



Journées d'échanges scientifiques autour du VIH/SIDA

Annaba, Algérie, mars 2013

Avec l'appui de la Direction de la Santé et des Populations
de la Wilaya de Annaba
et le Centre de Référence sur les IST/SIDA
Dans le cadre des Synergies du programme concerté Pluri-Acteur "JOUSSOUR"



Association De Lutte Contre Les IST/Sida
Et De Promotion De La Santé

En Partenariat avec



Organisent

"Les 2^{ème} Journées d'échanges Sur
La Prise En Charge De La Femme
Enceinte Vivant Avec Le VIH "



Les 22 et 23 Mars 2013 a l'institut national de formation supérieur des sages femmes de Annaba
Ateliers Satellites : Découverte, Annonce Et Diagnostic - Aspects Pratiques
De La Prise En Charge Du VIH-SIDA
PTME-La Prise En Charge De L'enfant

Dans le cadre de



Avec la participation
des membres de



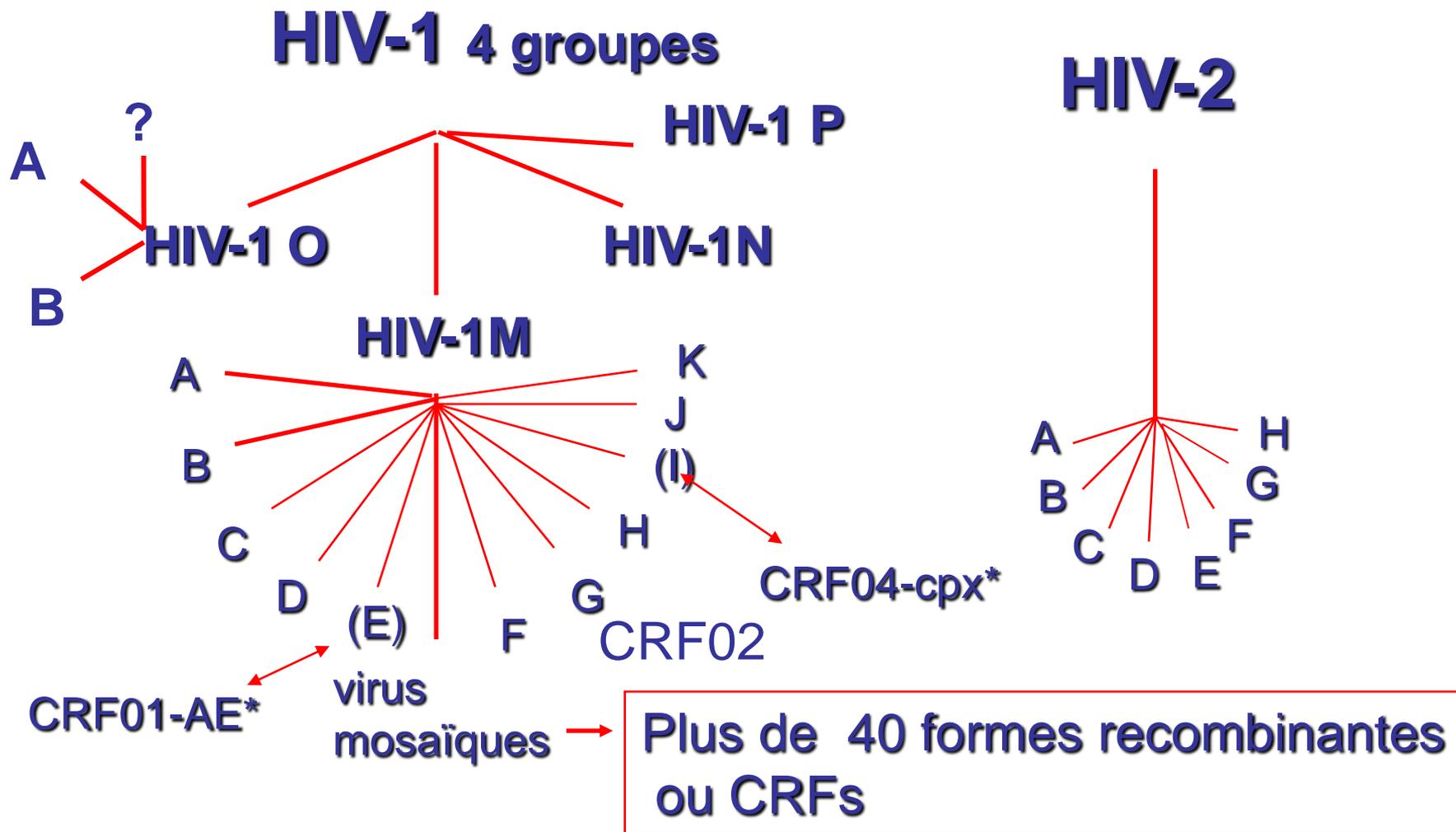
Rétrovirologie appliquée au diagnostic et au suivi des patients

Dr Ali KARA : Biologiste, Laboratoire de Biologie, CH Marc Jacquet, Melun, France

RETROVIRIDAE

- **Retroviridae : grande famille**
 - **Associés à de nombreuses pathologies incluant :**
 - ❖ **tumeurs à développement plus ou moins rapide**
 - ❖ **syndrome neurologique**
 - ❖ **immunodéficience**
 - **Tous les rétrovirus ont :**
 - ❖ **une structure**
 - ❖ **une organisation génomique**
 - ❖ **un mode de réplication**
- } **similaires**

Diversité du VIH



Distribution géographique des sous-types et des formes recombinantes

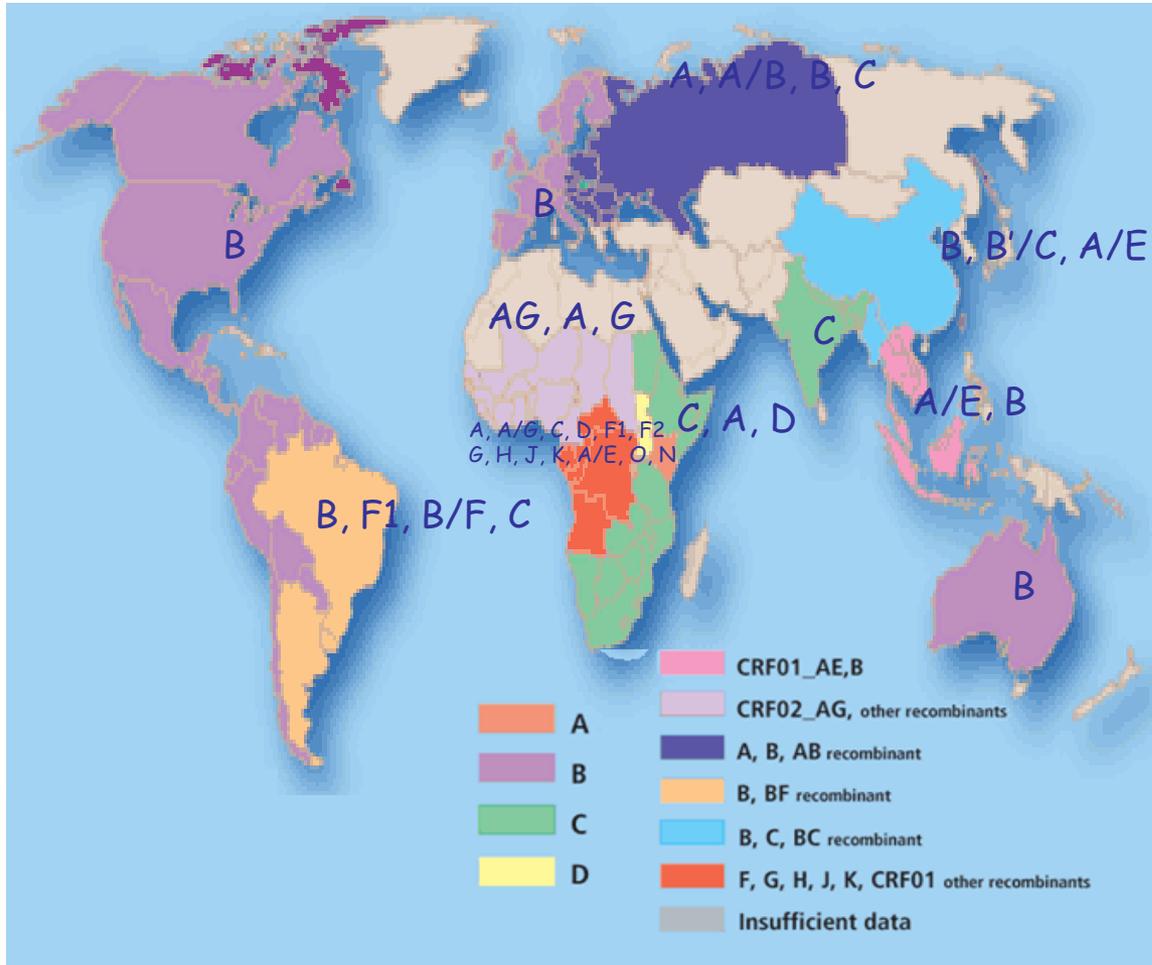


Table 2 Distribution of HIV-1 subtypes and circulating recombinant forms (CRFs)

Subtype	Global predominance	Main geographical distribution
A	High	Eastern Africa, Eastern Europe, Central Asia
B	High	Americas, Western Europe, Australia, Japan
C	High	South and Eastern Africa, India, China, Nepal
D	High	Eastern Africa
F	Low	South America, Central Africa, Eastern Europe
G	Low	Central Africa
H	Low	Central Africa
J	Low	Central Africa
K	Low	Central Africa
CRF01_AE	High	Southeast Asia
CRF02_AG	High	West and Central Africa

La diversité génétique du VIH-1 et données actuelles en Algérie

Salima Bouzeghoub,* , El Hadj Belabbes

Service de virologie - Laboratoire national de référence du VIH/sida

Institut Pasteur d'Algérie - Annexe de Sidi-Fredj – Alger – Algérie

Revue Francophone des Laboratoires - Novembre 2007 -

Supplément au n° 396

- **1. Population étudiée**

- Le séquençage a été réalisé à partir du plasma de 134 patients algériens porteurs du VIH-1, originaires de différentes régions d'Algérie.
- Il s'agit de patients contaminés par voie hétérosexuelle ; l'âge moyen est de 35 ans et la charge virale est de 5,4 log en moyenne.

- **2. Méthodes**

- L'étude a été réalisée au laboratoire de virologie de l'université Victor-Segalen (Bordeaux 2, France).
- Après extraction de l'ARN du VIH -1, une amplification des gènes RT (*reverse transcriptase*), Prot (protéase) et Env (enveloppe) est réalisée par RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*).
- Les fragments obtenus sont séquencés (Beckman CEQ 2000 DNA Analysis System). Les séquences nucléotidiques obtenues, une fois analysées et vérifiées, sont alignées avec le programme Clustal W 1.74 avec les séquences de références de sous-types M et N (<http://hiv-web.lanl.gov>)
- Un arbre phylogénétique est alors construit avec la méthode du plus proche voisin (*neighbor-joining*) pour déterminer les génotypes du VIH de chaque patient.

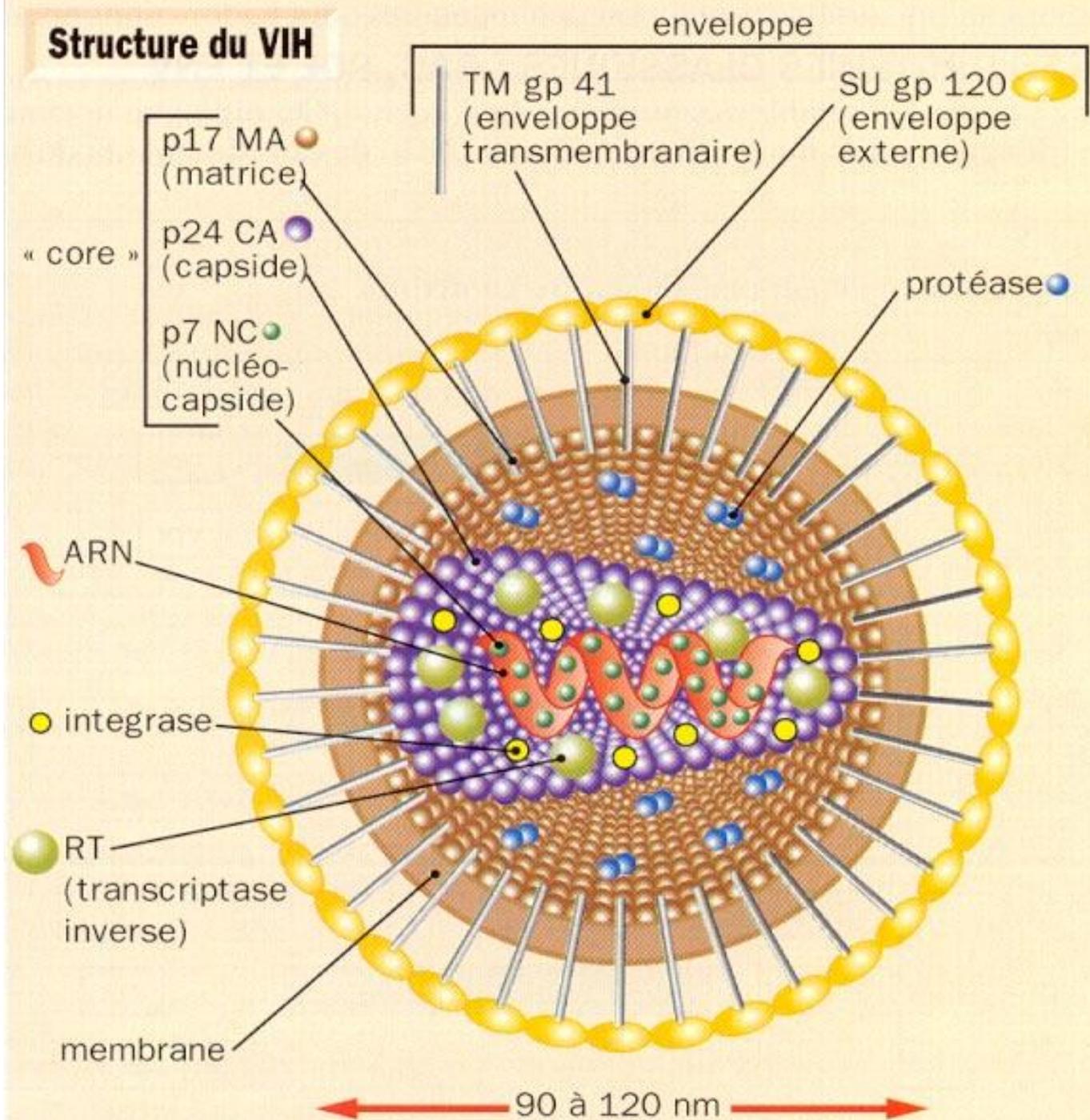
3. Résultats

- Une grande diversité génétique des souches VIH -1 des patients algériens a été observée lors de cette étude.
 - **En effet, après le sous-type B qui prédomine (56 %)**
 - **CRF 02-AG (12,7 %),**
 - **CRF 06 cpx (4 %),**
 - **inter-recombinants CRF 02-AG/CRF 06 cpx (9,7 %),**
 - **suivid'autres sous-types tel que le sous-type G, A et D.**
 - La distribution géographique de ces sous-types montre **que le sous-type B** circule particulièrement au nord du pays,
 - alors que les formes recombinantes (CRF) circulent surtout dans la région sud du pays du à sa situation géographique frontalière.

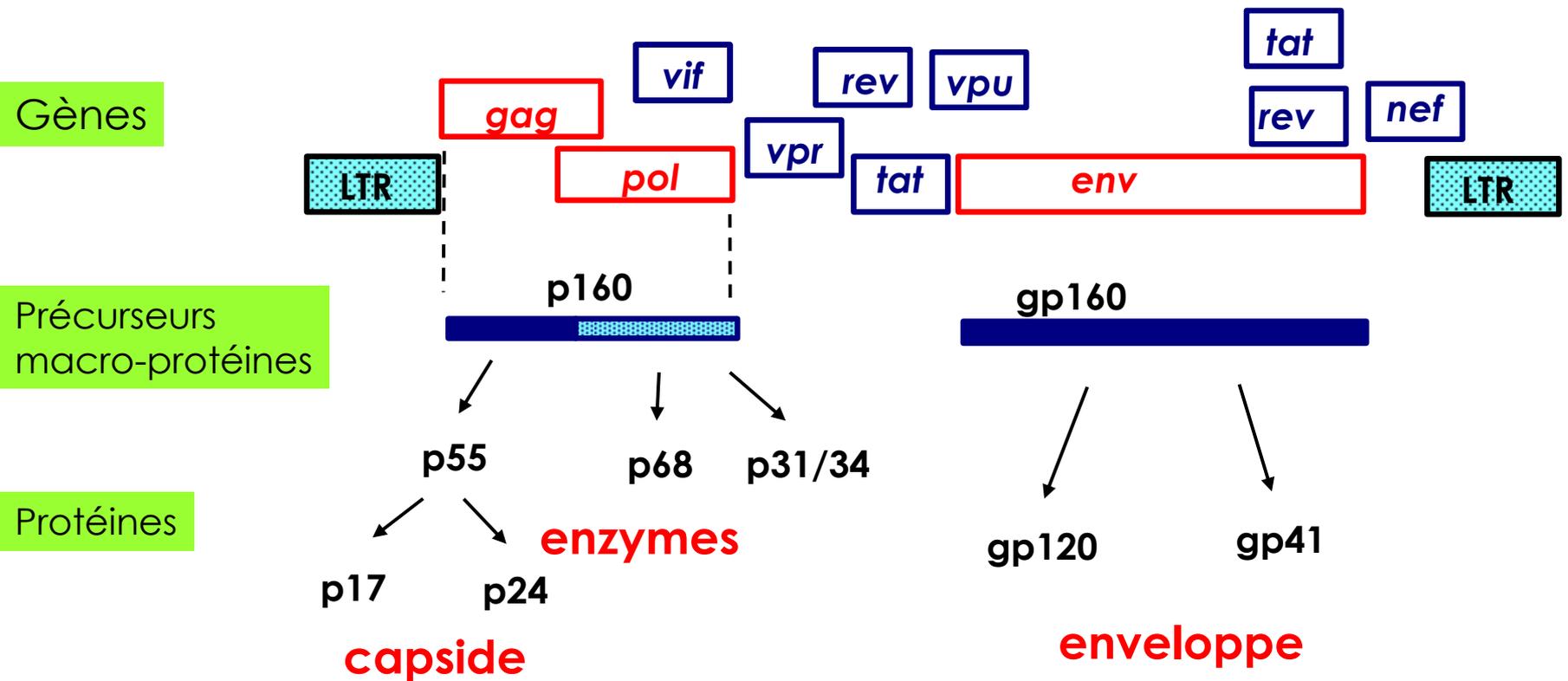
Impacts de la diversité génétique du VIH

- **Diagnostic** : détection du VIH-0 mise en défaut en 1994
- **Quantification** : sous-quantification/non quantification de sous-types VIH-1 (si CV basse ou indétectable en l'absence de ttt, associée à un taux de CD4 bas), VIH-2
- **Sensibilité aux antirétroviraux** :
 - Impact du polymorphisme du gène de la protéase
 - Prédisposition génétique du sous-type C à la résistance à l'éfavirenz, à la névirapine, au ténofovir
- **Transmissibilité** : TME plus importante des sous-types D
- **Pas d'impact des sous-types sur la réponse au traitement**
- **Vaccination** : reste l'enjeu majeur !

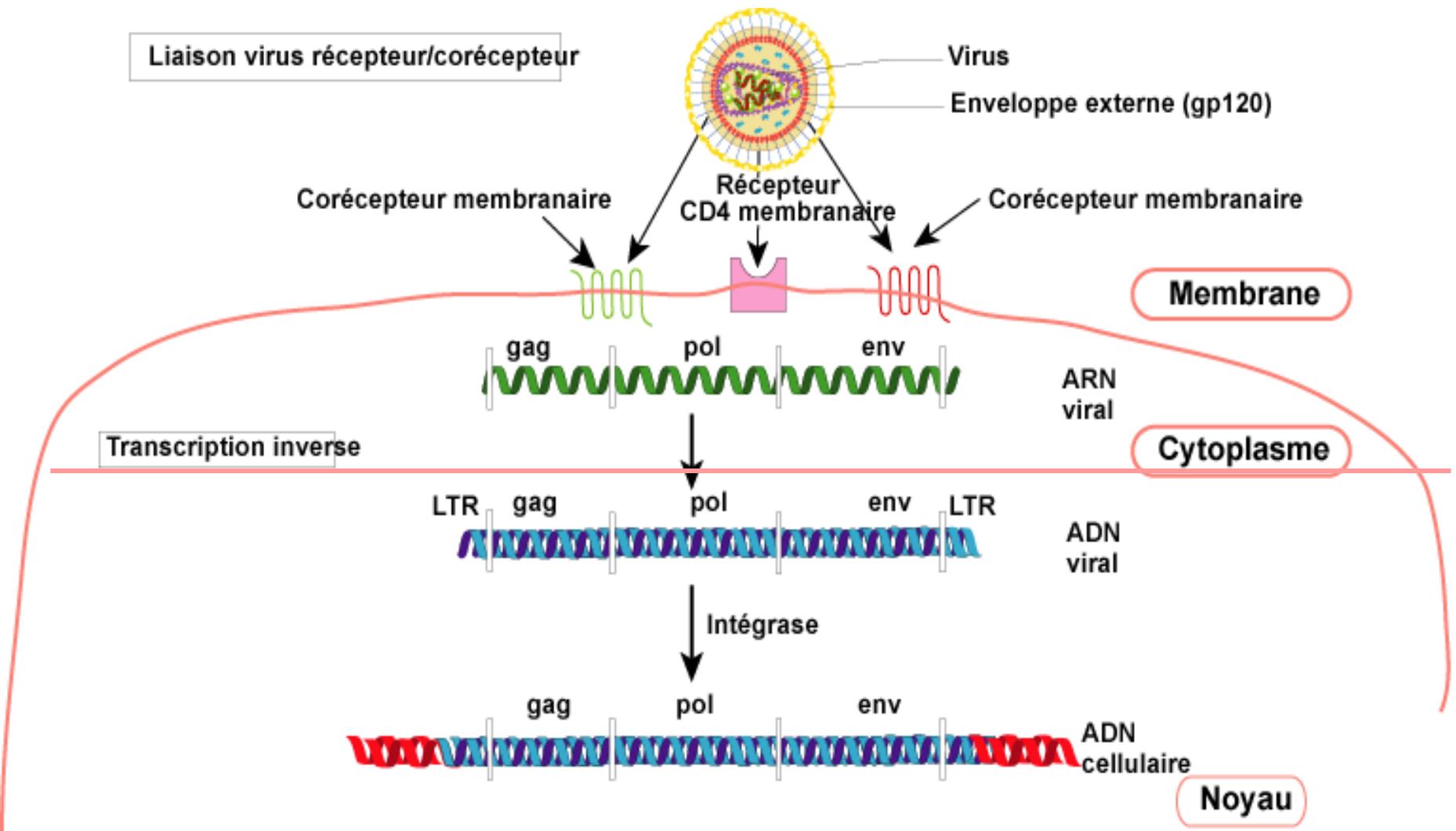
Structure du VIH

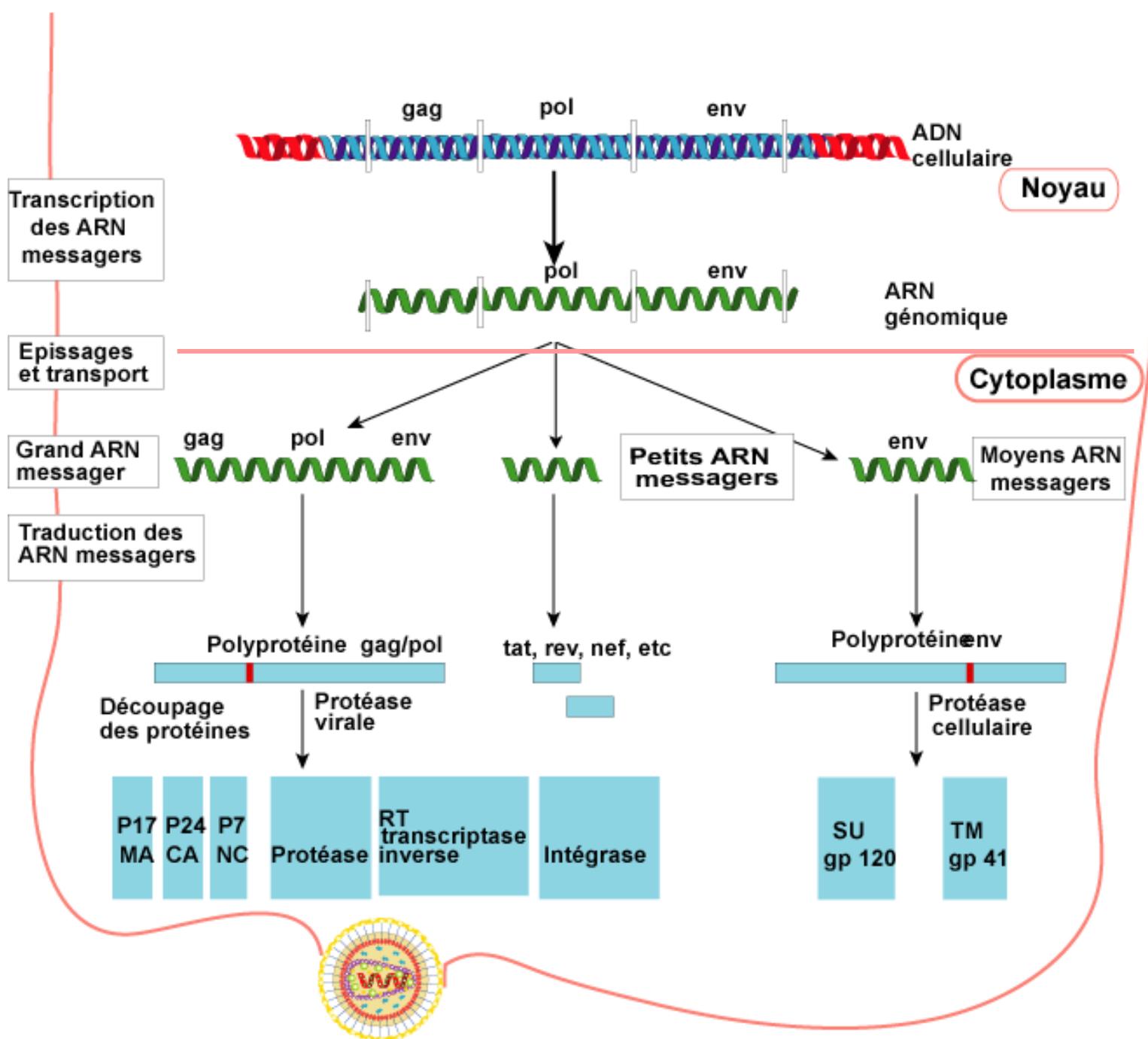


Génome et protéines structurales

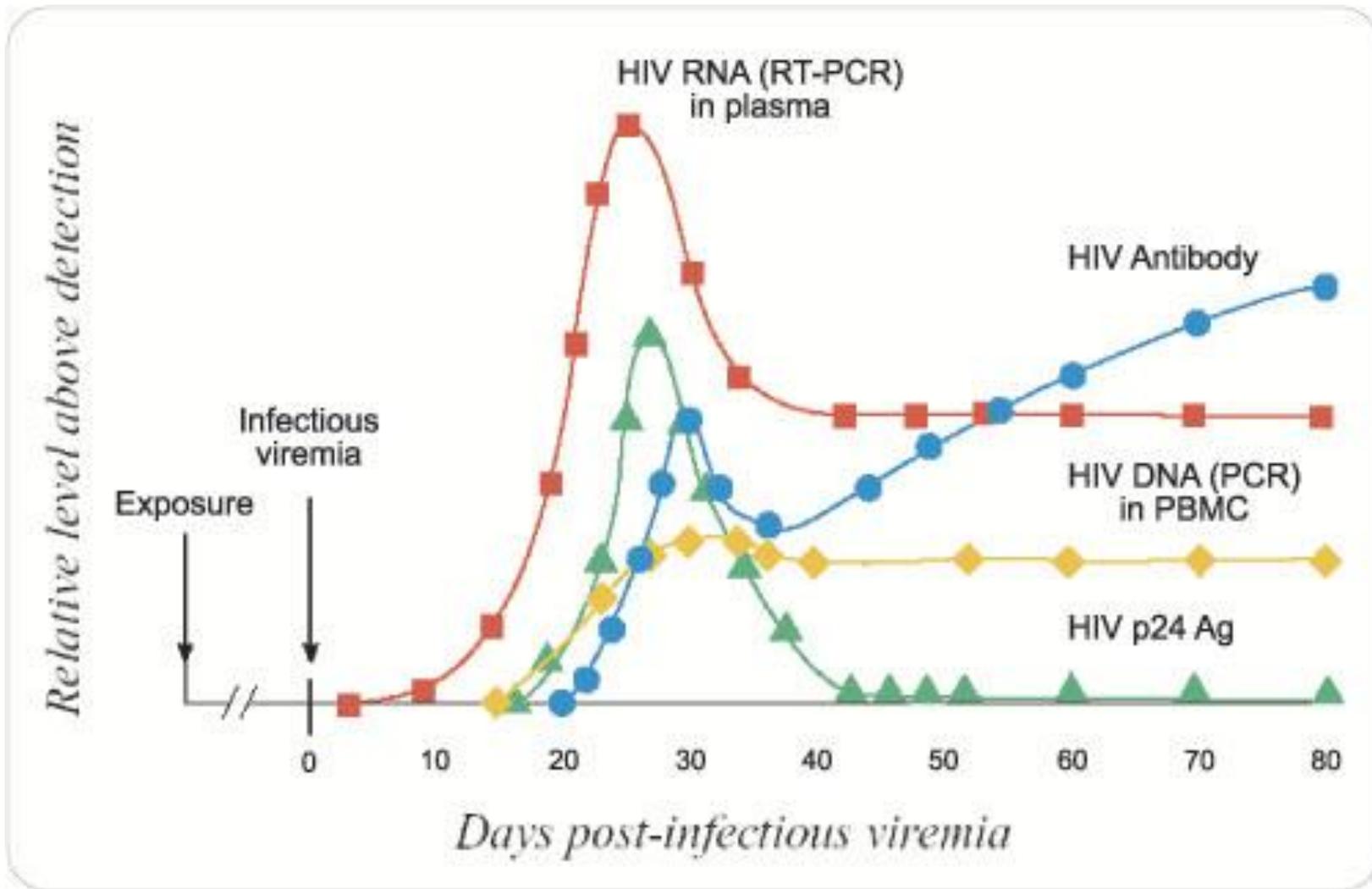


VIH - cycle de réplication





Quels sont les examens biologiques qui permettent de faire le diagnostic de l'infection à VIH-1 et à VIH-2 ?



Marqueurs moléculaires et sérologiques lors de l'infection par VIH-1

Les moyens du diagnostic

- ELISA le plus souvent (en UE) combinés (de 4eme génération dans l'UE) : détectent Antigène VIH et anticorps anti VIH1 & VIH2
- Tests dit rapides sont des dispositifs unitaires de réalisation simple sans apport de matériel et ne nécessitant pas de chaine du froid
- Western Blot confirment la présence des anticorps anti VIH-1 ou VIH-2
- Le typage lymphocytaire
- L'ARN plasmatique signe la présence d'un VIH réplicatif à partir des cellules infectées. Les tests dit de « charge virale » quantifie cette réplication en « copie » de virus par mL de plasma
- L'ADN proviral ou ADN intégré correspond à la présence du provirus dans les cellules infectées
- Les tests de résistance recherchent la présence de mutations du génome VIH sous la pression des antirétroviraux

Diagnostic indirect : Sérodiagnostic de dépistage

- Nature de l'antigène de capture des anticorps

- Virus entier purifié
- Protéines virales natives ou recombinantes
- Peptides de synthèse

- Détection des anticorps

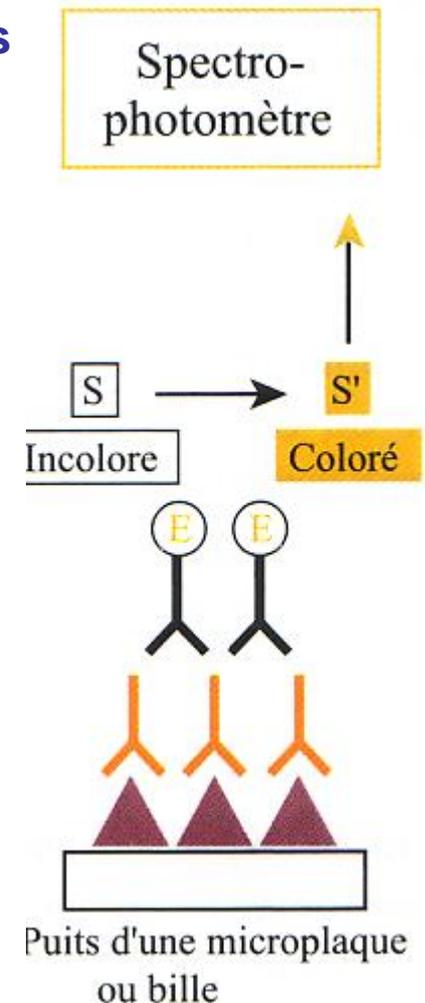
- Totaux (IgG + IgM)
- IgG ou IgM

- ELISA combinée : détecte anticorps et antigène

- Expression des résultats

- Qualitatif (positif ; négatif ; douteux)
- Quantitatif (titre)

ELISA



Test ELISA indirect (Infection par le VIH)



Microplaque ELISA : Les puits colorés correspondent à des positivités

Exemple d'automates EIA (VIH & hépatites et autres) EIA 4ème génération Ag + Ac



Architect Abbott



Vidas bioMérieux



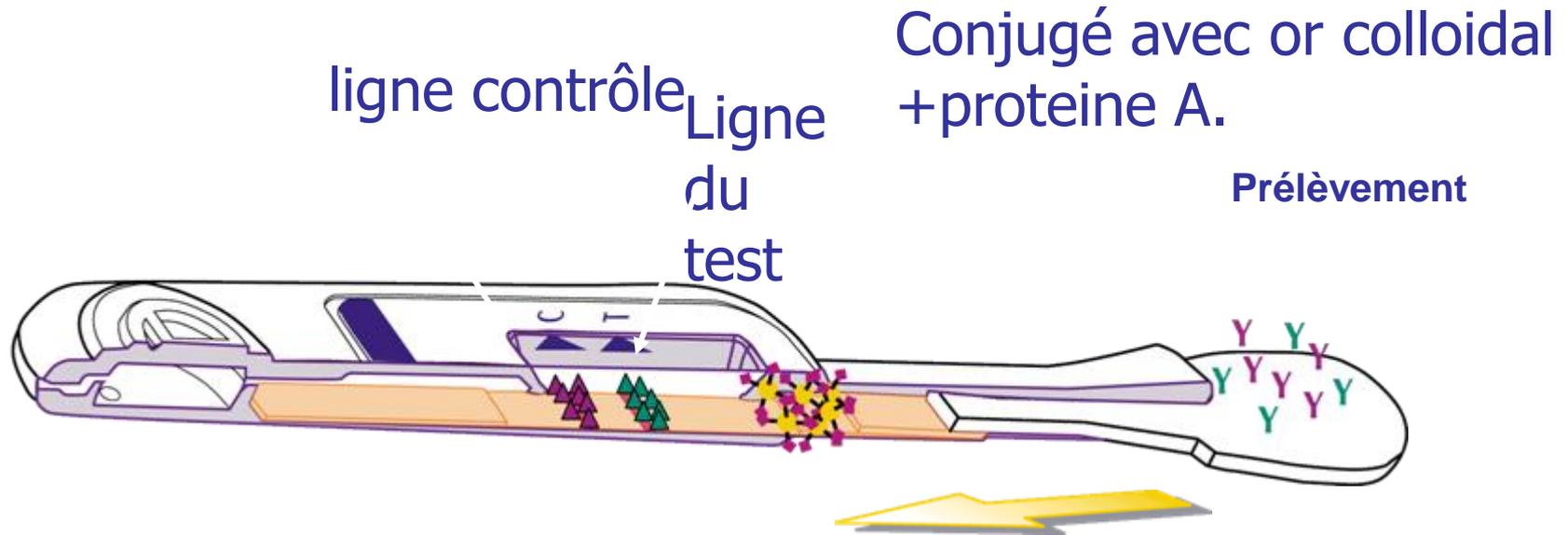
Microplaques Behring-Siemens



Axym Abbott

Principes généraux des TDR

Immuno-filtration ou immuno-chromatographie



▲ Ac anti anticorps humain
▲ Antigène HIV-1/2

Or Colloïdal
Conjugué à la
Protéine A

Y AC Humains non HIV
Y Ac HIV-1/2

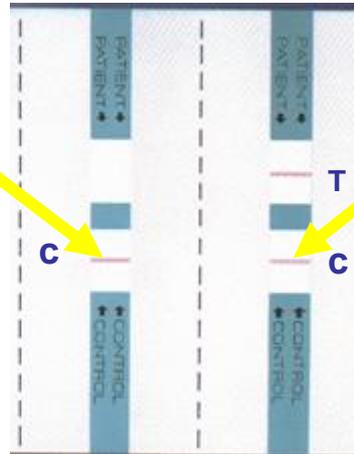
Tests de diagnostic rapide (TDR) : Utilisés depuis plus de 19 ans



Test VIKIA VIH 1/2, bioMérieux

Contrôles
interne
des tests

Réaction positive :
Présence possible
d'anticorps anti VIH-1



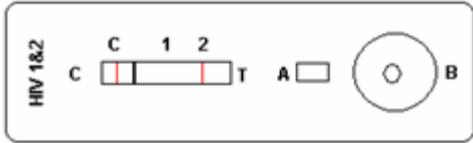
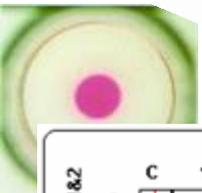
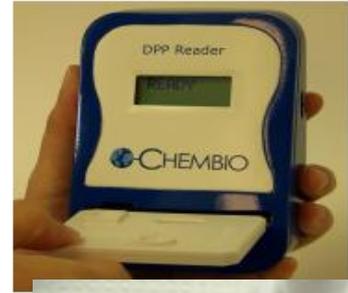
**Test Determine HIV 1-2
, Inverness**

C : bande contrôle de bon fonctionnement du test
T : bande de réactivité anti VIH

Marché mondial anarchique : > 80 tests, nombreux fabricants ,vendeurs et revendeurs (voir du même test !)

€ 23.00 EUR

ORDER



Buy Now

... and Non-invasive. Highly accurate (99.8%)



NO MORE WAITING FOR 48^{hrs} FOR RESULTS



6 Simple Steps



10 Minutes Results

Aids, **test** at home for HIV, € 21,95 a reliable, fast and discreet **test**



€ 23.00 EUR

ORDER NOW

For discretion and security

OVERNIGHT DELIVERY

We ship all our products in an flat anonymous envelope.

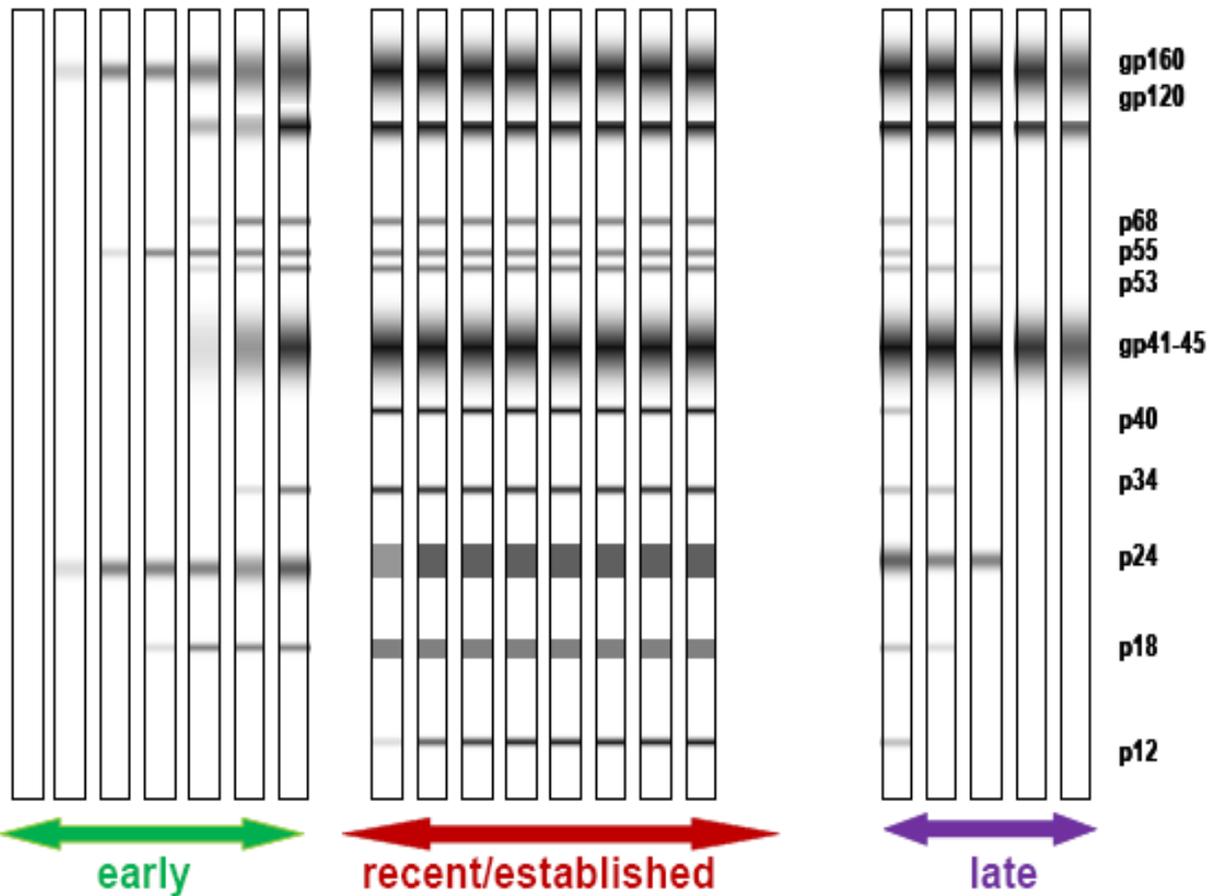
Tufts aQ!

la confirmation des infections par le Western Blot

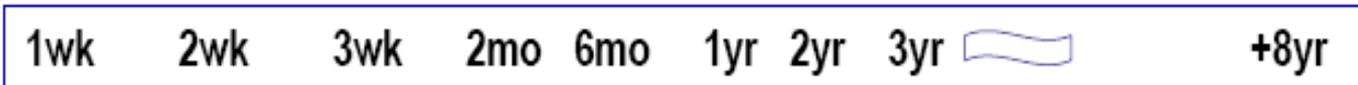
**western blot VIH-1 avec les poids moléculaires des principaux antigènes
(New Lav blot 1, Biorad-Pasteur).**

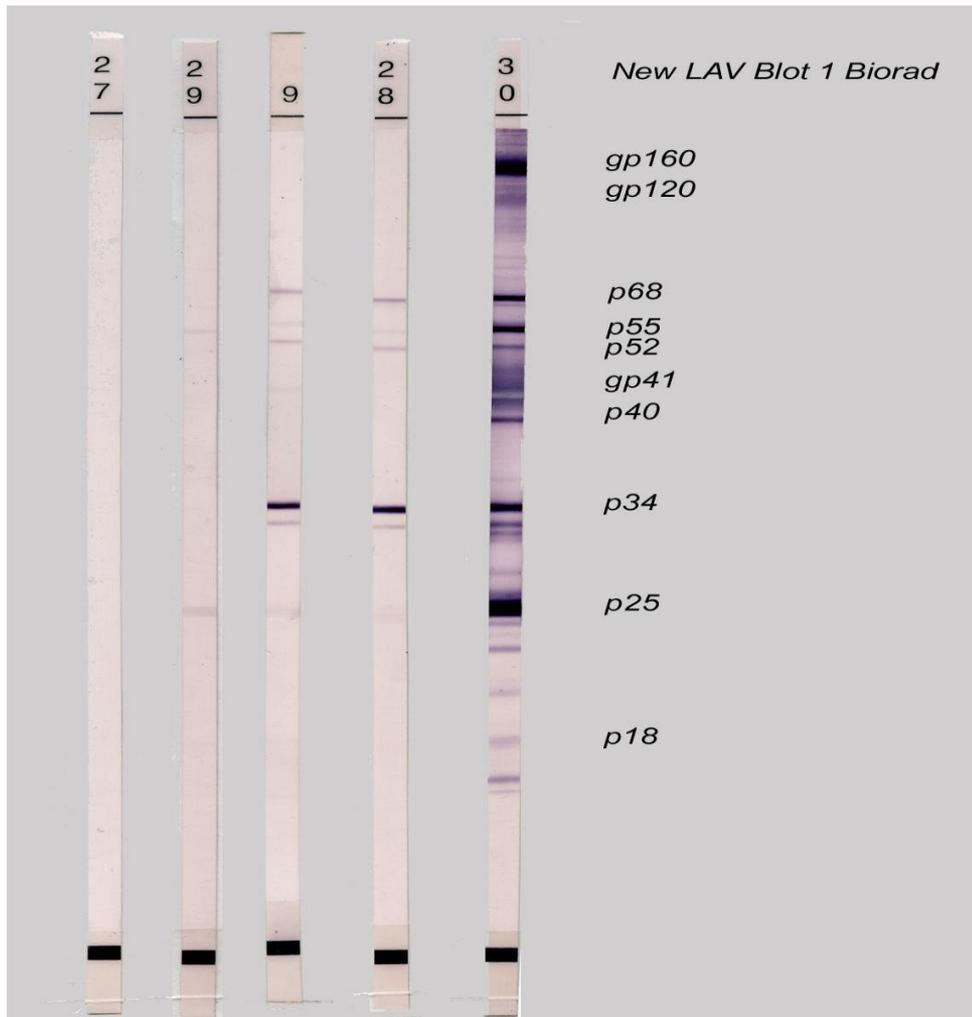


**Evolution:
antibody/
antigen testing
response**



Tests rapides





27 : *Témoin négatif*
 29 : *Prélèvement d'août 2004*
 9 : *Prélèvement d'avril 2005 (laboratoire de ville)*
 29 : *Prélèvement du 26/04/05 (Virologie - Tenon)*
 30 : *Témoin positif*

Figure 1 : Evolution du tracé du Western blot VIH1.

Sous type
O

TDR Sang total -

HIV négatif

Sauf exposition VIH dans les 3 mois précédents ou situations d'immunosuppression profonde ou de variants rares

TDR Sang total + ou +/-

Nouveau prélèvement

Recherche Ac ant VIH-1 et VIH-2 et d' Ag P24 par un test Elisa 4ème génération (EIA) et par un Western Blot (WB)

HIV positif

EIA + & WB +
Infection VIH confirmée

A différencier entre VIH-1 et VIH-2

EIA +
WB +

EIA -
WB + ou -

EIA +
WB +/- ou -

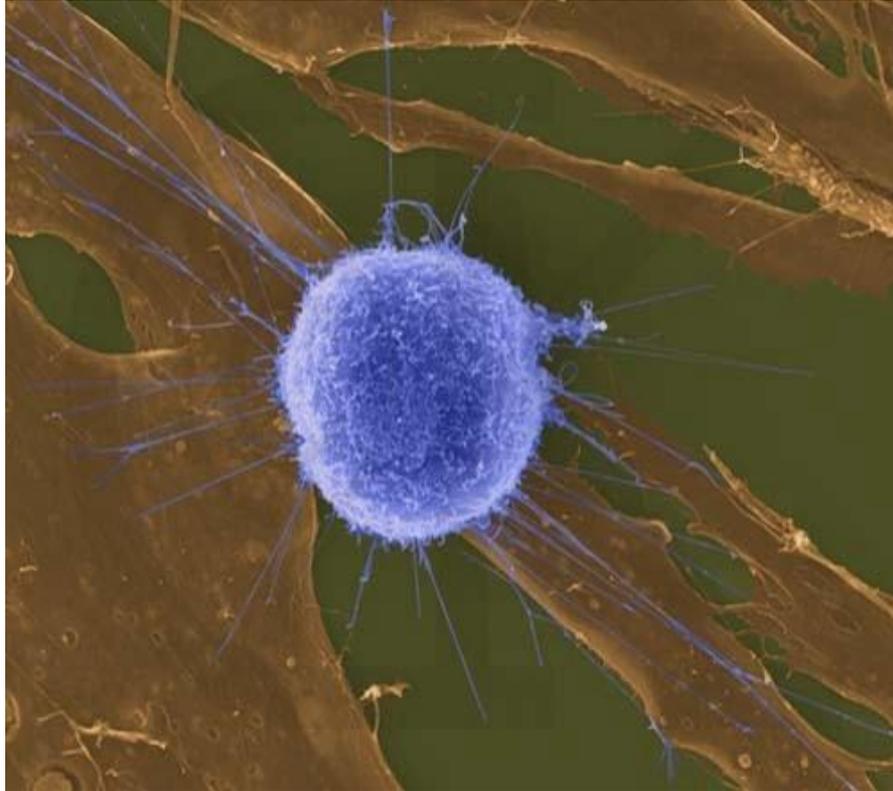
- réaction non spécifique
- Erreur d'identification

Primo-infection Probable ou VIH-2

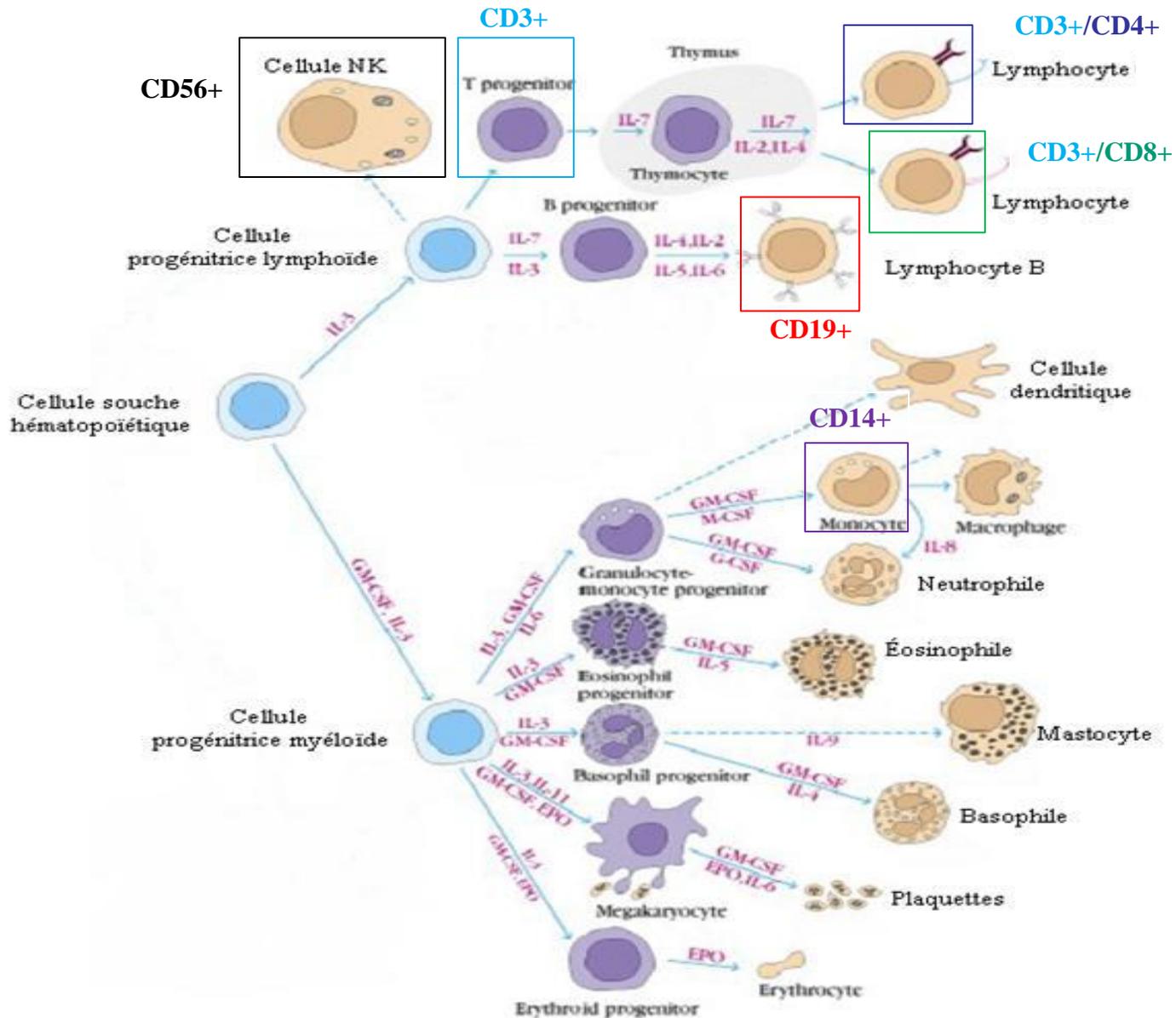
Nouveau contrôle sérologique
et explorations complémentaires = ARN, suspicion variants

Quantification des CD4

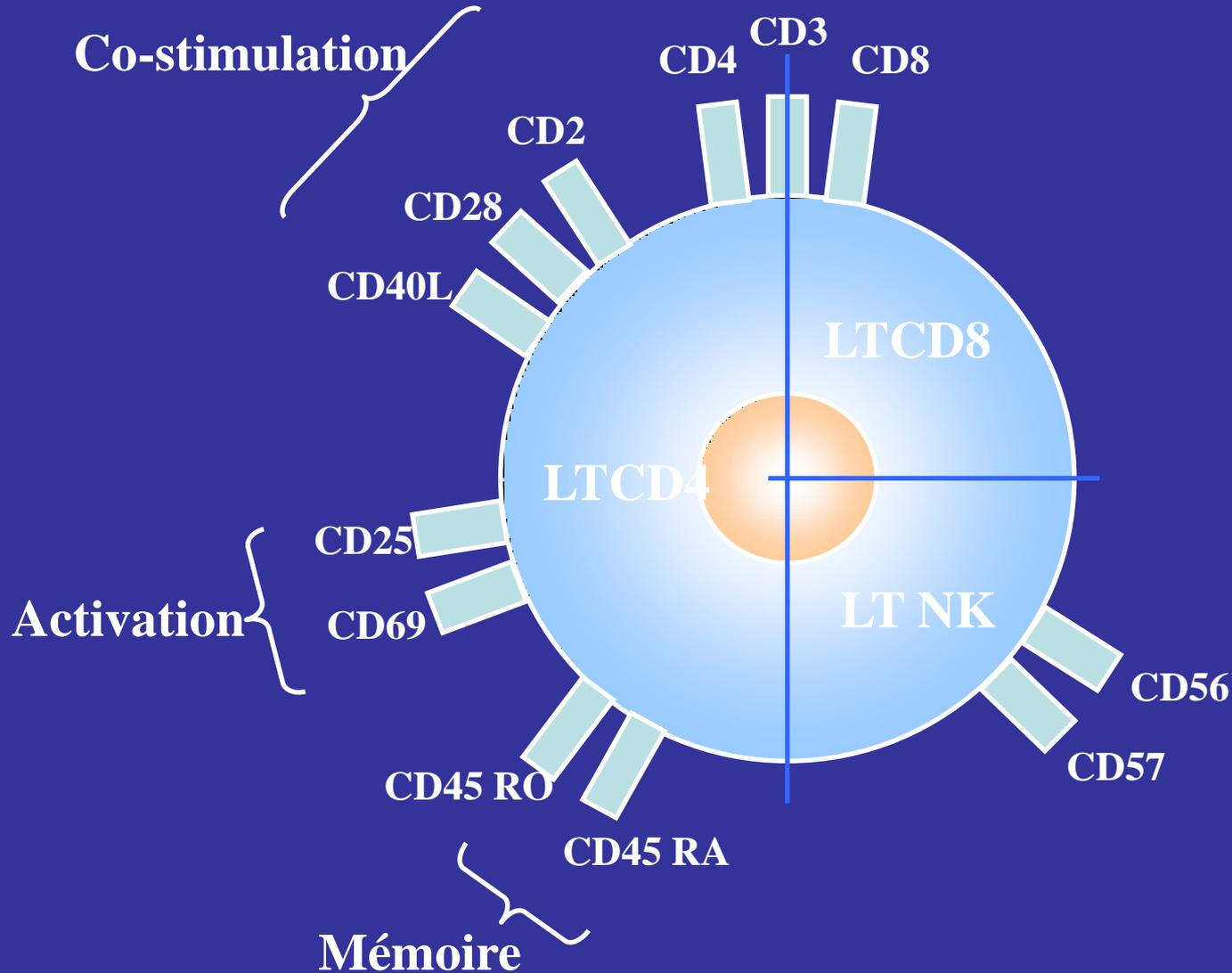
Un lymphocyte T



La différenciation lymphoïde et myéloïde



Les différents lymphocytes T



Introduction à la cytométrie en flux

Origine de la cytométrie en flux :

1934: applicable aux cellules hématopoïétiques (comptage)

1941: développement des techniques d'anticorps couplés

1960: développement des premiers cytomètres

Définition :

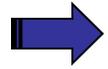
La cytométrie en flux permet l'étude précise de cellules isolées entraînées dans un flux liquide. Les cellules, alignées les unes derrière les autres, sont analysées une par une en défilant à grande vitesse (plus de 30Km/h) devant une source lumineuse (un laser).

Intérêt :

C'est une technique rapide qui permet une caractérisation :

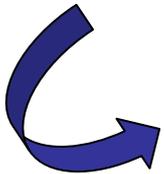
- **individuelle** de chaque cellule
- **quantitative** (intérêt statistique)
- **qualitative et multiparamétriques** (morphologie de la cellule et phénotypage)

Intérêt



Monitoring de l'état immunitaire des patients dans différentes maladies:

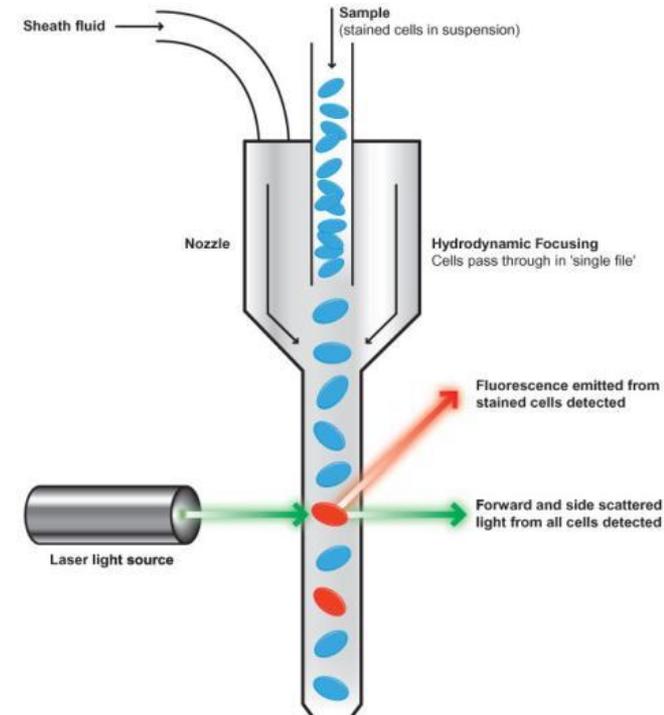
- déficits immunitaires
- infections graves
- maladies inflammatoires chroniques
- auto-immunité
- au décours de traitement (immunostimulants, immunosupresseurs, vaccinations...)



Evaluation du pourcentage des différents types cellulaires que compte le système immunitaire

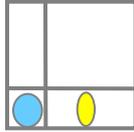
Principe

- ➔ Propulsion des cellules une à une à grande vitesse dans un flux hydrodynamique
- ➔ Passage devant une source lumineuse (Laser)
- ➔ Récupération de la fluorescence issu d'un immunomarquage le plus souvent
- ➔ Adaptée aux cellules en suspensions et donc à l'analyse de liquides biologiques :
 - Sang
 - Lavage broncho-alvéolaire
 - ascite ou épanchement pleural
 - Liquide céphalorachidien
 - aspiration médullaire
- ➔ Possibilité tout de même d'analyser des cellules tissulaires après dissociation



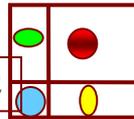
La cytométrie polychromatique

1 Colour



2 Populations

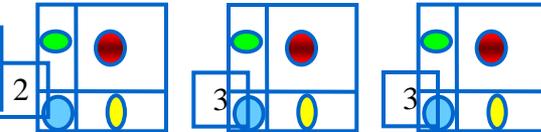
2 Colour



4

1

3 Colours



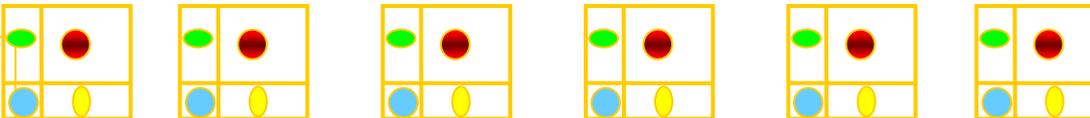
12

1

1

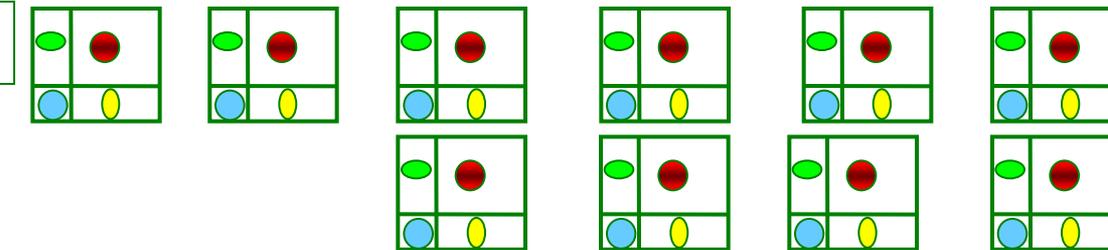
2

4 Colours



24

5 Colours



40

6 Colours

60

Les applications

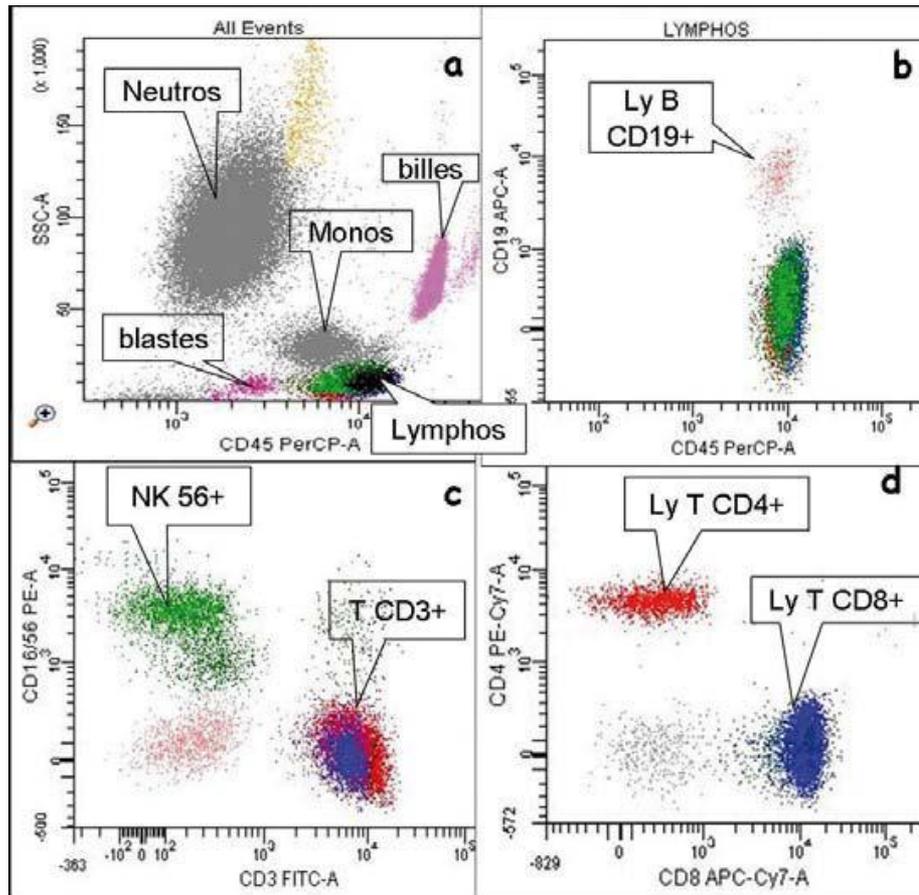
➡ **Application la plus courante : Le comptage de lymphocytes T pour le suivi des infections HIV ou de greffes.**

Principe

- 50 à 100uL de sang
- Ajout des Ac couplés
- Possibilité d'ajouter :
CD16 (neutrophile)
CD14 ou CD15 (monocytes)

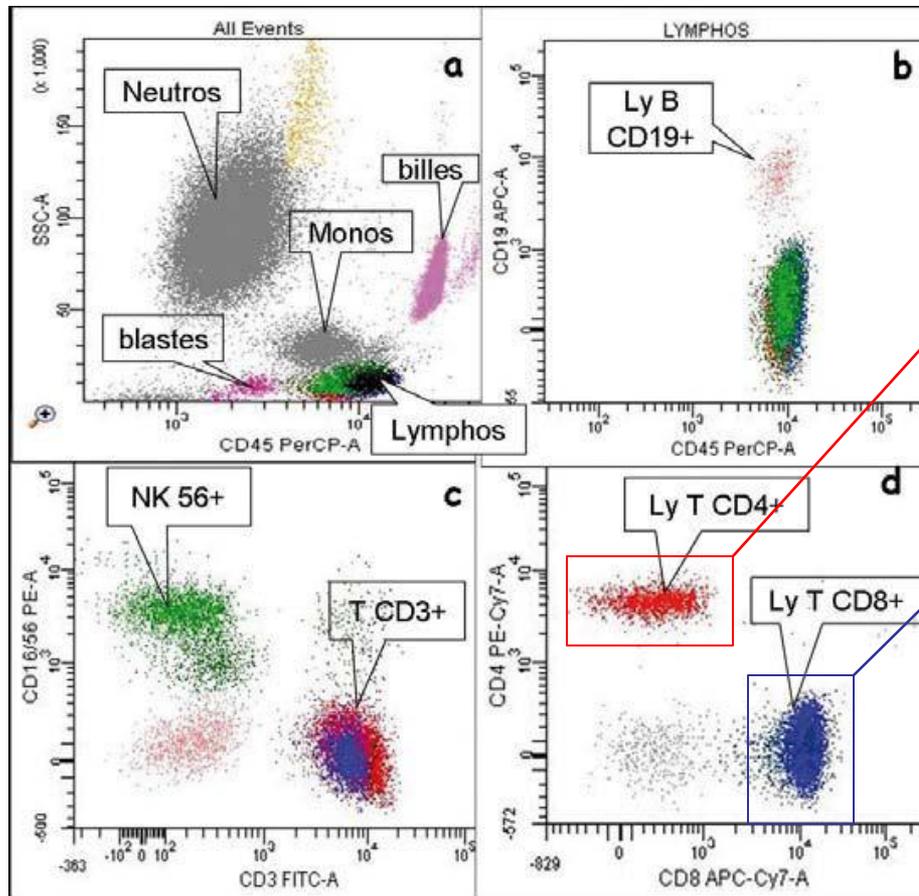
Avantages

- Intérêt statistique
- rapide (3min d'analyse)
- multiparamétrique donc précise (cas des monocytes CD4+ mais CD3-)



Les applications

Résultats attendus d'un sujet sein (sur sang périphérique) :



LyT CD3+/CD4+ = 66%

LyT CD3+/CD8+ = 33%

Rapport **CD4/CD8** doit être
2/3 à 1/3

Techniques utilisant la cytométrie de flux :

- Les cytomètres de flux les plus utilisés dans les pays développés:
 - (FACSCalibur de Becton Dickinson, ou
 - FC 500 BeckmanCoulter)
 - sont très coûteux à l'achat, en maintenance et en technicité du personnel,
 - inadéquats dans les pays à ressources limitées. (90000 euros)
- -peut rendre le comptage des lymphocytes T CD4
 - en pourcentage et en valeur absolue/microlitre
- - la formation du personnel est relativement simple et la firme a récemment mis en place une maintenance sur site en Afrique subsaharienne
- - le prix des réactifs atteint
 - environ 7 \$ US le point dans ces pays
 - le coût de la maintenance est de 3 000 euros par an
- - n'est pas transportable et ne peut être relié à un ordinateur (ce qui ne facilite pas le stockage des résultats).



Techniques alternatives : Mesure du taux de lymphocytes T CD4:

Minicytomètres de flux



- Le minicytomètre « **Cyflow Counter** » (Partec) : la version 2008 est équipée de 2 détecteurs fluorescents, permettant de mesurer les lymphocytes T CD4 :

- - en valeur absolue (Partec CD4 Easy Count : 1,75 euro à 2,5 euros). le test)

- Le minicytomètre dit « **Alternatif Guava** » (Guava) :

- - en cours de validation en conditions de terrain ;
- - faible coût unitaire : environ 1,25 - 1,50 \$ US/comptage T CD4 ;
- - permet le comptage des lymphocytes T CD4 en valeur absolue et/ou en pourcentage selon les réactifs utilisés.



Easy Guava CD4

- Le minicytomètre « **A40** » (Apogee, distribué par Inodex) :

- - spécialement conçu pour être transporté ; paraît équivalent ; - réactifs : 3,5 euros (CD4/microlitre) à 7,5 euros (valeur absolue + %).



- L'automate PointCare « **Now** » (depuis juillet 2007) :

- - - fermé, complètement automatisé, n'exige pas de formation spéciale ;
- - fournit le comptage des lymphocytes T CD4 en % et en valeur absolue, le taux d'hémoglobine et la numération-formule sanguine ;
- - le coût (10 \$ US par test) pourrait constituer un obstacle important.



Apogée A40

Pima™ CD4 Cartridge

- **L'Organisation Mondiale de la Santé (WHO)** a présélectionné le 25 novembre 2011. le Test d'Alere Pima™ CD4 en tant qu'un accès aux outils rapides et précis de surveillance de HIV/SIDA. de produits présélectionnés
- Le Test d'Alere Pima™ CD4 conçu pour la mesure de l'absolu CD4
- **The Alere Pima CD4 Test has been on the market since November 2009.**
-
- **In 2010, about ~650 devices were placed and ~580k tests sold;**
- **in 2011, this increased to ~1650 devices and ~900k – 1m tests sold;**
- **in 2012 through June, 750 analyzers have been placed, and 740k tests sold.**



Alere Pima CD4 Test

Bench top portable;
~5.5 lbs

Absolute CD4

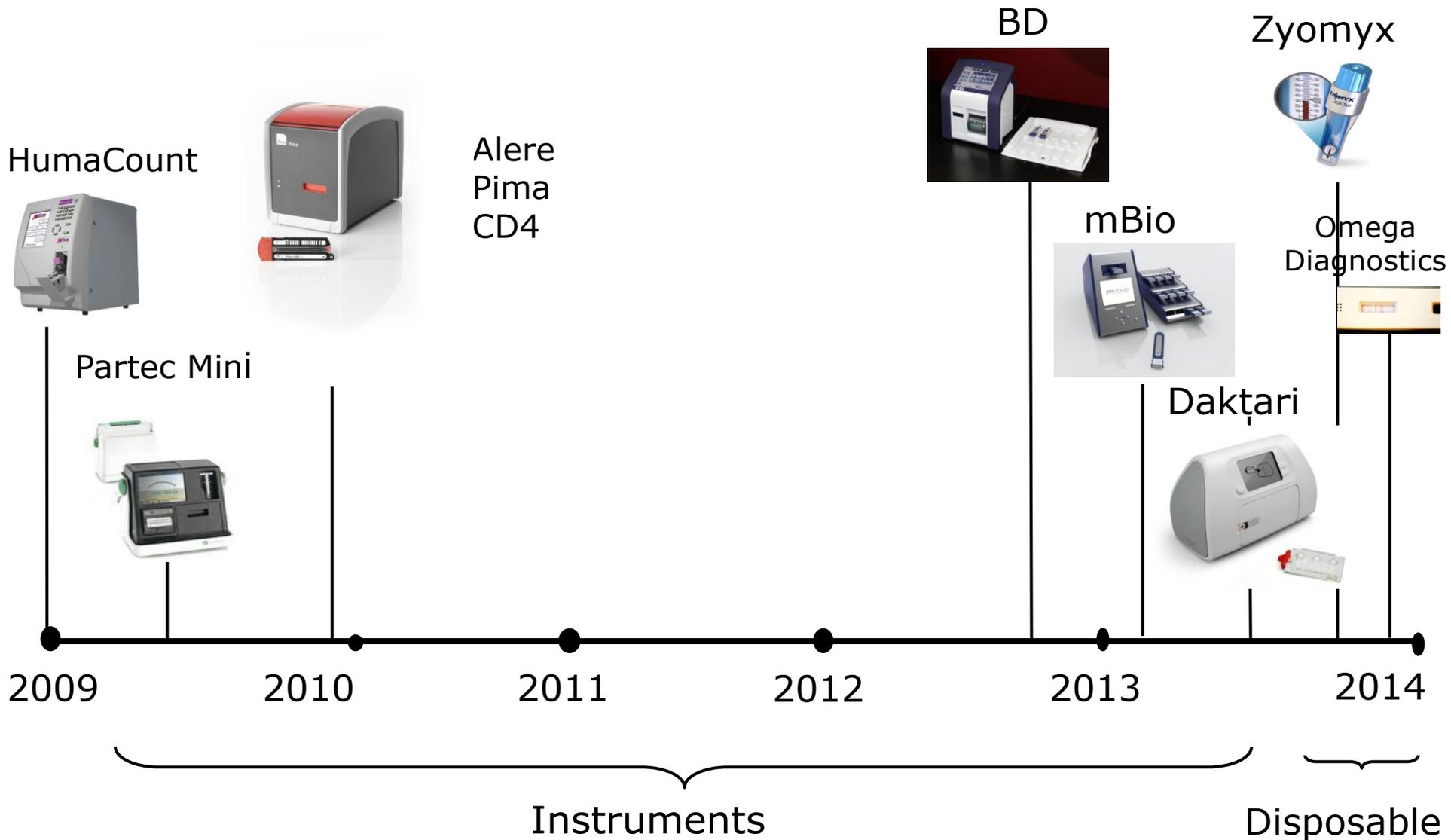
16 μ L fingerstick
blood

\$6.00 - \$12.00

Maximum of ~20
samples per day;
TAT 18 – 20 minutes
per test

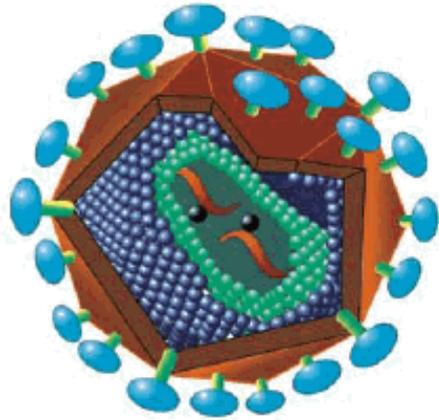
\$6,500 to \$12,000

CD4 Product Pipeline



*Estimated - timeline and sequence may change

Quantification ARN VIH-1



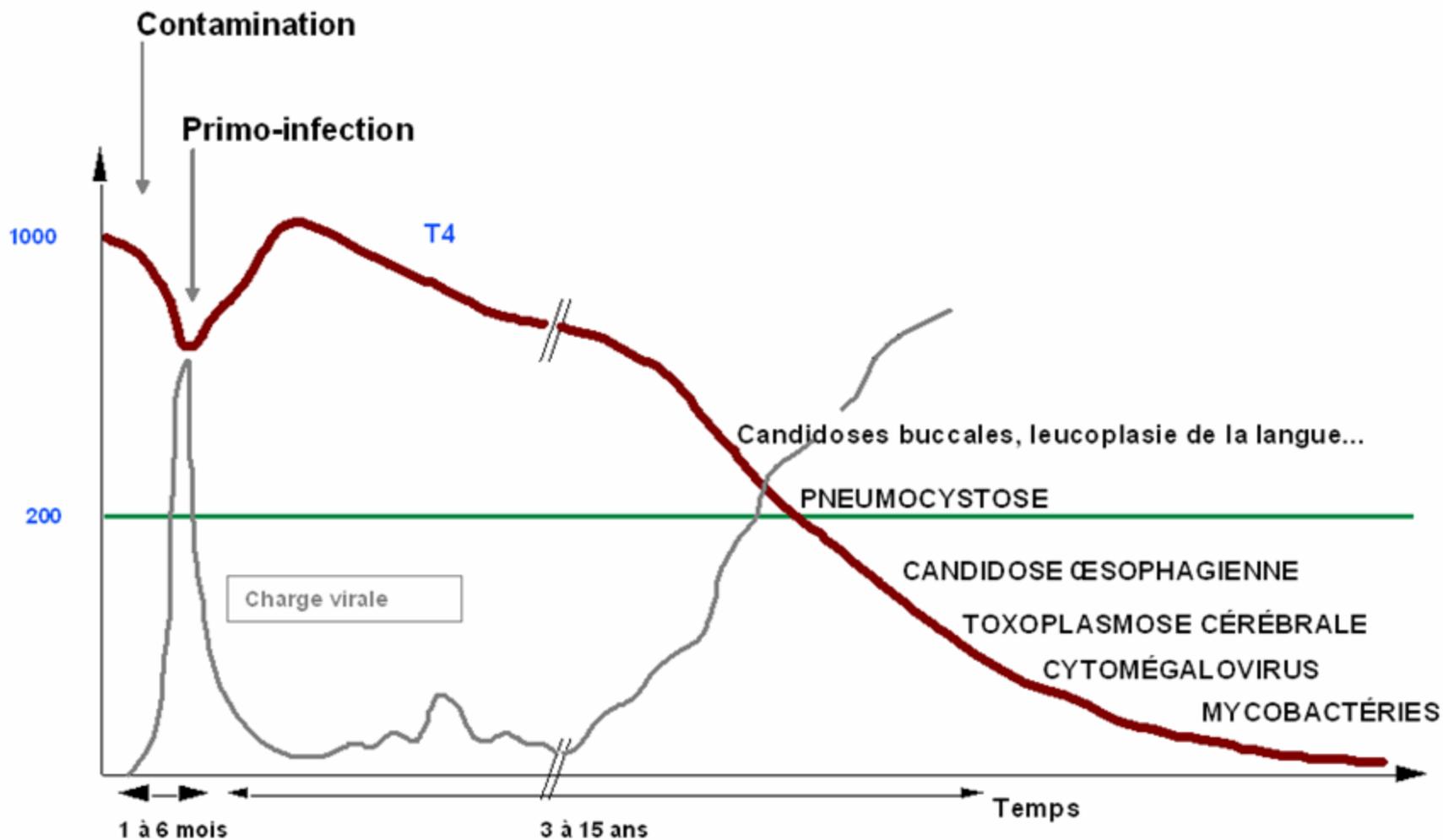
Charge virale
ARN VIH-1



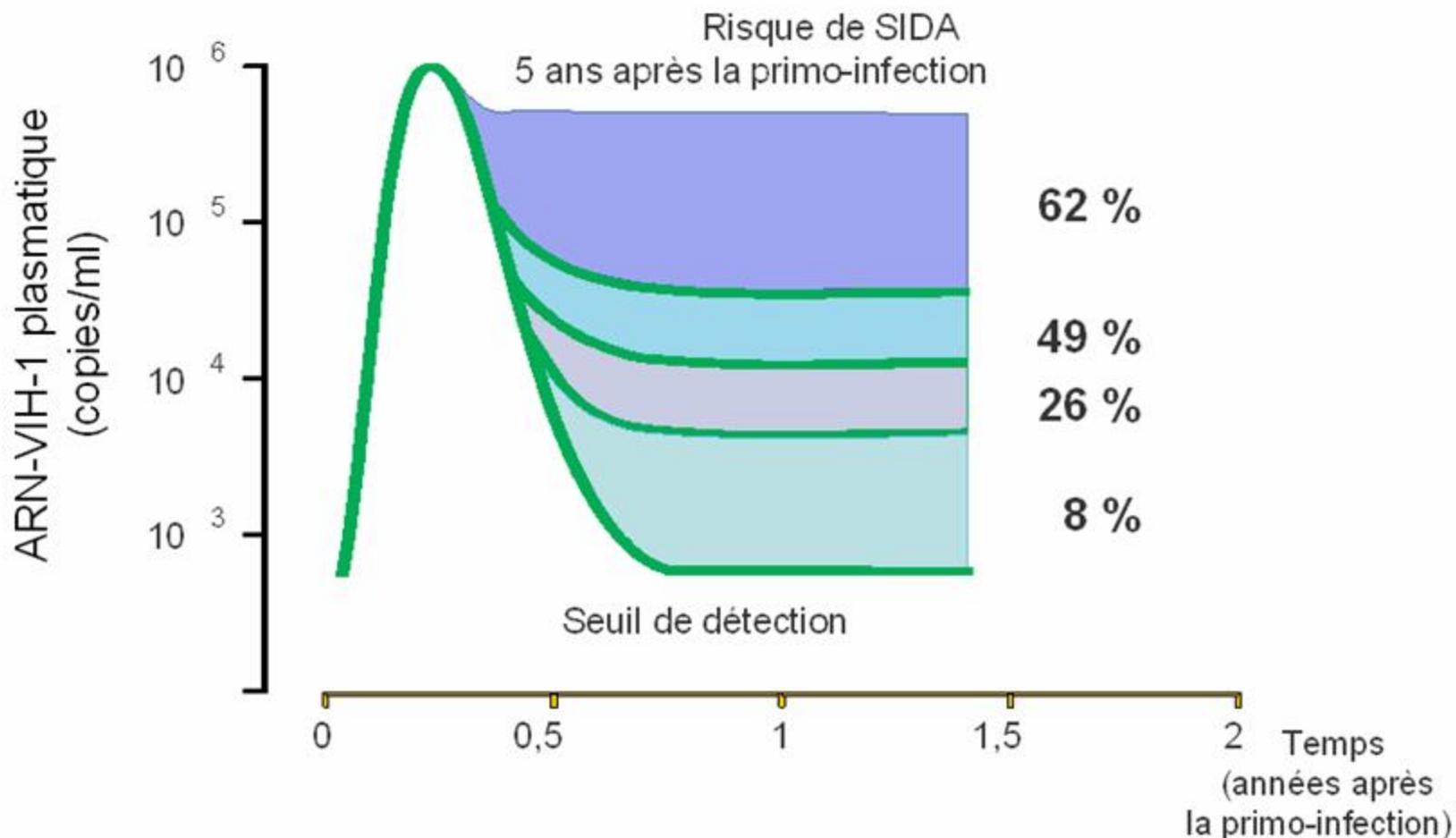
Plasma EDTA
(LCR)

Suivi biologique de l'infection à VIH-1

Évolution naturelle



Valeur prédictive du niveau de réplication virale



Mellors JW. Science. 1996, 272 : 1167-69

Girard PM, Katlama C, Pialoux G. : Doin 1998, p. 324

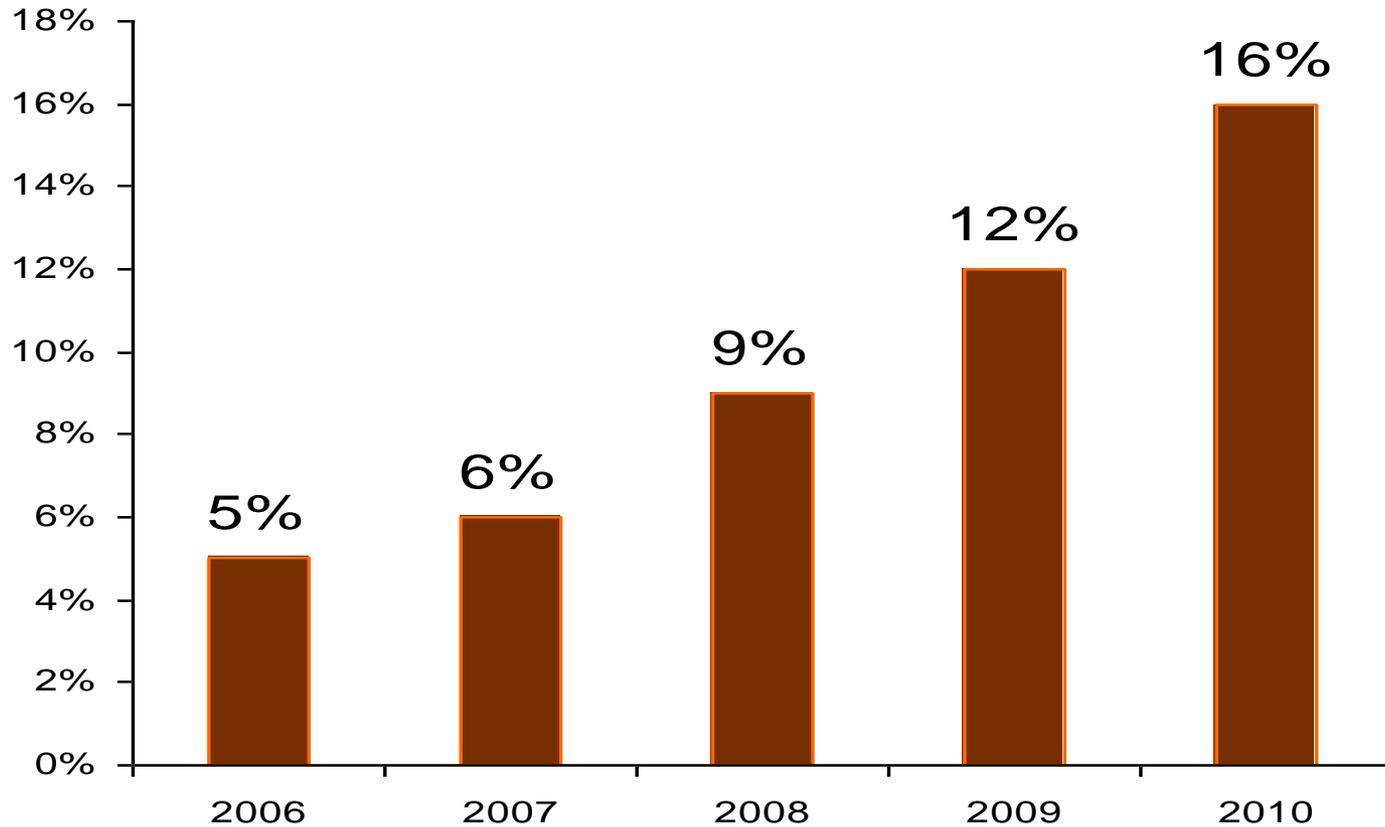
Quantification du VIH

Pourquoi avons-nous besoin de plus de charge virale dans les pays émergents ?

Couverture ARV dans les pays à faibles ressources, décembre 2008

Geographical region	Estimated number of people receiving ARV therapy	Estimated number of people needing ARV therapy	Antiretroviral therapy coverage
Sub-Saharan Africa	2 925 000	6 700 000	44%
Latin America and the Caribbean	445 000	820 000	54%
East, South and South-East Asia	565 000	1 500 000	37%
Europe and Central Asia	85 000	370 000	23%
North Africa and the Middle East	10 000	68 000	14%
Total	4 030 000 [3.7–4.4 million]	9 500 000 [8.6–10 million]	42% [40–47%]

Pourcentage cumulé de patients débutant un traitement de 2nd ligne = échec



PARCE QUE.....

Les critères cliniques et immunologiques d'échec thérapeutique de l'OMS ne sont pas bons, résultant en switch trop précoces ou trop tardifs de la première ligne vers la seconde ligne. AIDS 2009; 23:697-700:

- Dans une étude récente, menée en South Africa, **la sensibilité des critères immunologiques et cliniques pour détecter un échec virologique** était de **21% et 15%**, **la spécificité de 95% et 88%**. Mee P. AIDS 2008; 22:1971-1977.
- **Selon les études, entre 30% et 50% des patients en échec immunologique ont une CV indétectable et sont switchés inutilement, TROP TOT.** Van oosterhout JJ. Trop Med Int health 2009)(Hosseinipour MC, Curr HIV/AIDS Rep, May 2010
- Inversement, **20-30% des patients sans critères** d'échec clinique ou immunologique sont en échec virologique et **seront switchés TROP TARD**, alors que les résistances se seront accumulées et rendront plus incertaine l'efficacité d'une seconde ligne.
- Les **switch tardifs augmentent la mortalité** et la morbidité (MSF cohort, Pujades, CROI 2010)
- La mesure de **la CV augmente la survie** et, dans la plupart des pays, **est coût efficace** (kimmel, JAIDS, 2010;54:258)

Nous prémunir de cela

1 exemple: 11 machines à CV au Cameroun!!!! mais

Site	Type de machine à CV	Commentaires
Hôpital laquintinie de Douala	ABBOT m2000RT0	Non fonctionnel car pas de réactif
Hôpital Régional de LIMBE	MASTER CYCLEUR EPPENDORF	PCR des infections opportunistes, peut évoluer vers CV classiques de suivi des PVVIH, en cours d'installation.
Hôpital Général de Douala	CA ROCHE	En installation des accessoires depuis...1an et 1/2
Hôpital Régional De Garoua	bDNA ROCHE	Inutilisé faute de demande
Centre Hospitalier ESSOS Yaoundé	ABBOT m2000RT0	livrée fin avril 2010, non installée
Hôpital Régional de Bertoua	CA ROCHE	Neuf, jamais mis en service depuis
Hôpital Régional de Bafoussam	CA ROCHE	1an

AUCUNE DES 7 MACHINES DISPONIBLES N'EST FONCTIONNELLE
Mais 4 machines opérationnelles dans les labo de recherche!

Les Recommandations OMS 2010

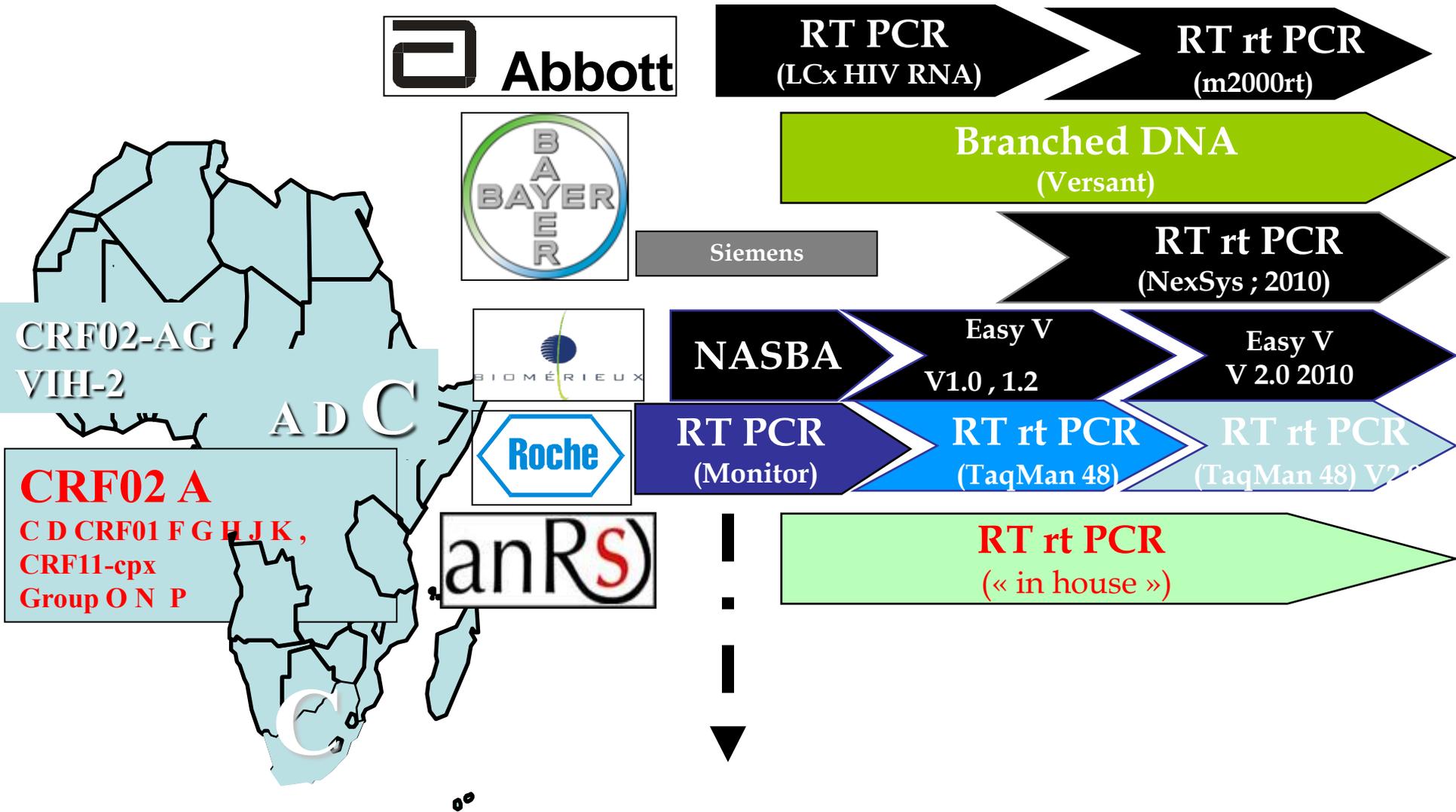
Phase of HIV management	Recommandé	souhaitable
Au diagnostic de HIV	CD4	HBsAg, ?HCV test
Pre ART	CD4 (6 monthly)	Charge Virale
Au démarrage des ARV	CD4	Hb pour AZT Tests Rénaux pour TDF
Sous ART	CD4	Charge Virale
Lors d'un échec clinique	CD4	Charge Virale
Lors d'un échec immuno	Charge Virale	

Seuil de CV > 5000 copies /ml pour définir un échec virologique

Selon le niveau de pyramide sanitaire

tests de laboratoire		Soins de santé Primaire	District	Niveau Régional ou central
Dépistage HIV		✓	✓	✓
Test de confirmation HIV		-	+	✓
Hémoglobine		+	✓	✓
NFS		-	✓	✓
CD4 (nombre et %)		-	✓	✓
Test de grossesse		+	✓	✓
ALAT		-	✓	✓
Biochimie		-	-	✓
Tests de diagnostic pour IO et co infections	Ziehl pour TB, frottis paludisme	+	✓	✓
	Examen du LCR	-	✓	✓
	Diagnostic HBV, HCV, cultures, PCP, autres IO, IST	-	+	✓
Charge Virale		?	?	✓

La charge virale : une référence



• PCR en temps réel commerciales

Seuil de détection 10-40copies/ml

- - développées par plusieurs fabricants (Roche, Abbott, Siemens....)
- - ont l'avantage d'être standardisées et disponibles en trousse
- - permettront une sécurisation de l'approvisionnement en réactifs et une maintenance assurée en fonction des différentes firmes
- - plusieurs auteurs ont rapporté une moindre sensibilité des trousse:
- Cobas Taqman HIV-1 (Roche) pour quantifier les VIH-1 de soustypes non-B ;
- - la trousse Abbott Real Time HIV-1 Quantitative Assay semble appropriée pour la quantification des VIH-1 de sous-types non-B et B, ainsi que pour les virus de groupe O.

Éléments d'appréciation pour le choix d'un système :

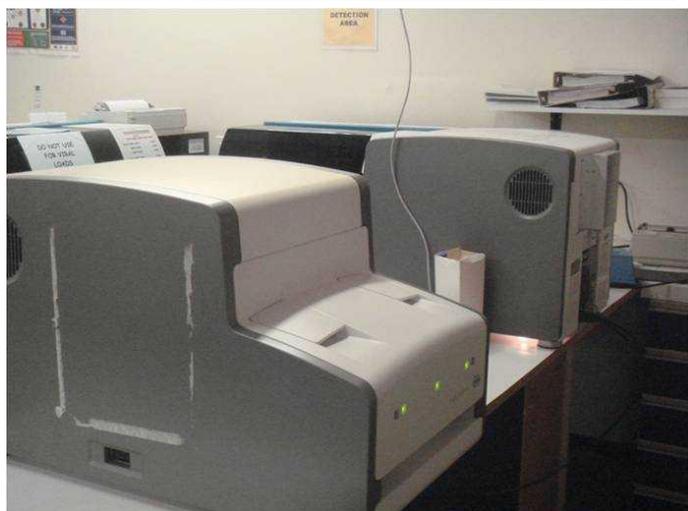
- Performances virologiques du test :
 - - Capacité à détecter la majorité des sous-types circulants dans une région donnée ; Sensibilité ; spécificité ; « dynamic range » ;
 - - Reproductibilité +++ (ADNbranché > RT-PCR # NASBA).
- Contrôles de qualité interne et externe ; contrôle des contaminations.
- Nécessité de moyens de laboratoire :
 - - PCR/RT-PCR : séparation physique des pièces :
 - - ADN branché : laboratoire « P1 » suffisant.
- Capacité de stockage des réactifs (à – 80 ° C pour l'ADN branché par exemple).
- Nécessité d'avoir du personnel formé.
- Coût et maintenance de l'appareillage.
- Coût et chaîne d'approvisionnement et d'envoi des réactifs.
- Volumes d'échantillon nécessaire (enfants).
- Possibilité de faire évoluer la technologie (automatisation ou nouveau système).
- Politique commerciale et de formation de la firme.

Plateformes commerciales de mesure de la Charge virale disponibles sur le marché

Roche > 56%



Abbott = 5%



BioMerieux 18% **Siemens 21%**



QIASymphony RGQ –QIAGEN



Comparison of the QIAGEN *artus* HIV-1 QS-RGQ test with the Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 test v2.0



Volume55, Issue1 September 2012, Pages 62–66

[G.R. Wall](#),

[D. Perinpanathan](#),

[D.A. Clark](#),

**Department of Virology, Barts Health NHS Trust,
London E1 2ES, UK**

- **Abstract**
- Background

Regular HIV-1 viral load monitoring is standard of care in the developed world for patients infected with HIV-1.

- Objectives

Here we report a comparative evaluation of the established Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 v2.0 test (Roche Diagnostics Ltd, Burgess Hill, UK) and the new *artus* HIV-1 QS-RGQ test (QIAGEN Ltd, Crawley, UK).

- Study design

169 clinical EDTA-plasma samples were tested, all of known HIV-1 subtype.

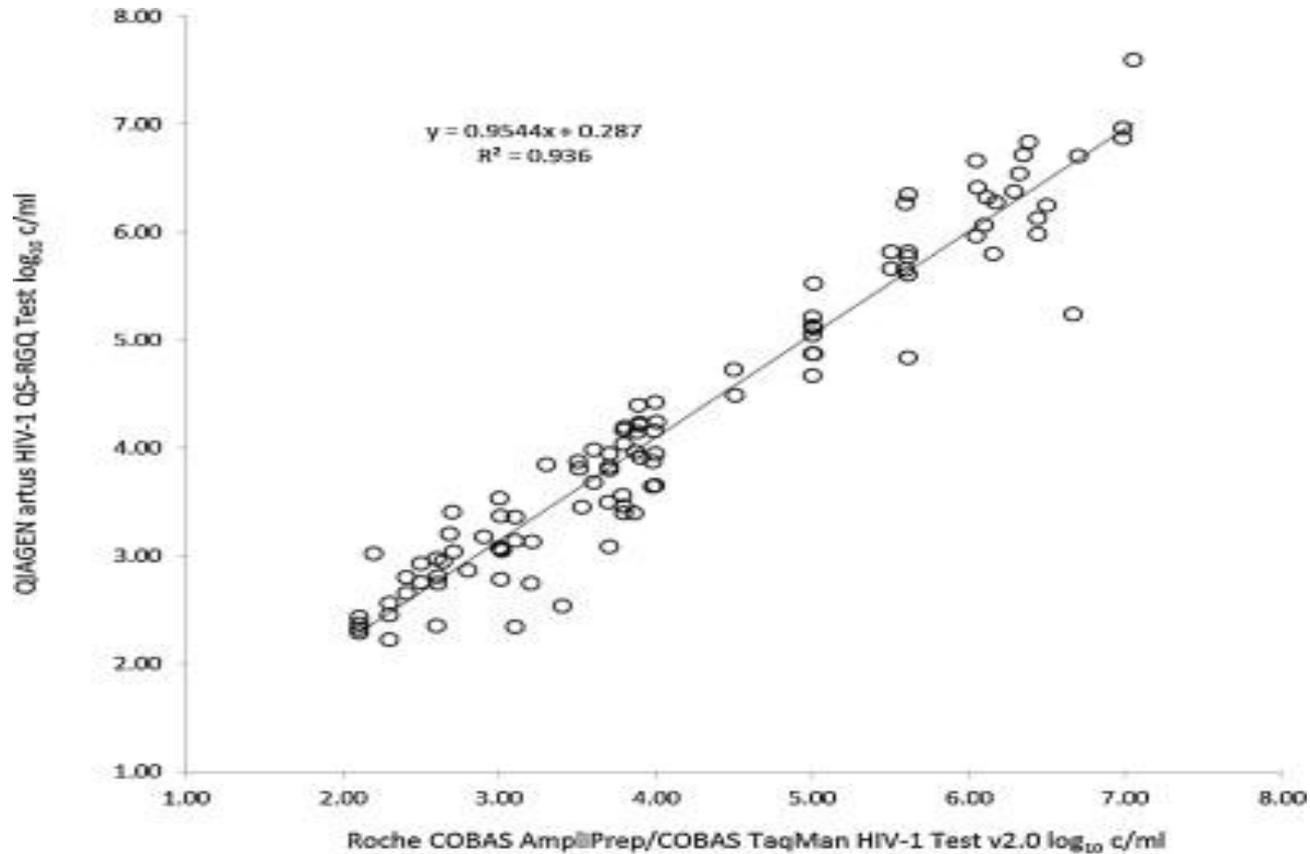
- Results

The mean overall log₁₀ c/ml difference was 0.10 (QIAGEN – Roche).

- Conclusion

- **The *artus* HIV-1 QS-RGQ test compared well with the Roche TaqMan HIV-1 v2.0 test, and Bland–Altman.**

Correlation of the Roche HIV-1 test v2.0 and the *artus* HIV-1 QS-RGQ test (103 quantitative results).



Prix de revient :

- Le prix du point demandé par les fabricants de la plupart des techniques commerciales disponibles reste encore élevé, aux alentours de 25 à 45 euros selon la quantité annuelle de tests réalisés.
- Des négociations au cas par cas permettent de diminuer ces coûts, et peuvent permettre en particulier d'obtenir une mise à disposition de l'appareil de mesure dédié à une trousse commerciale.
- Pour améliorer la négociation sur le prix des réactifs et l'approvisionnement dans une perspective de passage à l'échelle, il est recommandé
- de ne pas installer plusieurs systèmes différents de mesure de l'ARN plasmidique dans un pays donné.
- Prendre garde aussi à la mise en place d'un système dont la maintenance sera peu ou mal assurée sur site, ou qui ne tiendrait pas compte de l'évolution technologique des trousse chez le fabricant.

Alternative: Techniques “maison”

- Ce sont des systèmes **ouverts**
- Les Réactifs peuvent être utilisés sur différents types de machines
- Basées sur une technologie en temps réel
- Adaptables à d'autres paramètres microbiologiques (HBV, HCV, H1N1, TB)
- Moins chers (7-12 €)
- Plutôt réservés aux centres de référence (système ouvert)
- Nécessitent une préqualification pour être éligibles auprès des bailleurs
- Assurance qualité et maintenance essentiels (ex PASTEUR)
- **Comme les tests BIOCENTRIC (ANRS, PASTEUR)**
 - **Kit 'Generic HIV Charge Virale', Société BIOCENTRIC (Bandol, France). Ref. TR001-250 (220 tests)**
biocentric@biocentric.com
Prix TTC : ~7€/test

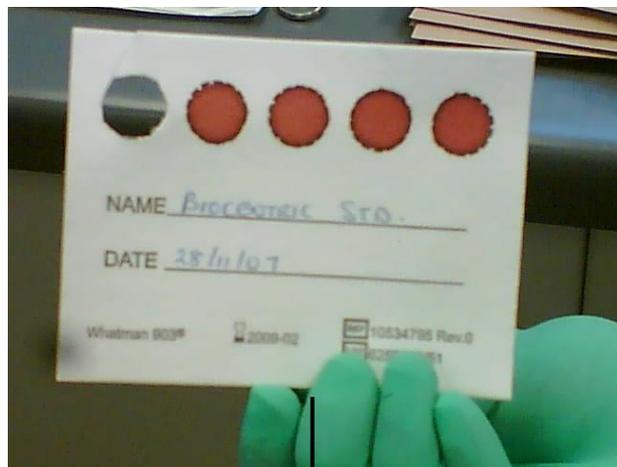
-Permettent la détection de la plupart des sous-types du VIH-1 du groupe M, et constituent désormais une alternative intéressante.

-Nécessitent du personnel entraîné et une supervision importante au début de la mise en place

-Reviennent moins chères, mais la maintenance des appareils n'est souvent pas assurée (absence de réseau commercial) ;

- leur utilisation pour un passage à l'échelle est en cours d'évaluation.

la charge virale HIV est faisable sur papier buvard (DBS)



DBS 50 μ l

ARN **Extraction MiniMAG[®]**

Amplification/Quantification
kit **Biocentric[®]/MiniOpticon[®]**



Exemple avec le kit **Biocentric**
Limite: extraction longue et sensibilité inférieure (seuil?)

Pourquoi c'est important

- La mesure de la CV permet de détecter tôt la mauvaise observance et les échecs thérapeutiques, donc de préserver les options thérapeutiques ultérieures
- Le nombre de patients en échec de traitement est grossièrement surestimé en absence de CV
- L'accès à la CV améliore la rétention et la survie
- Des technologies alternatives de mesure de la CV sont nécessaires pour les Pays émergents : adaptées à la décentralisation, faciles d'utilisation, moins coûteuses, robustes, modulaires

New Options for Viral Load Monitoring and EID are also on the Horizon

A number of new Viral Load/EID POC diagnostics are in development.

These will have lower instrument and per-test costs, but will also have lower throughput than lab-based systems.

One of these, the viral load assay for the Liat platform, may still launch in late 2012.

Additional platforms will follow over the next few years.



STEP 1.
Add sample



STEP 2.
Scan barcode

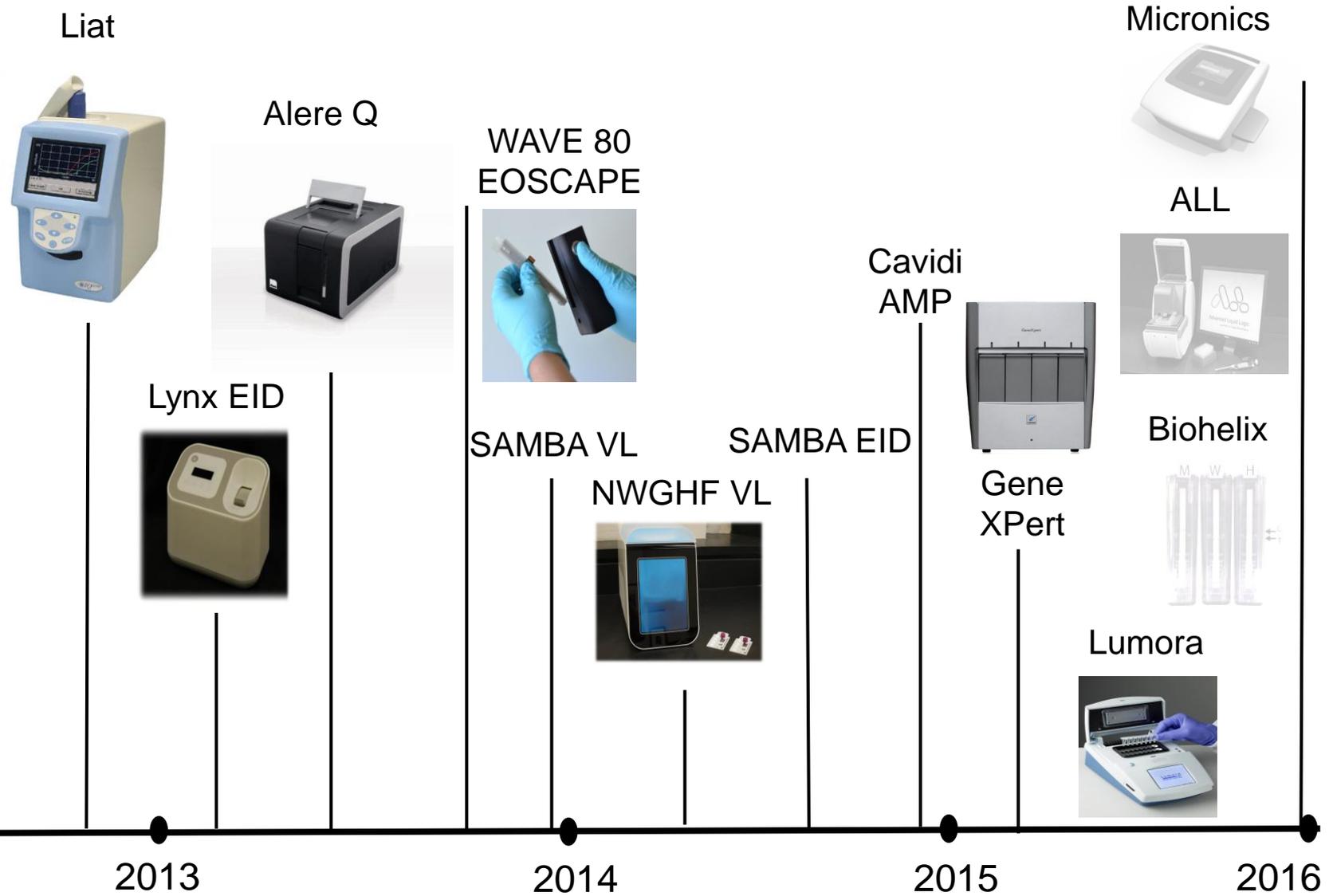


STEP 3.
Insert tube



Done.
Results in ~30 minutes

Technology Pipeline – Viral Load



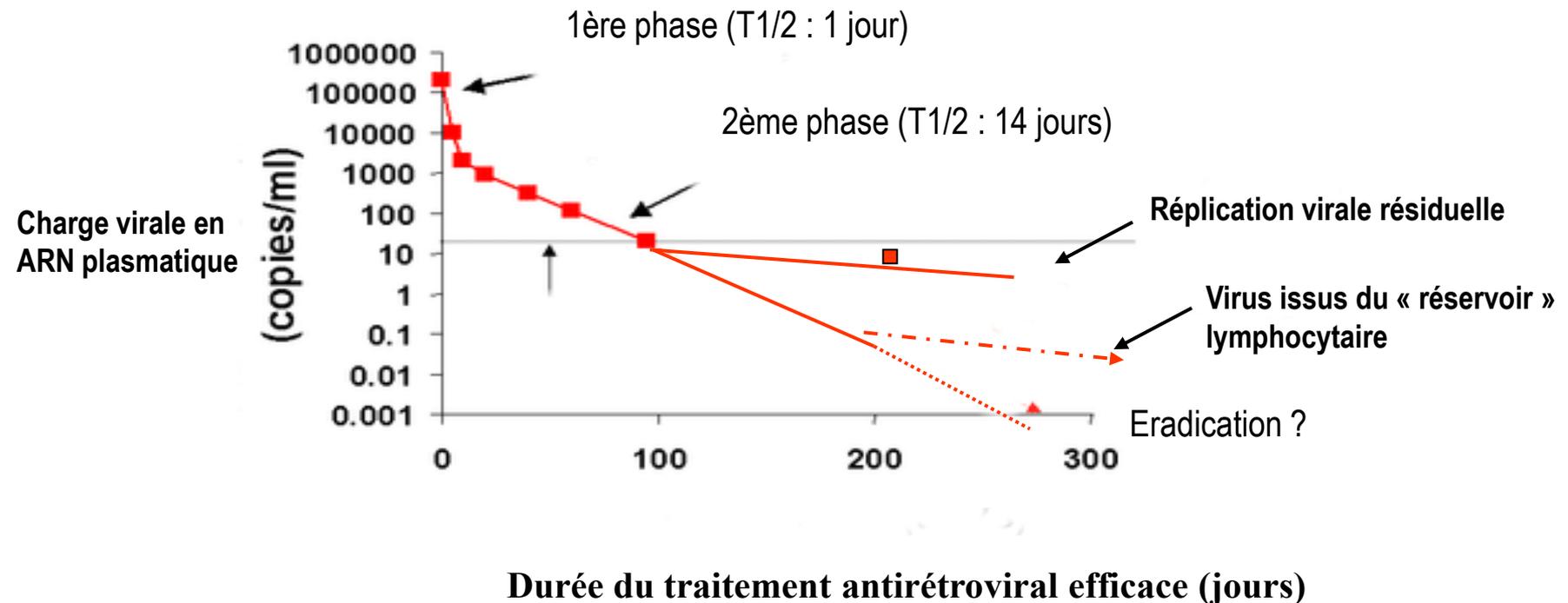
*Estimated - timeline and sequence may change

Monitoring HIV Patients on ART – Device-based Viral Load

Company	IQuum	Alere	WAVE80	DRW	NWGHF
Platform Name	Liat™ Analyzer	Alere Q	WAVE80 EOSCAPE-HIV™ System	SAMBA Analyzer	Lynx
Type	Bench top portable; ~8.3 lbs	Bench top portable; <11 lbs	Bench top portable analyzer with separate processing units	TBD	Bench top portable processor unit with cartridge
Output	Quantitative or qualitative VL	Quantitative HIV-1 RNA	HIV-1 RNA	Semi-quantitative VL or Qualitative for EID	P24 antigen assay for EID
Specimen Type	200 µL plasma or 10 - 50 µL fingerstick blood	25 µL fingerstick or 25 µL heel stick	100 µL fingerstick blood	200 µL plasma (VL) or 100 µL whole blood (EID)	~80 µL blood from infant's heel
Cost/test	TBD	TBD	<\$20 per test	TBD	~\$7.00 to \$15.00 per test
Number of	~8 - 15	Max of ~10	~50 samples per	4 samples per	~16 samples

RESISTANCE AUX ANTIRETROVIRAUX

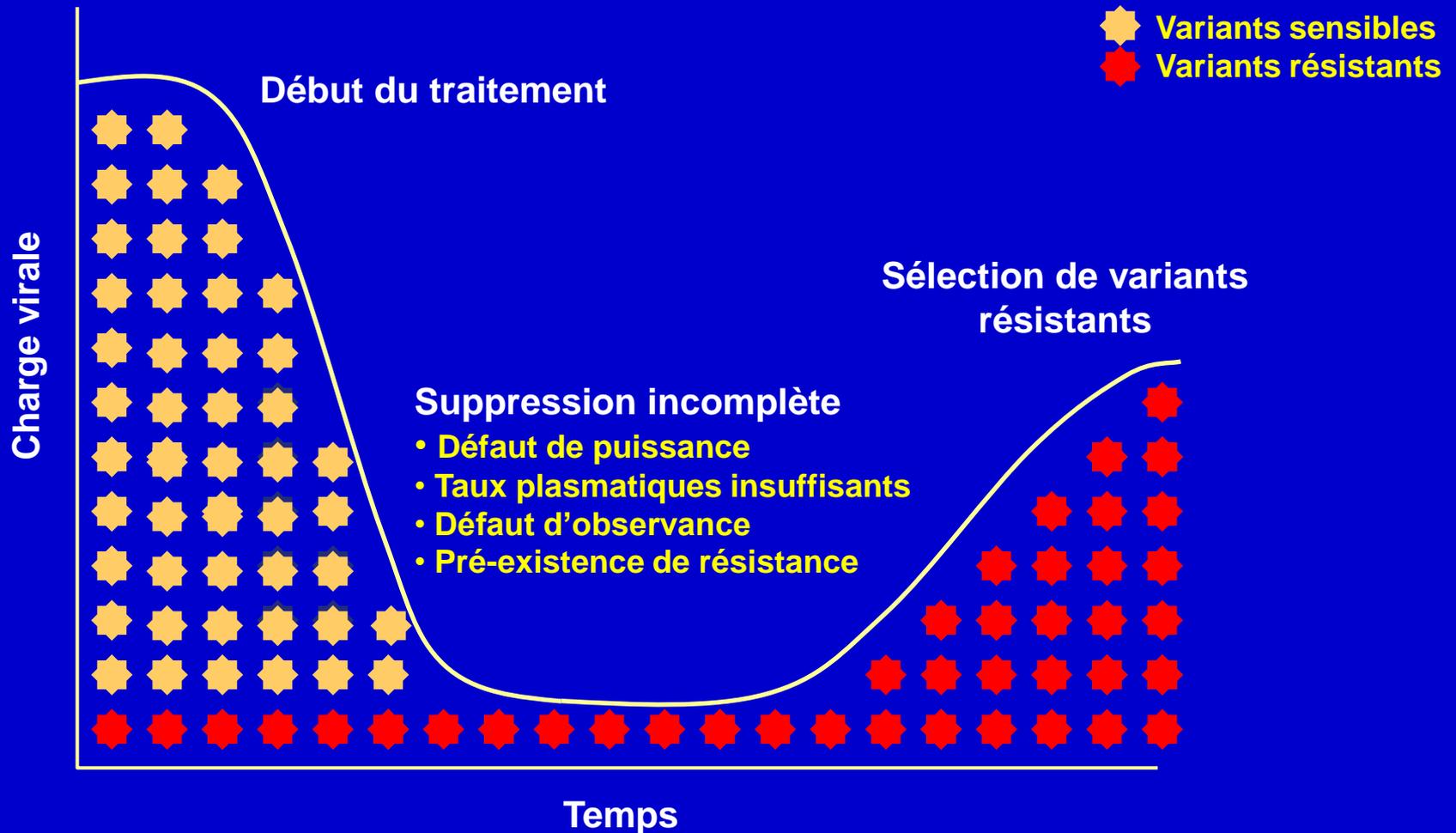
Modélisation de la cinétique de décroissance de la charge virale plasmatique chez un patient qui débute un traitement antirétroviral efficace



Pourquoi y a t'il sélection de virus résistants ?

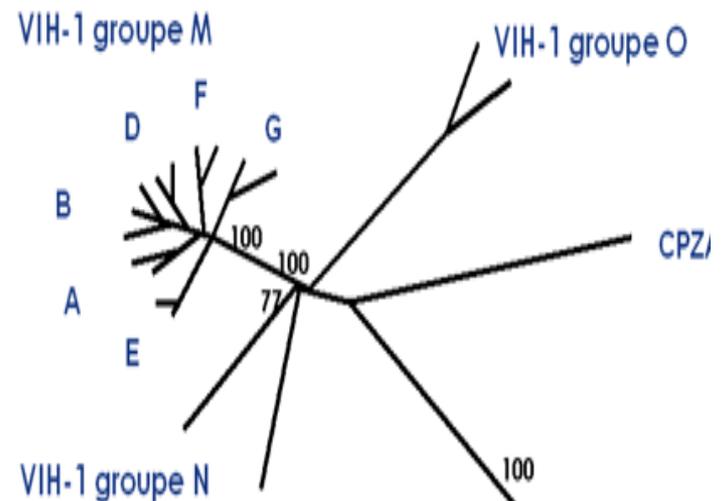
- ✓ Taux d'erreur de la TI: 1/10.000 nucléotides
- ✓ Production virale: 10^9 - 10^{10} particules par jour
- ✓ Toutes les mutations pré-existent avant traitement
- ✓ Taux de recombinaison: 5 à 10 évènements par cycle
- ✓ Evolution constante de la quasispèce
- ✓ Demie-vie d'un virus plasmatique = 0.3 jours
- ✓ Demie-vie des cellules infectées = 2.2 jours

Pression de sélection antirétrovirale



Facteurs influençant le profil de résistance

- Barrière génétique de l'antirétroviral
- Concentration de l'antirétroviral (plasma, compartiment)
- Combinaison antirétrovirale (diphénothésine + zalcitabine)
- Niveau de charge virale
- Sous type viral VIH-1



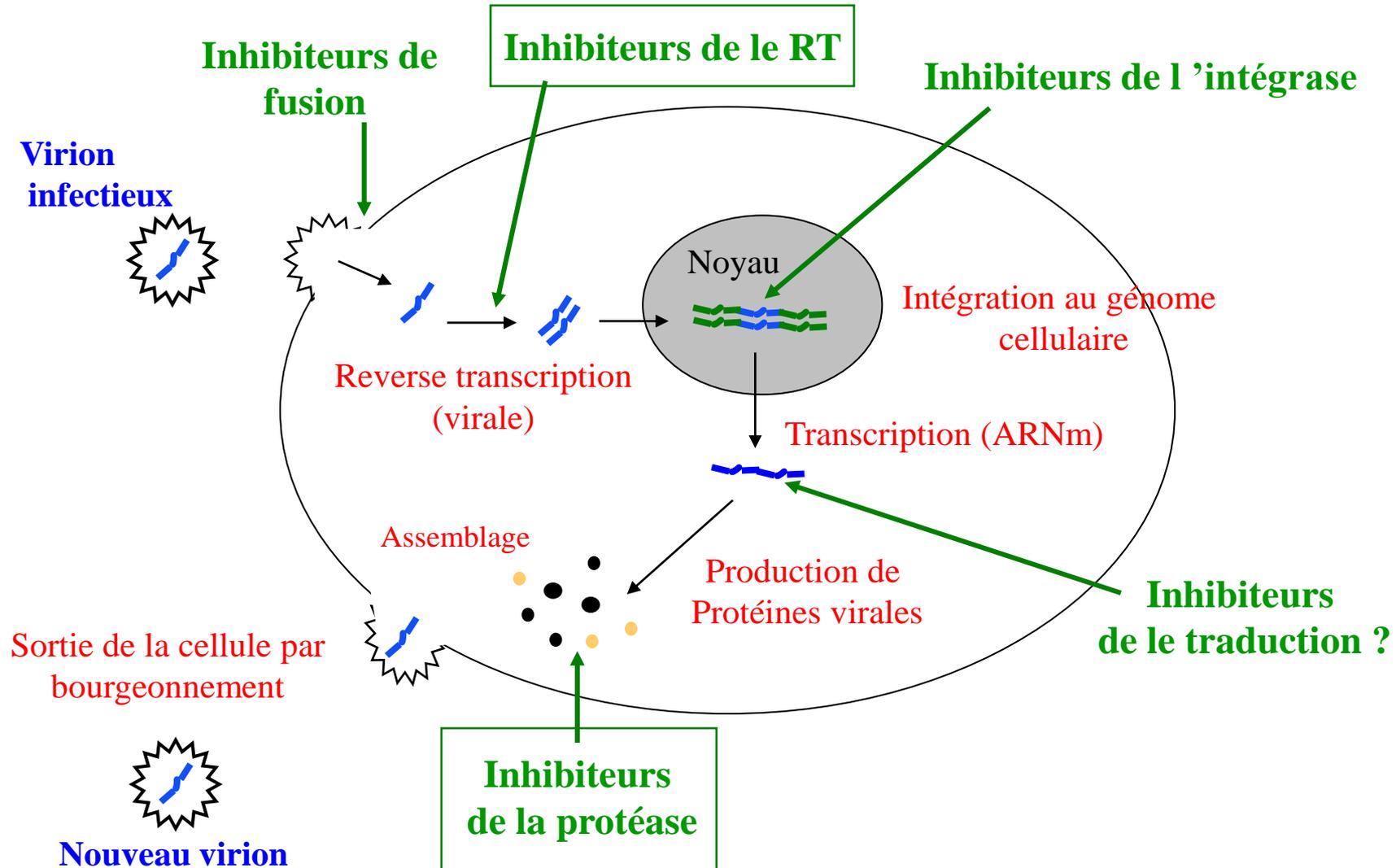
INDICATIONS DES TESTS DE RESISTANCE (Rapport Yéni 2010)

- **RECOMMANDE**
 - **Primo-infection et infection récente <6 mois**
 - **avant initiation du traitement:**
 - - **Dès le diagnostic**
 - - **prélèvement disponible le plus ancien**
 - - **ou avant de démarrer un traitement**
 - **Tous les échecs thérapeutiques (réplication virale sous traitement)**
 - **Grossesse**
 - **Nouveau-né**
 - **Enfant (diagnostic et échec)**
- **Réalisé au cas par cas**
 - **AES Accident d'exposition au sang/sexue**

Réalisation d 'un génotype de résistance

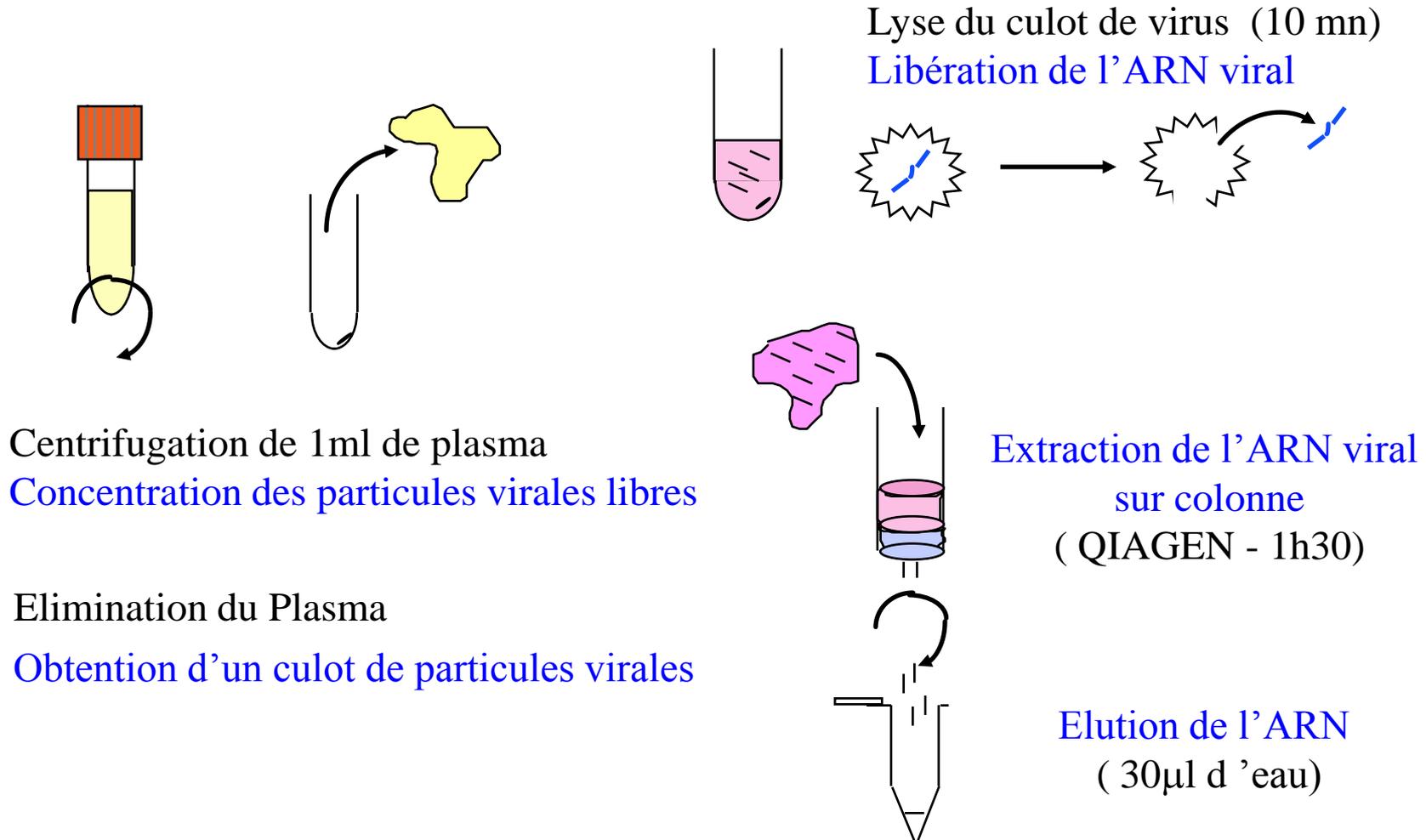
**Application au
Virus de l 'Immunodéficience Humaine (VIH)**

Réplication du VIH et cibles thérapeutiques



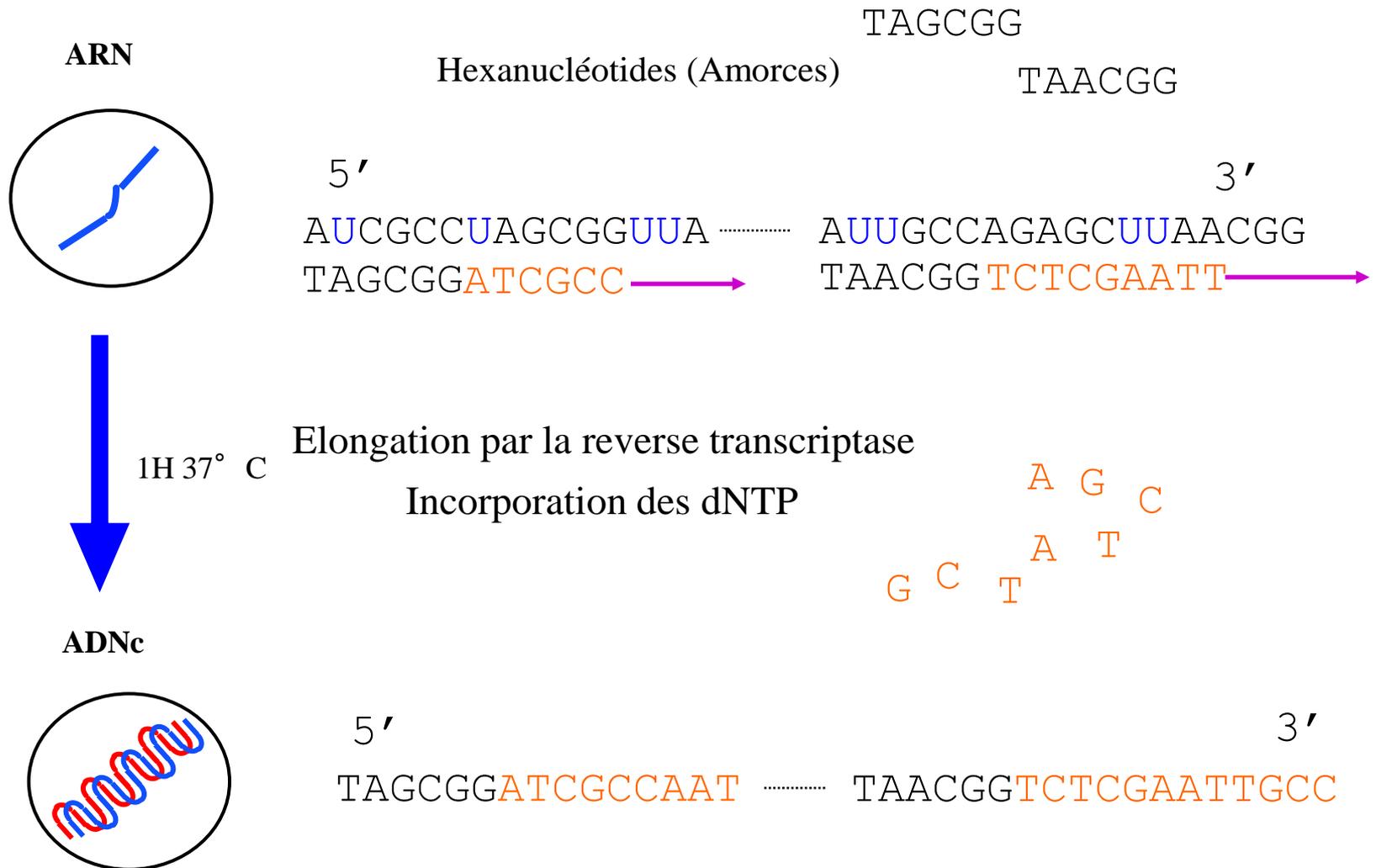
Réalisation d'un génotype à partir du plasma

1- Extraction de l'ARN viral



Réalisation d'un génotype à partir du plasma

2- Reverse Transcription



Réalisation d'un génotype à partir du plasma

3- Réaction de séquence

CTCTTTGGCAACGACCCCTCGTACAATAAAGATAGG
GAGAAACCGTTG



CTCTTTGGCAACGACCCCTCGTACAATAAAGATAGG
GAGAAACCGTTGCTGGGGAGCATGTTA



CTCTTTGGCAACGACCCCTCGTACAATAAAGATAGG
GAGAAACCGTTGCTGGGGGA



CTCTTTGGCAACGACCCCTCGTACAATAAAGATAGG
GAGAAACCGTTGCTGGGGAGCATGTTATTTCT



Les Didéoxynuléotides d'arrêts étant à très faible concentration, on obtient statistiquement tous les fragments avortés possibles de la base 1 à la base finale du produit à séquencer...

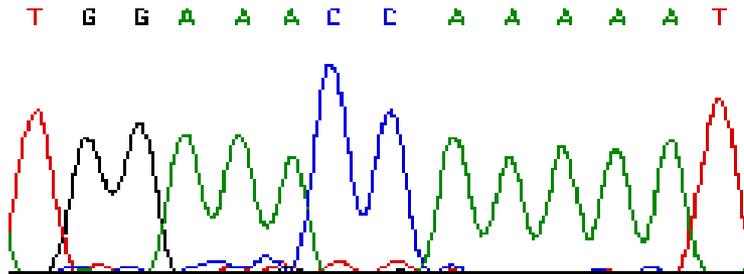


Réalisation d'un génotype à partir du plasma

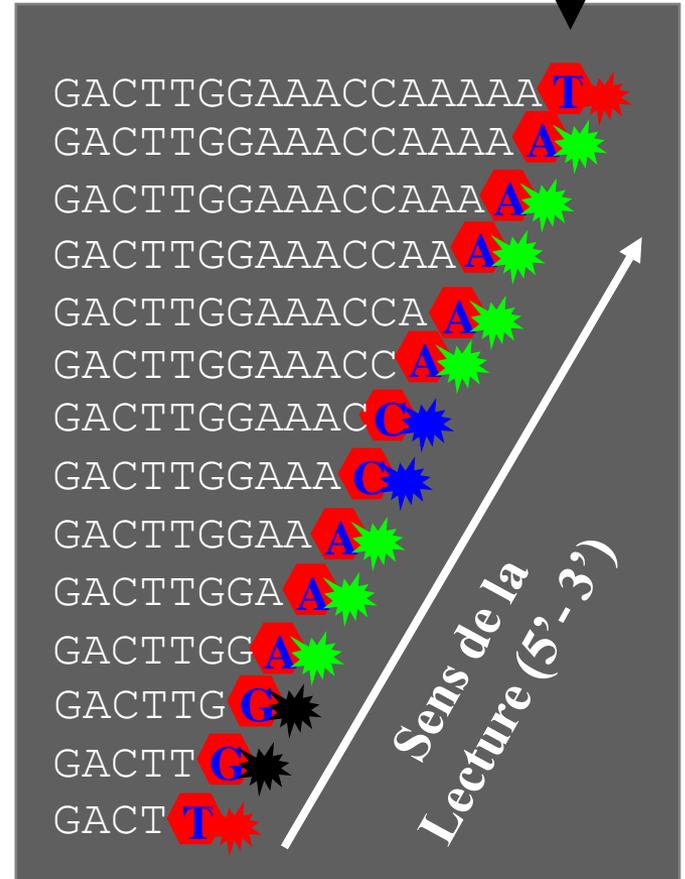
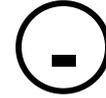
4- Gel de séquence

Dépot sur gel de polyacrylamide

Chromatogramme

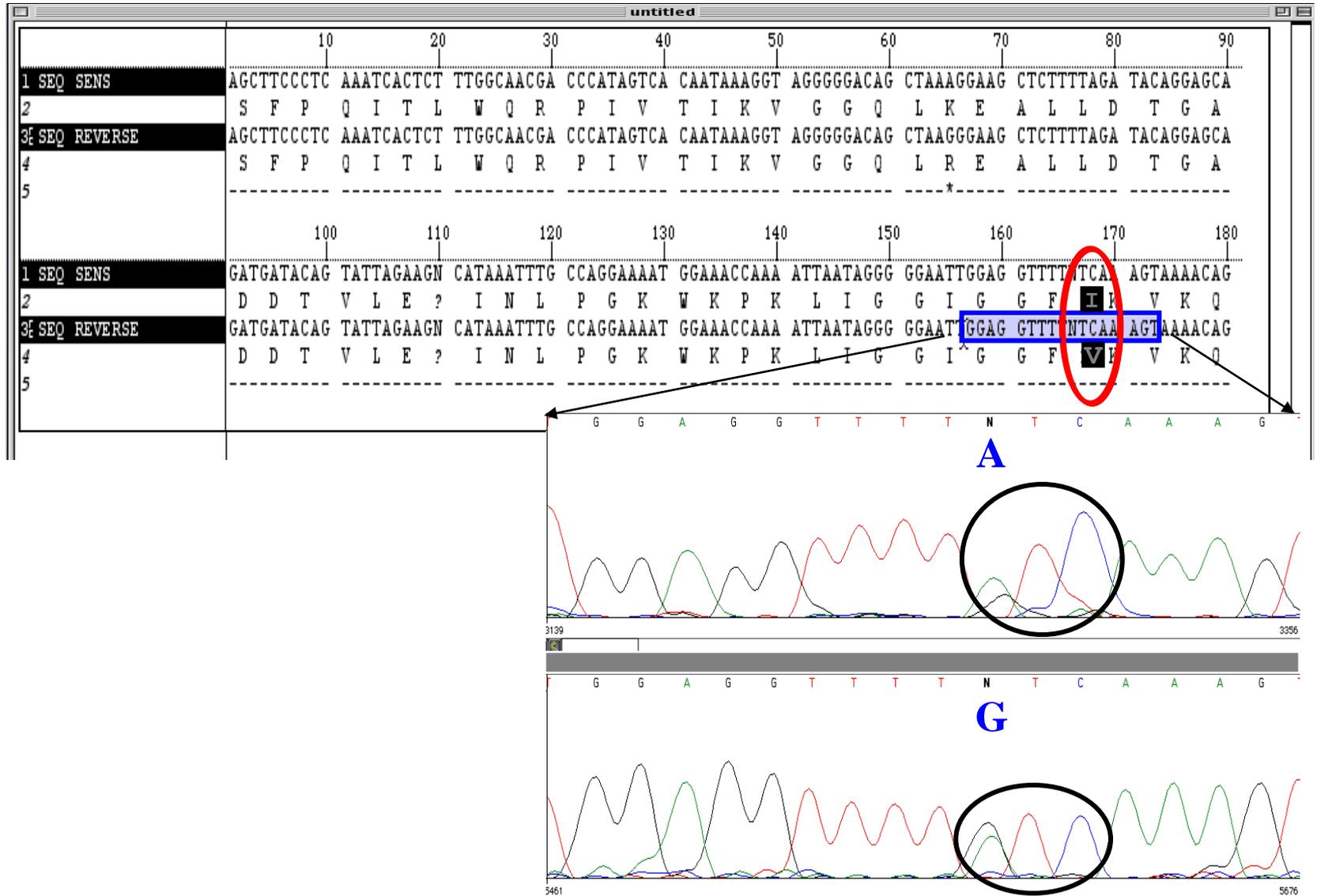


Lecture dynamique par un laser
Intégration informatique



Réalisation d'un génotype à partir du plasma

5- Analyse de séquence



Réalisation d'un génotype à partir du plasma

6- Analyse de séquence

SEQ REFERENCE	10	20	30	40	50	60	70				
★	CCTCAGATCA	CTCTTTGGCA	ACGACCCCTC	GTCACAATAA	AGATAGGGGG	GCAACTAAAG	GAAGCTCTAT				
	P Q I T L W Q	R P L V T I	K I G G	Q L K E A L							
SEQ PATIENT	★	CCTCAGATCA	CTCTTTGGCA	ACGACCCATC	GTCACAATAA	AGATAGGGGG	GCAACTAAAG	GAAGCTCTAT			
	P Q I T L W Q	R P I V T I	K I G G	Q L K E A L							
SEQ REFERENCE	24	80	30	32	33	36	110	120	130	46	47
	TAGATACAGG	AGCAGATGAT	ACAGTATTAG	AAGAAATGAG	TTTGCCAGGA	AGATGGAAAC	CAAAAATGAT				
	L D T G A D D	T V L E E M S	L P G R W K	P K M I							
SEQ PATIENT	TAGATACAGG	AGCAGATGAT	ACAGTAAATAG	AAGAAATGGA	TTTGCCAGGA	AGATGGAAAC	CAAAAATAAT				
	L D T G A D D	T V I E E M D	L P G R W K	P K I I							
SEQ REFERENCE	48	50	160	54	170	180	63	90	200	210	
	AGGGGGAATT	GGAGGTTTTA	TCAAAGTAAG	ACAGTATGAT	CAGATACTCA	TAGAAATCTG	TGGACATAAA				
	G G I G G F	I K V R	Q Y D	Q I L	I E I C	G H K					
SEQ PATIENT	AGGGGGAATT	GGAGGTTTTA	TCAAAGTAAG	ACAGTATGAT	CAGATACCCA	TAGAAATCTG	TGGACATAAA				
	G G I G G F	I K V R	Q Y D	Q I P	I E I C	G H K					
SEQ REFERENCE	71	73	227	240	82	250	84	260	88	90	280
	GCTATAGGTA	CAGTGTTAGT	AGGACCTACA	CCTGTAAACA	TAATGGGAAG	AAATCTGTTG	ACTCAGCTTG				
	A I G T V L V	G P T P V N	I I G R	N L L	T Q L						
SEQ PATIENT	ACTATAAGTA	CAGTATTAGT	AGGACCTACA	CCGTGTAACA	TAATTGGAAG	AAACCTGATG	ACTCAGCTTG				
	T I S T V L V	G P T P V N	I I G R	N L M	T Q L						
SEQ REFERENCE	290	300	310	320	330	340	350				
	GTTGCACTTT	AAATTTTCCC									
	G C T L N F P										
SEQ PATIENT	GTTGCACTTT	AAATTTTCCC									
	G C T L N F P										

Positions mutées :

L10I-L33I-M46I-L63P-A71T-G73S-L90M

Génotype de résistance -VIH1

Analyse des mutations de résistance
gènes RT, protéase, gp41, intégrase

- ◆ Liste International AIDS Society USA (www.iasusa.org)
 - Corrélation avec données phénotypiques
- ◆ Algorithmes d'interprétation
 - groupe résistance AC11 - ANRS (www.hivfrenchresistance.org)
 - » Corrélation avec réponse clinique
 - Stanford University (www.hivdb.stanford.edu)
 - » Pondération des mutations

Interprétation complexe

Prénom : GENARO

Date de naissance : 7/03/72

Plasma du : 18/09/01

Service demandeur : MALADIES INFECTIEUSES

Génotypage de l'isolat VIH-1

Génotypage de la souche majoritaire

8	Mutation majeure
3	Mutation mineure

Inhibiteurs de protéase

	IDV	SQV	NFV	APV	RTV	LPV	ATV
L10	I		3	3		3	
K20							
L24							
D30							
V32							
L33	F					3	
M36							
M46	L	8	3	3	8	3	
I47							
G48							
I50							
F53							
I54							
L63	P					3	
A71	V	3	3	3	3	3	
G73							
V77							
V82	A	8	3	3	3	8	3
I84	V	8	8	8	3	8	3
N88							
L90	M	3	8	8	3	3	3

Analogues nucléosidiques et nucléotidiques

	AZT	ddI	ddC	3TC	d4T	ABC	TDF
M41	L	3	3		3	3	3
A62							
K65							
D67	N	3	3		3	3	3
T69	N						
K70							
L74	V		8			3	
V75							
F77							
Y115							
F116							
Q151							
M184	V			8		3	
L210							
T215	Y	8	3		8	3	3
K219							

ddC : données insuffisantes pour établir des recommandations

Inhibiteurs non nucléosidiques

	EFV	NVP	DLV
A98			
L100			
K101	H		
K103	N	8	8
V106			
V108			
V179			
Y181	C	8	8
Y188			
G190	A	8	8
P225			
M230			
P236			

	IDV	SQV	NFV	APV	APV/RTV	RTV	LPV	ATV
Résistance	R	R	R	R		R	R	
Résistance possible								
Absence de résistance					b			b

	AZT	ddI	ddC	3TC	d4T	ABC	TDF
Résistance	R	R		R	R	R	R
Résistance possible							
Absence de résistance							

	EFV	NVP	DLV
Résistance	R	R	R
Résistance possible			
Absence de résistance			

Date :

Signature :

Prénom : GENARO

Date de naissance : 7/03/72

Service demandeur : MALADIES INFECTIEUSES

Plasma du : 30/01/04

Génotypage de l'isolat VIH-1

Génotypage de la souche majoritaire

8 Mutation majeure

3 Mutation mineure

Inhibiteurs de protéase

	IDV	SQV/RTV	NFV	APV/RTV	RTV	LPV/r	ATV	TPV/RTV
L10	I		3	3		3	3	
K20								
L24								
D30								
V32								
L33	F					3	3	3
E35								
M36								
R41	K			3				
M46	V							
G48								
I50								
F53								
I54	M	3	3		3	3		
I62								
L63	P			3		3	3	
A71	V	3	3		3	3	3	
G73								
V77								
V82	A	8	3	3	3	8	3	3
I84	V	8	3	8	3	8	3	3
N88								
L90	M	3	3	8		3	3	3

Inhibiteurs de fusion

Fragment du gène de fusion non demandé

	T20
G36	
V38	
Q40	
N42	
N43	

Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques

	AZT	ddI	ddC	3TC	d4T	ABC	TDF
M41	L	3	3		3	3	3
E44							
K65							
D67	N/D	3	3		3	3	3
T69	A/D						
K70							
L74	V		8			3	3
V75							
Y115							
Q151							
M184	V			8		3	
L210							
T215	Y	8	3		8	3	3
K219							

ddC : données insuffisantes pour établir des recommandations

Inhibiteurs non nucléosidiques

	EFV	NVP
L100		
K101	H	
K103	N	8
V106		
Y181	C	8
Y188		
G190	A	8
P225		

	IDV	SQV/RTV	NFV	APV/RTV	RTV	LPV/r	ATV	TPV/RTV	AZT	ddI	ddC	3TC	d4T	ABC	TDF	EFV	NVP	T20
Résistance	R	R	R		R	R	R	R	R	R		R	R	R		R	R	
Résistance possible															O			
Absence de résistance					b													

Date :

Signature :



Merci de
votre
attention