

Méthodes de détection de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV)

Ch. FRANÇOIS-GÉRARD⁽¹⁾, Ch. WARLING⁽²⁾, D. VAIRA⁽³⁾, B. RENTIER⁽⁴⁾, J. L. POPLAVSKY⁽⁵⁾, M. REGINSTER⁽⁶⁾, D. SONDAG-THULL⁽⁷⁾

⁽¹⁾ Premier Assistant en Techniques biomédicales, ⁽²⁾ Assistant de Laboratoire clinique, ⁽³⁾ Assistant, ⁽⁴⁾ Chargé de Cours ad intérim, ⁽⁵⁾ Assistant, ⁽⁶⁾ Professeur associé, Université de Liège, Département de Microbiologie.

⁽⁷⁾ Directeur-adjoint, Université de Liège, Centre de Transfusion et Centre de Référence pour le diagnostic du SIDA.

INTRODUCTION

Le virus appelé HIV est considéré comme responsable du syndrome d'immunodéficience acquise. Il s'agit d'un rétrovirus dont on connaît deux variétés dénommées HIV-1 et HIV-2. Le premier est répandu dans le monde entier et le second serait prépondérant en Afrique de l'Ouest. Comme tous les rétrovirus, le HIV détermine une infection persistante. Les antigènes viraux produits sollicitent le système immunitaire bien avant qu'apparaissent les manifestations cliniques. La présence d'anticorps spécifiques est donc le signe d'une infection persistante exprimée.

Généralement, le diagnostic de l'infection repose sur la mise en évidence d'anticorps spécifiques des constituants du virus. Cependant, la phase initiale de l'infection ne peut être reconnue de cette manière. Pendant cette période, dont la durée est variable, il faut rechercher les antigènes du virus lui-même dans le sang, ou cultiver le virus, ou encore identifier son génome dans les cellules mononucléées du sang périphérique. Le diagnostic précoce d'une infection par le HIV est d'autant plus important que les porteurs restent asymptomatiques pendant une période qui atteint plusieurs années durant lesquelles ils peuvent transmettre le virus par voies sanguine et sexuelle.

Malgré les efforts réalisés depuis 1983, époque à laquelle le virus a été isolé et cultivé, on ne dispose d'aucune drogue efficace contre le syndrome d'immunodéficience acquise. La seule action que l'on peut exercer contre l'infection est préventive et limitée à enrayer la dispersion du virus.

Mise en évidence des anticorps anti-HIV

Le diagnostic d'une infection par le virus HIV repose habituellement sur la mise en évidence d'anticorps spécifiques. Il convient de distinguer les méthodes de *dépistage* dont le but est de détecter avec un maximum de sensibilité la *présence* d'anticorps, et les méthodes plus élaborées, dont le but est de *définir* leur *spécificité*. Ces méthodes de vérification sont communément appelées tests de confirmation.

Chaque méthode souffrant de causes d'erreurs propres, le diagnostic d'infection par HIV ne repose que sur des résultats confirmés.

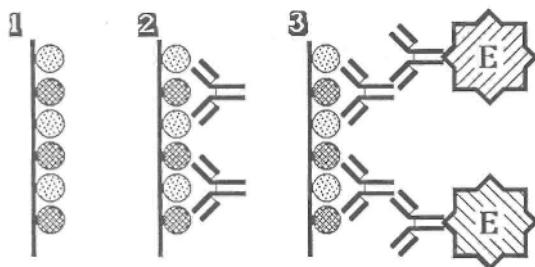
A. *Méthodes de dépistage*

Les premières trousse de laboratoire ont été commercialisées dès 1985 et les plus couramment utilisées à l'heure actuelle sont les méthodes immuno-enzymatiques (EIA : enzyme immunoassay). On peut détecter directement les anticorps fixés *in vitro* sur les antigènes ou les mettre en compétition avec des anticorps reconnus spécifiques de ces antigènes.

1. *EIA simple*.

On met un échantillon à analyser en présence d'un support solide telles une bille ou la paroi d'un tube recouvert au préalable d'une préparation d'antigènes viraux. Si les anticorps sont présents dans le sérum, ils se fixent sur l'antigène-cible et se trouvent ainsi immobilisés sur la phase solide (fig. 1). Leur présence est mise en évidence par des anticorps anti-immuno-globulines humaines couplés à une enzyme. La fixation des anticorps est révélée par l'addition d'un substrat chromogénique. L'intensité de la coloration (densité optique), qui reflète la présence d'anticorps, est mesurée à la longueur d'onde appropriée au moyen d'un spectrophotomètre.

FIG. 1. Schéma des trois étapes principales du test EIA pour la détection directe des anticorps anti-HIV.



Des témoins négatifs (sans anticorps anti-HIV), positifs (avec anticorps anti-HIV) permettent, pour chaque série de mesures de densité optique, de valider l'analyse et de déterminer une valeur-seuil à partir de laquelle la réaction observée doit être considérée comme positive. La procédure à suivre et les consignes à respecter pour valider l'analyse, calculer la valeur-seuil et interpréter les résultats, varient selon les cas.

Pour faciliter la comparaison des résultats obtenus en testant, par exemple, un même sérum par des trousse EIA différentes, on utilise un paramètre appelé « test ratio » qui correspond au quotient de la densité optique de l'échantillon par la densité optique de la valeur-seuil. En première approximation, on peut considérer que les sérum présentant un test ratio élevé contiennent une « activité » anticorps importante (c'est-à-dire une grande quantité d'anticorps, ou peu d'anticorps mais de haute affinité) et que les valeurs faibles de test ratio caractérisent les échantillons à faible « activité » anticorps (c'est-à-dire une petite quantité d'anticorps ou des anticorps de faible affinité). Le coefficient de variation qui affecte toujours les valeurs mesurées par les méthodes immuno-enzymatiques, apporte un degré d'incertitude particulièrement gênant pour l'interprétation des valeurs proches de la valeur-seuil. En effet, si l'on admet qu'un coefficient de variation de 10 % affecte généralement les paramètres mesurés par EIA, cela signifie en pratique que la valeur réelle d'un test ratio mesuré à 1, a une probabilité égale d'être située à 0,9 (et dans ce cas, l'échantillon devrait être considéré comme négatif) qu'à 1,1 (et dans ce cas, on devrait conclure à une séropositivité). En vertu de cette incertitude, on a défini une zone « grise » dans laquelle le résultat de l'analyse reste *douteux*. En pratique, les résultats douteux ne sont pas rares; ils doivent faire l'objet d'investigations plus approfondies, car ils peuvent donner lieu à plusieurs interprétations. En effet, ils peuvent suggérer un début de séroconversion ou l'existence de complexes immuns circulants.

La méthode EIA simple présente à la fois des avantages et des inconvénients. Un avantage majeur de la méthode est sa sensibilité. En contrepartie, elle donne une proportion non négligeable de réactions dites *faussement positives*.

Encore faut-il bien s'entendre sur le sens réel de ce terme. Quelques mots sur l'historique des tests éclaireront cette remarque. Les tests commerciaux dits de première génération utilisent, comme antigènes-cibles, des préparations virales purifiées à partir des cellules infectées. Même hautement purifiées, ces préparations contiennent des protéines cellulaires susceptibles de se fixer sur le support solide aux côtés des composants viraux. Même en quantités infimes, ces contaminants cellulaires peuvent retenir un anticorps correspondant de haute affinité s'il est présent dans le sérum à tester. La réaction EIA sera positive, en raison d'une réaction entre un antigène cellulaire et l'anticorps correspondant mais le résultat du test ne répondra pas à la question : « ce sérum contient-il ou non des anticorps suscités par le virus HIV lui-même ? ». La majorité des réactions dites faussement positives en EIA sont d'origine inconnue, mais elles sont généralement infirmées par les méthodes de vérification.

Dans le génome de HIV, les gènes *GAG*, *ENV* et *POL* codent respectivement pour les protéines du noyau, de l'enveloppe et pour des enzymes dont la transcriptase inverse. Les protéines constitutives du virus sont particulièrement importantes pour les tests sérologiques parce qu'elles sont les cibles privilégiées des anticorps produits lors de la séroconversion. Par génie génétique, il est possible de synthétiser des quantités suffisantes de protéines ou de fragments de protéines virales. Ces préparations, adsorbées sur un support solide, servent d'antigènes-cibles dans les tests de « deuxième génération ».

Des polypeptides synthétiques correspondant à des antigènes variant très peu d'une souche HIV à une autre sont également utilisés comme antigènes-cibles dans les tests EIA de deuxième génération.

Puisque les antigènes produits par génie génétique ou par synthèse chimique sont exempts de contaminations cellulaires d'origine humaine, on comprend mieux pourquoi les tests de deuxième génération donnent une proportion moins élevée de réactions « faussement positives ».

Mais qu'en est-il alors des réactions « faussement négatives » ? Il faut distinguer deux cas. Dans le premier, le sérum contient bien des anticorps spécifiques anti-HIV, mais le test n'est pas assez sensible pour les déceler. Cette situation existe mais se produit rarement avec les tests actuels. Dans le second cas, le sérum contient des

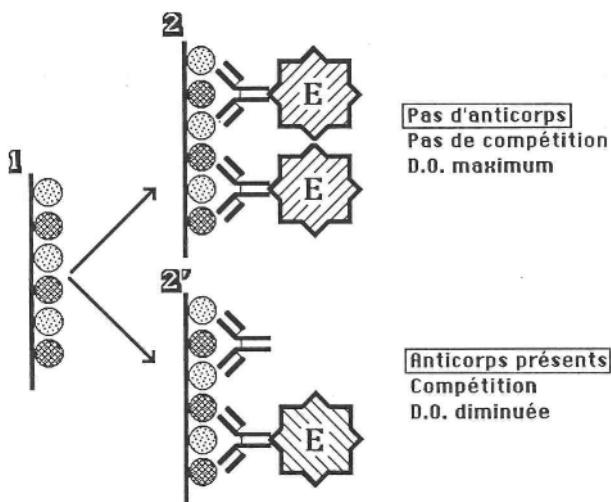
anticorps anti-HIV, mais l'antigène-cible ne contient pas les épitopes correspondant aux anticorps présents dans le sérum. Compte tenu de la variabilité de l'expression du virus HIV, ceci pourrait théoriquement se produire avec un peptide synthétique; cependant ces tests sont trop récents pour que leur évaluation soit déjà documentée à cet égard.

2. EIA de compétition.

Dans les tests EIA basés sur le principe de la compétition, la détection de l'anticorps s'effectue indirectement. Dans un système qui comporte une phase solide recouverte d'antigènes-cibles de première ou de deuxième génération, les anticorps à détecter sont mis en compétition avec des anticorps polyclonaux anti-HIV connus d'origine humaine ou animale et couplés à une enzyme (fig. 2). Dans ces conditions, en l'absence d'anticorps dans l'échantillon, l'anti-HIV conjugué se fixe à l'antigène-cible et la densité optique mesurée est maximale. Au contraire, si un anticorps anti-HIV est présent dans l'échantillon, il réagit spécifiquement avec l'antigène immobilisé et empêche, par compétition, la fixation du réactif anti-HIV conjugué. Dans ce cas, la densité optique est diminuée. Les tests de compétition sont plus spécifiques mais moins sensibles car certains anticorps de faible affinité peuvent échapper à la détection parce qu'ils incapables de déplacer la liaison du réactif conjugué.

Comme il n'est pas rationnel de comparer entre elles les performances de méthodes reposant sur des principes différents, il est préférable de considérer que les éléments d'information qu'elles apportent sont complémentaires.

FIG. 2. Schéma du test EIA de compétition pour la détection des anticorps anti-HIV.



3. Autres méthodes.

Actuellement, les tests EIA sont largement utilisés pour le dépistage des anticorps, en particulier parce qu'ils sont facilement automatisables pour l'analyse de grandes séries d'échantillons. Ceci constitue un avantage important par exemple, pour les banques de sang.

Des méthodes non enzymatiques de dépistage existent également, par exemple, celles basées sur le principe de l'*agglutination*. Des globules rouges, des particules de latex ou de gélatine recouverts, par couplage chimique, d'antigènes viraux sont mis en présence du sérum à tester. Lorsque les anticorps spécifiques sont présents, ils se fixent aux antigènes immobilisés à la surface des particules et réalisent un pontage interparticulaire qui se traduit, macroscopiquement, par la formation d'un agglutinat. La lecture des résultats s'effectue à l'œil nu. Ces méthodes semblent répondre aux besoins des pays en voie de développement et leur degré de sensibilité est acceptable.

Les tests EIA de dépistage des anticorps anti-HIV-1 détectent les anticorps anti-HIV-2 dans environ 80 % des cas. Une homologie de séquence entre les génomes de HIV-1 et HIV-2, principalement dans la région des gènes *GAG* et *POL* est à l'origine des réactions croisées. Il existe des tests adaptés au dépistage et à la confirmation de la spécificité des anticorps anti-HIV-2. Plus récemment, certaines firmes ont commercialisé des tests qui permettent de dépister simultanément les anticorps anti-HIV-1 et anti-HIV-2.

B. Les méthodes de confirmation

1. Immuno-(électro)-transfert ou « Western Blot ».

Une préparation de protéines virales obtenues à partir de cellules infectées est déposée sur un gel de polyacrylamide en présence d'un détergent anionique et soumise à une électro-phorèse. Dans ces conditions, la mobilité électrophorétique des composants viraux est inversement proportionnelle à leur poids moléculaire : les

protéines du gène *GAG* (p18, p24 du noyau) de petit poids moléculaire migrent plus loin dans le gel que les glycoprotéines du gène *ENV* (gp120, gp160 de l'enveloppe). Les produits du gène *POL*, parmi lesquels le complexe transcriptase inverse (p31, p51, p66), et le fragment (gp41) de la glycoprotéine transmembranaire migrent dans la zone intermédiaire (fig. 3).

Les protéines sont transférées par diffusion simple ou électriquement, du gel sur une membrane de nitrocellulose qui est découpée en bandelettes destinées à être mises en contact avec le sérum à tester. Les anticorps anti-HIV se fixent spécifiquement sur les divers composants protéiniques et glycoprotéiniques. Leur présence est révélée par des anticorps anti-immunoglobulines conjugués à une enzyme (le plus souvent la peroxydase) qui, après addition d'un substrat approprié, fait apparaître des bandes colorées aux endroits où les complexes antigènes-anticorps se sont formés. C'est donc une méthode de confirmation puisqu'elle permet de déterminer la spécificité des anticorps.

En cas de séropositivité, on observe des bandes correspondant aux protéines des trois groupes de gènes : *GAG* (p18, p24), *POL* (p31, p66, p51) et *ENV* (gp41, gp120, gp160) (fig. 4).

FIG. 3. Représentation schématique du génome du provirus HIV intégré au génome cellulaire. La localisation des gènes codant pour les diverses protéines, glycoprotéines et précurseurs visibles en immunotransfert est indiquée.

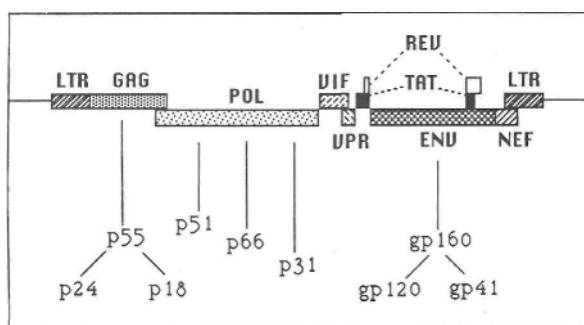
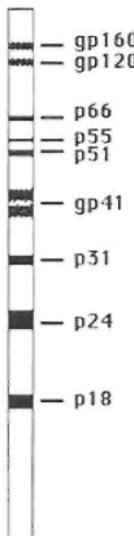


FIG. 4. Profil électrophorétique classique du Western Blot d'un sujet séropositif HIV-1.



En dehors de ce profil classique, il faut également interpréter comme positifs, les échantillons pour lesquels on met en évidence au moins deux bandes dans des zones correspondant aux produits des trois groupes de gènes *GAG*, *POL* et *ENV*.

A côté de la grande majorité des cas à vérifier où le résultat du Western Blot confirme sans équivoque un diagnostic de séropositivité ou de séronégativité, subsiste un pourcentage non négligeable — de l'ordre de 10 à 15 % selon les populations — d'échantillons donnant des résultats *douteux* ou *ininterprétables*. Ils sont ininterprétables car, ne montrant pas les bandes correspondant aux critères de positivité, on ne peut pas les considérer comme positifs; mais puisque des bandes apparaissent, on ne peut pas les déclarer négatifs. Dans ces cas, il faut examiner un nouvel échantillon prélevé 15 jours à 1 mois après le premier. Lorsqu'il s'agit d'une séroconversion, le plus souvent, le deuxième prélèvement ne laisse plus de doute quant à la séropositivité.

Toutefois, il subsiste des cas pour lesquels le profil du Western Blot reste ininterprétable pour plusieurs prélèvements successifs : des anticorps reconnaissant des bandes isolées, probablement dues à des réactions croisées d'origine inconnue dans des échantillons prélevés successivement, persistent pendant plusieurs mois.

Le Western Blot est plus sensible que d'autres méthodes pour la détection des anticorps dirigés contre les protéines du noyau viral. L'origine de cette particularité est double : d'une

part, lors du procédé de purification des protéines virales à partir de cellules infectées, il se produit un clivage partiel des glycoprotéines de l'enveloppe (les gp41 et 120 sont des fragments de la gpl60), et d'autre part, les glycoprotéines soumises à une électrophorèse ont tendance, à cause de l'hétérogénéité de leur portion glycosylée, à s'étaler en zones plus diffuses que les composants peptidiques.

Il en résulte que le Western Blot détecte mieux les bandes correspondant aux protéines du noyau (p18, p24) que les bandes caractéristiques des glycoprotéines de l'enveloppe (gp41, gp120, gpl60).

2. *Radio-immunoprécipitation (Radioimmunoprecipitation assay ou RIPA).*

Des cellules infectées par le virus sont mises en culture dans un milieu contenant de la méthionine marquée au (³⁵S). Les cellules, après avoir métaboliquement incorporé l'isotope, sont lysées. Après centrifugation, le surnageant contenant les protéines marquées est mis en présence du sérum à tester. Les complexes immuns qui se forment sont isolés par immuno-précipitation puis dissociés par chauffage à 100°C dans un tampon dénaturant avant d'être soumis à une électrophorèse dans un gel de polyacrylamide. Le profil électrophorétique révélé par autoradiographie est comparable à celui obtenu par Western Blot.

A l'inverse du Western Blot, la radio-immunoprécipitation détecte mieux les anticorps dirigés contre les glycoprotéines de l'enveloppe.

Dans cette technique en effet, les complexes antigènes-anticorps sont formés en phase liquide puis dissociés avant d'être soumis à l'électrophorèse. Dans ces conditions moins dénaturantes, les glycoprotéines de l'enveloppe sont mieux conservées et la détection des anticorps correspondants est plus aisée.

3. *Immunofluorescence (immunofluorescence assay ou IF A).*

Des cellules infectées par le virus et des cellules non infectées, fixées par de l'acétone sur une lame porte-objet de microscope, sont mises en présence du sérum à tester. S'ils sont présents, les anticorps anti-HIV se fixent sur les cellules infectées exprimant les antigènes viraux et ne réagissent pas avec les cellules non infectées.

Les anticorps fixés sont mis en évidence grâce à des anti-immunoglobulines conjuguées à la fluorescéine. La fluorescence des cellules examinées au microscope indique la séropositivité. Dans environ 5 % des cas, à cause de fixations « non spécifiques », il faut procéder à une absorption du sérum avec des cellules non infectées.

Des études comparatives ont montré que l'immunofluorescence est aussi sensible que le Western Blot. Toutefois, l'interprétation des résultats est plus subjective et nécessite, pour être fiable, une grande habitude de la méthode.

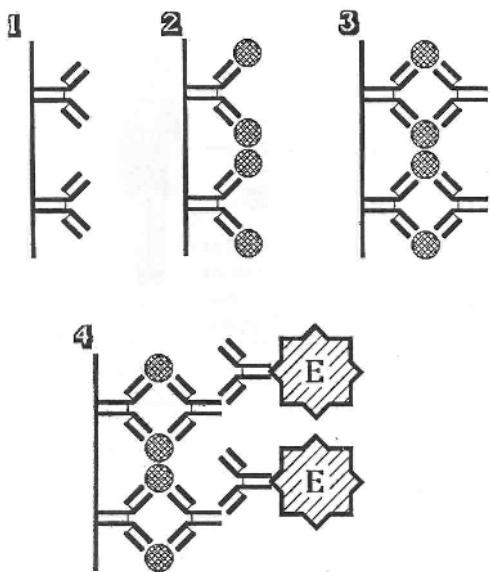
4. *Test El A de compétition.*

Chaque laboratoire choisit, en fonction de critères qui lui sont propres, d'employer l'une ou l'autre des méthodes de confirmation. En plus du Western Blot, le Laboratoire de Référence de Liège utilise aussi un test **EIA** de compétition qui permet de détecter séparément les anticorps dirigés contre les protéines du noyau et contre les composants de l'enveloppe virale. Les protéines-cibles du noyau d'une part et de l'enveloppe d'autre part, immobilisées sur la phase solide sont obtenues par génie génétique. Le test comporte deux systèmes distincts : l'un utilisant comme réactif, des anticorps anti-noyau, l'autre des anti-protéines de l'enveloppe, conjugués à une enzyme. L'avantage de ce test est de déceler séparément et de fournir une estimation semi-quantitative des anticorps anti-noyau et anti-enveloppe (fig. 5).

Mise en évidence du virus

Entre le moment de la contamination et le moment où les anticorps spécifiques sont décelables, s'écoule un délai moyen de 6 à 8 semaines mais qui, dans certains cas bien documentés de contamination transfusionnelle, atteindrait une durée de 10 à 12 mois. Néanmoins, des techniques existent pour détecter l'infection pendant la période précoce dite sérologiquement silencieuse.

FIG. 5. Schéma des quatre étapes principales du test EIA en double sandwich pour la détection et le dosage des antigènes viraux.



1. Mise en évidence de l'antigène p24 dans le sérum.

Certains auteurs ont décrit une phase d'antigénémie, accompagnée ou non de signes cliniques, précédant la séroconversion. On recherche l'antigène p24 par un test EIA d'im-muno-capture utilisant un support solide sur lequel sont fixés des anticorps polyclonaux humains anti-HIV. Si l'antigène p24 est présent, il est trappé par l'anticorps immobilisé, et il fixe d'autre part des anticorps de lapin anti-p24 de haute affinité. Le complexe en « sandwich » (anti-HIV humains/antigène p24/anti-p24 de lapin) est révélé au moyen d'anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin conjugués à une enzyme.

Le seuil de détection de l'antigène est très bas (de l'ordre de 50 pg/ml de sérum) mais, parce qu'un résultat négatif ne permet pas de conclure à l'absence de virus, l'utilité de ce test pour le diagnostic de l'infection avant séroconversion est limitée.

Comme nous le verrons plus loin, la recherche de l'antigène p24 trouve une meilleure indication dans la surveillance de l'infection.

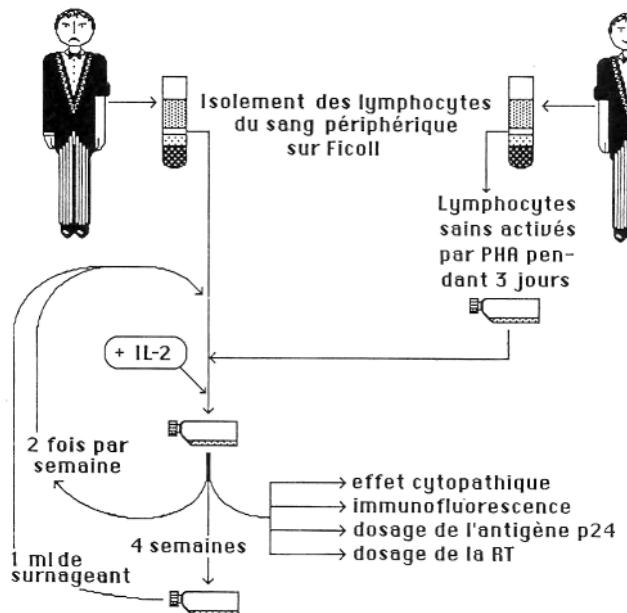
2. *Mise en évidence du virus infectieux dans les lymphocytes circulants.*

La présence du virus dans les lymphocytes circulants peut être révélée par coculture de ces lymphocytes avec des lymphocytes sains préalablement activés par de la phytohémagglutinine. Cette coculture, réalisée en présence d'interleukine 2, est entretenue pendant quatre à six semaines. Elle est l'objet, pendant ce temps, d'observations régulières concernant la présence d'antigènes viraux dans le milieu de culture et dans les cellules, d'une activité transcriptase inverse et de manifestations cytopathiques caractéristiques du virus.

L'antigène p24 est détecté dans le milieu de culture par la méthode EIA utilisée pour rechercher ces antigènes dans le sérum. Les antigènes viraux présents dans les cellules sont recherchés par immunofluorescence indirecte. La transcriptase inverse virale est dosée par son activité de synthèse de DNA *in vitro* à partir de RNA. L'effet cytopathique du HIV consiste en une fusion de cellules voisines résultant en la formation de syncytiums (fig. 6).

Ces différents indices de la multiplication du virus dans les cellules en culture ne sont pas équivalents. L'observation de l'effet cytopathique n'a qu'une valeur indicative. Le dosage de la transcriptase inverse est une technique longue et coûteuse, nécessitant l'usage de radio-isotopes. Moins sensible et moins précoce que la détection de l'antigène, cette technique présente toutefois l'avantage d'être caractéristique des rétrovirus, ce qui permet la détection de souches virales autres que HIV-1, notamment HIV-2.

FIG. 6. Schéma du mode opératoire de la mise en culture des lymphocytes de patients pour la détection du virus HIV.



Si, après six semaines de culture, aucun de ces tests n'a donné de résultat positif, la culture est considérée comme négative. Cependant, une culture négative ne permet pas d'exclure la présence du virus chez le patient.

L'indication principale de la mise en culture est le diagnostic de l'infection chez un individu séronégatif présentant un facteur de risque. Elle n'offre aucun intérêt diagnostique pour des patients séropositifs. Toutefois, certains auteurs suggèrent que l'efficacité de la réplication virale *in vitro* pourrait refléter la virulence de la souche *in vivo*. La culture apporterait alors une information épidémiologique et, peut-être, pronostique intéressante.

3. Mise en évidence du génome viral dans les lymphocytes circulants.

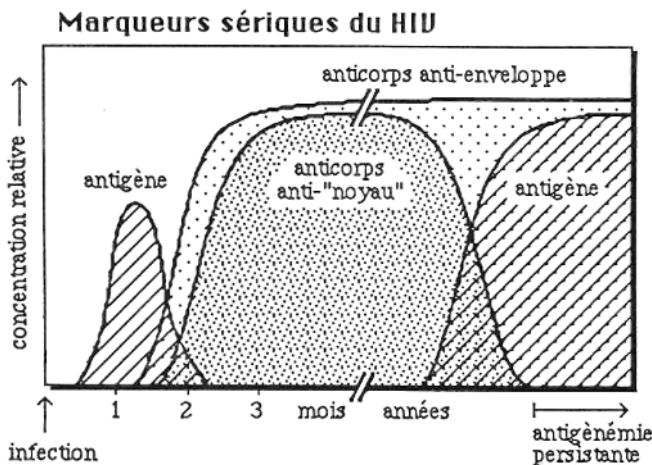
Le virus reste latent dans les lymphocytes pendant une période variable, sous forme de DNA, le RNA viral étant transcrit en DNA par la transcriptase inverse. Le DNA est intégré au génome cellulaire, ou *provirus*. Il est donc théoriquement possible, en utilisant des sondes appropriées, de mettre le génome viral en évidence dès la contamination et ainsi d'obtenir un diagnostic plus précoce, avant la séroconversion et même avant la phase d'antigénémie. Cependant, le nombre de cellules infectées est faible, de même que le nombre de provirus par cellule, et les techniques classiques de sondage se révèlent insuffisamment sensibles pour la détection directe du génome viral dans les lymphocytes du patient.

Récemment, une méthode d'amplification spécifique de séquences génomiques a été décrite. Cette méthode, appelée *Polymerase Chain Reaction* (PCR), permet de produire un grand nombre de copies d'une région du DNA dont la séquence nucléotidique est connue, et de la rendre ainsi décelable, même si elle n'est présente qu'à un seul exemplaire dans un million de cellules. Elle a été mise au point pour l'amplification de séquences particulières du génome cellulaire dans le cadre du dépistage d'anomalies génétiques, et adaptée pour la détection du provirus du HIV. L'amplification génomique constitue donc l'élément qui manquait jusqu'ici au dépistage précoce du virus. En outre, en raison de sa rapidité relative et de son efficacité supérieure, elle pourrait remplacer avantageusement la mise en culture. Il s'agit cependant d'une technique complexe de biologie moléculaire qui nécessite encore beaucoup d'adaptations pour devenir une méthode de routine.

Finalité des tests

Si l'on schématise l'évolution des paramètres sériques durant le décours de l'infection, on comprend mieux l'utilité des analyses à proposer (fig. 7).

FIG. 7. Représentation schématique de l'évolution, en fonction du temps, des paramètres sériques des patients infectés par le HIV.



1. Le diagnostic.

Le dépistage des séropositifs est un moyen de lutte contre la dissémination du virus, pour autant qu'il s'accompagne d'une information adéquate sur les mesures de prévention. La promotion du dépistage doit aller de pair avec une réflexion d'ordre éthique et moral et s'accompagner d'une prise en charge et d'une information adéquate des séropositifs.

Si la sensibilité et la spécificité des tests de dépistage atteignent maintenant des valeurs élevées, il faut cependant garder à l'esprit que ces méthodes sont destinées à la seule détection des anticorps. Ceci signifie, en pratique, que si la valeur prédictive d'un résultat négatif en EIA atteint 99,99 % dans la population générale, elle avoisine 75 % quand il s'agit d'individus « ayant des comportements à risque ». Ces chiffres sont à mettre en relation avec la fréquence de l'infection dans les deux populations.

Dans tous les cas, lorsqu'une réaction positive est observée avec un test de dépistage, il est de pratique courante que le laboratoire procède à une deuxième analyse de ce prélèvement. Si les deux résultats concordent (« *repeatedly reactive sample* » des Anglo-Saxons), l'échantillon est soumis à une méthode de confirmation. Le profil obtenu en Western Blot permet, dans la grande majorité des cas, de confirmer la spécificité anti-HIV des anticorps et de poser le diagnostic de séropositivité.

Avant l'apparition des anticorps, d'autres tests peuvent être envisagés pour le diagnostic, notamment la recherche de l'antigène viral p24. Dans une faible proportion des individus exposés, cet antigène peut être détecté avant l'apparition des anticorps. De sorte que la recherche de l'antigène HIV dans le sérum, soit à cause de son manque de sensibilité, soit à cause de la fugacité de l'antigénémie précoce, ne doit pas être considérée comme une méthode fiable de diagnostic pendant la phase initiale de l'infection.

La détection du génome viral par hybridation génomique après amplification est, à présent, la méthode la plus efficace pour le diagnostic précoce. Elle est actuellement appliquée, au Laboratoire de Référence de Liège, au cas où un risque de contamination a été mis en évidence par l'anamnèse, et que l'événement suspect s'est produit trop récemment pour qu'une séroconversion soit intervenue. Une autre indication, particulièrement justifiée de la « *Polymerase Chain Reaction* », est le diagnostic périnatal de l'infection HIV chez l'enfant né de mère séropositive. Des anticorps anti-HIV passent chez le fœtus par la voie transplacentaire. Un nouveau-né séropositif n'est pas forcément infecté par le virus. Dans ce cas, l'examen répété du sérum montre la diminution progressive de son activité spécifique. Le diagnostic sérologique de l'infection HIV du nouveau-né est difficile et tardif car une latence très variable peut exister avant la production des anticorps par l'enfant infecté. La mise en évidence de l'antigène par EIA ou du virus par coculture ou, mieux, par sondage génomique, constitue, quel que soit l'âge du nourrisson, une preuve de sa contamination.

2. Après le diagnostic.

Le Western Blot donne aussi des renseignements sur le stade de l'infection. En effet, les anticorps dirigés contre la protéine p24 et son précurseur p55, qui apparaissent au moment de la séroconversion, tendent à disparaître lorsque l'état clinique du patient se détériore. La disparition — on devrait plutôt dire la non-détectabilité — des anticorps anti-p24 qui accompagne le plus souvent une réapparition de l'antigène dans le sérum, est de pronostic défavorable : elle accompagne généralement le passage du stade I (séropositif asymptomatique) aux stades II et III (ARC = AIDS Related Complex) ou le passage du stade III au stade IV (SIDA clinique). Plusieurs auteurs ont montré que la diminution des anticorps anti-noyau est corrélée avec la présence de l'antigène et de complexes p24/anti-p24 circulants, alimentant une hypothèse selon laquelle une réplication virale intense, déclenchée par un mécanisme encore inconnu, s'accompagnerait d'une abondante production de la protéine p24. Engagés dans des complexes, les anticorps anti-noyau ne seraient plus détectables par le test EIA. En fait, on ne sait pas expliquer actuellement pourquoi le phénomène observé pour les anticorps anti-p24 ne semble pas se produire pour les anticorps anti-enveloppe.

Parce qu'il est très sensible, le Western Blot ne permet pas toujours de déceler, dès qu'elle s'amorce, la diminution des anticorps anti-noyau. Le test EIA de compétition permet lui, d'estimer semi-quantitativement, par la valeur du *test ratio*, la décroissance ou la disparition des anticorps anti-noyau. Ce test est donc particulièrement utile pour le suivi des séropositifs. En pratique, des études longitudinales font apparaître que lorsque les anticorps anti-noyau diminuent alors que les anticorps anti-enveloppe restent stables, il faut suspecter la réapparition de l'antigène circulant et le passage probable à un stade clinique plus avancé.

C'est également dans la surveillance de l'efficacité thérapeutique des drogues antivirales que la recherche de l'antigène trouve une juste indication. On sait que l'azidothymidine (AZT), en bloquant l'action de la transcriptase inverse, exerce un effet inhibiteur sur la réplication des rétrovirus. L'effet du traitement peut être contrôlé par la mesure de la quantité d'antigène circulant.

Références

- ALLAIN, J. P., LAURIAN, Y., PAUL, D. A., SENN, D. and Members of the AIDS Haemophilia French Study Group — Serological markers in early stages of human immunodeficiency virus infection in haemophiliacs. *Lancet*, 1986, II, 1233.
- ASJO, B., MORFELDT-MANSON, L., ALBERT, J., BIBERFELD, G., KARLSSON, A., LIDMAN, K., FENYO, E. M. — Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet*, 1986, II, 660.
- BORKOWSKY, W., KRASINSKI, K., PAUL, D., MOORE, T., BEBENROTH, D., CHANDWANI, S. — Human-Immunodeficiency-virus infections in infants negative for anti-HIV by enzyme-linked immunoassay. *Lancet*, 1987, I, 1168. BARIN, F., MCLANE, M. F., ALLAN, J. S., LEE, T. H. — Virus envelope protein of HTLV III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. *Science*, 1985, 228, 1094.
- BARRE-SINOUSSI, F., CHERMANN, J. C., REY, F., NUGEYRE, M. T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROSENBAUM, W., MONTAGNIER, L. — Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 1983, 220, 868.
- Centers for Disease Control. — « *Pneumocystis carinii* » pneumonia among persons with hemophilia A. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, 1982, 31, 365.
- Centers for Disease Control. — Provisional public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing acquired immunodeficiency syndrome. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, 1985, 34, 1.
- Centers for Disease Control. — Transfusion associated human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus infection from a seronegative donor. (Colorado). *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, 1986, 35, 389.
- CHENG-MAYER, C., SETO, D., TATENO, M., LEVY, J. A. — Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science*, 1988, 240, 80.
- CHIODI, F., BREDBERG-RADEN, U., BIBERFELD, G., BOTTIGER, B., ALBERT, J., ASJO, B., FENYO, E. M., NORRBY, E. — Radioimmunoprecipitation and Western blotting with sera of human immunodeficiency virus infected patients : a comparative study. *AIDS Res. human retroviruses*, 1987, 3, 165.
- CLAVEL, F., GUETARD, D., BRUN-VEZINET, F., CHAMARET, S., REY, M., SANTOS-FERREIRA, M. O., LAURENT, A. G., DAUGUET, C., KATLAMA, C., ROUZIOUX, C., KLATZMANN, D., CHAMPALIMAUD, J. L., MONTAGNIER, L. — Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 1986, 233, 343.
- DENIS, F., LÉONARD, G., SANGARE, A., GERSHY-DAMET, G., REY, J. L., SORO, B., SCHMIDT, D., MOUNIER, M., VERDIER, M., BAILLOU, A., BARIN, F. — Comparison of 10 enzyme immunoassays for detection of antibody to human immunodeficiency virus type 2 in West African Sera. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26, 1000.
- GALLO, R. C., SALAHUDDIN, S. Z., POPOVIC, M., SHEARER, G. M., KAPLAN, M., HAYNES, B. F., PALKER, T. J., REDFIELD, R., OLESKE, J., SAFAI, B., WHITE, G., FOSTER, P., MARKHAM, P. D. — Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLV III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 1984, 224, 500.
- GNANN, J. W., SCHWIMMBECK, P. L., NELSON, J. A., TRUAX, A. B., OLDSSTONE, M. B. A. — Diagnosis of AIDS by using a 12-aminoacid peptide representing an immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.*, 1987, 156, 261.
- GNANN, J. W., MCCORMICK, J. B., MITCHELL, S., NELSON, J. A., OLDSSTONE, M. B. A. — Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections. *Science*, 1987, 237, 1346.

- GOTLIEB, M. S., SCHROFF, R., SHANKER, H. M. — *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men : evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New Engl. J. Med.*, 1981, 305, 1325.
- GOUDSMIT, J., LANGE, J. M. A., PAUL, D. A., DAWSON, G. J. — Antigenemia and antibody titers to core and envelope antigens in AIDS, AIDS-related complex and subclinical human immunodeficiency virus infection. *J. infect. Dis.*, 1987, 155, 558.
- JACKSON, J. B., BALFOUR, J. R. — Practical diagnostic testing of Human Immunodeficiency Virus. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1988, 1, 124.
- KESSLER, H. A., BLAAUW, B., SPEAR, J., PAUL, D. A., FALK, L. A., LANDAY, A. — Diagnosis of human immunodeficiency virus infection in seronegative homosexuals presenting with an acute viral syndrome. *J. amer. med. Ass.*, 1987, 258, 1196.
- KWOK, S., MACK, D. H., MOLLIS, K. B., POIES, Z., EHRLICH, G., BLAIR, D., FRIEDMAN-KIEN, A., SNINSKY, J. J. — Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J. Virol.*, 1987, 61, 1690.
- LANGE, J., PAUL, D. A., HUISMAN, H. G., DE WOLF, F., VAN DEN BERG, H., COUTINHO, R. A., DANNER, S. A., VAN DER NOORDAA, J., GOUDSMIT, J. — Persistent HIV antigenemia and decline of HIV core antibodies associated with transition to AIDS. *Brit. med. J.*, 1986, 293, 1459.
- LEUE, N. P., REESINK, H. W., HUISMAN, H. — Evaluation of three second-generation and three confirmatory assays for antibodies to human immunodeficiency virus. *Vox Sang.*, 1988, 54, 84.
- LOMBARDO, J. M. — *HIV-1 testing : an overview*. International Clinical Products, Review, Diagnostic Technology, 1988.
- MARLINK, R. G., ALLAN, J. S., MCLANE, M. F., ESSEX, M., ANDERSON, K. C., GROOPMAN, J. E. — Low sensitivity of ELISA testing in early HIV infection. *New Engl. J. Med.*, 1986, 315, 1549.
- MARTIN, P. W., BURGER, D. R., CAOUETTE, S., GOLDSTEIN, A. S., PEETOOM, F. — Importance of confirmatory tests after strongly positive HTLV III screening tests. *New Engl. J. Med.*, 1986, 314, 1577.
- OU, C. Y., KWOK, S., MITCHELL, S. W., MACK, D. H., SNINSKY, J. J., KREBS, J. W., FEORINO, P., WARFIELD, D., SCHOCHETMAN, G. — DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science*, 1988, 239, 295.
- PETRICCIANI, J. C. — Licensed tests for antibody to human T-lymphotropic virus type III : sensitivity and specificity. *Ann. intern. Med.*, 1985, 103, 726.
- SAAH, A. J., FARZADEGAN, H., FOX, R., NISHANIAN, P., RINALDO, C. R. Jr., PHAIR, J. P., FAHEY, J. L., LEE, T. H., POLK, B. F. — The Multicenter AIDS Cohort Study. Detection of early antibodies in human immunodeficiency virus infection by enzyme-linked immunosorbent assay, western blot and radioimmunoprecipitation. *J. clin. Microbiol.*, 1987, 25, 1605.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. — Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230, 1350.
- SANDSTROM, E. G., SCHOOLEY, R. T., HO, D. D., BYINGTON, R., SARNGADHARAN, M. G., MACLANE, M. E., ESSEX, M., GALLO, R. C., HIRSCH, M. S. — Detection of human anti-HTLV III antibodies by indirect immunofluorescence using fixed cells. *Transfusion*, 1985, 25, 308.
- SAYERS, M. H., BEATTY, P. G., HANSEN, J. A. — HLA antibodies as a cause of false-positive reactions in screening enzyme immunoassays for antibodies to T-lymphotropic virus Type III. *Transfusion*, 1986, 26, 113.
- THORN, R. M., BELTZ, G. A., HUNG, C. H., FALLIS, B. F., WINKLE, S., CHENG, K. L., MARCIANI, D. J. — Enzyme immunoassay using a novel recombinant polypeptide to detect human immunodeficiency virus env antibody. *J. clin. Microbiol.*, 1987, 25, 1207.
- ULSTRUP, J. C., SKAUG, K., FIGENSCHAU, K. J., ORSTAVIK, I., BRUNN, J. N., PETERSEN, G. — Sensitivity of Western blotting (compared with ELISA and immunofluorescence) during seroconversion after HTLV III infection. *Lancet*, 1986, I, 1151.
- WONG-STALL, F., GALLO, R. C. — Human T-lymphotropic retrovirus. *Nature*, 1985, 317, 395.