai	
	50 µl	100 µl
Patient 1	0,12	0,11
Patient 2	0,17	0,26

(Patient 1 et 2 : FGC de patients positifs en anticorps anti-VHC sur sérum)

Tableau VIII : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC en fonction de la prise d'essai (100 µl versus 50 µl)

Sur cinq patients, une prise d'essai de 200 μ l de FGC donne en moyenne des DO supérieures ($0,17 \pm 0,07$) à celles obtenues avec une prise d'essai de 150 μ l ($0,14 \pm 0,06$), sans perdre en spécificité puisque la DO du patient négatif n'augmente pas (Tableau IX).

	Volume de la prise d'essai	
	150 μ l	200 μ l
Patient VHC+ 1	0,13	0,17
Patient VHC+ 2	0,14	0,19
Patient VHC+ 3	0,06	0,07
Patient VHC+ 4	0,21	0,24
Patient VHC+ 5	0,15	0,17
Patient VHC-	0,06	0,05

(Patient VHC+ 1, 2, 3, 4, et 5 : FGC de patients positifs en Ac anti-VHC sur sérum ; Patient VHC- : FGC d'un patient négatif en Ac anti-VHC sur sérum)

Tableau IX : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC en fonction de la prise d'essai (150 μ l et 200 μ l)

La taille des puits de la microplaque du test combiné ne permet pas d'augmenter d'avantage le volume de la prise d'essai. Nous avons donc choisi de rester sur une prise d'essai de 200 μ l de FGC.

- Choix de la durée d'incubation

Lorsque la durée d'incubation augmente de 1h30 à 15h, on observe une augmentation des DO aussi bien pour les patients positifs que pour les patients négatifs. Il y a donc une perte de spécificité (Tableau X). Nous avons par conséquent choisi de ne pas augmenter la durée d'incubation des FGC sur la microplaque.

	Durée d'incubation	
	1h30	15h
Patient VHC+ 1	0,19	0,26
Patient VHC+ 2	0,13	0,28
Patient VHC+ 3	0,17	0,27
Patient VHC+ 4	0,17	0,45
Patient VHC+ 5	0,50	0,87
Patient VHC+ 6	0,08	0,16
Patient VHC+ 7	0,07	0,11
Patient VHC- 1	0,05	0,09
Patient VHC- 2	0,04	0,12
Patient VHC- 3	0,04	0,12

(Patient VHC+ 1, 2, 3, 4, 5, 6, et 7 : FGC de patients positifs en Ac anti-VHC sur sérum ; Patient VHC- 1, 2, 3 : FGC de patients négatifs en Ac anti-VHC sur sérum)

Tableau X : Comparaison des densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC en fonction de la durée de l'incubation du FGC avec le conjugué 1 (1h30 versus 15h)

- Choix du cut-off

Le cut-off de départ était de 0,069 (soit $0,051 + 3 \times 0,006$) (Tableau XI).

Témoins VHC négatifs	Densité optique
1	0,059
2	0,048
3	0,052
4	0,047
5	0,049
6	0,061
7	0,056
8	0,057
9	0,052
10	0,048
11	0,044
12	0,044

Moyenne	0,051
Ecart type	0,006

Tableau XI: Résultats du passage des FGC des témoins VHC négatifs (= patients négatifs en Ac anti-VHC sur sérum)

Le passage des 201 FGC avec la technique combinée a permis de réajuster le cut-off à l'aide d'une courbe ROC (Figure 10). Nous avons choisi de placer le cut-off à 0,10 de DO, ce qui permet d'obtenir une sensibilité de 71,68% et une spécificité de 94,32% (Annexe 5).

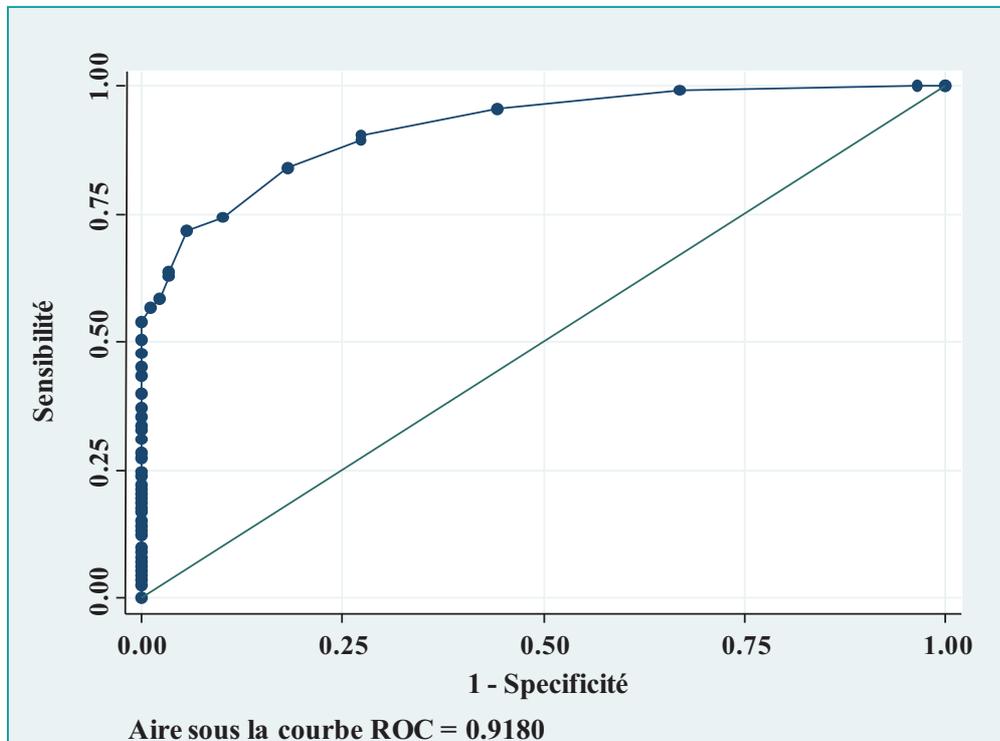


Figure 10 : Courbe ROC obtenue avec les résultats du passage des 201 FGC avec le test combiné

2.3 La PCR VHC sur fluide gingival crévulaire

Aucunes des trois techniques utilisées ne nous a permis de détecter l'ARN du VHC dans le FGC. La PCR VHC n'étant qu'un objectif secondaire de cette étude, nous n'avons pas poursuivi nos investigations et avons décidé de ne pas quantifier l'ARN viral dans les FGC des patients de l'étude.

B Conditions d'utilisation et caractéristiques du test combiné

1 Conditions de conservation des prélèvements

1.1 Conservation du fluide gingival crévulaire

Le cut-off établi grâce à la courbe ROC est de 0,10 en DO.

A température ambiante, le pool de patients VHC négatifs est proche du seuil de positivité à J12 (Figure 11).

Aux autres températures (+4°C et -20°C), il n'y a pas de variations significatives pour le pool négatif.

Pour le pool positif aucunes variations significatives ne sont observées durant les 12 jours, que le stockage soit à TA, +4°C ou -20°C.

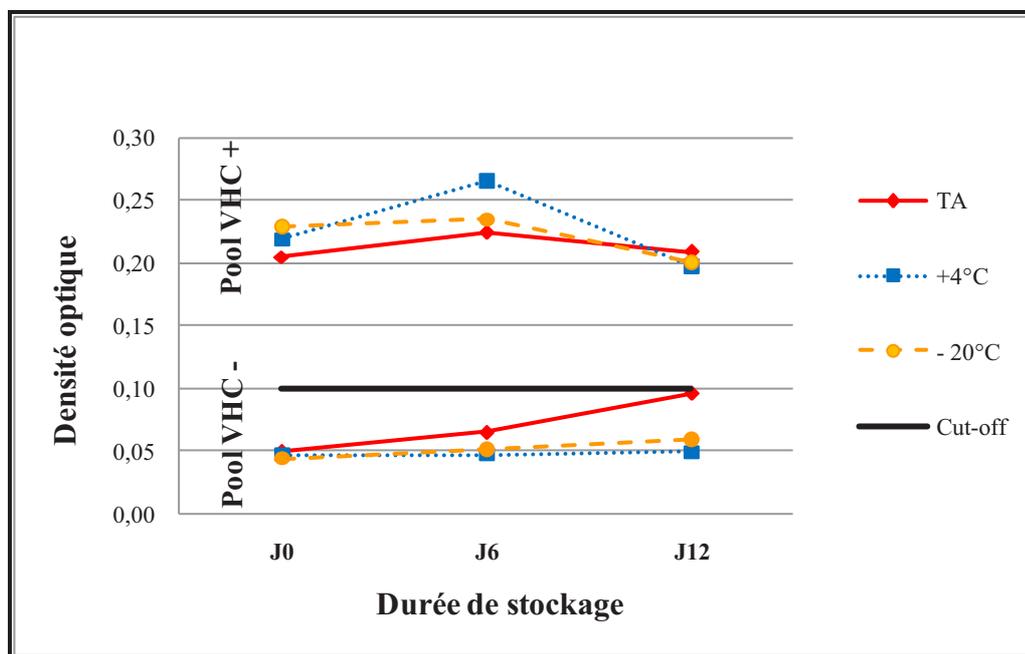


Figure 11 : Évolution des densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC au cours du stockage (J0, J6, et J12) à TA, +4°C et -20°C

1.2 Conservation des buvards

1.2.1 Le test combiné sur buvard

En prenant le cut-off à 0,20 de DO, comme défini précédemment avec la courbe ROC, on observe que les sangs capillaires des trois patients VHC négatifs se positivent en anticorps anti-VHC dès le 3^{ème} jour de stockage à TA. A +4°C, deux des trois patients négatifs sont au seuil de positivité à J6 et les trois sont positifs à J12. Cependant, les sangs capillaires VHC négatifs stockés à -20°C ne se positivent pas (Figure 12).

Pour les patients positifs, que le stockage se fasse à TA, +4°C ou -20°C, aucune variation significative des DO n'est observée au cours du temps.

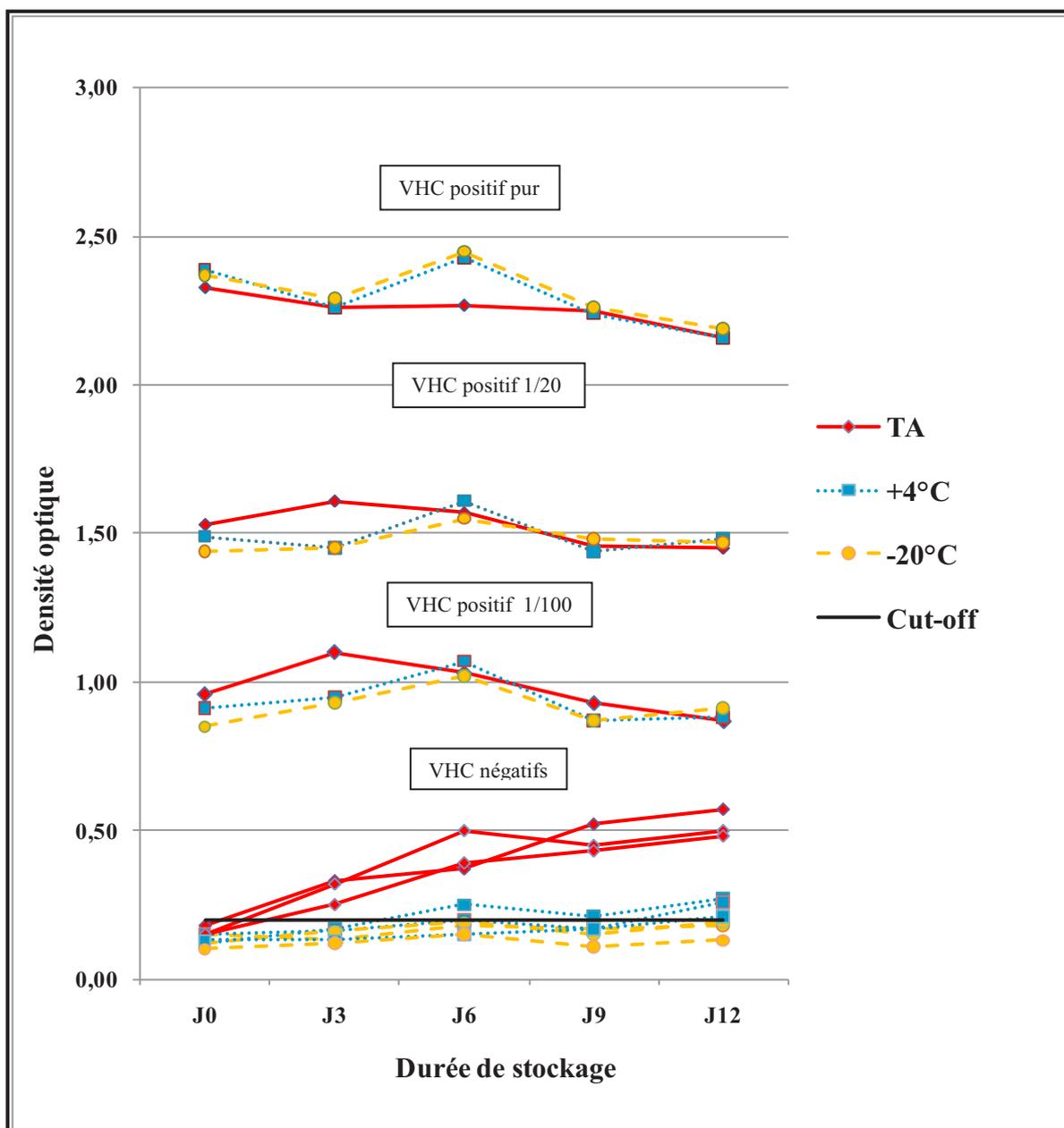


Figure 12 : Évolution des densités optiques obtenues avec le test combiné sur sang capillaire au cours du stockage (J0, J3, J6, J9, et J12) à TA, + 4°C et - 20°C.

1.2.2 La PCR VHC sur buvard

L'étude de l'évolution de la charge virale sur buvard à différentes températures de stockage montre tout d'abord que les sujets possédant une CV indétectable à J0 conservent une CV indétectable à J13 (Figure 13).

Chez les patients avec ARN viral quantifiable, une décroissance de la charge virale est observée à J13 de 0,96 log UI/ml (+/- 0,45) à TA versus 0,45 log UI/ml (+/- 0,40) et 0,16 log

UI/ml (+/- 0,19) à +4°C et -80°C respectivement. On observe donc à TA une décroissance significative de la CV. Aux trois températures de stockage, la décroissance moyenne est similaire sur sang capillaire pur et sang capillaire dilué au 1/100.

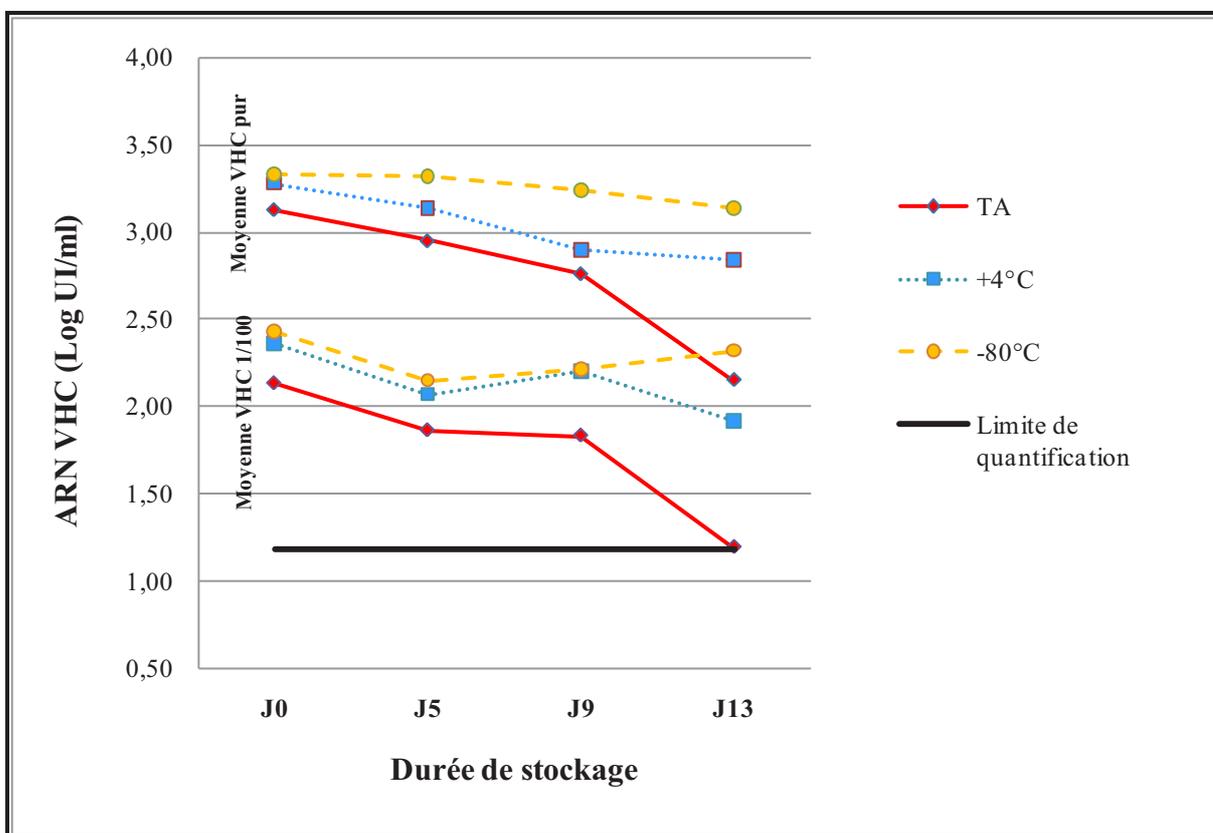


Figure 13 : Évolution de la charge virale sur sang capillaire au cours du stockage (J0, J5, J9, et J13) à TA, +4°C et -80°C.

2 Validation des méthodes

2.1 Répétabilité

2.1.1 Répétabilité du test combiné

- Sur fluide gingival crévulaire

Les passages des pools de FGC pur et dilué au demi, 8 fois dans la même série permettent d'obtenir un coefficient de variation de 6,50% et 10,87% pour le pool pur et le pool dilué respectivement.

- Sur sang capillaire

Les coefficients de variation obtenus sont de 2,70% pour le sang capillaire pur, 3,22% pour le sang capillaire dilué au 1/20, et 4,14% pour le sang capillaire dilué au 1/100.

2.1.2 Répétabilité de la PCR VHC sur sang capillaire

L'étude de la répétabilité de la PCR sur sang capillaire déposé sur buvard montre des CV de 11,1%, 23,3% et 22,1% pour le sang capillaire pur, au 1/20 et au 1/200 respectivement.

2.2 Reproductibilité

2.2.1 Reproductibilité du test combiné

- Sur fluide gingival crévulaire

La reproductibilité du test combiné sur FGC permet d'obtenir des DO allant de 0,14 à 0,28 ce qui donne un coefficient de variation à 27,38%.

- Sur sang capillaire

L'étude de la reproductibilité du test combiné sur le sang capillaire montre des coefficients de variation de 19,49%, 16,58% et 14,63% sur les sangs capillaires purs, au 1/20, et 1/200 respectivement.

2.2.2 Reproductibilité de la PCR VHC sur sang capillaire

L'étude de la reproductibilité de la PCR VHC sur sang capillaire montre des coefficients de variation de 21,1%, 16,3%, et 38% pour le sang total pur, au 1/20, et au 1/200 respectivement.

C L'étude DIAG VHC

L'ensemble des résultats des 201 patients en technique combinée sur sérum, sang capillaire, et FGC, ainsi qu'en test rapide OraQuick® HCV sur sang capillaire et FGC, et en RT-PCR sur plasma et sang capillaire, figurent dans le tableau en annexe 6.

Dans notre étude, la prévalence des anticorps anti-VHC est de 56,2% et celle de l'ARN viral est de 34,8%.

1 Performance du dépistage de l'hépatite C sur sang capillaire et fluide oral

Les performances des différents tests réalisés dans notre étude sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau XII).

Type de prélèvement	Technique	Se [95%IC]	Sp [95%IC]	VPP	VPN	Kp	LR +	LR -	VP	FP	VN	FN
Sang capillaire	Oraquick®	97,4% [92.48 ; 99.09]	100% [95.82 ; 100]	100%	96,7%	1	∞	0,0265	110	0	88	3
	Test combiné	98,2% [93.78 ; 99.51]	100% [95.82 ; 100]	100%	97,8%	1	∞	0,0177	111	0	88	6
Fluide oral	Oraquick®	94,6% [88.61 ; 97.48]	100% [95.72 ; 100]	100%	93,5%	0,9	∞	0,0545	104	0	86	2
	Test combiné	71,7% [62.77 ; 79.17]	94,3% [87.38 ; 97.54]	94,2%	72,2%	0,6	12,62	0,3	81	5	83	32

(Se : Sensibilité ; Sp : Spécificité ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative ; Kp : Indice Kappa de concordance ; LR : Likelihood ratio ; VP : Vrai positifs ; FP : Faux positifs ; VN : Vrai négatifs ; FN : Faux négatifs)

Tableau XII : Performances de l'OraQuick® et du test combiné sur sang capillaire et fluide oral

1.1 L'OraQuick® HCV

Pour le prélèvement de sang capillaire, le test rapide OraQuick® HCV donne une sensibilité de 97,35% [92.48 ; 99.09] et une spécificité de 100% [95.82 ; 100] (Tableau XII). Le coefficient Kappa de concordance avec la méthode de référence est de 0,97, ce qui est jugé très bon.

Trois faux négatifs ont été observés :

- Le premier, chez un usager de drogue IV ayant une charge virale indétectable après une guérison spontanée et un index (=DO/CO) faible sur sérum (I=1,7).
- Les deux autres, chez des patients co-infectés par le VIH, ayant un ARN viral indétectable suite à une guérison spontanée ou à un traitement pour le VHC et des index sur sérum d'intensité moyenne (I=2,5 et 3,3).

La valeur prédictive positive (VPP) est de 100% et la valeur prédictive négative (VPN) de 97,8%.

Sur le prélèvement oral, la sensibilité est légèrement inférieure, à 94,55% [88.61 ; 97.48], et la spécificité à 100% [95.72 ; 100] sur 196 patients (Tableau XII).

On retrouve six faux négatifs, dont deux chez des patients avec une CV indétectable, trois chez des patients avec une CV indétectable et une sérologie VIH positive et un chez un sujet porteur du VIH ayant une PCR VHC positive.

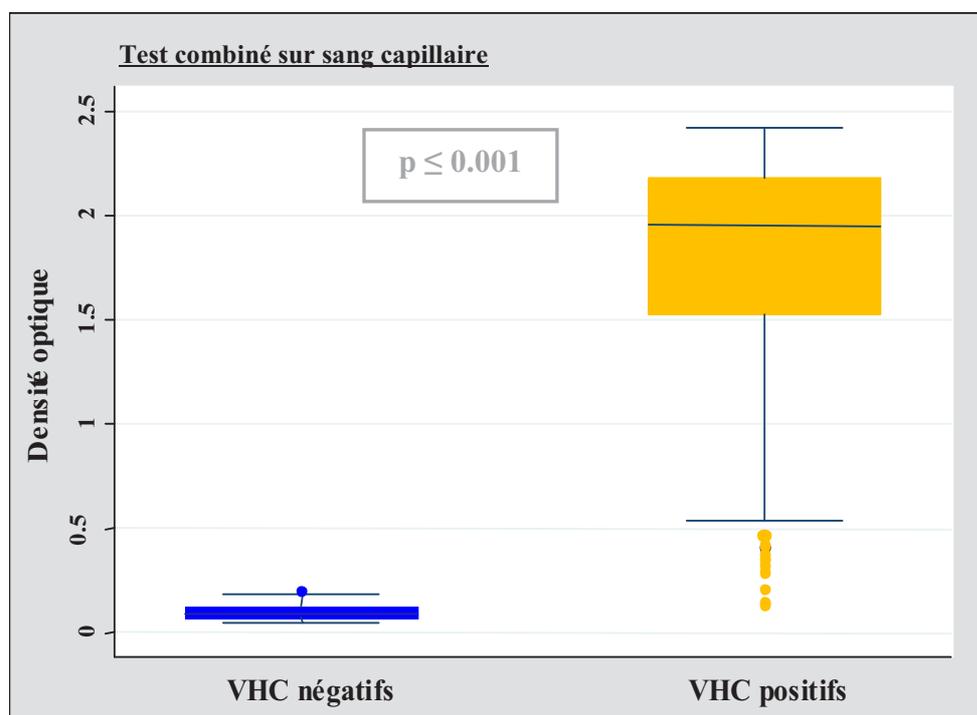
La VPP est de 100% et la VPN de 93,48%.

Il faut préciser que cinq prélèvements oraux étaient invalides (absence de la bande contrôle) et ont été écartés du calcul des performances du test. S'ils avaient été pris en compte, on trouverait une sensibilité de 92%, une spécificité de 97,7%, une VPP de 98,11%, et une VPN de 90,53%.

1.2 Le test Monolisa HCV Ag-Ab Ultra® (Bio-Rad)

La moyenne des DO est de $5,70 \pm 1,45$ pour les sérums des patients positifs en anticorps anti-VHC et de $1,73 \pm 0,51$ pour les sangs capillaires positifs en anticorps anti-VHC.

Chez les patients négatifs en anticorps anti-VHC, la moyenne est de $0,16 \pm 0,07$ pour les sérums et de $0,08 \pm 0,02$ pour les sangs capillaires (Figure 14)



(Principe du diagramme en boîte : représente la distribution des valeurs ; le rectangle va du premier quartile au troisième quartile et est coupé par la médiane ; les segments aux extrémités mènent jusqu'aux valeurs extrêmes)

Figure 14 : Densités optiques obtenues avec le test combiné sur sang capillaire chez les patients Ac anti-VHC+ et Ac anti-VHC-

Avec le cut-off fixé au départ ($DO/CO=1$), la sensibilité est de 92,5% environ et la spécificité de 100% pour le test combiné sur buvard.

Le cut-off réajusté à 0,20 de DO permet d'obtenir une sensibilité de 98,23% [93,78 ; 99,51] et de garder une spécificité de 100% (Tableau XII). Le coefficient kappa de concordance avec les résultats sur sérum est alors de 0,98.

Deux faux négatifs sont observés avec le test combiné sur sang capillaire :

- L'un est commun avec l'OraQuick® HCV. Il s'agit de celui retrouvé chez un ancien usager de drogue IV, avec PCR VHC négative et index sur sérum faible ($I=1,7$).
- Le deuxième faux négatif est retrouvé chez un patient ayant une CV positive et un index sur sérum relativement élevé ($I=4,8$). Ce faux positif est du à un prélèvement difficile n'ayant pas permis de récupérer une quantité de sang suffisante.

Compte tenu des 100% de spécificité, la VPP est de 100% et la VPN est de 97,8%.

La comparaison de l'OraQuick® HCV et du test combiné sur sang capillaire montre que la sensibilité ($p=0,652$) et la spécificité ($p=1$) n'apparaissent pas significativement différentes.

Pour la technique combinée sur FGC, le cut-off de départ ($DO=0,069$) permet d'obtenir une sensibilité de 90% environ et une spécificité de 72,73%. Les performances retrouvées sont donc nettement moins bonnes que celles du test combiné sur sang capillaire ou de l'OraQuick® HCV sur sang capillaire ou prélèvement oral.

Lorsque le cut-off est réajusté avec la courbe ROC à 0,10 de DO, la sensibilité est de 71,68% [62,77 ; 79,17] et la spécificité de 94,32% [87,38 ; 97,54]. La VPP est de 94,2% et la VPN de 72,7%. Malgré l'ajustement du cut-off, les performances restent donc médiocres.

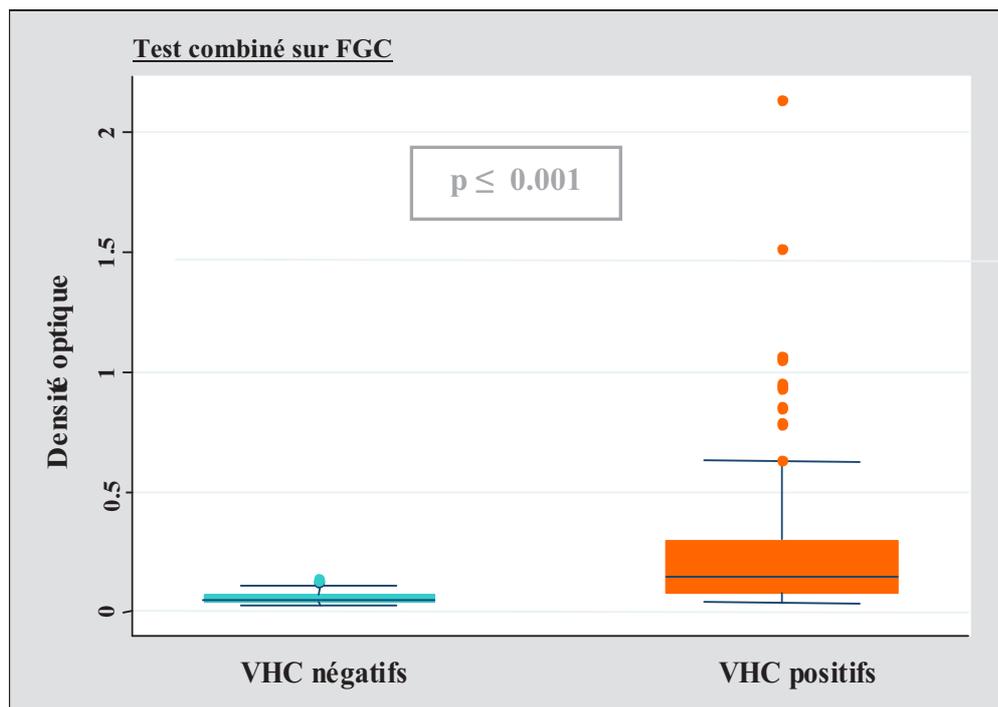


Figure 15 : Densités optiques obtenues avec le test combiné sur FGC chez les patients Ac anti-VHC+ et Ac anti-VHC-

Lorsque l'on compare la technique combinée et l'OraQuick® HCV sur fluide oral, la sensibilité ($p \leq 0.001$) et la spécificité ($p=0.0249$) de l'OraQuick® HCV apparaissent significativement meilleures.

La comparaison des techniques combinées sur FGC et sur sang capillaire, réalisée par la comparaison des aires sous la courbe (AUC), montre que la technique sur FGC est statistiquement moins bonne que la technique sur sang capillaire ($p < 0,001$).

2 Détection de l'ARN viral dans le sang capillaire

La prévalence de l'ARN du VHC est de 34,8% dans cette étude. Sur les 63 patients de l'étude ayant une charge virale quantifiable (> 43 UI/ml), la sensibilité de la PCR sur sang capillaire est de 95,24% [86,91 ; 98,37] et la spécificité de 100% [97,15 ; 100]. L'index Kappa de concordance avec la méthode de référence est de 0,96.

Trois faux négatifs ont été retrouvés. Parmi eux, deux étaient chez des patients traités avec des CV faibles de 2,03 et 2,10 log UI/ml dans le plasma. Le troisième faux négatif a été retrouvé chez un patient non traité avec une CV pourtant élevée, à 5,31 log UI/ml dans le plasma. Ce dernier faux positif est dû à un prélèvement difficile n'ayant pas permis de récupérer une quantité de sang suffisante.

Les échantillons des sept patients ayant une charge virale < 15 UI/ml mais détectable dans le plasma sont négatifs sur buvard. Le but de cette PCR sur sang capillaire est de déterminer s'il y a une réplication virale chez les sujets découverts porteurs d'anticorps anti-VHC. Les charges virales inférieures à 3 log UI/ml sont rares chez les patients non traités.

L'ARN viral est donc détecté sur les buvards de 60 patients sur 61 (98,4%) ayant une charge virale > 3 log UI/ml.

3 Facteurs influençant le dépistage de l'hépatite C

Nous avons étudié l'influence de trois facteurs sur le test combiné sur sang capillaire et sur FGC : le statut VIH, le statut VHB, et la charge virale VHC.

- Le statut VIH

Lorsque l'on fait une analyse univariée, le statut VIH négatif est significativement associé à des DO plus élevées en technique combinée sur sang capillaire ($p=0,007$) (Figure 16) et sur FGC ($p=0,0125$) (Figure 17) en comparaison au statut VIH positif.

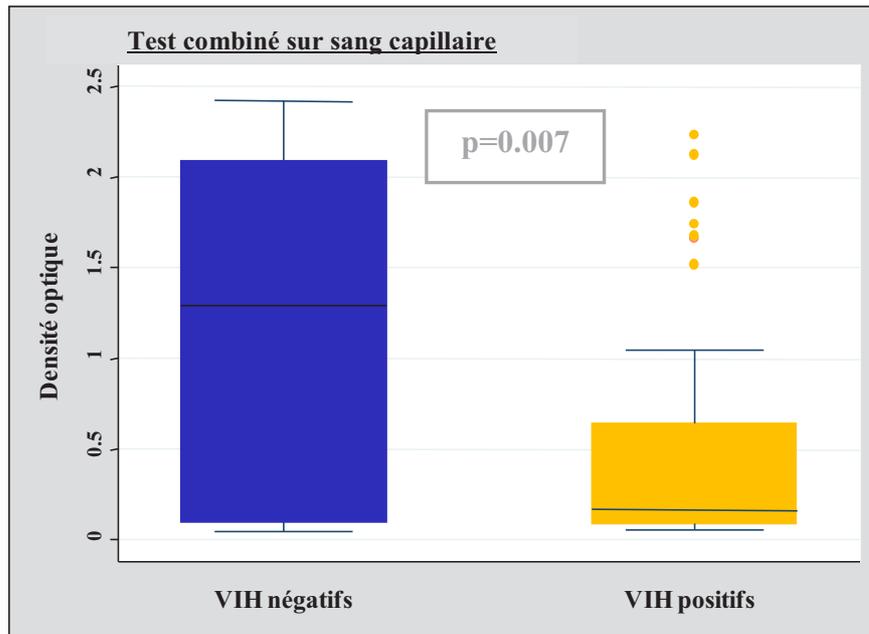


Figure 16 : Densités optiques observées avec le test combiné sur sang capillaire en fonction de la sérologie VIH

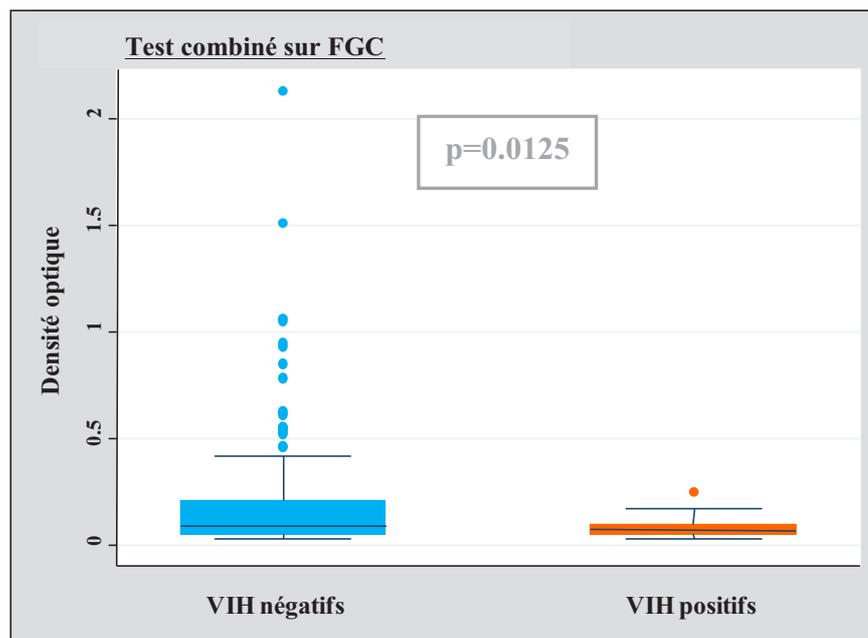


Figure 17 : Densités optiques observées avec le test combiné sur FGC en fonction de la sérologie VIH

Chez les sujets positifs en anticorps anti-VHC, la moyenne des DO observées sur sang capillaire chez les sujets co-infectés par le VIH est de 0,71 [0,42 ; 1,68] versus 2,02 [1,70 ; 2,20] chez les sujets négatifs pour le VIH ($p \leq 0,001$) (Figure 18).

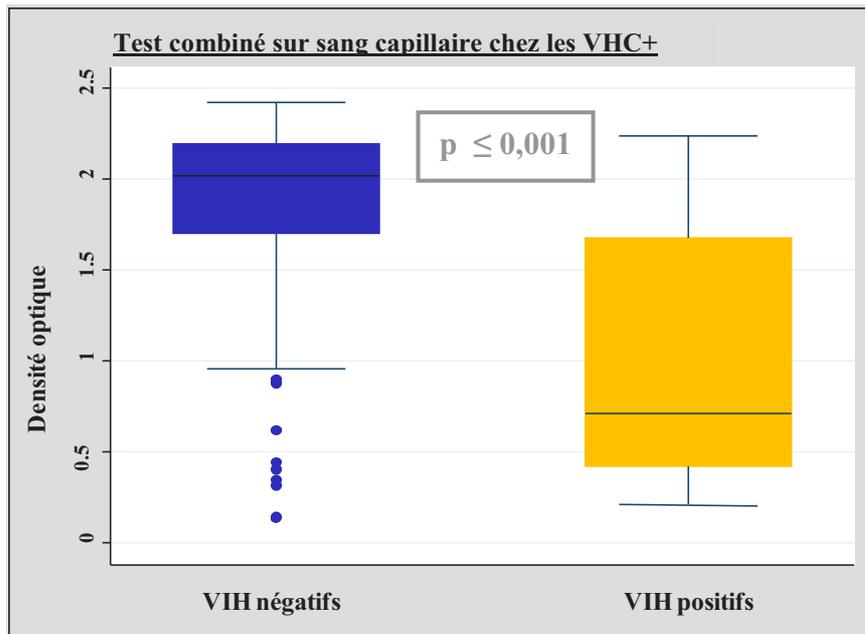


Figure 18 : Densités optiques observées avec le test combiné sur sang capillaire chez les sujets Ac anti-VHC+ en fonction de la sérologie VIH.

Sur le FGC, on observe également une différence significative ($p \leq 0,001$) entre la moyenne des DO chez les sujets co-infectés VHC/VIH (0,08 [0,06 ; 0,11]) et la moyenne des DO chez les sujets mono-infectés VHC (0,18 [0,10 ; 0,35]) (Figure 19).

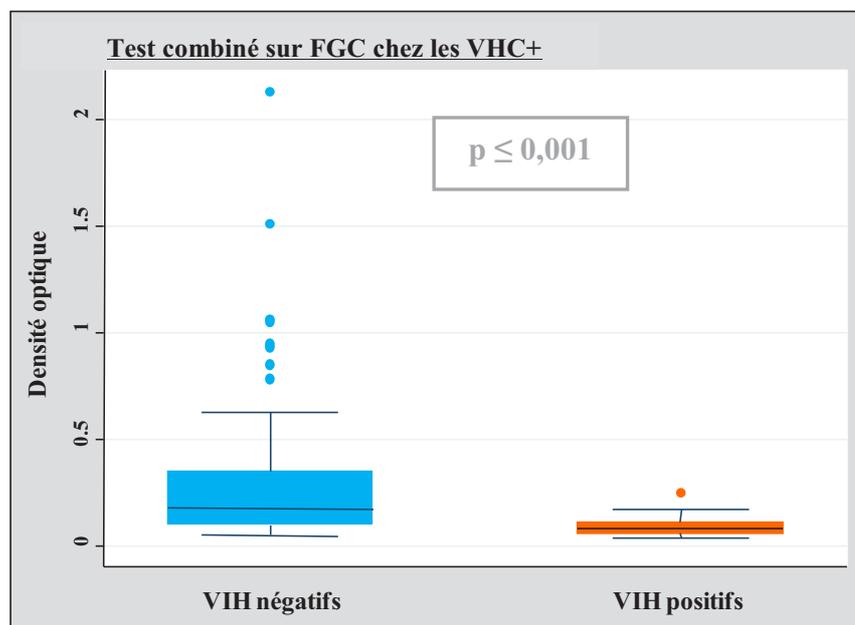


Figure 19 : Densités optiques observées avec le test combiné sur FGC chez les sujets Ac anti-VHC+ en fonction de la sérologie VIH.

On observe donc des DO significativement plus faibles chez les sujets co-infectés par le VIH sur le prélèvement de sang capillaire comme sur le prélèvement de FGC. L'analyse multivariée d'ANOVA montre également que le VIH est indépendamment associé à la DO sur sang capillaire ($p < 0,001$) et sur FGC ($p = 0,049$).

- Le statut VHB

Pour le statut VHB, l'analyse univariée montre que la négativité de l'Ag HBs est significativement ($p = 0,0047$) associée à des DO plus élevée en technique combinée sur sang capillaire (Figure 20) mais pas sur le fluide oral ($p = 0,089$) (Figure 21).

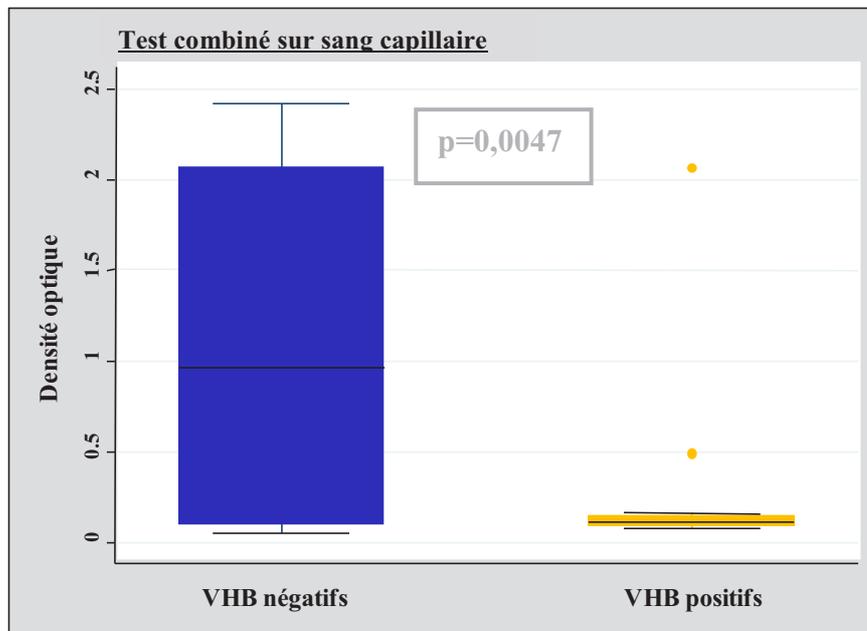


Figure 20 : Densités optiques observées avec le test combiné sur sang capillaire en fonction de la sérologie VHB

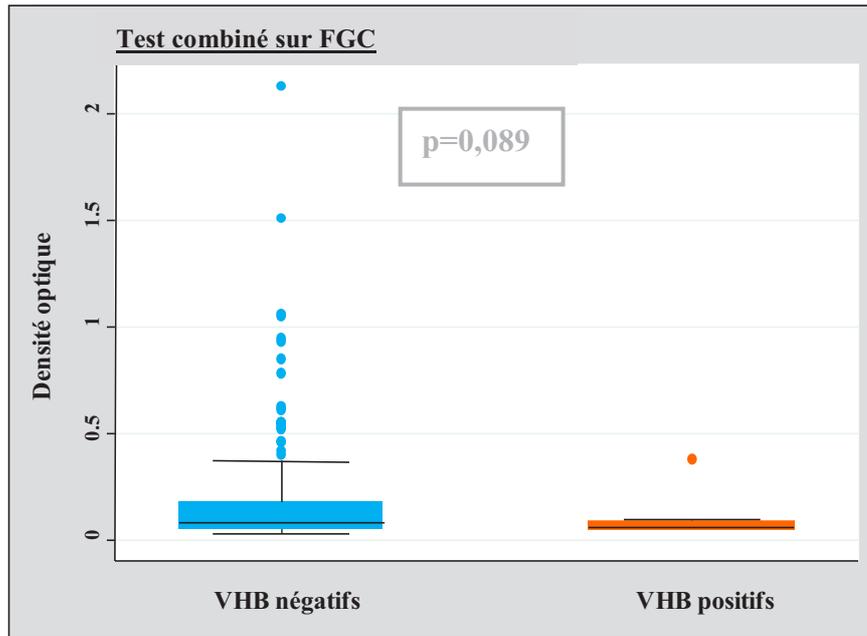


Figure 21 : Densités optiques observées avec le test combiné sur FGC en fonction de la sérologie VHB

L'analyse multivariée ne retrouve pas d'association entre le statut VHB et la sérologie VHC sur sang capillaire et sur FGC.

La faible proportion de sujets co-infectés par le VHB ne permet pas d'établir des statistiques assez puissantes pour cette population.

- L'ARN viral

Sur le sang capillaire ($p \leq 0,001$) (Figure 22) et sur le FGC ($p \leq 0,001$) (Figure 23), l'analyse univariée montre que la positivité de l'ARN du VHC est significativement associée à des DO plus élevées en technique combinée.

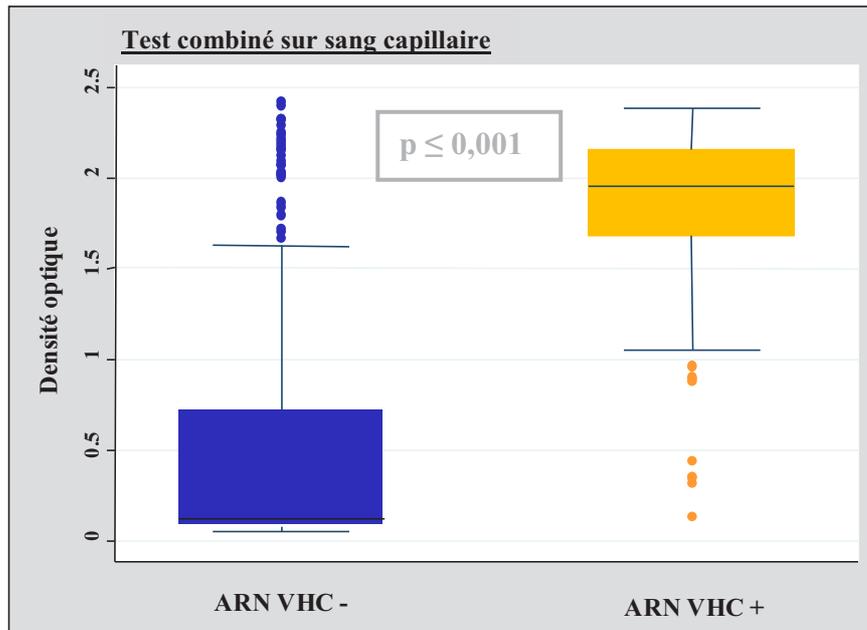


Figure 22 : Densités optiques observées avec le test combiné sur sang capillaire en fonction de l'ARN viral

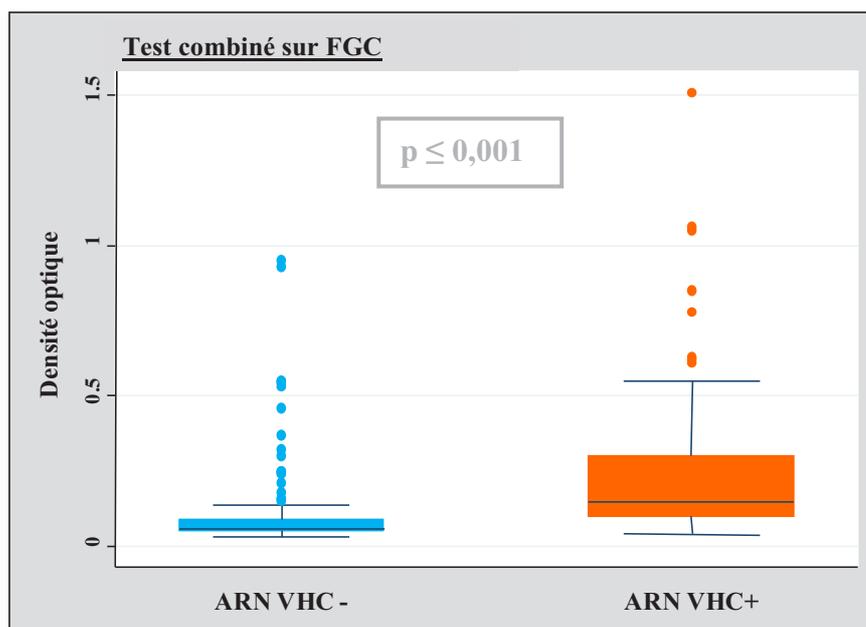


Figure 23 : Densités optiques observées avec le test combiné sur FGC en fonction de l'ARN viral

A l'inverse l'analyse multivariée ne montre pas d'association indépendante entre la charge virale et les DO observées lors du dépistage sur sang capillaire (Figure 24) et sur FGC (Figure 25). Sur sang capillaire, chez les sujets anticorps anti-VHC positifs la moyenne des DO retrouvées chez les sujets avec un ARN positif (1,95 [1,68 ; 2,15]) n'est pas significativement différente ($p=0,303$) de la moyenne chez les sujets avec ARN négatif (1,84 [0,71 ; 2,16]).

Pour le fluide oral, il en va de même, la positivité de l'ARN n'est pas associée à des DO plus élevées (0,15 [0,10 ; 0,30] versus 0,11 [0,08 ; 0,25] ; $p=0,235$) chez les sujets anticorps anti-VHC positifs.

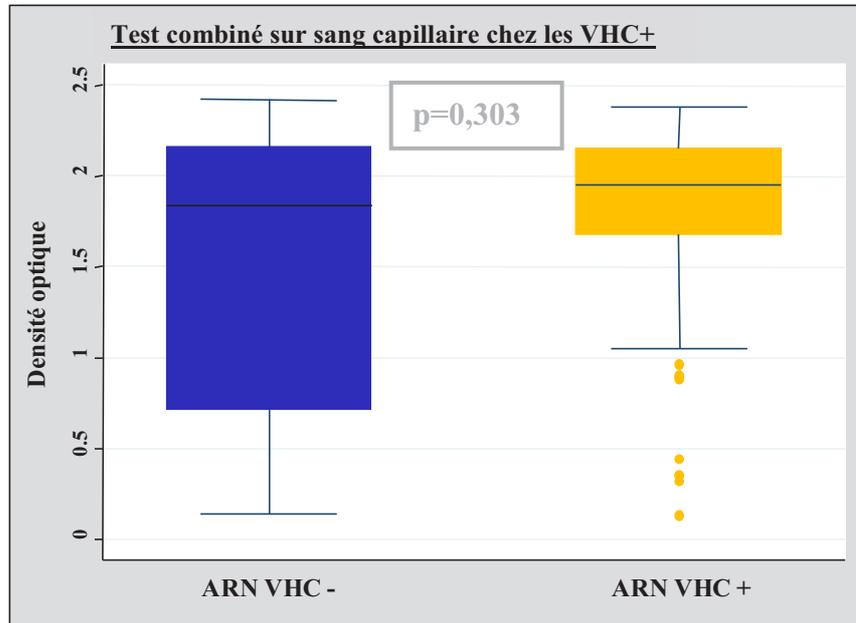


Figure 24 : Densités optiques observées avec le test combiné sur sang capillaire chez les sujets anticorps anti-VHC+ en fonction de l'ARN viral

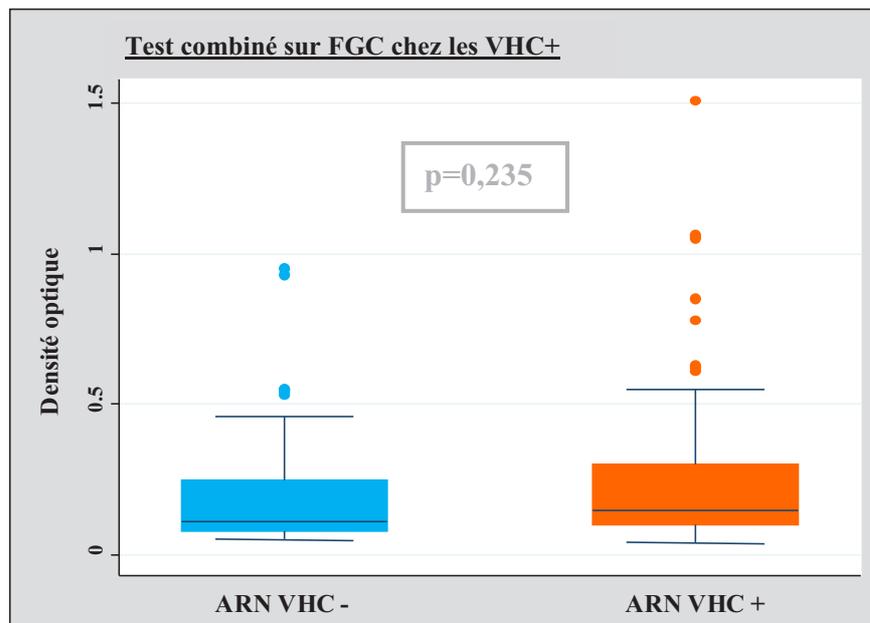


Figure 25 : Densités optiques observées avec le test combiné sur FGC chez les sujets anticorps anti-VHC+ en fonction de l'ARN viral

DISCUSSION

L'utilisation de prélèvements alternatifs comme le sang capillaire et le fluide oral pour le dépistage de l'hépatite C notamment chez les usagers de drogues, a déjà fait l'objet de nombreuses études [78] [77]. L'introduction de ces prélèvements alternatifs semble augmenter nettement le taux de dépistage dans la population toxicomane [78]. Ils pourraient donc être une bonne alternative à la ponction veineuse et leur évaluation sur des tests de 3^{ème} génération a montré des performances satisfaisantes pour le sang capillaire mais plus variables pour le fluide oral. En effet la sensibilité sur sang capillaire varie de 97,2% à 100% et la spécificité de 98% à 100%, ce qui est relativement bon et laisse envisager son utilisation pour le dépistage de l'hépatite C. Cependant, sur le fluide oral les sensibilités varient selon les études de 72% à 100% et les spécificités de 92,5% à 100%. Le mode de recueil du fluide oral semble jouer un rôle important sur les performances obtenues. L'équipe de Judd qui compare la salivette® et l'OraSure® sur le test Ortho de 3^{ème} génération montre la supériorité de l'OraSure® qui permet d'augmenter nettement la sensibilité (91,7% versus 74,1%) [84].

Les tests de 4^{ème} génération, permettant un diagnostic plus précoce de la primo-infection VHC, n'ont pas encore fait l'objet d'études sur sang capillaire et fluide oral. Laperche et al rapportent un gain de 27 jours sur la détection de la primo-infection VHC avec les tests combinés [66]. De plus, ces tests présentent un intérêt certain chez les sujets VIH positifs, représentant 10,8% de la population toxicomane [3], puisqu'ils permettent de détecter une primo-infection VHC en moyenne 50 jours plus tôt qu'avec les tests de 3^{ème} génération [6].

Un autre moyen d'augmenter le dépistage des infections virales est la généralisation des tests rapides d'orientation diagnostique comme cela est fait actuellement pour le VIH [76]. L'OraQuick® HCV est le seul TROD à bénéficier du marquage CE, de l'agrément par l'AFSSAPS et par la FDA sur le sérum, le plasma, le sang total, le sang capillaire, et le fluide oral. Ses performances sur sérum ont récemment été publiées et comparées avec d'autres TROD VHC par le Center of Disease Control d'Atlanta [116]. Dans cette étude, le test OraQuick® HCV apparaît comme étant le plus sensible des TROD étudiés mais les performances retrouvées sur sérum restent inférieures à celles annoncées par le fabricant [114] [115].

Dans notre étude, la sensibilité de l'OraQuick® HCV sur fluide oral est correcte mais également inférieure à celle décrite par le fabricant puisqu'elle est de 94,5% au lieu des 98,1% attendus. La spécificité, annoncée à 99,6% par le fabricant, est quant à elle excellente puisqu'on la retrouve à 100%. Mais dans le cas le plus défavorable en incluant les 5 échantillons sur 201 qui n'ont pas correctement migré, la sensibilité et la spécificité chutent à 92% et 97,7% respectivement.

Le test combiné adapté au FGC a, quant à lui, donné des résultats très médiocres avec une sensibilité atteignant à peine 72%. En effet, à l'inverse des kits de 3^{ème} génération, le sérum du patient est déposé sans dilution préalable dans le test combiné, ce qui ne permet pas de jouer sur le ratio échantillon/diluant pour sensibiliser la technique. Ceci n'a pas posé de problème pour l'adaptation au sang capillaire qui contient une quantité d'IgG plus importante mais a limité la sensibilisation du test sur FGC. En effet, la faible quantité d'anticorps présente dans le prélèvement oral par rapport au sérum (1/800) [81] rend cet ajustement nécessaire. Les modifications apportées à la technique de prélèvement et l'augmentation de la prise d'essai n'ont pas permis d'augmenter suffisamment la sensibilité du test. Ainsi, les performances analytiques obtenues sur les fluides oraux ne sont pas pleinement satisfaisantes. Le test rapide OraQuick® HCV peut éventuellement être utilisé en dépistage à condition d'informer clairement le patient sur la perte de chance due à la sensibilité plus faible du test sur ce prélèvement. En revanche, l'utilisation du test combiné sur prélèvement oral est pour le moment à exclure.

Pour les prélèvements de sang capillaire, leur analyse directe avec le test OraQuick® HCV montre de bonnes performances bien que, là encore, légèrement inférieures à celles décrites par le fabricant. En effet, la sensibilité a été trouvée à 97,4% au lieu des 99,7% décrits. Cependant, la spécificité attendue à 99,9% était de 100% dans notre étude [115]. Sur ce même prélèvement, le test combiné adapté à l'analyse des spots de sang capillaire séchés sur buvard, montre également des performances satisfaisantes. Comme observé dans l'étude de Croom et al [106], notre test combiné sur sang capillaire montre des DO en moyenne nettement inférieures à celles retrouvées sur sérum ($1,73 \pm 0,51$ versus $5,70 \pm 1,45$ chez les patients Ac anti-VHC+). Malgré cela, après ajustement du cut-off à 0,2 de DO, la sensibilité et la spécificité sont de 98,2% et 100% respectivement.

Sur le sang capillaire, pour l'OraQuick® HCV comme pour le test combiné, les valeurs prédictives positives sont excellentes sur la population de notre étude choisie pour refléter

celle des usagers de drogues IV. La prévalence de l'hépatite C est de 56,2% dans notre étude soit sensiblement identique à celle décrite dans la population toxicomane par l'INVS dans l'étude Coquelicot [3].

Les faux négatifs du test OraQuick® HCV sont retrouvés chez des sujets non virémiques et/ou porteurs du VIH. En effet, 8 patients sur les 9 faux négatifs avaient un ARN viral négatif et 6 sur 9 avaient une sérologie VIH positive. Dans les études de Lee et al [114] [115], les faux négatifs ont également été observés chez des sujets avec un ARN viral VHC négatif mais malgré un effectif important (2206 patients), l'influence de la séropositivité VIH ou VHB n'a pas été étudiée. La prise en compte de cette influence est pourtant importante étant donné le taux de co-infection retrouvé dans la population ciblée par le dépistage de l'hépatite C. En effet, 10,2% des toxicomanes IV sont co-infectés par le virus du SIDA [3]. L'absence d'étude sur l'impact du statut VIH et VHB pourrait expliquer la différence de sensibilité observée entre notre étude et celles de Lee. Cependant l'étude de Smith et al [116], réalisée sur des sérums, ne montre pas d'association pour l'OraQuick® HCV entre les faux négatifs et la séropositivité VIH. L'influence de la présence de l'ARN viral n'a pas été évaluée par l'équipe de Smith.

Afin d'évaluer l'impact d'une infection par le VIH ou le VHB sur le dépistage de l'hépatite C, des sujets mono-infectés par le VIH ou le VHB et des sujets co-infectés VHC/VIH ou VHC/VHB ont été inclus dans notre étude. L'étude de Bello et al [87] réalisée sur des prélèvements oraux avait montré une sensibilité bien inférieure chez les sujets co-infectés VIH/VHC (Se=91,9%) en comparaison aux sujets mono-infectés VHC (Se=95,1%). Pareillement, dans notre étude, la co-infection VHC/VIH est significativement associée à des densités optiques plus faibles avec le test combiné à la fois sur le sang capillaire et sur le FGC. Cependant aucun faux négatif n'a été observé chez les patients VIH positifs avec le test combiné sur sang capillaire. En effet, une baisse des anticorps anti-VHC a déjà été décrite chez les sujets VIH du fait d'une diminution des lymphocytes B [67]. Un retard à l'apparition des anticorps lors de primo-infection VHC a également été observé chez les sujets VIH [74]. Cette diminution du taux d'anticorps anti-VHC joue donc sur la détection des hépatites chroniques telle que celles des patients inclus dans cette étude mais devrait être compensée par la détection de l'antigène de capsidite lors des infections récentes. L'infection par le VIH ou par le VHB n'influe cependant pas sur la spécificité du test combiné sur sang capillaire et sur FGC. L'étude univariée du statut VHB montre que chez les sujets AgHBs négatifs, les DO sont significativement plus élevées en test combiné sur sang capillaire mais pas sur FGC.

Chez les sujets VHC positifs, aucune association n'est retrouvée entre le statut VHB et les DO en test combiné sur sang capillaire et sur FGC. Cependant l'analyse statistique réalisée pour évaluer l'influence de la sérologie VHB n'est pas assez robuste, étant donné la faible proportion de sujets co-infectés VHB/VHC (N=2), et ne permet donc pas de tirer de conclusion fiable.

L'association entre l'ARN viral VHC et la sensibilité des tests de 3^{ème} génération sur les prélèvements alternatifs a déjà fait l'objet de nombreuses études. Ainsi l'équipe de Cameron rapporte dès 1999 que la sensibilité de son test sur fluide oral augmente nettement chez les sujets virémiques (Se=98% versus 85%) [88]. En 2003, Judd et al ont adapté le test Ortho 3.0 aux fluides oraux récoltés avec l'OraSure® et ont montré que la sensibilité de leur test passait de 77,8% chez les sujets avec un ARN VHC négatif à 98,3% chez les sujets avec ARN positif [84]. Lucidarme et al ont également montré un gain de sensibilité de 15% chez les sujets virémiques sur fluide oral [90]. Cependant, pour le sang capillaire il semblerait qu'un ARN viral positif ne soit pas associé à des DO plus élevées. En effet, l'étude de Judd ne montre pas d'augmentation de la sensibilité sur sang capillaire chez les sujets virémiques. Étonnamment, dans notre étude, chez les sujets positifs en anticorps anti-VHC le fait d'avoir un ARN viral positif ne donne pas des densités optiques significativement plus élevées sur FGC. Ce résultat pourrait s'expliquer par la proportion importante de patients sous traitement durant notre étude (16/43 Ac anti-VHC+/ARN VHC<0). Sur sang capillaire, comme décrit précédemment, nous n'observons pas d'association entre l'ARN viral et la sensibilité de notre test combiné.

Les performances retrouvées sur sang capillaire avec l'OraQuick® HCV et le test combiné laissent penser qu'ils pourraient tous les deux constituer une bonne alternative à la ponction veineuse pour le dépistage de l'hépatite C. Il faut noter que les sensibilités et les spécificités retrouvées pour ces deux tests ne sont pas significativement différentes (p=0.652 et p=1, respectivement).

Les performances retrouvées sur sang capillaire avec le test combiné sont similaires à celles retrouvées dans les études réalisées avec les tests de 3^{ème} génération [84] [107] mais l'intérêt principal des tests de 4^{ème} génération, de pouvoir diagnostiquer une infection de façon plus précoce avant l'apparition des anticorps anti-VHC, n'a pas été évalué dans notre étude qui n'incluait pas de patient ayant une hépatite C aiguë.

Un des intérêts du prélèvement de sang capillaire déposé sur buvard est de permettre, en plus de la recherche d'anticorps anti-VHC, la détection de l'ARN viral ce qui permet de

distinguer les sujets guéris des sujets ayant besoin d'une prise en charge médicale. Pour évaluer la présence de l'ARN du VHC, nous avons utilisé la même technique que celle décrite dans l'étude de Tuaille et avons obtenu des résultats similaires. L'ARN viral est détecté chez 60 des 61 patients avec un ARN > 3 log (Se=98,3%) et la sensibilité diminue si l'on prend en compte les sujets avec un ARN viral inférieur à 3 log. Cependant des charges virales inférieures à 3 log sont rarement rencontrées chez des sujets non traités.

En prévision de la réalisation de prélèvements de sang capillaire hors contexte hospitalier, les conditions de stockage des prélèvements seront importantes à respecter. En effet, d'après les résultats obtenus lors de l'étude de la conservation des buvards, la réalisation de la technique combinée sur sang capillaire nécessite une conservation des buvards à -20°C. Cependant un stockage à +4°C pourraient être envisagé si celui-ci n'excède pas trois jours car à J6 les 2/3 des patients négatifs se sont positivés. Ces résultats concordent avec ceux de l'étude de Tuaille *et al* [107]. La possibilité d'un stockage à +4°C est intéressante pour la réalisation de ce type de prélèvements dans les structures délocalisées telles que les CDAG ou les prisons, qui ne peuvent pas toujours assurer un transport journalier des prélèvements au laboratoire. Le stockage à TA est quant à lui à proscrire. En effet, comme Tuaille *et al* l'avaient montré précédemment, il expose au risque de faux positifs dès le 3^{ème} jour dans notre étude. Si l'on veut détecter la présence d'ARN viral sur les buvards, un stockage à température ambiante est possible si celui-ci n'excède pas une semaine. En effet, une décroissance significative de la charge virale (> 0,5 log) est observée après 13 jours de stockage à TA. Le stockage à +4°C pourrait être envisagé mais pas au-delà de deux semaines car il y a une tendance à la diminution de la CV et il est probable que si nous avons poursuivi le stockage au-delà de 13 jours une baisse significative aurait été observée. Au final, si l'on devait réaliser le test combiné et la RT-PCR sur sang capillaire, les buvards ne pourraient pas rester plus de 24 heures à TA et 3 jours à +4°C avant d'être perforés puis stockés à -20°C pour les disques destinés au test combiné et -80°C pour ceux destinés à la PCR.

L'évaluation de la répétabilité du test combiné adapté au prélèvement de sang capillaire montre des coefficients de variations très corrects puisqu'ils sont inférieurs à 5%. Cependant, l'étude de la reproductibilité donne des coefficients de variations plus élevés allant de 15% à 20% environ. Ces résultats soulignent la difficulté d'obtenir une quantité constante de prélèvement par élution des buvards, ainsi que le problème de standardisation de la méthode.

Pour la PCR sur sang capillaire, l'étude de la répétabilité et de la reproductibilité donnent des coefficients de variations relativement élevés, reflète également d'une difficulté de standardisation. Ces résultats montrent que la PCR VHC sur sang capillaire déposé sur buvards devrait être utilisée pour détecter l'ARN viral plus que pour le quantifier réellement.

En conclusion, sous réserve d'une quantité de sang suffisante et d'une conservation correcte des échantillons pour la technique combinée, les deux tests évalués montrent des performances satisfaisantes sur le sang capillaire permettant d'envisager leur utilisation clinique. Le sang capillaire déposé sur buvard, en plus de permettre l'évaluation de la présence d'ARN viral, permet aussi de déterminer le génotype viral mais ceci n'a pas été évalué dans notre étude. Ainsi, avec un seul prélèvement non invasif, on pourrait obtenir l'ensemble des éléments permettant de déterminer si le patient doit bénéficier d'une consultation spécialisée pour la prise en charge de l'infection VHC dépistée. De plus, de façon générale, le prélèvement capillaire a été très bien accepté, étonnamment plus que le prélèvement de FGC à cause du goût désagréable du tampon de prélèvement.

Une deuxième étude devra déterminer la stratégie la plus adaptée au dépistage des patients à risque. Le TROD peut être d'interprétation plus subjective mais permet un rendu du résultat en 20 minutes au patient. Le caractère immédiat de l'obtention des résultats peut poser problème notamment dans le cas de résultats douteux ou positifs. Le fait de devoir gérer lors d'une même consultation la démarche diagnostique et le rendu d'un résultat positif peut être difficile pour le médecin et ne peut être envisagée avec un personnel non médical. Le test combiné devrait avoir une meilleure sensibilité sur les infections récentes qui sont fréquentes dans les populations à risque mais nécessite une réalisation en laboratoire, et donc une deuxième consultation du patient pour avoir son résultat ce qui peut aboutir à une perte de vue du patient.

Thèse soutenue par Melle BOURDON Cécile

TITRE : « Dépistage de l'infection par le virus de l'hépatite C : adaptation et évaluation d'un test sérologique combiné sur prélèvement de sang capillaire et prélèvement oral ».

CONCLUSION

Avec une prévalence de 60%, la population toxicomane constitue le principal réservoir du virus de l'hépatite C en France. Cette population, chez qui un dépistage répété devrait être proposé, est en général peu intégrée dans les circuits de santé. De plus, le prélèvement veineux reste problématique chez les toxicomanes du fait d'un accès veineux parfois rendu difficile par les injections répétées et peut être un frein au dépistage. Les prélèvements alternatifs que sont le sang capillaire et le fluide oral pourraient constituer une bonne alternative à la ponction veineuse. Les tests rapides d'orientation diagnostic (TROD) réalisables sur sang capillaire et fluide oral semblent permettre également un accès plus facile au dépistage.

Le test combiné Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra (BioRad) permettant la détection conjointe des anticorps anti-VHC et de l'antigène de capsid viral n'a jamais été évalué sur ces types de prélèvements. Ce test permet une meilleure détection des infections récentes, notamment chez les patients co-infectés par le VIH, ce qui est particulièrement intéressant chez les usagers de drogues. Nous avons ainsi adapté ce test aux prélèvements de sang capillaire et de fluide gingival créviculaire (FGC). Une RT-PCR VHC a également été réalisée sur le sang capillaire déposé sur buvard. Puis les conditions de stockage de ces prélèvements ont été établies. L'étude DIAGVHC, incluant 201 patients, nous a permis d'évaluer les performances du test combiné en parallèle de celles du TROD, l'OraQuick® HCV (OraSure Technologies).

Les performances de l'OraQuick® HCV, bien qu'inférieures à celles annoncées par le fabricant sont satisfaisantes sur ces 2 prélèvements alternatifs. Le test combiné a également donné de bons résultats sur sang capillaire avec une sensibilité de 98,2% et une spécificité de 100%. Il a cependant été difficile d'adapter ce test au FGC et les performances obtenues excluent son utilisation pour le dépistage de l'hépatite C. La PCR VHC sur sang capillaire permet de détecter l'ARN viral avec une sensibilité de 98,4% chez les patients ayant une charge virale > 3

log UI/ml. Une charge virale < 3 log UI/ml étant rare chez les sujets non traités. Comme cela a été montré précédemment, le statut VIH diminue la sensibilité des deux tests chez les patients ayant une hépatite C chronique. En revanche, la sensibilité du test combiné sur FGC comme sur sang capillaire n'est pas augmentée chez les sujets virémiques. L'étude des conditions de stockage du sang capillaire déposé sur buvard a montré une nette perte de spécificité de la technique combinée BioRad lorsque les prélèvements sont conservés à température ambiante et une baisse de la sensibilité de la RT-PCR lorsque les buvards ne sont pas congelés.

La technique combinée BioRad et le TROD OraQuick® HCV sur sang capillaire montrent des performances satisfaisantes permettant d'envisager leur utilisation clinique. Une deuxième étude devra déterminer la stratégie la plus adaptée au dépistage des patients à risque. Le TROD, qui peut être d'interprétation subjective, permet un rendu rapide du résultat au patient. L'analyse par le test combiné BioRad du sang capillaire déposé sur buvard, qui permet également d'évaluer la présence d'ARN viral, oblige le patient à une seconde consultation afin d'avoir son résultat, ce qui peut aboutir à une perte de vue du patient. Cependant avec un seul prélèvement non invasif, réalisable dans des structures délocalisées, et à condition que les buvards soient conservés correctement, il serait possible d'obtenir l'ensemble des éléments permettant de déterminer si le patient doit être pris en charge pour son hépatite C.



VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 26 Octobre 2011

LE DOYEN
Professeur Christophe RIBOT



C.H.U. DE GRENOBLE
PÔLE DE BIOLOGIE

Département de Biochimie,
Toxicologie et Pharmacologie
Responsable Pr P. FAURE

LE PRESIDENT DE LA THESE
Professeur Patrice FAURE

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* Jan 2009 ; 29 Suppl 1: 74–81.
- [2] Département des maladies infectieuses. L'épidémiologie des hépatites B et C en France. *Bull Epidémiol Hebd.* 2009 ; 20-21: 195.
- [3] Jauffret-Roustide M, Couturier E, Strat YL. Estimation de la séroprévalence du VIH et du VHC et profils des usagers de drogues en France, étude INVS-ANRS Coquelicot. *Bull Epidémiol Hebd.* 2006 ; 33: 244–47.
- [4] Ministère de la santé et des sports. Plan national de lutte contre les hépatites B et C 2009-2012. http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Plan_national_Hepatitis.pdf
- [5] Laperche S, Elghouzzi MH, Morel P, Asso-Bonnet M, Marrec NL, Girault A, et al. Is an assay for simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing? *Transfusion.* 2005 ; 45(12): 1965–1972.
- [6] Schnuriger A, Dominguez S, Valantin MA, Tubiana R, Duvivier C, Ghosn J, et al. Early detection of hepatitis C virus infection by use of a new combined antigen-antibody detection assay: potential use for high-risk individuals. *J Clin Microbiol.* 2006 ; 44(4): 1561–1563.
- [7] Alter HJ, Holland PV, Purcell RH. The emerging pattern of post-transfusion hepatitis. *Am J Med Sci.* 1975 ; 270(2): 329–334.
- [8] Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med.* 1975 ; 292(15): 767–770.
- [9] Alter MJ, Gerety RJ, Smallwood LA, Sampliner RE, Tabor E, Deinhardt F, et al. Sporadic non-A, non-B hepatitis: frequency and epidemiology in an urban U.S. population. *J Infect Dis.* 1982 ; 145(6): 886–893.
- [10] Houghton M. Discovery of the hepatitis C virus. *Liver Int.* 2009 ; 29 Suppl 1: 82–88.
- [11] Cahour A. Un nouveau défi pour la recherche sur le virus de l'hépatite C. *Virologie.* 2006 ; 10: 159–65.
- [12] Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol.* 2007 ; 13(17): 2461–2466.
- [13] Pawlotsky JM. Le virus de l'hépatite C. *Médecine/Sciences.* 2002 ; 18: 303–14.

- [14] Santantonio T, Wiegand J, Gerlach JT. Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. *J Hepatol.* 2008 ; 49(4): 625–633.
- [15] Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute hepatitis C. *Hepatology.* 2001 ; 33(2): 321–327.
- [16] Wiegand J, Deterding K, Cornberg M, Wedemeyer H. Treatment of acute hepatitis C: the success of monotherapy with (pegylated) interferon alpha. *J Antimicrob Chemother.* 2008 ; 62(5): 860–865.
- [17] Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol.* 2008 ; 48(1): 148–162.
- [18] EASL. Clinical practice guidelines: management of hepatitis c virus infection. *Journal of hepatology.* 2011.
- [19] Marcellin P, Pequignot 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 Feb;48(2):200–207.
- [20] Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 2004;24 Suppl 2:3–8.
- [21] Bartosch B, Thimme R, Blum HE, Zoulim F. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *J Hepatol.* 2009 ; 51(4): 810–820.
- [22] Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 ; 7(8): 448–458.
- [23] Awad T, Thorlund K, Hauser G, Stimac D, Mabrouk M, Glud C. Peginterferon alpha-2a is associated with higher sustained virological response than peginterferon alfa-2b in chronic hepatitis C: systematic review of randomized trials. *Hepatology.* 2010 ; 51(4): 1176–1184.
- [24] Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002 ; 347(13): 975–982.
- [25] Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut.* 2006 ; 55(9): 1350–1359.
- [26] Poordad FF. Review article: the role of rapid virological response in determining treatment duration for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010 ; 31(12): 1251–1267.
- [27] Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature.* 2009 ; 461(7262): 399–401.

- [28] Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O’Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009 ; 461(7265): 798–801.
- [29] Balagopal A, Thomas DL, Thio CL. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2010 ; 139(6): 1865–1876.
- [30] Lagging M, Askarieh G, Negro F, Bibert S, Söderholm J, Westin J, et al. Response prediction in chronic hepatitis C by assessment of IP-10 and IL28B-related single nucleotide polymorphisms. *PLoS One*. 2011 ; 6(2): e17232.
- [31] Darling JM, Aerssens J, Fanning G, McHutchison JG, Goldstein DB, Thompson AJ, et al. Quantitation of pretreatment serum interferon- β -inducible protein-10 improves the predictive value of an IL28B gene polymorphism for hepatitis C treatment response. *Hepatology*. 2011 ; 53(1): 14–22.
- [32] L’Hénaff M. Les hépatites au pied du mur. *Le journal du Sida*. 2011 ; 220: 11–15.
- [33] Fellay J, Thompson AJ, Ge D, Gumbs CE, Urban TJ, Shianna KV, et al. ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature*. 2010 ; 464(7287): 405–408.
- [34] Thompson AJ, Fellay J, Patel K, Tillmann HL, Naggie S, Ge D, et al. Variants in the ITPA gene protect against ribavirin-induced hemolytic anemia and decrease the need for ribavirin dose reduction. *Gastroenterology*. 2010 ; 139(4): 1181–1189.
- [35] Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Bisseglie AMD, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2011 ; 364(25): 2405–2416.
- [36] Sherman KE, Flamm SL, Afdhal NH, Nelson DR, Sulkowski MS, Everson GT, et al. Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2011 ; 365(11): 1014–1024.
- [37] Poordad F, McCone J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011 ; 364(13): 1195–1206.
- [38] 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): 746–754.
- [39] Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011 ; 364(13): 1207–1217.
- [40] Vermehren J, Sarrazin C. New hepatitis C therapies in clinical development. *Eur J Med Res*. 2011 ; 16(7): 303–314.

- [41] Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*. 2000 ; 355(9207): 887–891.
- [42] Palitzsch KD, Hottenträger B, Schlottmann K, Frick E, Holstege A, Schölmerich J, et al. Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999 ; 11(11): 1215–1220.
- [43] Zou S, Tepper M, Saadany SE. Prediction of hepatitis C burden in Canada. *Can J Gastroenterol*. 2000 ; 14(7): 575–580.
- [44] Law MG, Dore GJ, Bath N, Thompson S, Crofts N, Dolan K, et al. Modelling hepatitis C virus incidence, prevalence and long-term sequelae in Australia, 2001. *Int J Epidemiol*. 2003 ; 32(5): 717–724.
- [45] Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med*. 2006 ; 144(10): 705–714.
- [46] Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005 ; 5(9): 558–567.
- [47] Puro V, Petrosillo N, Ippolito G, Aloisi MS, Boumis E, Rava L. Occupational hepatitis C virus infection in Italian health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of Bloodborne Infections. *Am J Public Health*. 1995 ; 85(9): 1272–1275.
- [48] Bruandet DL. Incidence and risk factors of HCV infections in a cohort of intravenous drug users in the north and east of France. *Epidemiol Infect*. 2004 ; 132: 699–708.
- [49] Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int*. 2011 ; 31 Suppl 2: 30–60.
- [50] Nainan OV, Alter MJ, Kruszon-Moran D, Gao FX, Xia G, McQuillan G, et al. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. *Gastroenterology*. 2006 ; 131(2): 478–484.
- [51] Sievert W, Altraif I, Razavi HA, Abdo A, Ahmed EA, Alomair A, et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver Int*. 2011 ; 31 Suppl 2: 61–80.
- [52] Thiers V, Tuveri R. Epidemiologie moléculaire du virus de l'hépatite C. *Revue Française des laboratoires*. Février/mars 2000 ; 320: 41–48.
- [53] Chao DT, Abe K, Nguyen MH. Systematic review: epidemiology of hepatitis C genotype 6 and its management. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 ; 34(3): 286–296.

- [54] 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 millenium: The GEMHEP GenoCII Study. *J Viral Hepat.* 2005 ; 12(4): 405–413.
- [55] Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis.* 1995 ; 171(6): 1607–1610.
- [56] Elghouzzi MH, Bouchardeau F, Pillonel J, Boiret E, Tirtaine C, Barlet V, et al. Hepatitis C virus: routes of infection and genotypes in a cohort of anti-HCV-positive French blood donors. *Vox Sang.* 2000 ; 79(3): 138–144.
- [57] Mohamed MK, Abdel-Hamid M, Mikhail NN, Abdel-Aziz F, Medhat A, Magder LS, et al. Intrafamilial transmission of hepatitis C in Egypt. *Hepatology.* 2005 ; 42(3): 683–687.
- [58] WHO. Global database on blood safety.
http://www.who.int/bloodsafety/global_database/en/ 2004-2005.
- [59] Martins T, Narciso-Schiavon JL, de Lucca Schiavon L. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *Rev Assoc Med Bras.* 2011 ; 57(1): 107–112.
- [60] Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, 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): 529–538.
- [61] Wong JB, McQuillan GM, McHutchison JG, Poynard T. Estimating future hepatitis C morbidity, mortality, and costs in the United States. *Am J Public Health.* 2000 ; 90(10): 1562–1569.
- [62] Brouard C, Delarocque-Astagneau E, Meffre C. Evolution du dépistage de l'hépatite C en France à partir des systèmes de surveillance Rena-VHC et des pôles de référence, 2000-2007. *Bull Epidémiol Hebd.* 2009 ; 20-21: 199–203.
- [63] Jeanblanc G. Recommandations de la Haute autorité de santé (France) pour le dépistage biologique des hépatites virales B et C. *Bull Epidémiol HebdWeb.* 2011 ; 1: 1–7.
- [64] Dhumeaux D. Surveillance et prévention des hépatites B et C en France : bilan et perspectives. *Bull Epidémiol Hebd.* 2009 ; 20-21: 193–220.
- [65] Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology.* 2002 ; 36(5 Suppl 1): S65–S73.
- [66] Laperche S, Marrec NL, Girault A, Bouchardeau F, Servant-Delmas A, Maniez-Montreuil M, et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies improves the early detection of HCV infection. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43(8): 3877–3883.

- [67] Thio CL, Nolt KR, Astemborski J, Vlahov D, Nelson KE, Thomas DL. Screening for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol.* 2000 ; 38(2): 575–577.
- [68] Lok AS, Chien D, Choo QL, Chan TM, Chiu EK, Cheng IK, et al. Antibody response to core, envelope and nonstructural hepatitis C virus antigens: comparison of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Hepatology.* 1993 ; 18(3): 497–502.
- [69] Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1989 ; 244(4902): 362–364.
- [70] Fournillier-Jacob A, Lunel F, Cahour A, Cresta P, Frangeul L, Perrin M, et al. Antibody responses to hepatitis C envelope proteins in patients with acute or chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 1996 ; 50(2): 159–167.
- [71] Bresters D, Cuypers HT, Reesink HW, Schaasberg WP, van der Poel CL, Mauser-Bunschoten EP, et al. Enhanced sensitivity of a second generation ELISA for antibody to hepatitis C virus. *Vox Sang.* 1992 ; 62(4): 213–217.
- [72] Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H, Vermeylen C. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang.* 1994 ; 66(2): 122–129.
- [73] Galel SA, Strong DM, Tegtmeier GE, Holland PV, Kuramoto IK, Kemper M, et al. Comparative yield of HCV RNA testing in blood donors screened by 2.0 versus 3.0 antibody assays. *Transfusion.* 2002 ; 42(11): 1507–1513.
- [74] Thomson EC, Nastouli E, Main J, Karayiannis P, Eliahoo J, Muir D, et al. Delayed anti-HCV antibody response in HIV-positive men acutely infected with HCV. *AIDS.* 2009 ; 23(1): 89–93.
- [75] Ansaldi F, Bruzzone B, Testino G, Bassetti M, Gasparini R, Crovari P, et al. Combination hepatitis C virus antigen and antibody immunoassay as a new tool for early diagnosis of infection. *J Viral Hepat.* 2006 ; 13(1): 5–10.
- [76] Chevaliez S. Méthodes alternatives au prélèvement sanguin pour le diagnostic de l'infection par le virus de l'hépatite C. *Bull Epidemiol HebdWeb.* 2011 ; 1: 1–5.
- [77] White B, Day C, Thein HH, Doab A, Bates A, Holden J, et al. Acceptability of hepatitis C virus testing methods among injecting drug users. *Drug Alcohol Rev.* 2008 ; 27(6): 666–670.
- [78] Hickman M, McDonald T, Judd A, Nichols T, Hope V, Skidmore S, et al. Increasing the uptake of hepatitis C virus testing among injecting drug users in specialist drug treatment and prison settings by using dried blood spots for diagnostic testing: a cluster randomized controlled trial. *J Viral Hepat.* 2008 ; 15(4): 250–254.

- [79] Parry JV, Perry KR, Mortimer PP. Sensitive assays for viral antibodies in saliva: an alternative to tests on serum. *Lancet*. 1987 ; 2(8550): 72–75.
- [80] Thieme T, Yoshihara P, Piacentini S, Beller M. Clinical evaluation of oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis. *J Clin Microbiol*. 1992 ; 30(5): 1076–1079.
- [81] Cameron SO, Carman WF. The use of the OraSure collection device for hepatitis virus testing in health care settings. *J Clin Virol*. 2005 ; 34 Suppl 1: S22–S28.
- [82] Sherman KE, Creager RL, O'Brien J, Sargent S, Piacentini S, Thieme T. The use of oral fluid for hepatitis C antibody screening. *Am J Gastroenterol*. 1994 ; 89(11): 2025–2027.
- [83] Allwright S, Bradley F, Long J, Barry J, Thornton L, Parry JV. Prevalence of antibodies to hepatitis B, hepatitis C, and HIV and risk factors in Irish prisoners: results of a national cross sectional survey. *BMJ*. 2000 ; 321(7253): 78–82.
- [84] Judd A, Parry J, Hickman M, McDonald T, Jordan L, Lewis K, et al. Evaluation of a modified commercial assay in detecting antibody to hepatitis C virus in oral fluids and dried blood spots. *J Med Virol*. 2003 ; 71(1): 49–55.
- [85] Gonzalez V, Martro E, Folch C, Esteve A, Matas L, Montoliu A, et al. Detection of hepatitis C virus antibodies in oral fluid specimens for prevalence studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 ; 27(2): 121–126.
- [86] McIntyre PG, Laszlo J, Appleyard K, Ogden GR. Modified enzyme immunoassay to detect hepatitis C virus antibodies in oral fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996 ; 15(11): 882–884.
- [87] Bello PY, Pasquier C, Gourney P, Puel J, Izopet J. Assessment of a hepatitis C virus antibody assay in saliva for epidemiological studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998 ; 17(8): 570–572.
- [88] Cameron SO, Wilson KS, Good T, McMenamin J, McCarron B, Pithie A, et al. Detection of antibodies against hepatitis C virus in saliva: a marker of viral replication. *J Viral Hepat*. 1999 ; 6(2): 141–144.
- [89] Van Doornum GJ, Lodder A, Buimer M, van Ameijden EJ, Bruisten S. Evaluation of hepatitis C antibody testing in saliva specimens collected by two different systems in comparison with HCV antibody and HCV RNA in serum. *J Med Virol*. 2001 ; 64(1): 13–20.
- [90] Lucidarme D, Decoster A, Delamare C, Schmitt C, Kozlowski D, Harbonnier J, et al. [An inter-laboratory study of anti-HCV antibody detection in saliva samples]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2003 ; 27(2): 159–162.
- [91] Elsana S, Sikuler E, Yaari A, Shemer-Avni Y, Abu-Shakra M, Buskila D, et al. HCV antibodies in saliva and urine. *J Med Virol*. 1998 ; 55(1): 24–27.
- [92] Cock LD, Hutse V, Verhaegen E, Quoilin S, Vandenberghe H, Vranckx R. Detection of HCV antibodies in oral fluid. *J Virol Methods*. 2004 ; 122(2): 179–183.

- [93] Moorthy M, Daniel HD, Kurian G, Abraham P. An evaluation of saliva as an alternative to plasma for the detection of hepatitis C virus antibodies. *Indian J Med Microbiol.* 2008 ; 26(4): 327–332.
- [94] Mariette X, Loiseau P, Morinet F. Hepatitis C virus in saliva. *Ann Intern Med.* 1995 ; 122(7): 556.
- [95] Roy KM, Bagg J, McCarron B, Good T, Cameron S, Pithie A. Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. *J Med Virol.* 1998 ; 54(4): 271–275.
- [96] Fabris P, Infantolino D, Biasin MR, Marchelle G, Venza E, Marin VTW, et al. High prevalence of HCV-RNA in the saliva cell fraction of patients with chronic hepatitis C but no evidence of HCV transmission among sexual partners. *Infection.* 1999 ; 27(2): 86–91.
- [97] Hermida M, Ferreira MC, Barral S, Laredo R, Castro A, Dios PD. Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis C virus infection by using a highly sensitive test. *J Virol Methods.* 2002 ; 101(1-2): 29–35.
- [98] Goncalves PL, Cunha CB, Busek SCU, Oliveira GC, Ribeiro-Rodrigues R, Pereira FEL. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. *Braz J Infect Dis.* 2005 ; 9(1): 28–34.
- [99] Maticic M, Poljak M, Kramar B, Seme K, Brinovec V, Meglic-Volkar J, et al. Detection of hepatitis C virus RNA from gingival crevicular fluid and its relation to virus presence in saliva. *J Periodontol.* 2001 ; 72(1): 11–16.
- [100] Lins L, Almeida H, Vitvisk L, Carmo T, Parana R, Reis MG. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva is not related to oral health status or viral load. *J Med Virol.* 2005 ; 77(2): 216–220.
- [101] Suzuki T, Omata K, Satoh T, Miyasaka T, Arai C, Maeda M, et al. Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43(9): 4413–4417.
- [102] Liou TC, Chang TT, Young KC, Lin XZ, Lin CY, Wu HL. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol.* 1992 ; 37(3): 197–202.
- [103] Komiyama K, Kawamura F, Arakawa Y, Mastuo H, Hayashi N, Shikata T, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV)-RNA in saliva and gastric juice. *Adv Exp Med Biol.* 1995 ; 371B: 995–997.
- [104] Parker SP, Cubitt WD, Ades AE. A method for the detection and confirmation of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots. *J Virol Methods.* 1997 Nov;68(2):199–205.
- [105] McCarron B, Fox R, Wilson K, Cameron S, McMenamin J, McGregor G, et al. Hepatitis C antibody detection in dried blood spots. *J Viral Hepat.* 1999 ; 6(6): 453–456.

- [106] Croom HA, Richards KM, Best SJ, Francis BH, Johnson EIM, Dax EM, et al. Commercial enzyme immunoassay adapted for the detection of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots. *J Clin Virol*. 2006 ; 36(1): 68–71.
- [107] Tuaille 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): 752–758.
- [108] Behets F, Kashamuka M, Pappaioanou M, Green TA, Ryder RW, Batter V, et al. Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole blood dried on filter paper and stored under various tropical conditions in Kinshasa, Zaire. *J Clin Microbiol*. 1992 ; 30(5): 1179–1182.
- [109] Abe K, Konomi N. Hepatitis C virus RNA in dried serum spotted onto filter paper is stable at room temperature. *J Clin Microbiol*. 1998 ; 36(10): 3070–3072.
- [110] Monleau M, Butel C, Delaporte E, Boillot F, Peeters M. Effect of storage conditions of dried plasma and blood spots on HIV-1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance genotyping. *J Antimicrob Chemother*. 2010 ; 65(8): 1562–1566.
- [111] Laforgerie E, Boucher B, Ly TD, Maisoneuve L, Izopet J, Delaugerre C, et al. Sensitivity of 8 CE (European Community)-approved rapid disposable tests for anti-HIV antibody detection during and after seroconversion. *J Virol Methods*. 2010 ; 165(1): 105–107.
- [112] 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 ; 5(7): e11581.
- [113] Cumiskey J. False positive oral fluid rapid HIV tests, New York City, 2005-2008. *CDC*. 2008 ; 57(24): 660–665.
- [114] 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): 15–17.
- [115] 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.
- [116] Smith BD, Drobeniuc J, an Bernard M Branson AJ, Garfein RS. Evaluation of three rapid screening assays for detection of antibodies to hepatitis C virus. *The journal of infectious diseases*. 2011 ; 204: 825–831.
- [117] COFRAC. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / Validation (portée B) des méthodes en Biologie Médicale. SH-GTA-04. Avril 2011.

**Performance of a point-of-care and an antigen–antibody combined assay
for hepatitis C virus screening without venipuncture**

Sylvie LARRAT^{1*}, Cécile BOURDON¹, Monique BACCARD¹, Cécile GARNAUD¹,
Sophie MATHIEU¹, Marie-Noelle HILLERET², Jean-Louis QUESADA³, Anne
SIGNORI-SCHMUCK¹, Myriam BLANC⁴, Pascale LECLERCQ⁴, Vincent LEROY²,
Jean-Pierre ZARSKI², Patrice MORAND¹

¹ Laboratoire de Virologie /UMI 3265 CNRS-UJF-EMBL, CHU Grenoble, BP 217, 38043
Grenoble cedex 9, France

² Clinique universitaire d’Hépatogastro-entérologie/ INSERM U823, CHU Grenoble, BP
217, 38043 Grenoble cedex 9, France

³ Centre d’Investigation Clinique/ INSERM 003, CHU Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble
cedex 9, France

⁴ Clinique universitaire d’Infectiologie CHU Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9,
France

Corresponding author :

Sylvie LARRAT

Laboratoire de Virologie

Institut de Biologie et Pathologie

CHU Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9, France

Tel: (33)-476-765-604.
Fax: (33)-476-765-228
e-mail: Slarrat@chu-grenoble.fr

Electronic word count: 4928

Number of figures: 4

Number of tables: 1

List of abbreviations:

**HCV: hepatitis C virus; POC: point of care; cEIA: combined enzyme immunoassay;
HCV; antigen–antibody assay; FB: fingerstick blood; OMT: oral mucosal transudate;
IDU: injection drug users, RT: room temperature, DBS: dried blood spots**

Conflict of interest:

Roche Diagnostics provided kits for HCV RT-PCR on DBS.

Financial support:

**This work was financially supported by a grant from the Agence Nationale de
Recherches sur le SIDA et les Hépatites virales (ANRS) and to a lesser extent by Roche
Pharmaceutics, Roche Diagnostics and Merck/Schering-Plough.**

Abstract:

Background & aims: To increase the opportunities for hepatitis C virus (HCV) screening, we evaluated the analytical performance of the point-of-care (POC) HCV Oraquick device from Orasure Technologies and the combined HCV antigen–antibody assay (cEIA) from Bio-Rad on fingerstick blood (FB) and oral mucosal transudate (OMT).

Methods: FB, OMT and serum samples were collected from 201 patients, 113 of whom were HCV-antibody-positive, including 63 patients with quantifiable HCV-RNA, and 88 HCV-antibody-negative.

Results: With FB specimens, both assays exhibited a specificity of 100% with 97.4% sensitivity for the Oraquick-HCV device and 98.2% for the cEIA-Bio-Rad assay. Using the Cobas-TaqMan-HCV test on dried FB, HCV-RNA was also detected in 60 of 61 (98%) patients with serum HCV-RNA greater than 3 log IU/mL. With OMT specimens, Oraquick-HCV sensitivity was 94.6% with 100% specificity, whereas cEIA sensitivity was only 71.7% for 94.3% specificity. Evaluation of storage conditions showed that specificity of the cEIA assay sharply decreased after 3 days at room temperature as well as the sensitivity of the RT-PCR assays after 5 days when dried FB spots were not frozen.

Conclusion: FB sampling followed by a POC Oraquick-HCV assay or by a Bio-Rad cEIA, after appropriate storage, is a reliable alternative to venous sampling for the detection of anti-HCV antibodies. Moreover, chronic infection can be assessed on the same sample using HCV-RNA RT-PCR.

Electronic word count of the abstract: 221

Keywords: **alternative sampling, dried blood spots, oral mucosal transudate, high-risk population, HIV/HCV co-infection**

Introduction:

Hepatitis C virus (HCV) infections remain under-diagnosed in developing and developed countries, precluding adequate management of this worldwide infection. These patients constitute a reservoir for the dissemination of the virus and are at risk of developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Recent advances in anti-HCV drugs have increased the benefit of treatment, by clearing the virus in around 70% of chronically infected patients [1]. Moreover, early detection of recent infection allows a sustained virological response in 63% of patients with only 6 months of pegylated- α -interferon [2]. Eradication of the virus from the contaminated population will be highly dependent on increasing diagnosis [3].

This under-diagnosis is in part due to the poor acceptability and feasibility of venipuncture in various high-risk populations, especially intra-venous drug-users (IDU). Alternative samplings such as oral mucosal transudate (OMT) or fingerstick blood (FB) increase the opportunities for HCV screening in these populations [4, 5]. The use of OMT, sampled with the Orasure-Device, or FB dried on protein saver cards as dried blood spots (DBS) associated with third-generation enzyme-immunoassay (EIA) detection of HCV antibodies has already been explored, showing adequate analytical performance. However, the performance of the combined enzyme-immunoassay (cEIA) detecting simultaneously HCV core protein and anti HCV antibodies on OMT or DBS is still unknown. The combination with the HCV-antigen search may allow detecting the virus 20–50 days before third-generation EIA [6], thus making it possible to frequently re-test patients with a high risk of contamination such as IDUs. Detection of the viral capsid antigen may also increase the sensitivity of HCV infection screening in

populations with delayed anti-HCV antibody response such as HIV-positive or haemodialysis patients [7, 8].

Alternatively, point-of-care (POC) devices may also help promote large-scale screening of HCV-infected patients by increasing testing opportunities outside of traditional laboratory settings [9]. A Center for Disease Control and Prevention study retrospectively evaluated three recently developed HCV POC devices on serum and highlighted the differences in their analytical performance, underlining the need for preliminary independent evaluations [10].

The aim of the present study was to evaluate the analytical performance of these two HCV screening strategies in OMT and FB using the CE-marked POC device Oraquick[®]-HCV-Rapid-Antibody-Test (Orasure Technologies, Bethlehem, PA, USA) and a laboratory-based commercialized cEIA Monolisa[®]-HCV-Ag-Ab-ULTRA (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Furthermore, because the screening strategy of HCV positive patients also relies on HCV-RNA detection, this study tested the HCV-RNA detection with an automated Ampliprep Taqman (Roche Diagnostics, Meylan, France) on FB specimen collected on DBS

Materials and Methods

Study population

Samples were collected from 113 patients attending Grenoble University Hospital for HCV infection monitoring and 88 controls seen on the same period for the follow-up of another pathology. To reflect HCV prevalence in IDU populations, the study included 113 anti-HCV-positive and 88 anti-HCV-negative serum samples selected on a previous EIA anti-HCV result. The presence of anti-HCV antibodies was confirmed with cEIA (Monolisa[®]-HCV-Ag-Ab-ULTRA, Bio-Rad) on the serum collected on the day of the study. Seventeen of the anti-

HCV-positive patients were chronically co-infected with HIV and two with HBV (one with undetectable HBV DNA and one with an HBV viral load of 57 IU/mL, COBAS® Ampliprep/Taqman HBV-Test v2, Roche Diagnostics). Among HIV-HCV co-infected patients, at the time of the sampling, 12 had undetectable HIV RNA and the mean HIV viral load of the five other patients was 43 copies/mL (COBAS® Ampliprep/Taqman HIV1-Test v2, Roche Diagnostics). In the anti-HCV-negative patients, 22 were mono-infected with HIV (14 undetectable HIV-RNA, mean positive viral loads: 8150 copies/mL) and 16 with HBV (11 undetectable HBV-DNA, mean positive viral loads: 1,329,800 UI/mL). On plasma collected at the same time, 63 out of the 113 anti-HCV-positive antibody patients had quantifiable HCV-RNA in plasma (i.e. >43 IU/mL), seven had HCV-RNA detectable but less than 15 IU/mL, and for 43 of them HCV-RNA was not detected using the Cobas-Ampliprep/Cobas-Taqman-HCV test (Roche Diagnostics). On the 43 HCV-antibody-positive HCV-RNA-negative patients, 16 were under anti-HCV therapy at the time of the study. HCV genotypes were displayed as follows: 73% genotype 1, 3% genotype 2, 11% genotype 3 and 14% genotype 4. On the 43 HCV-antibody-positive HCV-RNA-negative patients, 16 were under anti-HCV therapy at the time of the study. The protocol was approved by the Institutional Review Board (CCPPCRB 2011-09: Comité de Protection des Personnes Sud-Est I). All patients provided written informed consent before participating in the study.

Sample collection and processing

For each patient, 2 OMT samplings were performed for the rapid test or the cEIA by swiping the gums with the collection pad protruding from the Oraquick®-HCV device and using the Orasure collection system (Orasure Technologies) following the manufacturer's instructions. For cEIA analysis, the Orasure pad was then placed in the associated vial containing only 400 µl of preservative solution instead of the initial 800 µl to minimise dilution of the sample.

These samples were immediately transported to the laboratory where vials were centrifuged 10 min at 1000 g to elute the sample from the pad. This eluate was then stored at -20°C before analysis. The order in which the two OMT samples were taken was randomised and a minimal 10-min delay was respected between the two collections. FB was obtained pricking the index finger with a sterile 0.8-mm lancet (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) and was placed alternatively on the specimen loop associated with the OraQuick® HCV assay and on a Protein-Saver-903-Card (Whatman, Dassel, Germany) to fill eight 10-mm pre-printed circular disks. The cards were then dried 24 h at room temperature (RT) and forwarded in a zipped plastic bag to the laboratory. Dried blood spots (DBS) 6 mm in diameter were punched out: four of them were stored at -20°C before cEIA analysis and four were stored at -80°C before RT-PCR.

The results of the qualitative immune-chromatographic Oraquick®-HCV assays on OMT and FB were interpreted 20 min after sampling as described by the manufacturer, and the cEIA assays were tested further in laboratory settings.

Adaptation of the antigen–antibody combined HCV enzyme immunoassay for OMT and DBS analysis

Use of cEIA outside of the CE-labelling was authorised by AFSSAPS decision no.2011-A00280-41. For the DBS elution, two 6-mm discs were incubated overnight in an uncoated microtiter plate well with 130 μl of elution buffer (phosphate-buffered saline, 0.05% Tween 20 and 1% bovine serum albumin) with gentle shaking at RT. cEIA was then performed on 50 μl of this DBS eluate and on 200 μl of OMT eluate following the recommendations given by the manufacturer for serum analysis.

HCV-RNA detection

HCV-RNA detection was performed on two pooled 6-mm DBS for each patient after elution and extraction as described by Tuailon et al [11].

Evaluation of DBS and OMT storage conditions

The DBS storage conditions for the cEIA assay were evaluated from FB specimens of 3 anti-HCV-positive and 3 anti-HCV-negative patients. These samples were placed on filter paper as the 13 DBS pro patient. After initial cEIA analysis, four DBS for each patient were stored at RT, four at +4°C and four at -20°C. Analyses were then performed on days 3, 6, 9 and 12. Seven OMT samples of one anti-HCV-positive patient and seven samples from an anti-HCV-negative patient were also stored at these different temperatures and analysed on days 6 and 12.

To investigate the DBS storage conditions before RT-PCR, FB of three high-level HCV-RNA-positive patients (plasmatic viral load ranging from 5.8 to 6.8 log IU/mL) and three low-level HCV-RNA-positive (plasmatic viral load ranging from 3.8 to 4.8 log IU/mL) were placed on filter paper as 10 DBS pro patient. After day 0, RT-PCR analysis on plasma and DBS, three DBS pro patient were stored at RT, three at +4°C and three at -80°C. The RT-PCR analyses were performed on days 5, 9 and 13.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) for quantitative data and in terms of size and frequency for categorical data. The Student *t*-test was used to compare continuous data. The Mann-Whitney test was applied for non-Gaussian assumptions. Independence between qualitative parameters was assessed using either the chi-square test or with Fisher's exact test. Receiver-operating-characteristic (ROC) curve analysis was used to estimate the area under the curve [12] with 95% confidence intervals. To assess agreements between

methods, Kappa statistics were used. Confidence intervals [13] for sensitivity and specificity were calculated using the Wilson Score method [14]. AUC comparison was performed as described in DeLong et al. [15].

The statistical analysis was performed using STATA release 11.1 (STATA Corp, College Station, Texas, USA) for PC Software. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Performance of HCV screening on FB and OMT

Performances of the two Oraquick-HCV and cEIA-Bio-Rad assays in FB and OMT for 201 patients are shown in Table 1. For FB specimens, the Oraquick-HCV device showed 97.4% sensitivity [92.5; 99.1] and 100% specificity [95.8; 100]. With the cEIA Bio-Rad assay, the optical density (OD) means \pm standard deviation were 5.70 ± 1.45 in serum anti-HCV-positive patients for 1.73 ± 0.51 on DBS and 0.16 ± 0.07 for serum anti-HCV-negative patients for 0.08 ± 0.02 on DBS. For DBS analysis, an optical density cutoff set at 0.20 (Fig. 1A) gave 100% [95.8; 100] specificity and 98.2% sensitivity [93.8; 99.5]. The agreement between these two assays and results obtained in serum was excellent according to their respective Kappa index (k: 0.97 for Oraquick-HCV assay and k: 0.98 for cEIA) (Fig. 2A). A total of 5 false negative results were observed in four anti-HCV positive patients. One false-negative result was common to the two assays, corresponding to a past IDU patient whose hepatitis C spontaneously resolved and who had a low index value of 1.70 on the serum cEIA assay. Two other false HCV-negative results were observed only with the Oraquick®-HCV performed in HIV co-infected patients whose hepatitis C virus cleared, spontaneously or after treatment, attested by repeatedly negative HCV-RNA results. The index value of the cEIA in serum was 2.50 and 3.30 for these two samples. The last false negative result was observed only with the cEIA in an HCV-RNA-positive patient with a cEIA serum index value of 4.8. Taking into account 100% specificity, the positive predictive value (PPV) was 100% for the two assays even though the HCV prevalence. Negative predictive values (NPV) were 96.7% for the Oraquick-HCV and 97.8% for the cEIA-Bio-Rad with the HCV prevalence of this study, which was 56.2%.

Concerning the analysis of the OMT specimens, Oraquick®-HCV showed a sensitivity of 94.6% [88.6; 97.5] with 100% specificity [95.7; 100] on 196 patients leading to a NPV of

93.48% and a kappa index of 0.94. Six false-negative results were observed with the Oraquick®-HCV on OMT. Five of them came from HCV-RNA-negative patients whose hepatitis C virus cleared spontaneously in two cases or after treatment since more than three years for the others and four of them came from HIV co-infected patients. Five results were invalid due to the absence of migration of the samples. If the invalid results were taken into account, the sensitivity fell to 92% [85.6; 95.8] and specificity to 97.7% [92.1; 99.4]. PPV was then 98.1% and NPV 90.5%.

With a cutoff value of 0.10, the cEIA-Bio-Rad assay performance was significantly lower than the same assay on FB ($p < 0.001$) and the Oraquick®-HCV device on OMT ($p < 0.03$) with 71.7% sensitivity [62.8; 79.2] for 94.3% specificity [87.4; 97.5] (Fig. 2B). The PPV was then 94.2% and the NPV 72.2%. Changing the cutoff value did not improve sensitivity and specificity, as shown by the ROC curve shown in Figure 1B.

Detection of HCV-RNA on DBS

The second step of HCV screening was to determine whether the virus was replicating in HCV-seropositive patients. Qualitative HCV-RNA RT-PCR was evaluated on DBS in HCV-RNA-positive and HCV-RNA-negative patients. The sensitivity of RT-PCR on DBS was 95.2% [86.9; 98.4] and specificity was 100% [97.2; 100] when compared to HCV RNA detection on plasma with a kappa index of 0.96. In this study, HCV RNA positivity prevalence was 32.5% and led to 97.8% NPV. On the 3 false negative results, 2 cases displayed a plasmatic viral load less than 2.2 log IU/mL and the plasmatic viral load of the third case was 5.3 log IU/ml. Finally, HCV-RNA was detected in 60 of 61 (98.4%) of the patients with HCV-RNA greater than 3 log UI/mL in plasma.

It should be noted that the seven samples of treated patients with detectable serum HCV-RNA but less than 15 IU/mL were excluded from the analysis. No HCV-RNA could be detected in the corresponding DBS.

Factors influencing HCV screening

In the univariate analysis, HCV-RNA positivity ($p<0.001$), HIV negative status ($p=0.007$) and HBsAg negativity ($p=0.0047$) were significantly associated with higher cEIA OD on FB (Fig. 3A and 3B). On OMT, only HIV status ($p=0.0125$) and HCV replication ($p<0.001$) were linked to cEIA OD. HBV status was not associated with statistically different OD. In multivariate ANOVA analysis that used variables that were statistically significant in the univariate analysis and HCV serology, only HIV positivity was independently associated with lower cEIA OD on FB ($p<0.001$) and OMT ($p=0.049$). On HCV-positive patients, the FB mean optical densities of HIV-negative patients were 2.02 [1.70; 2.20] versus 0.71 [0.42; 1.68] for HIV-positive patients ($p<0.001$) (Fig. 3D). OMT cEIA optical densities were also different, reaching only 0.08 [0.06; 0.11] for HIV-positive patients versus 0.18 [0.10; 0.35] for HIV-negative patients ($p<0.001$). The population of only two HCV–HBV co-infected patients was too small to perform statistical analysis. More surprisingly, HCV-RNA positivity was not associated with higher optical densities in FB specimens in HCV-positive patients (1.95 [1.68; 2.15] versus 1.84 [0.71; 2.16]; $p=0.303$) or in OMT (0.15 [0.10; 0.30] versus 0.11 [0.08; 0.25]; $p=0.235$) (Fig. 3C).

Storage conditions for cEIA analysis of OMT and DBS

The storage temperature of OMT and DBS were evaluated in anticipation of their sampling outside of laboratory settings. After 3 days of RT storage, the three HCV-negative DBS tested with cEIA gave absorbance values reaching or exceeding the threshold level. When stored at

+4°C, one out of three negative DBS reached the cut-off value on day 6 and two out of three were positive on day 12. Frozen negative DBS stored at -20°C exhibited stable optical densities throughout the 12 days of storage. The three HCV-positive DBS with various starting cEIA absorbance values did not show significant change during the 12 days of this experiment, whatever the storage temperature (Fig. 4A). For OMT samples, the HCV-positive specimen did not highlight any difference according to storage temperatures but the negative OMT sample stored at RT reached the cutoff level on day 12 (Fig. 4B). HCV-RNA quantification on six different FB stored as DBS at various temperatures showed a mean decrease of 0.95 ± 0.48 log IU/mL after 13 days of storage at RT versus 0.41 ± 0.44 log IU/mL when stored at +4°C or 0.13 ± 0.13 log IU/mL at -80°C (Fig. 4C).

Discussion

To increase HCV screening in high-risk populations, alternative sampling methods and modes of analysis are needed. Before testing these strategies in such populations, it is mandatory to explore their analytical performance. To our knowledge, this study describes for the first time the use of a HCV antigen–antibody assay on OMT and FB and provides the first independent evaluation of a POC HCV Oraquick device on the same specimens.

With 97.4% sensitivity when tested with the Oraquick-HCV device and 98.2% when tested with the cEIA and 100% specificity with both assays, FB sampling seems a reliable alternative to venipuncture for HCV screening. It can be noted that sensitivities did not significantly differ between the 2 techniques ($p=0.652$). Predictive values were also excellent for the two assays in the study population, which was chosen to represent the IDU population. HCV seroprevalence in this study was 56.4% and similar to that reported by the French Institut National de Veille Sanitaire (59.8%), the Coquelicot IDU study and a recent English IDU study (54%) [16, 17]. Given that HCV-RNA-positive patients enrolled in this study were chronically infected, it was not possible to evaluate the potential of cEIA to detect earlier acute infection. This study was not designed to highlight any difference between these two assays but rather to assess their performance on FB and OMT. In this study, observed Oraquick-HCV sensitivity on FB specimens is slightly lower than in studies published by the manufacturer, but false results corresponded to patients with resolved hepatitis C infection and relatively low index serum cEIA values (<3.5) [18, 19]. The results obtained with the cEIA were close to those described with third-generation HCV assays [11, 13]. Finger blood specimens collected on DBS for cEIA can also be used for HCV-RNA testing. Similar to the study of Tuailon et al., we found that 98.4% of the patients with a plasmatic HCV viral load greater than 3 log IU/mL who likely represent the vast majority of the patients in diagnostic setting, were RNA positive on DBS.

HCV screening on OMT was also investigated in this study. A sensitivity of 94.6% associated with 100% specificity was observed using the Oraquick-HCV device. This is also slightly lower than the performance described by the manufacturer (98.1% and 99.2% sensitivity for a 100% specificity according to the studies) but much better than those obtained with the cEIA (71.7% with 94.3% specificity) or in the earlier studies using third-generation EIA, which described sensitivities ranging from 74.1 to 91.7% with specificities between 94 and 100% [18, 19]. The quantity of immunoglobulins in OMT is roughly 1/800 diluted compared with serum, and serum assays must be modified to enhanced sensitivity on such specimens [20]. Common modifications of third-generation tests such as inverting the sample-to-diluent ratio could not be applied to cEIA because of the assay's limitations. Increasing incubation times did not increase the sensitivity of the assay (data not shown).

To investigate the impact on HCV screening of the presence of HIV or HBV infections, which are frequent in IDU settings, HIV and HBV mono-infected patients as well as HIV/HCV or HBV/HCV co-infected patients were included in this study. HIV or HBV mono-infection did not impact the specificities of these assays, but HIV in co-infected patients was associated with a significant decrease in the observed cEIA OD on FB and OMT. A lower HCV antibody level has already been described in HIV-infected patients associated with a loss of B lymphocytes and a lack of recovery of specific humoral immune responses after successful antiretroviral therapy [21-23]. Delayed HCV antibody response was also described in HIV-positive patients acutely infected with HCV [8]. On the other hand, the association of HCV replication (i.e. HCV-RNA positivity in serum) with higher OD values, which has already been described in a number of studies with third-generation assays, was found in univariate analysis on FB [20, 24, 25]. Despite a trend ($p=0.0862$), multivariate analysis did not confirm this relation, probably because some of HCV-seropositive RNA-negative patients of this study were currently or recently treated.

To reach high-risk populations, samples had to be taken outside of laboratory settings. If analysis was not immediately done, as with the POC devices, this study clearly demonstrated the importance of storage conditions. To practice a cEIA HCV screening and/or an HCV-RNA RT-PCR, DBS should be either frozen or shipped at room temperature to the laboratory within 3 days of sampling. As described by Tuailon et al. with a third-generation EIA [11] and in contrast with previous report [26], we observed a sharp decrease in cEIA specificity when testing DBS after more than 3 days' storage at room temperature and a decrease of HCV-RNA loads after 5 days of storage at room temperature.

This study had some limitations: no acute hepatitis was included to demonstrate the advantage of using cEIA on FB instead of a third-generation EIA. The number of patients was also too low to highlight any analytical performance difference between POC and cEIA for FB specimens. Nevertheless, FB sampling associated with either the POC HCV-Oraquick or cEIA-Bio-Rad appeared as a reliable alternative to venous sampling. DBS properly stored for this second assay also allows HCV-RNA testing with a commercially available RT-PCR assay to identify viremic patient. The POC Oraquick-HCV or cEIA-Bio-Rad on FB specimens are reliable enough to envisage a larger study comparing these two different strategies on high-risk patients in specialist drug treatment centers and prisons.

Acknowledgments:

The authors also thank Ms. Linda Northrup for revision of the English manuscript.

References

- [1] Asselah T, Marcellin P. New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int* 2011;31 Suppl 1:68-77.
- [2] Matthews GV, Pham ST, Hellard M, Grebely J, Zhang L, Oon A, et al. Patterns and characteristics of hepatitis C transmission clusters among HIV-positive and HIV-negative individuals in the Australian trial in acute hepatitis C. *Clin Infect Dis* 2011;52:803-811.
- [3] Deuffic-Burban S, Mathurin P, Pol S, Larsen C, Roudot-Thoraval F, Desenclos J, et al. The availability of direct acting antivirals in 2012 : a french model based analysis of the increased number of patients treated for chronic HCV infection. *J Hepatol* 2011;54:S539.
- [4] Hickman M, McDonald T, Judd A, Nichols T, Hope V, Skidmore S, et al. Increasing the uptake of hepatitis C virus testing among injecting drug users in specialist drug treatment and prison settings by using dried blood spots for diagnostic testing: a cluster randomized controlled trial. *J Viral Hepat* 2008;15:250-254.
- [5] White B, Day C, Thein HH, Doab A, Bates A, Holden J, et al. Acceptability of hepatitis C virus testing methods among injecting drug users. *Drug Alcohol Rev* 2008;27:666-670.
- [6] Schnuriger A, Dominguez S, Valantin MA, Tubiana R, Duvivier C, Ghosn J, et al. Early detection of hepatitis C virus infection by use of a new combined antigen-antibody detection assay: potential use for high-risk individuals. *J Clin Microbiol* 2006;44:1561-1563.
- [7] Miedouge M, Saune K, Kamar N, Rieu M, Rostaing L, Izopet J. Analytical evaluation of HCV core antigen and interest for HCV screening in haemodialysis patients. *J Clin Virol* 2010;48:18-21.

- [8] Thomson EC, Nastouli E, Main J, Karayiannis P, Eliahoo J, Muir D, et al. Delayed anti-HCV antibody response in HIV-positive men acutely infected with HCV. *Aids* 2009;23:89-93.
- [9] Anderson DA, Crowe SM, Garcia M. Point-of-care testing. *Curr HIV/AIDS Rep* 2011;8:31-37.
- [10] Smith BD, Drobeniuc J, Jewett A, Branson BM, Garfein RS, Teshale E, et al. Evaluation of three rapid screening assays for detection of antibodies to hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2011;204:825-831.
- [11] Tuailleon 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;51:752-758.
- [12] Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, et al. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 2002;36:211-218.
- [13] Croom HA, Richards KM, Best SJ, Francis BH, Johnson EI, Dax EM, et al. Commercial enzyme immunoassay adapted for the detection of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots. *J Clin Virol* 2006;36:68-71.
- [14] Newcombe RG. Interval estimation for the difference between independent proportions: comparison of eleven methods. *Stat Med* 1998;17:873-890.
- [15] DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44:837-845.
- [16] Hope VD, Hickman M, Ngui SL, Jones S, Telfer M, Bizzarri M, et al. Measuring the incidence, prevalence and genetic relatedness of hepatitis C infections among a community recruited sample of injecting drug users, using dried blood spots. *J Viral Hepat* 2011;18:262-270.

- [17] Jauffret Roustide M CE, Le Strat Y, Barin F, Emmanuelli J, Semaille C, et al. Estimation de la séroprévalence du VIH et VHC et profils des usagers de drogue en France : étude InVS-ANRS coquelicot 2004. . Bull Epidemiol Hebd 2006;33:244-247.
- [18] 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;172:27-31.
- [19] 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;48:15-17.
- [20] Cameron SO, Carman WF. The use of the OraSure collection device for hepatitis virus testing in health care settings. J Clin Virol 2005;34 Suppl 1:S22-28.
- [21] Garcia-Costa J, Romero PA, Soriano V, Sheldon J, Toro C. Seroreversion of hepatitis C virus (HCV) antibodies in an HIV-infected patient despite continuous HCV replication. Clin Infect Dis 2009;48:1634-1635.
- [22] Herrero-Martinez E, Sabin CA, Lee CA, Jones IM, Pillay D, Emery VC. The effect of highly active antiretroviral therapy for HIV on the anti-HCV specific humoral immune response. J Med Virol 2004;72:187-193.
- [23] Titanji K, De Milito A, Cagigi A, Thorstensson R, Grutzmeier S, Atlas A, et al. Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. Blood 2006;108:1580-1587.
- [24] Lucidarme D, Decoster A, Delamare C, Schmitt C, Kozlowski D, Harbonnier J, et al. [An inter-laboratory study of anti-HCV antibody detection in saliva samples]. Gastroenterol Clin Biol 2003;27:159-162.

- [25] van Doornum GJ, Lodder A, Buimer M, van Ameijden EJ, Bruisten S. Evaluation of hepatitis C antibody testing in saliva specimens collected by two different systems in comparison with HCV antibody and HCV RNA in serum. *J Med Virol* 2001;64:13-20.
- [26] McCarron B, Fox R, Wilson K, Cameron S, McMenamin J, McGregor G, et al. Hepatitis C antibody detection in dried blood spots. *J Viral Hepat* 1999;6:453-456.

Fig. 1. : Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis of FB and OMT HCV optical densities assessed with the cEIA assay.

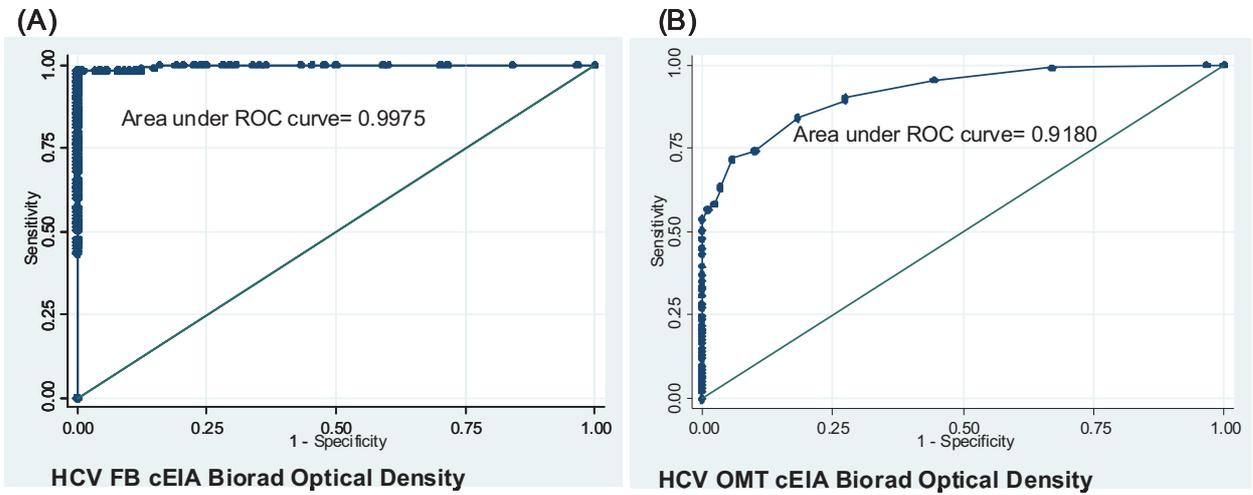


Fig. 2.: cEIA optical density according to HCV serological status in FB and OMT.

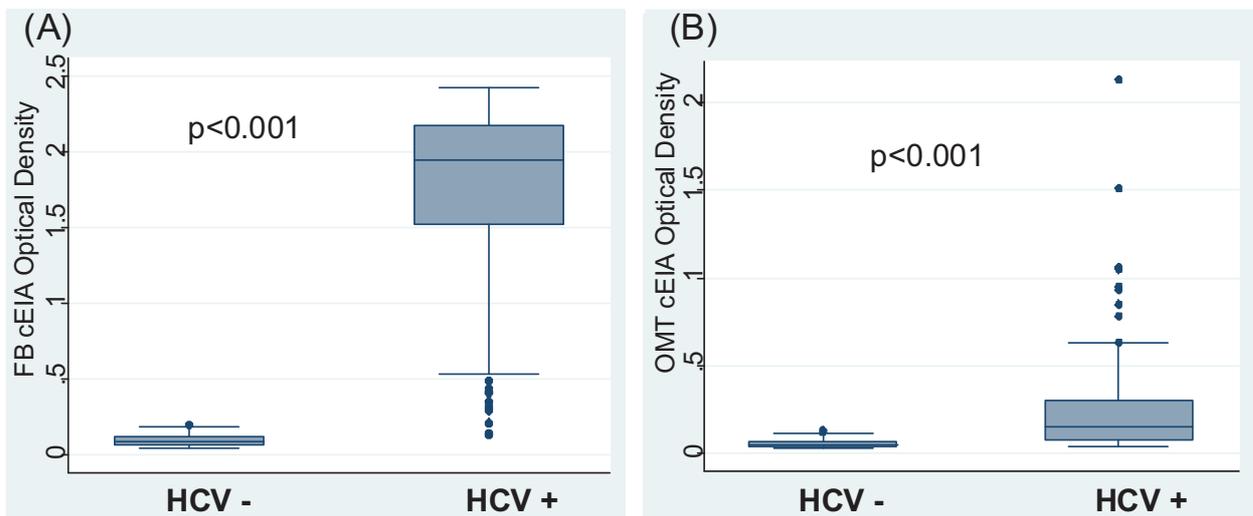


Fig. 3. : Finger blood HCV cEIA optical density according to factors influencing HCV screening.

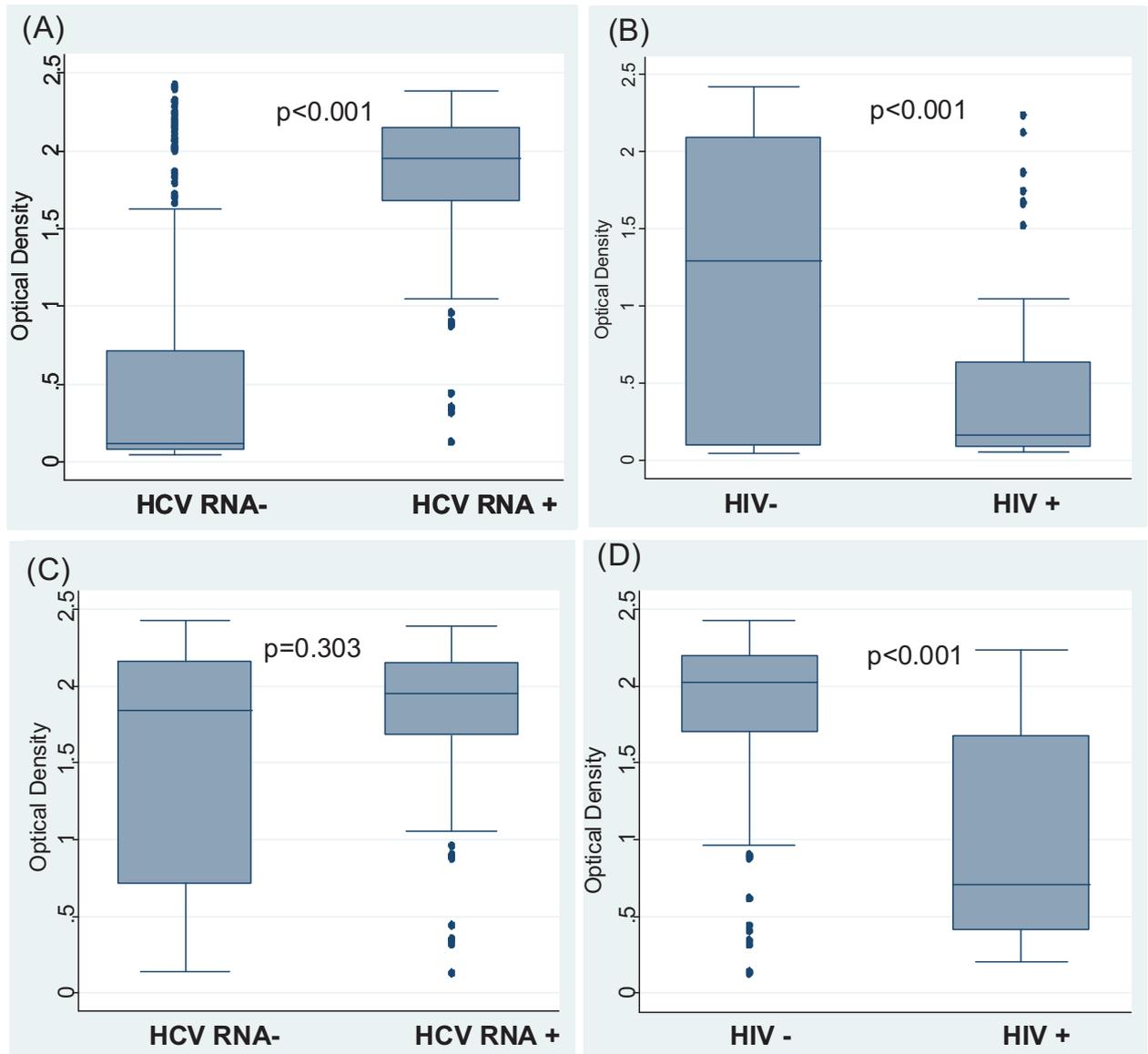


Fig. 4.: Storage conditions for cEIA analysis of OMT and DBS

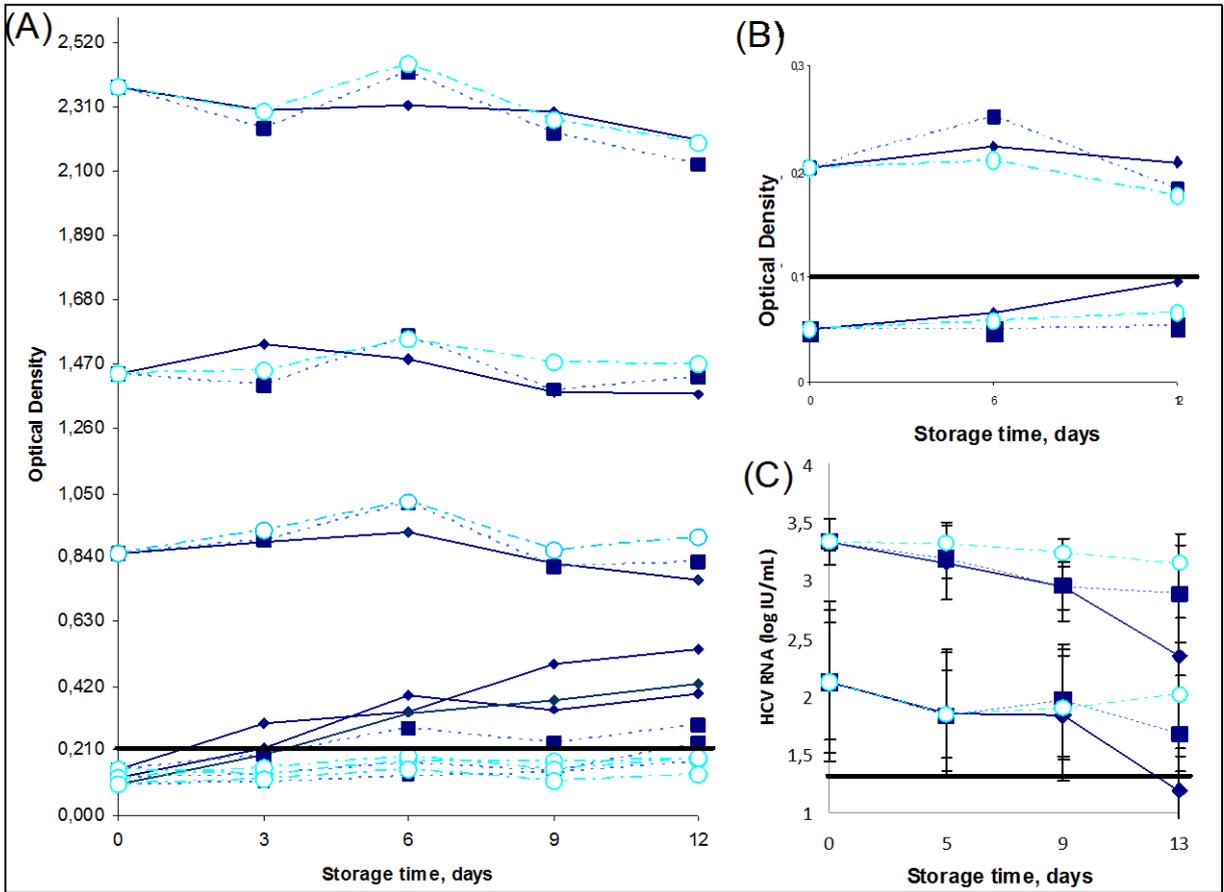


Table 1: Performance of HCV screening of point-of-care OraQuick® HCV and cEIA

Monalisa® HCV Ag-Ab ULTRA on finger blood and oral mucosal transudate specimens

		Sensitivity [95%CI]	Specificity [95%CI]	PPV	NPV	LR+	LR-	TP	FP	FN	TN
Finger blood	OraQuick® HCV	97.4% [92.5; 99.1]	100% [95.8; 100]	100%	96.7%	∞	0.03	110	0	3	88
	cEIA BioRad	98.2% [93.8; 99.5]	100% [95.8; 100]	100%	97.8%	∞	0.02	111	0	2	88
Oral mucosal transudate	OraQuick® HCV	94.6% [88.6; 97.5]	100% [95.7; 100]	100%	93.5%	∞	0.05	104	0	6	86
	cEIA BioRad	71.7% [62.8; 79.27]	94.3% [87.4; 97.5]	94.2%	72.2%	12.62	0.30	81	5	32	83

cEIA: antigen-antibody combined enzyme immunoassay Monalisa® HCV Ag-Ab ULTRA; PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value, LR: likelihood ratio, FN, false negative; FP, false positive; TN, true negative; TP, true positive

FICHE D'INFORMATION AU PATIENT

**Dépistage de l'infection par le virus de l'hépatite C :
adaptation et évaluation d'un test sérologique combiné pour
le dépistage du VHC sur prélèvement oral et de sang capillaire**

Investigateur coordonnateur :
Pr Patrice MORAND (Laboratoire de Virologie, CHU de Grenoble)

Promoteur : CHU Grenoble,

Madame, Monsieur,

Nous vous présentons ci-dessous pour information, l'étude pour laquelle nous souhaiterions votre participation volontaire lors d'une de vos venues au CHU pour un prélèvement ou une consultation de suivi. Nous restons à votre disposition pour répondre à toutes vos questions. Un exemplaire de cette fiche d'information vous est destiné.

Votre participation à cette étude est totalement volontaire et vous êtes libre de refuser d'y participer. Vous pouvez vous retirer de l'étude sans avoir à vous justifier et sans que cela ait de conséquence sur votre prise en charge médicale et les soins qui vous sont prodigués.

Afin d'éclairer votre décision voici des informations concernant cette recherche :

A l'heure actuelle, le dépistage du virus de l'hépatite C (VHC) est prescrit lors d'une consultation médicale puis réalisé sur une prise de sang au pli du coude, dans un laboratoire d'analyses médicales. Cela présente 2 inconvénients : 1-le patient doit se déplacer à 2 endroits différents et 2-subir un prélèvement invasif qui peut être particulièrement difficile chez les personnes ayant des veines fragiles. Ceci peut entraîner un frein au dépistage dans certaines catégories de population à risque qui n'ont pas un accès aisé aux services de soins et sont réfractaires à la prise de sang.

Cette recherche consiste donc à mettre au point et valider un test de diagnostic précoce du VHC sur des prélèvements oraux (salive) et de sang capillaire (goutte de sang sur buvard). Afin de mettre au point la technique et d'évaluer les caractéristiques (sensibilité et spécificité) de ce test, nous avons besoin de prélèvements oraux et de sang capillaire réalisés chez 140 patients ayant une sérologie positive pour le VHC connue et chez 60 patients connus pour avoir une sérologie négative pour le VHC.

Ces différents prélèvements seront réalisés en une seule fois par un infirmier et/ou un interne au sein du service d'hépatogastroentérologie ou du COREVIH du CHU de Grenoble.

Il s'agit de :

-1-un prélèvement veineux de contrôle de la sérologie et de la charge virale VHC (1 tube jaune+ 1 tube violet de 5 ml chacun) qui correspondent à ceux effectués lors du suivi habituel pour les patients porteurs d'une hépatite C.

-2-trois prélèvements oraux seront réalisés : le premier avec une spatule directement reliée avec un test de diagnostic rapide du VHC, les deux autres à l'aide de deux tampons Orasure® placés 2 minutes de chaque côté entre la mâchoire inférieure et la joue et qui seront ensuite remis dans le tube prévu à cet effet clairement identifié.

Paraphe du patient :

-3-un prélèvement de sang capillaire sera effectué au bout du doigt à l'aide d'une lancette de sécurité BD Microtainer® puis déposé en : 1 goutte sur un test de diagnostic rapide du VHC, et 8 gouttes sur une carte en buvard identifiée et mise dans un sachet plastique.

Il est à noter que du fait des prélèvements oraux il est préférable de ne pas avoir mangé ou fumer dans l'heure précédant le prélèvement.

Ces trois prélèvements seront transportés le jour même au service de virologie du CHU de Grenoble où ils seront stockés puis ultérieurement analysés et comparés entre eux afin de déterminer leur efficacité dans le dépistage du virus de l'hépatite C.

Les prélèvements réalisés n'engendrent aucun risque pour le patient et aucun bénéfice individuel n'est à attendre de cette étude. En revanche, la mise au point de ce test vise à permettre un meilleur accès au dépistage du VHC pour les personnes à haut-risque de contamination, de par sa réalisation possible lors de consultations délocalisées. Les bénéfices collectifs attendus sont donc une meilleure prise en charge de ces patients ainsi qu'une diminution du risque de transmission du virus à leur entourage.

Votre participation à l'étude sera ponctuelle et ne présente aucun risque spécifique hormis ceux induits par une prise de sang : malaise vagal, hématome au point de prélèvement.

Votre participation à cette recherche n'engendrera pour vous aucun frais supplémentaire

Aucune indemnisation ne vous sera versée pour votre participation à cette étude.

Vous avez obligation d'être affilié(e) à la sécurité sociale et d'être âgé de plus de 18 ans.

- Préalablement à sa mise en œuvre ce projet de recherche clinique a obtenu l'avis favorable du CPP Sud Est I en date du 15.04.2011 et l'Agence de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé décision no.2011-A00280-41 le 11304-2011. Le CHU de Grenoble, promoteur de cette recherche, a également pris toutes les dispositions prévues par la loi sur la protection des personnes (contrat d'assurance SHAM n°135.751; 18, rue Edouard Rochet, 69372 Lyon Cedex 08).

Cette étude bénéficie de la déclaration réalisée par le CHU de Grenoble, de conformité à la méthodologie de référence MR-001 de la CNIL

Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales en application des dispositions de l'article L 1111-7 du Code de la Santé Publique.

Ces droits s'exercent auprès du médecin qui vous suit dans le cadre de la recherche.

- Les échantillons prélevés pourront être stockés pour contrôle des données obtenues si nécessaire

- Ces échantillons seront conservés au Laboratoire de Virologie, Institut de Biologie et Pathologie, CHU de Grenoble sous la responsabilité du Dr Sylvie LARRAT

Les échantillons biologiques collectés ne seront utilisés que pour réaliser les analyses spécifiées dans l'étude et seront détruits à la fin de celle-ci.

A l'issue de cette recherche vous pourrez être informé de ses résultats globaux à votre demande, en envoyant un courrier au pharmacien biologiste investigateur : slarrat@chu-grenoble.fr (tel : 04.76.76.56.04)

Nous vous remercions de votre coopération et, si vous êtes d'accord, après un délai de réflexion d'une heure ou lors de votre prochaine consultation, nous vous demanderons de

bien vouloir signer le formulaire de consentement conjointement avec le médecin investigateur avant de démarrer la recherche.

Paraphe du patient :

Annexe 3 : Formulaire de consentement

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

Dépistage de l'infection par le virus de l'hépatite C : adaptation et évaluation d'un test sérologique combiné pour le dépistage du VHC sur prélèvement oral et de sang capillaire

Promoteur : CHU de Grenoble
Investigateur : Pr Patrice MORAND (CHU Grenoble)

Je soussigné (e) (nom, prénom, date de naissance)

Adresse du volontaire :
certifie avoir lu et compris le document d'information qui m'a été remis.

J'ai eu la possibilité de poser toutes les questions que je souhaitais au Drtel :et je pourrai à tout moment lui demander des informations complémentaires.

Pour participer à cette recherche, je suis affilié à un régime de sécurité sociale comme le prévoit la loi.

Je comprends que les événements indésirables potentiels de cette étude sont uniquement ceux potentiellement induits par la prise de sang (malaise vagal, hématome au point de prélèvement).

A tout moment, je suis libre d'arrêter ma participation à cette étude et de retirer mon consentement et en particulier d'interrompre le stockage des mes prélèvements sans encourir aucune responsabilité ni aucun préjudice de ce fait (article L.1122-1 du code de la santé publique).

J'accepte qu'une partie de mon sang soit stocké dans la bibliothèque de l'étude au CHU de Grenoble.

J'ai compris que l'utilisation de la bibliothèque sera sous la responsabilité de l'investigateur en charge de l'étude et du promoteur.

Je ne m'oppose pas à ce que les échantillons congelés soient utilisés pour vérifier éventuellement certaines données de cette présente étude.

J'ai compris que si d'autres études notamment génétiques doivent être réalisées, mon consentement sera demandé.

J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche puissent faire l'objet d'un traitement informatisé. J'ai bien noté que le droit d'accès prévu par la loi « Informatique et Libertés » du 6 janvier 1978 modifiée, s'exerce à tout moment auprès du Docteur et que je pourrai exercer mon droit de rectification et d'opposition auprès de celui-ci, directement ou par l'intermédiaire d'un médecin désigné à cet effet.

J'accepte que tout médecin ou scientifique impliqué dans le déroulement de cette étude, ainsi qu'éventuellement les représentants des Autorités de Santé aient accès aux données me concernant dans le respect le plus strict de la confidentialité.

Le promoteur de l'étude, le CHU de Grenoble a souscrit, en cas de préjudice, une assurance de responsabilité civile en cas de préjudice auprès de la SHAM n°135.751, 18 rue Edouard Rochet , 69372 Lyon cedex 08)

Paraphe du patient :

Mon consentement ne décharge en rien les organisateurs de l'étude de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits garantis par la loi.

J'accepte librement de participer à cette recherche dans les conditions précisées dans le document d'information.

Si je le souhaite, les résultats de mes examens et les résultats globaux de l'étude me seront communiqués directement selon l'article L1111-7 de la loi du 4 mars 2002 sur les droits des malades.

J'accepte librement de participer à cette recherche dans les conditions précisées dans la note d'information

Consentement signé en 3 exemplaires dont un remis au patient.

Fait à , le Signature du patient

Fait à , le Signature du médecin

*Annexe 4 : Test combiné sur sang capillaire (DO) et référence
(sérum –DO)*

Performances du test combiné sur sang capillaire (DO) et référence (sérum –DO)

Cut-off	Se	Sp	Classification	LR+	LR-
(\geq .05)	100.00%	0.00%	56.22%	1.0000	0.0000
(\geq .06)	100.00%	3.41%	57.71%	1.0353	0.0000
(\geq .07)	100.00%	15.91%	63.18%	1.1892	0.0000
(\geq .077)	100.00%	28.41%	68.66%	1.3968	0.0000
(\geq .08)	100.00%	29.55%	69.15%	1.4194	0.0000
(\geq .089)	100.00%	39.77%	73.63%	1.6604	0.0000
(\geq .09)	100.00%	40.91%	74.13%	1.6923	0.0000
(\geq .093)	100.00%	50.00%	78.11%	2.0000	0.0000
(\geq .094)	100.00%	52.27%	79.10%	2.0952	0.0000
(\geq .095)	100.00%	54.55%	80.10%	2.2000	0.0000
(\geq .1)	100.00%	56.82%	81.09%	2.3158	0.0000
(\geq .103)	100.00%	63.64%	84.08%	2.7500	0.0000
(\geq .108)	100.00%	64.77%	84.58%	2.8387	0.0000
(\geq .11)	100.00%	65.91%	85.07%	2.9333	0.0000
(\geq .114)	100.00%	69.32%	86.57%	3.2593	0.0000
(\geq .119)	100.00%	70.45%	87.06%	3.3846	0.0000
(\geq .12)	100.00%	71.59%	87.56%	3.5200	0.0000
(\geq .121)	100.00%	75.00%	89.05%	4.0000	0.0000
(\geq .122)	100.00%	76.14%	89.55%	4.1905	0.0000
(\geq .125)	100.00%	77.27%	90.05%	4.4000	0.0000
(\geq .127)	100.00%	79.55%	91.04%	4.8889	0.0000
(\geq .128)	100.00%	80.68%	91.54%	5.1765	0.0000
(\geq .13)	100.00%	84.09%	93.03%	6.2857	0.0000
(\geq .137)	99.12%	85.23%	93.03%	6.7093	0.0104
(\geq .141)	99.12%	87.50%	94.03%	7.9292	0.0101
(\geq .143)	98.23%	87.50%	93.53%	7.8584	0.0202
(\geq .152)	98.23%	88.64%	94.03%	8.6442	0.0200
(\geq .154)	98.23%	89.77%	94.53%	9.6047	0.0197
(\geq .156)	98.23%	90.91%	95.02%	10.8053	0.0195
(\geq .159)	98.23%	92.05%	95.52%	12.3489	0.0192
(\geq .16)	98.23%	94.32%	96.52%	17.2885	0.0188
(\geq .166)	98.23%	95.45%	97.01%	21.6106	0.0185
(\geq .188)	98.23%	96.59%	97.51%	28.8141	0.0183
(\geq .197)	98.23%	98.86%	98.51%	86.4427	0.0179
(\geq .21)	98.23%	100.00%	99.00%	0.0177	Diagnostic
(\geq .293)	97.35%	100.00%	98.51%	0.0265	
(\geq .317)	96.46%	100.00%	98.01%	0.0354	
(\geq .347)	95.58%	100.00%	97.51%	0.0442	
(\geq .351)	94.69%	100.00%	97.01%	0.0531	
(\geq .406)	93.81%	100.00%	96.52%	0.0619	

(>= .41)	92.92%	100.00%	96.02%	0.0708
(>= .418)	92.04%	100.00%	95.52%	0.0796
(>= .44)	91.15%	100.00%	95.02%	0.0885
(>= .49)	90.27%	100.00%	94.53%	0.0973
(>= .536)	89.38%	100.00%	94.03%	0.1062
(>= .617)	88.50%	100.00%	93.53%	0.1150
(>= .622)	87.61%	100.00%	93.03%	0.1239
(>= .643)	86.73%	100.00%	92.54%	0.1327
(>= .713)	85.84%	100.00%	92.04%	0.1416
(>= .88)	84.96%	100.00%	91.54%	0.1504
(>= .89)	84.07%	100.00%	91.04%	0.1593
(>= .901)	83.19%	100.00%	90.55%	0.1681
(>= .959)	82.30%	100.00%	90.05%	0.1770
(>= 1.05)	81.42%	100.00%	89.55%	0.1858
(>= 1.197)	79.65%	100.00%	88.56%	0.2035
(>= 1.21)	78.76%	100.00%	88.06%	0.2124
(>= 1.37)	77.88%	100.00%	87.56%	0.2212
(>= 1.42)	76.99%	100.00%	87.06%	0.2301
(>= 1.46)	76.11%	100.00%	86.57%	0.2389
(>= 1.52)	75.22%	100.00%	86.07%	0.2478
(>= 1.6)	74.34%	100.00%	85.57%	0.2566
(>= 1.62)	73.45%	100.00%	85.07%	0.2655
(>= 1.623)	72.57%	100.00%	84.58%	0.2743
(>= 1.63)	71.68%	100.00%	84.08%	0.2832
(>= 1.65)	70.80%	100.00%	83.58%	0.2920
(>= 1.663)	69.91%	100.00%	83.08%	0.3009
(>= 1.678)	69.03%	100.00%	82.59%	0.3097
(>= 1.7)	68.14%	100.00%	82.09%	0.3186
(>= 1.719)	65.49%	100.00%	80.60%	0.3451
(>= 1.729)	64.60%	100.00%	80.10%	0.3540
(>= 1.744)	63.72%	100.00%	79.60%	0.3628
(>= 1.75)	62.83%	100.00%	79.10%	0.3717
(>= 1.793)	61.95%	100.00%	78.61%	0.3805
(>= 1.8)	61.06%	100.00%	78.11%	0.3894
(>= 1.82)	60.18%	100.00%	77.61%	0.3982
(>= 1.83)	57.52%	100.00%	76.12%	0.4248
(>= 1.832)	56.64%	100.00%	75.62%	0.4336
(>= 1.838)	55.75%	100.00%	75.12%	0.4425
(>= 1.85)	54.87%	100.00%	74.63%	0.4513
(>= 1.86)	53.98%	100.00%	74.13%	0.4602
(>= 1.864)	53.10%	100.00%	73.63%	0.4690
(>= 1.865)	52.21%	100.00%	73.13%	0.4779
(>= 1.871)	51.33%	100.00%	72.64%	0.4867
(>= 1.95)	50.44%	100.00%	72.14%	0.4956
(>= 2)	47.79%	100.00%	70.65%	0.5221
(>= 2.003)	46.90%	100.00%	70.15%	0.5310
(>= 2.012)	46.02%	100.00%	69.65%	0.5398
(>= 2.016)	45.13%	100.00%	69.15%	0.5487
(>= 2.022)	44.25%	100.00%	68.66%	0.5575
(>= 2.03)	43.36%	100.00%	68.16%	0.5664

(>= 2.06)	41.59%	100.00%	67.16%	0.5841
(>= 2.07)	39.82%	100.00%	66.17%	0.6018
(>= 2.071)	38.94%	100.00%	65.67%	0.6106
(>= 2.09)	38.05%	100.00%	65.17%	0.6195
(>= 2.092)	37.17%	100.00%	64.68%	0.6283
(>= 2.096)	36.28%	100.00%	64.18%	0.6372
(>= 2.105)	34.51%	100.00%	63.18%	0.6549
(>= 2.11)	32.74%	100.00%	62.19%	0.6726
(>= 2.12)	31.86%	100.00%	61.69%	0.6814
(>= 2.124)	30.97%	100.00%	61.19%	0.6903
(>= 2.13)	30.09%	100.00%	60.70%	0.6991
(>= 2.138)	27.43%	100.00%	59.20%	0.7257
(>= 2.15)	26.55%	100.00%	58.71%	0.7345
(>= 2.151)	25.66%	100.00%	58.21%	0.7434
(>= 2.16)	24.78%	100.00%	57.71%	0.7522
(>= 2.162)	23.89%	100.00%	57.21%	0.7611
(>= 2.18)	22.12%	100.00%	56.22%	0.7788
(>= 2.183)	21.24%	100.00%	55.72%	0.7876
(>= 2.185)	20.35%	100.00%	55.22%	0.7965
(>= 2.195)	19.47%	100.00%	54.73%	0.8053
(>= 2.2)	18.58%	100.00%	54.23%	0.8142
(>= 2.201)	16.81%	100.00%	53.23%	0.8319
(>= 2.207)	15.93%	100.00%	52.74%	0.8407
(>= 2.213)	13.27%	100.00%	51.24%	0.8673
(>= 2.215)	12.39%	100.00%	50.75%	0.8761
(>= 2.236)	11.50%	100.00%	50.25%	0.8850
(>= 2.241)	10.62%	100.00%	49.75%	0.8938
(>= 2.25)	8.85%	100.00%	48.76%	0.9115
(>= 2.27)	7.96%	100.00%	48.26%	0.9204
(>= 2.273)	7.08%	100.00%	47.76%	0.9292
(>= 2.28)	6.19%	100.00%	47.26%	0.9381
(>= 2.29)	5.31%	100.00%	46.77%	0.9469
(>= 2.293)	3.54%	100.00%	45.77%	0.9646
(>= 2.3)	2.65%	100.00%	45.27%	0.9735
(>= 2.319)	1.77%	100.00%	44.78%	0.9823
(>= 2.323)	0.88%	100.00%	44.28%	0.9912
(>= 2.354)	0.00%	100.00%	43.78%	1.0000
(>= 2.357)	100.00%	0.00%	56.22%	1.0000

Annexe 5 : Test combiné sur FGC (DO) et référence (sérum – DO)

Performances du test combiné sur FGC (DO) et référence (sérum –DO)

Cut-off	Se	Sp	Classification	LR+	LR-	
(\geq .03)	100.00%	0.00%	56.22%	1.0000		
(\geq .04)	100.00%	3.41%	57.71%	1.0353	0.0000	
(\geq .05)	99.12%	32.95%	70.15%	1.4783	0.0269	
(\geq .06)	95.58%	55.68%	78.11%	2.1566	0.0795	
(\geq .067)	90.27%	72.73%	82.59%	3.3097	0.1338	
(\geq .07)	89.38%	72.73%	82.09%	3.2773	0.1460	
(\geq .08)	84.07%	81.82%	83.08%	4.6239	0.1947	
(\geq .09)	74.34%	89.77%	81.09%	7.2684	0.2859	
(\geq .1)	71.68%	94.32%	81.59%	12.6159	0.3002	diagnostic
(\geq .107)	63.72%	96.59%	78.11%	18.6902	0.3756	
(\geq .11)	62.83%	96.59%	77.61%	18.4307	0.3848	
(\geq .12)	58.41%	97.73%	75.62%	25.6991	0.4256	
(\geq .13)	56.64%	98.86%	75.12%	49.8409	0.4386	
(\geq .14)	53.98%	100.00%	74.13%		0.4602	
(\geq .15)	50.44%	100.00%	72.14%		0.4956	
(\geq .16)	47.79%	100.00%	70.65%		0.5221	
(\geq .17)	45.13%	100.00%	69.15%		0.5487	
(\geq .18)	43.36%	100.00%	68.16%		0.5664	
(\geq .19)	39.82%	100.00%	66.17%		0.6018	
(\geq .21)	37.17%	100.00%	64.68%		0.6283	
(\geq .22)	35.40%	100.00%	63.68%		0.6460	
(\geq .23)	33.63%	100.00%	62.69%		0.6637	
(\geq .24)	32.74%	100.00%	62.19%		0.6726	
(\geq .25)	30.97%	100.00%	61.19%		0.6903	
(\geq .27)	28.32%	100.00%	59.70%		0.7168	
(\geq .3)	27.43%	100.00%	59.20%		0.7257	
(\geq .31)	24.78%	100.00%	57.71%		0.7522	
(\geq .32)	23.89%	100.00%	57.21%		0.7611	
(\geq .34)	22.12%	100.00%	56.22%		0.7788	
(\geq .36)	21.24%	100.00%	55.72%		0.7876	
(\geq .37)	20.35%	100.00%	55.22%		0.7965	
(\geq .38)	19.47%	100.00%	54.73%		0.8053	
(\geq .4)	18.58%	100.00%	54.23%		0.8142	
(\geq .42)	17.70%	100.00%	53.73%		0.8230	
(\geq .46)	16.81%	100.00%	53.23%		0.8319	
(\geq .52)	15.04%	100.00%	52.24%		0.8496	
(\geq .53)	14.16%	100.00%	51.74%		0.8584	
(\geq .54)	13.27%	100.00%	51.24%		0.8673	
(\geq .55)	12.39%	100.00%	50.75%		0.8761	
(\geq .61)	9.73%	100.00%	49.25%		0.9027	

(>= .62)	8.85%	100.00%	48.76%	0.9115
(>= .63)	7.96%	100.00%	48.26%	0.9204
(>= .78)	7.08%	100.00%	47.76%	0.9292
(>= .85)	6.19%	100.00%	47.26%	0.9381
(>= .93)	5.31%	100.00%	46.77%	0.9469
(>= .95)	4.42%	100.00%	46.27%	0.9558
(>= 1.05)	2.65%	100.00%	45.27%	0.9735
(>= 1.06)	1.77%	100.00%	44.78%	0.9823
(>= 1.51)	0.88%	100.00%	44.28%	0.9912
(>= 2.13)	0.00%	100.00%	43.78%	1.0000
(> 2.13)	100.00%	0.00%	56.22%	1.0000

*Annexe 6 : Résultats des 201 patients prélevés dans l'étude
DIAGVHC*

	OraQuick®		Test combiné (DO)			Charge virale VHC (log)	
	Sang capillaire	salive	Sérum	Sang capillaire	salive	Plasma	Sang capillaire
1	POS	POS	2,305	1.623	0,133	TND	TND
2	NEG	NEG	0,059	0,074	0,108	TND	TND
3	NEG	NEG	0,123	0,087	0,049	TND	TND
4	POS	POS	2,159	1,703	0,11	TND	TND
5	POS	POS	2,324	2.151	0,186	6,37	3,79
6	POS	POS	2,326	2,153	0,317	TND	TND
7	POS	POS	2,244	1.793	0,083	TND	TND
8	POS	POS	1,260	0,131	0,186	5,26	3,18
9	POS	POS	2,407	2.319	0,303	TND	TND
10	POS	POS	1,933	0.959	0,083	5,64	2,82
11	POS	POS	2,185	1,86	0,08	5,09	DNQ
12	NEG	NEG	0,037	0,054	0,033	TND	TND
13	NEG	NEG	0,038	0,057	0,042	TND	TND
14	NEG	NEG	0,041	0,076	0,043	TND	TND
15	NEG	NEG	0,058	0,098	0,057	TND	TND
16	POS	POS	2,441	1,701	0,109	5,82	1.44
17	POS	POS	2,363	2.207	0,549	6,55	3,95
18	NEG	NEG	0,040	0,069	0,071	TND	TND
19	NEG	NEG	0,040	0.114	0,059	TND	TND
20	POS	POS	2,240	2,07	1,061	5,66	3,02
21	NEG	NEG	0,044	0,076	0,055	TND	TND
22	NEG	NEG	0,037	0,056	0,066	TND	TND
23	POS	POS	2,200	1.197	0,058	TND	TND
24	NEG	NEG	0,054	0,079	0,046	TND	TND
25	POS	NEG	2,078	0.713	0,046	TND	TND
26	POS	POS	2,149	2,119	0,526	TND	TND
27	POS	NEG	1,687	0.406	0,062	TND	TND
28	POS	POS	2,122	1,948	0,115	4,75	1.99
29	POS	POS	1,463	1,821	0,177	6.57	3.09
30	NEG	NEG	0,076	0,08	0,042	TND	TND
31	NEG	NEG	0,081	0.154	0,093	TND	TND
32	POS	POS	1,706	2.421	0,252	TND	TND
33	POS	POS	1,968	2.293	2,132	DNQ	TND
34	POS	POS	2,299	2.092	0,144	TND	TND
35	NEG	NEG	0,062	0.080	0,048	TND	TND

36	POS	POS	2,227	2.236	0,247	TND	TND
37	POS	POS	2,105	1.663	0,096	TND	TND
38	POS	POS	2,288	2.323	0,946	TND	TND
39	POS	POS	1,324	1.871	0,174	6,2	3,63
40	POS	POS	1,940	0.347	0,08	3,41	3,61
41	NEG	NEG	0,070	0,134	0,04	TND	TND
42	POS	POS	2,216	2.383	1,046	6,28	3,63
43	NEG	NEG	0,038	0.128	0,065	TND	TND
44	POS	POS	2,291	1,946	0,111	5,93	1.48
45	POS	POS	2,002	1,698	0,057	6.39	2.86
46	NEG	NEG	0,053	0.093	0,05	TND	TND
47	NEG	NEG	0,058	0.125	0,096	TND	TND
48	POS	POS	2,245	2.160	0,081	TND	TND
49	POS	Non migré	2,145	2,36	1,508	6.84	3.83
50	NEG	NEG	0,044	0,067	0,079	TND	TND
51	POS	NEG	1,995	0.490	0,068	TND	TND
52	POS	POS	2,133	2.201	0,395	DNQ	TND
53	POS	POS	2,280	0,893	0.107	6,51	3.44
54	POS	POS	2,039	1,626	0,214	2,03	TND
55	POS	POS	1,647	2,108	0,132	6.06	3.03
56	NEG	Non migré	0,100	0.094	0,032	TND	TND
57	POS	POS	2,088	1,422	0,147	TND	TND
58	NEG	NEG	0,029	0.080	0,072	TND	TND
59	NEG	NEG	0,040	0,069	0,043	TND	TND
60	POS	POS	1,899	0.536	0,161	TND	TND
61	NEG	NEG	0,036	0,089	0,052	TND	TND
62	NEG	NEG	0,053	0.122	0,048	TND	TND
63	NEG	NEG	0,086	0.156	0,046	TND	TND
64	NEG	NEG	0,080	0,084	0,061	TND	TND
65	POS	POS	2,377	2.400	0,548	TND	TND
66	NEG	NEG	0,055	0.095	0,063	TND	TND
67	NEG	NEG	0,052	0,055	0,027	TND	TND
68	NEG	NEG	0,041	0.093	0,079	TND	TND
69	POS	POS	1,873	0,443	0,088	6.8	2.49
70	POS	POS	2,207	2.016	0,239	TND	TND
71	POS	POS	2,175	1,752	0,065	6,68	3.12
72	POS	POS	2,323	1.838	0,092	TND	TND
73	POS	POS	2,359	2,247	0,371	TND	TND
74	NEG	NEG	0,073	0,117	0,064	TND	TND
75	POS	POS	1,415	2.273	0,778	5,3	2,46
76	POS	POS	2,289	2.180	0,455	TND	TND
77	POS	POS	2,172	2.138	0,318	5,88	1,77
78	POS	POS	2,051	2,055	0,379	5,66	3.31
79	NEG	NEG	0,077	0.166	0,083	TND	TND
80	NEG	NEG	0,042	0,095	0,073	TND	TND
81	POS	POS	2,322	1.729	0,078	6,49	3,13

82	POS	NEG	1,157	0.351	0,039	6,13	DNQ
83	NEG	NEG	0,061	0,111	0,056	TND	TND
84	NEG	NEG	0,040	0.108	0,039	TND	TND
85	POS	POS	0,789	2,2	0,847	6,81	3.35
86	NEG	NEG	0,041	0,06	0,041	TND	TND
87	NEG	NEG	0,182	0.152	0,043	TND	TND
88	POS	POS	2,176	1,823	0,304	6,28	2,46
89	POS	POS	1,812	0.617	0,552	TND	TND
90	NEG	NEG	0,042	0.125	0,077	TND	TND
91	NEG	NEG	0,063	0.159	0,118	TND	TND
92	NEG	NEG	0,030	0,086	0,056	TND	TND
93	POS	POS	2,380	2.241	0,3	DNQ	TND
94	NEG	NEG	0,044	0,059	0,043	TND	TND
95	NEG	NEG	0,041	0,054	0,039	TND	TND
96	NEG	NEG	0,045	0,104	0,043	TND	TND
97	POS	POS	2,222	2.003	0,247	TND	TND
98	POS	POS	2,132	2.290	0,539	TND	TND
99	POS	POS	2,188	1,946	0,224	2,1	TND
100	POS	POS	2,057	1,457	0,141	5.71	2.65
101	NEG	NEG	0,054	0,066	0,039	TND	TND
102	POS	POS	2,156	2.183	0,188	3,55	DNQ
103	POS	POS	2,205	2,116	0,068	5.9	2.57
104	POS	POS	2,349	2.071	0,047	TND	TND
105	POS	POS	2,082	2.300	0,221	6,4	3.76
106	NEG	NEG	0,041	0.103	0,129	TND	TND
107	NEG	NEG	0,041	0,09	0,089	TND	TND
108	POS	POS	1,571	2,275	0,518	4.66	DNQ
109	POS	POS	2,116	2.012	0,178	4,58	2,65
110	POS	Non migré	2,209	2.096	0,424	3,02	DNQ
111	NEG	NEG	0,048	0,112	0,049	TND	TND
112	NEG	NEG	0,057	0.127	0,05	TND	TND
113	POS	POS	2,090	1,207	0,096	TND	TND
114	POS	POS	2,190	2.250	0,632	5,56	3,1
115	NEG	NEG	0,035	0,048	0,046	TND	TND
116	POS	POS	1,467	2,253	0,362	DNQ	TND
117	POS	POS	1,977	0.643	0,052	TND	TND
118	NEG	NEG	0,062	0,124	0,036	TND	TND
119	POS	POS	2,038	0.622	0,057	DNQ	TND
120	NEG	NEG	0,040	0,067	0,04	TND	TND
121	POS	POS	2,328	2.105	0,126	6,68	3,77
122	POS	POS	2,264	2.354	0,163	5,95	1,45
123	POS	POS	1,943	1,522	0,104	4,04	DNQ
124	NEG	NEG	0,076	0,087	0,094	TND	TND
125	NEG	NEG	0,043	0,067	0,038	TND	TND
126	NEG	NEG	0,080	0,082	0,039	TND	TND
127	POS	POS	2,116	1.678	0,109	4,7	DNQ

128	POS	POS	1,742	0.418	0,067	TND	TND
129	POS	POS	2,114	2.130	0,226	3,67	DNQ
130	POS	POS	1,879	2,001	0,269	5,85	2.75
131	NEG	NEG	0,049	0.188	0,064	TND	TND
132	POS	POS	2,171	2,027	0,092	TND	TND
133	POS	POS	2,106	1,599	0,159	TND	TND
134	NEG	NEG	0,052	0,094	0,049	TND	TND
135	NEG	NEG	0,046	0,063	0,047	TND	TND
136	NEG	NEG	0,056	0,1	0,043	TND	TND
137	NEG	NEG	0,575	0.141	0,077	TND	TND
138	NEG	NEG	1,072	0.210	0,052	TND	TND
139	POS	POS	2,059	1.050	0,12	6,44	3,9
140	NEG	NEG	0,047	0.128	0,048	TND	TND
141	POS	POS	2,158	2.357	0,624	4,65	2,26
142	NEG	NEG	0,062	0,087	0,063	TND	TND
143	POS	POS	1,902	0.317	0,055	5,31	TND
144	POS	POS	2,240	2.162	0,098	4,71	1,61
145	POS	POS	1,417	0,407	0,078	TND	TND
146	NEG	NEG	0,026	0,064	0,042	TND	TND
147	NEG	NEG	0,076	0.137	0,103	TND	TND
148	NEG	POS	1,390	0.293	0,062	TND	TND
149	NEG	NEG	0,040	0,056	0,054	TND	TND
150	NEG	NEG	0,041	0.095	0,055	TND	TND
151	NEG	NEG	0,039	0,124	0,036	TND	TND
152	NEG	NEG	0,038	0.188	0,074	TND	TND
153	POS	POS	2,323	2.124	0,081	6,07	3,21
154	POS	POS	2,263	2.213	0,144	5,73	3,67
155	POS	POS	1,898	2,069	0,929	TND	TND
156	NEG	NEG	0,039	0,096	0,055	TND	TND
157	NEG	NEG	0,056	0.197	0,082	TND	TND
158	NEG	NEG	0,042	0,099	0,055	TND	TND
159	POS	POS	2,291	2.195	0,112	TND	TND
160	NEG	NEG	0,062	0.090	0,069	TND	TND
161	NEG	NEG	0,038	0.089	0,064	TND	TND
162	NEG	NEG	0,055	0.160	0,091	TND	TND
163	POS	POS	1,772	1,819	0,1	6,2	3,01
164	POS	POS	2,102	1,797	0,077	6,96	3,13
165	NEG	NEG	0,055	0.119	0,051	TND	TND
166	NEG	NEG	0,042	0,108	0,045	TND	TND
167	POS	POS	2,268	1.865	0,181	TND	TND
168	POS	POS	2,196	2.385	0,46	DNQ	TND
169	POS	POS	2,152	1,829	0,069	6,51	3,38
170	NEG	NEG	0,035	0,071	0,042	TND	TND
171	POS	Non migré	2,201	2,085	0.1	6,06	3.55
172	NEG	NEG	0,025	0,064	0,048	TND	TND
173	POS	POS	2,257	2,154	0,146	6,17	3,1

174	NEG	NEG	0,054	0.143	0,076	TND	TND
175	NEG	NEG	0,104	0,071	0,05	TND	TND
176	POS	POS	2,014	1,365	0.067	6,39	3.37
177	POS	POS	2,115	0,881	0,076	7,1	3,83
178	POS	POS	2,160	1.719	0,1	TND	TND
179	POS	POS	2,265	2.185	0,343	5,94	DNQ
180	NEG	NEG	0,040	0,063	0,045	TND	TND
181	NEG	NEG	0,047	0,084	0,07	TND	TND
182	POS	POS	2,021	2.280	0,613	6,21	3,56
183	POS	POS	2,117	1,654	0,24	DNQ	TND
184	NEG	NEG	0,053	0,069	0,046	TND	TND
185	NEG	NEG	0,035	0.128	0,046	TND	TND
186	POS	POS	2,336	1,623	0,136	5.88	3.04
187	NEG	NEG	0,034	0,066	0,06	TND	TND
188	NEG	NEG	0,068	0,062	0,044	TND	TND
189	NEG	NEG	0,074	0.137	0,051	TND	TND
190	POS	POS	1,770	1.832	0,182	5,91	3,54
191	NEG	NEG	0,068	0.121	0,038	TND	TND
192	POS	POS	2,436	1.050	0,1	TND	TND
193	POS	POS	2,032	1.864	0,153	5,59	3,73
194	POS	POS	2,290	2.022	0,066	TND	TND
195	POS	POS	1,637	2.215	0,206	TND	TND
196	NEG	NEG	0,059	0.159	0,041	TND	TND
197	NEG	Non migré	0,038	0.077	0,078	TND	TND
198	POS	POS	2,248	1,847	0,096	6.77	4.25
199	POS	POS	2,207	0.901	0,313	3,59	DNQ
200	POS	POS	2,059	1.744	0,173	4,88	DNQ
201	NEG	NEG	0,070	0.094	0,044	TND	TND

POS : Positif ; NEG : Négatif ; TND : Target not detected ; DNQ : Detectable non quantifiable

SERMENT DE GALIEN

*Faculté de Pharmacie,
Université Joseph Fourier Grenoble I.*



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

BOURDON Cécile

Dépistage de l'infection par le virus de l'hépatite C :
Adaptation et évaluation d'un test sérologique combiné sur prélèvement de sang capillaire et
prélèvement oral

MOTS CLES

Hépatite C, toxicomanes, dépistage, sang capillaire, fluide oral, test combiné, Oraquick®,
étude DIAGVHC

RESUME

La population toxicomane constitue le principal réservoir du virus de l'hépatite C dans les pays industrialisés. Dans cette population, la ponction veineuse constitue souvent un frein au dépistage. L'utilisation de prélèvements alternatifs, comme le sang capillaire et le fluide oral, ou de tests rapides d'orientation diagnostique réalisables également sur ces prélèvements pourrait faciliter le dépistage.

Le test combiné, Monolisa® HCV Ag-Ab Ultra (BioRad) adapté au prélèvement de sang capillaire a donné une sensibilité de 98,2% et une spécificité de 100%. Le test combiné sur fluide gingival crévulaire donne des résultats excluant son utilisation pour le dépistage de l'hépatite C. Les performances retrouvées pour l'OraQuick® HCV bien qu'inférieures à celles annoncées par le fabricant restent satisfaisantes notamment sur le sang capillaire. L'influence du statut VIH sur la sensibilité des deux tests a bien été retrouvée sur sang capillaire et sur fluide gingival crévulaire, cependant une augmentation de la sensibilité chez les patients virémiques n'a pas été observée dans notre étude.

Compte tenu des performances observées, l'utilisation du test combiné BioRad ou de l'OraQuick® HCV sur sang capillaire pourrait être envisagée en clinique. Le prélèvement de sang capillaire déposé sur buvard, sous réserve d'une bonne conservation, permet également d'évaluer la présence de l'ARN viral mais nécessite une 2^{ème} consultation contrairement à l'OraQuick® HCV, dont le résultat est rendu en 20 minutes. Une 2^{ème} étude devrait déterminer la stratégie la plus adaptée.

ADRESSE DE L'AUTEUR

109 cours Berriat
38000 GRENOBLE
CBourdon@chu-grenoble.fr