

6

Les tests virologiques pour le diagnostic et le suivi des patients infectés par les virus des hépatites B, C et D

Les tests virologiques sont indispensables à la prise en charge des patients infectés par les virus des hépatites B, C et D, à la fois pour le diagnostic de l'infection, la mise en place du traitement antiviral et le suivi de la réponse virologique au traitement. À côté des tests classiques (tests sérologiques de détection des antigènes viraux et des anticorps dirigés contre les protéines virales et tests de détection et de quantification des acides nucléiques dans le sang périphérique), de nouveaux tests, comme la quantification des antigènes viraux et la caractérisation des profils de résistance aux antiviraux, sont en développement et certains pourraient trouver une application clinique dans le futur.

Outils virologiques

Il existe deux types de marqueurs virologiques des virus des hépatites virales B, C et D : les marqueurs directs et les marqueurs indirects. Les marqueurs directs sont un des constituants du virus, antigènes ou acides nucléiques (acide désoxyribonucléique [ADN] ou acide ribonucléique [ARN]). Les marqueurs indirects sont les anticorps dirigés contre les protéines virales ; ces anticorps témoignent de la mise en place d'une réponse immune spécifique contre l'infection virale.

Antigènes et anticorps viraux

Principes des méthodes de détection et de quantification des antigènes et des anticorps

Tests immuno-enzymatiques

La détection ou la quantification des antigènes viraux et des anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes dans les fluides biologiques est fondée sur l'utilisation de tests immuno-enzymatiques (*enzyme immunosorbent assay*, EIA). L'antigène ou l'anticorps recherché est habituellement pris en « sandwich » entre deux anticorps lorsqu'il s'agit d'un antigène ou entre un antigène et un anti-anticorps lorsqu'il s'agit d'un anticorps. Ces méthodes sont rapides, faciles à utiliser, automatisables et, de ce fait, permettent de traiter un grand nombre d'échantillons. Elles sont en outre peu coûteuses (environ 30 %

du coût d'une mesure de la charge virale). On distingue des techniques qualitatives, qui permettent d'indiquer la présence ou l'absence de l'analyte (antigène ou anticorps) et des techniques quantitatives, qui permettent d'évaluer avec précision la quantité de l'analyte dans le fluide biologique. Les techniques quantitatives sont étalonnées par rapport à des standards internationaux dont les résultats sont idéalement exprimés en unités internationales (UI) par unités de volume. La détection et la quantification des antigènes ou des anticorps s'effectuent sur le sérum et éventuellement sur le plasma à condition que les trousseaux soient validés pour cette matrice biologique. Les performances des trousseaux sur ces deux matrices biologiques sont généralement équivalentes. Les trousseaux sérologiques utilisés pour le diagnostic et le suivi des infections par les virus des hépatites relèvent de la directive européenne 98/79/CE ; elles doivent répondre à ses exigences afin de pouvoir bénéficier du marquage CE et être utilisées dans les laboratoires de biologie médicale. En outre, les réactifs utilisés pour la détection, la confirmation et la quantification des marqueurs des virus d'hépatites B, C et D, au même titre que les dispositifs utilisés pour la détection et la quantification du VIH et de l'HTLV, sont mentionnés à l'annexe II, liste A de la directive. À ce titre, ils doivent être conformes à des spécifications techniques communes (STC, décision 2009/886/CE). Les STC définissent les modalités d'évaluation des performances de sensibilité et de spécificité, ainsi que des critères de sensibilité et de spécificité devant être atteints dans les conditions d'utilisation revendiquées par le fabricant.

Alternatives au prélèvement veineux

- *Point-of-care testing*

Les matrices biologiques alternatives au prélèvement veineux au pli du coude, telles que le liquide cravicaire, prélevé entre le sillon de la gencive et de la lèvre, et le sang total capillaire, prélevé au bout du doigt, permettent une biologie délocalisée auprès du patient ou « *point-of-care testing* (POCT) ». Elles peuvent en effet être utilisées dans des lieux fixes (cabinets médicaux, services d'urgence, centres d'information et de dépistage anonyme et gratuit [CIDAG], structures de prévention, structures associatives, domicile du patient) ou mobiles (camion ou tente, par exemple). Les POCT en médecine comprennent les tests immunologiques sur carte ou bandelette permettant la mise en évidence d'antigènes ou d'anticorps spécifiques (tests rapides d'orientation diagnostique [TROD] à partir de liquide cravicaire ou de sang total capillaire) et des tests moléculaires (non immunologiques), en développement, permettant la détection ou la quantification des acides nucléiques. En 2003, le programme de recherche et de formation en maladies tropicales de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a défini les caractéristiques idéales d'un POCT [1] : il doit être bon marché, sensible, spécifique, facile à réaliser en un maximum de trois à quatre étapes à température ambiante par des personnels formés, soignants ou non, directement auprès des personnes exposées et hors des structures classiques de dépistage, et les résultats doivent être disponibles en moins de 30 minutes. Ces tests ne doivent pas nécessiter de matériel spécifique tel que centrifugeuses ou tubes de prélèvement.

- Tests rapides d'orientation diagnostique

Le principe des tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) est simple. La plupart permettent la capture d'analytes (antigènes ou anticorps) sur une surface solide. Dans un deuxième temps, l'interaction de ces analytes avec des peptides synthétiques dans le cas de la détection d'anticorps ou des immunoglobulines spécifiques dans le cas de la détection d'antigènes permet une détection à l'œil nu, généralement sous la forme d'un trait de couleur. Une bande contrôle permet de valider le test. Il existe plusieurs technologies. La plus utilisée est l'immunochromatographie sur bandelettes. Un grand nombre

de matrices biologiques sont acceptées comme échantillons (liquide cravculaire, sang total capillaire, sang total veineux, sérum, plasma). Il s'agit de tests simples à utiliser et à interpréter. Lorsque les TROD sont réalisés à partir de matrices non usuelles telles que le liquide cravculaire ou le sang total capillaire, ils permettent éventuellement un diagnostic délocalisé auprès du patient (POCT), sans nécessité de disposer d'un laboratoire de biologie. Les TROD présentent un certain nombre de limites : une moindre sensibilité par rapport aux méthodes EIA réalisées sur sérum ou plasma, une absence d'automatisation, une lecture subjective justifiant la nécessité d'une formation, l'absence de traçabilité et d'archivage du résultat et une difficulté pour l'élimination des déchets infectieux. La moindre sensibilité des TROD est expliquée par la nature des antigènes ou des anticorps utilisés, la liaison des antigènes et des anticorps à température ambiante et non à 37° C comme dans les tests EIA et la nature des matrices biologiques utilisées. Le temps de réaction (maximum 30 minutes) diminue également la sensibilité. La spécificité des TROD est bonne mais tout résultat positif doit être contrôlé par une méthode de référence.

Papier buvard (dried blood spot)

Le papier buvard (*dried blood spot*, DBS) permet de recueillir le sang et de le conserver sous forme desséchée. Une fois séchés à température ambiante, les prélèvements peuvent être acheminés par voie postale, puis conservés rigoureusement à -20° C afin de ne pas altérer la qualité des acides nucléiques en vue des analyses moléculaires. Le papier buvard pourrait donc constituer un support intéressant pour le dépistage, le diagnostic et la prise en charge des infections virales. Le buvard permet la détection des anticorps et des antigènes, ainsi que la détection et la quantification des acides nucléiques, voire leur séquençage. Après séchage à température ambiante pendant 4 à 24 heures, les buvards peuvent être stockés à +4° C ou à -20° C et sont habituellement transportés dans des sacs plastiques zippés contenant un dessiccant à température ambiante. Le stockage à température ambiante est déconseillé car il réduirait la spécificité des tests sérologiques et induirait des faux négatifs de détection de l'AgHBs [2, 3]. L'éluion du matériel biologique est un facteur limitant qui nécessite une adaptation des tampons aux tests à réaliser. Les buvards permettent des analyses moléculaires. Néanmoins, les charges virales sont sous-estimées par rapport à celles déterminées à partir d'un prélèvement sérique ou plasmatique. De plus, les seuils de sensibilité pour la détection de l'ARN du VHC et de l'ADN du VHB sont respectivement de l'ordre de 500 et 1 000 IU/ml [4, 5]. Des analyses sérologiques (détection d'anticorps) et pharmacologiques sont également possibles.

Matrices biologiques alternatives

- Liquide cravculaire

Le liquide cravculaire est un exsudat sérique (plus riche en IgG et moins riche en IgA que la salive). Il peut être prélevé au moyen d'un tampon imprégné d'un mélange de sels et de gélatine qui crée un environnement hypertonique favorisant le transfert passif des anticorps par gradient osmotique et empêche la liaison irréversible des anticorps au coton du tampon. Néanmoins, la concentration en IgG du liquide cravculaire est inférieure à celle du sérum (au moins d'un facteur 4 à 5) [6] rendant les performances des TROD utilisant cette matrice biologique pour la détection de l'AgHBs ou la détection des anticorps anti-VHC, inférieures à celles obtenues sur sérum ou plasma.

- Sang total capillaire

Le sang total capillaire, obtenu par simple piqûre au bout du doigt, permet d'éviter le matériel et le temps nécessaires à l'étape de centrifugation pour obtenir du sérum, mais présente, du fait de la présence des globules rouges, l'inconvénient d'entraîner une

dilution et une hémolyse du prélèvement qui diminuent les performances des TROD utilisant cette matrice par rapport à celles obtenues sur sérum.

Marqueurs sérologiques du virus de l'hépatite B

Antigène de surface du VHB (AgHBs)

- Détection de l'AgHBs

L'AgHBs est le principal marqueur diagnostique de l'infection par le VHB. La sensibilité des trousse de détection de l'AgHBs a été considérablement améliorée, puisqu'elle est aujourd'hui au moins égale à 0,13 UI/ml d'AgHBs circulant. Cette amélioration a permis une réduction de la « fenêtre sérologique », période de l'infection aiguë au cours de laquelle l'AgHBs n'est pas encore détectable, de neuf jours en moyenne par rapport aux précédentes générations de tests [7]. Par ailleurs, la capacité des trousse à détecter les mutants de l'AgHBs portant des substitutions amino-acidiques pouvant modifier les propriétés antigéniques de l'AgHBs, a été améliorée par rapport aux précédentes générations de tests. La spécificité des trousse de dernière génération est supérieure à 99,5 %. Les résultats faussement positifs sont donc exceptionnels. Ils peuvent être observés chez des femmes enceintes ou des patients atteints de maladies auto-immunes ou d'hépatopathies chroniques d'autres causes. Des résultats faussement négatifs peuvent également être observés lorsque les échantillons sanguins, recueillis sur héparine, sont hémolysés (hémoglobine >1,4 g/dl) ou fortement ictériques (bilirubine > 500 µmol/l).

- Neutralisation de l'AgHBs

Le test de neutralisation est une méthode robuste et indispensable de confirmation de la présence de l'AgHBs. Le principe est de saturer les déterminants antigéniques de l'AgHBs de l'échantillon par les anticorps anti-HBs en excès du réactif. L'AgHBs ne pourra donc plus se lier à l'anticorps immobilisé sur une phase solide. Une diminution d'au moins 50 % du signal est habituellement considérée comme étant nécessaire pour confirmer la présence de l'AgHBs. La neutralisation peut être problématique pour les sérums dont le titre d'AgHBs est faible. Le test est alors considéré comme non valide. Le test de neutralisation n'est pas obligatoire sur un plan légal, mais il est fortement recommandé.

- Quantification des antigènes et des anticorps de l'AgHBs

La quantification de l'AgHBs est aujourd'hui possible à l'aide de trousse commerciales standardisées. Trois trousse sont disponibles en France : (a) HBsAg assay sur l'automate Architect (Abbott), (b) HBsAg II Quant assay sur l'automate Elecsys ou Cobas (Roche), (c) Liaison XL HBsAg Quant assay sur l'automate Liaison XL (Diasorin). Le niveau d'AgHBs semble corrélé au contenu intrahépatique en ADNccc (*covalently closed circular DNA*, forme épisomale de persistance du VHB dans les cellules) transcriptionnellement actif dans le foie. Le niveau d'AgHBs est donc considéré comme un marqueur indirect du réservoir de cellules infectées par le VHB. De nombreuses études ont suggéré un intérêt de la quantification de l'AgHBs dans l'évaluation de la réponse au traitement des hépatites chroniques B et dans l'identification des porteurs inactifs en association à d'autres paramètres tels que la mesure de la charge virale et de l'activité sérique des transaminases [8-11].

Anticorps anti-HBs

Au cours de la résolution d'une infection par le VHB, les anticorps anti-HBs apparaissent, associés aux anticorps anti-HBc. Leur titre augmente de façon concomitante à la diminution de l'AgHBs. Néanmoins, du fait de l'absence de détection des complexes

antigène-anticorps par les tests, les anticorps anti-HBs deviennent détectables seulement deux mois en moyenne après que l'AgHBs est devenu indétectable. Le titre des anticorps anti-HBs peut fluctuer au cours du temps et les anticorps peuvent devenir indétectables plusieurs années après la guérison d'une infection aiguë. Les anticorps anti-HBs apparaissent également dans le sérum des patients vaccinés contre le VHB. Dans ce cas, leur présence n'est pas associée à celle d'anticorps anti-HBc. La réponse vaccinale est définie par un titre d'anticorps anti-HBs >10 UI/l mesuré 1 à 3 mois après la dernière injection [12]. Néanmoins, aucune étude n'a évalué le niveau de protection à un seuil inférieur à 10 UI/l. Une série de trois doses de primovaccination (schéma vaccinal d'après le calendrier vaccinal 2013) induit des concentrations protectrices d'anticorps chez plus de 95 % des nourrissons, enfants et adultes jeunes en bonne santé. Après l'âge de 40 ans, le taux de réponse diminue progressivement (*cf.* thématique « Conséquences cliniques et traitement de l'hépatite B »).

Des études récentes ont montré qu'un peu plus d'un tiers des personnes qui répondaient à la vaccination après trois à quatre injections avaient un niveau d'anticorps inférieur à 10-12 UI/l vingt ans après la vaccination, et ce quel que soit le niveau d'endémicité considéré [13, 14]. Cependant, une grande majorité conservaient un niveau détectable d'anticorps anti-HBs ($\geq 3,3$ UI/l) et la quasi-totalité des sujets ayant un titre d'anticorps inférieur à 100 UI/l avait une réponse anamnétique après l'injection d'une dose supplémentaire [13]. En pratique, cette situation sérologique doit être distinguée de la non réponse à la vaccination (titre d'anticorps qui reste <10 UI/l dans le mois suivant la vaccination), observée chez environ 10 % des adultes et 5 % des enfants recevant le schéma vaccinal standard. La mesure du titre des anticorps anti-HBs peut varier légèrement selon la trousse commerciale utilisée, malgré le calibrage des tests de quantification à l'aide de standards internationaux [15].

Anticorps anti-HBc totaux et IgM anti-HBc

Les anticorps dirigés contre les protéines de capsid du VHB (anticorps anti-HBc) sont le meilleur marqueur sérologique d'un contact avec le VHB. Les anticorps anti-HBc de type IgM sont présents à un titre élevé au cours de l'infection aiguë. Ils peuvent également être présents à un titre faible et fluctuant au cours de la phase d'immuno-élimination de l'hépatite chronique B ou réapparaître en cas de réactivation d'une hépatite chronique B chez un porteur inactif du VHB. Les IgG anti-HBc apparaissent également précocement et sont le témoin du contact avec le VHB. Elles persistent toute la vie. Contrairement aux anticorps anti-HBs, les IgG anti-HBc ne sont pas protectrices. Les résultats faussement négatifs de détection des anticorps anti-HBc sont rares, observés essentiellement chez des patients immunodéprimés.

Dans certains cas, les anticorps anti-HBc sont le seul marqueur virologique présent chez un sujet infecté par le VHB. Cette situation peut être observée : (a) au cours de la phase de l'hépatite aiguë qui suit la disparition de l'AgHBs et précède la guérison sérologique caractérisée par l'apparition des anticorps anti-HBs ; dans ce cas, la présence isolée d'IgM anti-HBc et l'apparition ultérieure des anticorps anti-HBs permettent le diagnostic ; (b) chez des patients « guéris » ayant perdu leurs anticorps anti-HBs ; (c) chez des patients ayant une infection B occulte, définie par la présence d'ADN du VHB dans le foie, alors que l'AgHBs, produit en très faible quantité, est indétectable par les tests commerciaux classiques. Chez ces malades, l'ADN sérique peut être détectable (généralement <200 UI/ml) ou indétectable [16].

Antigène HBe et anticorps anti-HBe

- Détection de l'AgHBe et des anticorps anti-HBe

La protéine HBe, qui porte le déterminant antigénique HBe, est un produit du gène *pré-C/C* (dont le gène *C* code la protéine de capsid du VHB portant le déterminant antigénique HBe). Elle est excrétée dans le sang périphérique. Son rôle dans la physiopathologie de l'infection n'est pas clairement défini. Elle pourrait favoriser la tolérance immunitaire et serait indispensable au passage à la chronicité. La présence d'AgHBe dans le sang indique une réplication active du VHB, associée à une infectiosité élevée du sang. L'AgHBe est détecté précocement au cours de l'infection aiguë, entre 6 et 12 semaines après la contamination. Au cours de l'évolution de l'hépatite B, l'AgHBe peut disparaître et cela est suivi de l'apparition d'anticorps anti-HBe. La disparition de l'AgHBe s'associe à une diminution importante du niveau sérique d'ADN du VHB. La persistance de l'AgHBe dans le sérum, trois à quatre mois après la contamination, indique généralement une évolution vers une infection chronique.

Deux types d'hépatites chroniques B peuvent être observés : les hépatites chroniques à AgHBe positif et les hépatites chroniques à AgHBe négatif. L'infection chronique à AgHBe négatif est aujourd'hui majoritaire en France : elle touche près de 90 % des patients pris en charge pour une hépatite B dans les pôles de référence et réseaux « hépatites » [17]. L'absence de production de la protéine HBe résulte de la présence de substitutions nucléotidiques dans la région précore du gène *pré-C/C* et/ou dans la région promotrice du core. Les mécanismes qui conduisent, après séroconversion HBe spontanée, certains patients vers une résolution de l'hépatite ou un portage chronique inactif et d'autres vers une hépatite chronique active à AgHBe négatif, ne sont pas connus.

- Quantification de l'AgHBe

Des études récentes ont suggéré un intérêt de la quantification de l'AgHBe dans le suivi de la réponse aux traitements antiviraux, en tant que facteur prédictif de la séroconversion HBe. Un titre pré-thérapeutique de l'AgHBe inférieur à 360 U PEI/ml (*Paul Ehrlich Institute Units*) et une diminution précoce de l'AgHBe sont des facteurs prédictifs de séroconversion HBe chez des patients naïfs de traitement traités par entécavir [18, 19]. Des résultats identiques ont été observés chez des patients traités par interféron α pégylé [20]. L'utilisation de ce marqueur en pratique clinique est limitée par l'absence de trousse commerciale standardisées et par l'expression des résultats en unités PEI.

Marqueurs sérologiques du virus de l'hépatite C*Détection et quantification de l'antigène de capsid du VHC*

L'antigène de capsid du VHC (Ag-HC) peut être détecté et quantifié dans le sang des patients infectés. L'Ag-HC est un marqueur indirect de la réplication virale et, de ce fait, constitue une alternative aux techniques de détection et de quantification de l'ARN du VHC. En effet, le titre de l'Ag-HC est corrélé à la charge virale, comme cela a été montré dans différentes populations de patients infectés par différents génotypes du VHC [21, 22]. La détection de l'Ag-HC peut être utilisée pour réduire la période de la « fenêtre sérologique » dans le cadre du don de sang (mais, en France, un test moléculaire est utilisé dans cet objectif) et pour identifier les sujets répliquants si un test moléculaire n'est pas disponible. La quantification de l'Ag-HC a été proposée pour le suivi de patients sous traitement antiviral [23]. Un test standardisé et automatisé (Architect HCV Core Antigen test, Abbott) est disponible. Son intervalle de quantification est de 3 à 20 000 fmol/l. C'est un test simple, facile d'utilisation et peu coûteux. La sensibilité de ce test pour détecter la réplication est estimée à l'équivalent de 500 à 3 000 UI/ml d'ARN selon le génotype

[23, 24]. Ce manque de sensibilité limite son utilisation, notamment pour le suivi thérapeutique. L'Ag-HC pourrait être une alternative possible à la détection-quantification de l'ARN du VHC dans l'avenir, dans la mesure où la seule présence ou absence de répllication pourrait suffire au diagnostic et au suivi des nouvelles thérapies orales, pour un coût représentant environ un tiers de celui d'une charge virale.

Détection des anticorps totaux anti-VHC

La « fenêtre sérologique » entre la contamination et l'apparition des anticorps anti-VHC est en moyenne de 70 jours avec les tests de troisième génération [25]. Les anticorps anti-VHC apparaissent en moyenne 2 à 8 semaines après la phase aiguë de l'infection et persistent chez les sujets qui développent une hépatite chronique C. Les tests de détection des anticorps anti-VHC sont utilisés à la fois pour le dépistage et pour le diagnostic de l'infection par le VHC. Les tests commerciaux actuellement disponibles détectent des anticorps dirigés contre des protéines structurales (protéine de capside) et non structurales (NS) du virus (protéines NS3, NS4 et NS5). Ces tests sont à la fois très spécifiques et très sensibles. Les résultats faussement positifs sont de fréquence variée selon les trousse de réactifs. Les résultats faussement négatifs peuvent être observés chez des patients hémodialysés ou profondément immunodéprimés comme les transplantés d'organes ou de moelle, certains patients infectés par le VIH et les patients hypo- ou agammaglobulinémiques [26, 27]. Des tests de confirmation de la présence des anticorps anti-VHC fondés sur le principe de l'*immunoblot* ont été utilisés pendant de nombreuses années. Ces tests ne sont plus utiles aujourd'hui car la plupart des laboratoires disposent de techniques de biologie moléculaire pour la détection de l'ARN du VHC. La signification de la présence d'IgM anti-VHC au cours de l'infection par le VHC n'est pas claire. En effet, ces IgM ont été observés chez 50 % à 93 % des patients ayant une hépatite aiguë C et chez 50 % à 70 % de ceux ayant une infection chronique [28, 29]. En conséquence, les IgM anti-VHC ne peuvent être considérées comme un marqueur fiable d'hépatite aiguë et ne sont pas utilisées en pratique clinique. La mesure de l'index d'avidité des IgG anti-VHC n'est pas utilisée car ses résultats sont difficiles à interpréter.

Détection simultanée de l'antigène de capside du VHC et des anticorps anti-VHC (test Combo)

La détection simultanée de l'Ag-HC et des anticorps anti-VHC par un même test permet de réduire la « fenêtre sérologique » de 20 à 30 jours en moyenne [25]. Les tests proposés sont manuels et faciles à utiliser, mais moins sensibles que les tests de troisième génération pour la détection des anticorps anti-VHC. Deux trousse sont disponibles en France (Monalisa HCV antigen-antibody Ultra, Bio-Rad ; Murex HCV Ag/Ab Combination, DiaSorin). Les performances de ces trousse sont satisfaisantes [30]. Néanmoins, ces tests sont un peu moins performants que la recherche de l'ARN viral, leur positivité étant retardée de quelques jours par rapport à celle de l'ARN [30].

Ces tests Combo sont peu utilisés dans les laboratoires de diagnostic dans la mesure où aucune information d'intérêt clinique n'est apportée. Ils pourraient avoir un intérêt chez les patients immunodéprimés, en particulier au cours de l'infection à VIH ou chez les patients transplantés, chez lesquels l'Ag-HC peut être détecté alors que, du fait de l'immunodépression, les anticorps anti-VHC peuvent être absents.

Marqueurs sérologiques du virus de l'hépatite D

Antigène D (Ag-HD)

L'Ag-HD est exprimé dans le noyau des cellules hépatocytaires où il peut être détecté par des techniques d'immunohistochimie sur biopsie hépatique. Au cours de l'infection

chronique à VHB/VHD, le pourcentage de cellules exprimant l'Ag-HD diminue lors de la progression de la maladie hépatique, ce qui limite l'intérêt de ce marqueur. L'Ag-HD peut être également trouvé dans les particules virales libérées dans le sang circulant. Cependant, les patients immunocompétents infectés par le VHD développent rapidement une réponse anticorps qui masque les Ag-HD circulants dont la présence est habituellement fugace. Les Ag-HD circulants peuvent être trouvés chez des patients immunodéprimés, transplantés ou infectés par le VIH. Il existe des trousse commerciales, mais la place de ce marqueur diagnostique reste limitée.

Anticorps anti-HD totaux

Le diagnostic indirect de l'infection par le VHD repose sur la recherche des anticorps anti-HD totaux dans le sérum à l'aide de techniques EIA. Plusieurs trousse commerciales sont disponibles comme ETI-AB-MAK2 (Diasorin), HDV Ab (Dia.Pro.) ou EIAgen HDV Ab (Adaltis). Les anticorps anti-HD totaux, principalement de type IgG, ne sont pas protecteurs. Ils peuvent être présents au cours d'une infection chronique ou être le témoin d'une infection ancienne chez des patients ayant éliminé le virus D, et ce indépendamment du statut VHB.

IgM anti-HD

Les IgM anti-HD sont détectées par des techniques EIA d'immunocapture. Différentes trousse commerciales sont disponibles comme ETI-DELTA-IgMK2 (Diasorin), HDV IgM (Dia.Pro.) et EIAgen HDV IgM (Adaltis). Au début de l'infection aiguë, les IgM anti-HD sont présents sous forme pentamérique. Elles persistent au cours de l'infection chronique sous une forme monomérique. Les IgM anti-HD ont longtemps été considérées comme un marqueur de répllication du VHD. En effet, leur élimination ou la diminution de leur titre au cours de l'infection chronique seraient prédictifs de la clairance du VHD spontanée ou induite par les traitements antiviraux [31, 32]. Cependant, les IgM anti-HD peuvent être absentes chez certains patients d'origine africaine en dépit d'une répllication active [33].

Génomés viraux

Détection et quantification des génomes

Les génomes viraux sont détectés et quantifiés à l'aide de méthodes d'amplification de la cible : PCR (*polymerase chain reaction*) ou TMA (*transcription-mediated amplification*).

Principes des méthodes de détection et de quantification des génomes viraux

Les méthodes d'amplification de la cible de première génération utilisaient une détection des produits d'amplification à la fin de la réaction à l'aide de sondes oligonucléotidiques. Les amplicons étaient détectés par une réaction enzymatique. Un des inconvénients majeurs de ces méthodes était un intervalle de quantification étroit. De ce fait, les fortes charges virales n'étaient pas correctement quantifiées et nécessitaient des dilutions manuelles, tandis que les faibles charges virales n'étaient pas détectées. Ces problèmes ont été résolus par le développement des méthodes dites d'amplification en temps réel, désormais disponibles dans tous les laboratoires de biologie en France.

- PCR en temps réel

Le principe de la PCR en temps réel est de détecter la synthèse des produits d'amplification au cours de la réaction de PCR et d'en déduire la quantité de génome viral présente initialement dans l'échantillon grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente. La quantité

de fluorescence libérée est directement proportionnelle à la quantité de produits d'amplification synthétisés à chaque cycle de PCR, qui dépend de la quantité initiale. Les valeurs obtenues (exprimées en Ct, cycle *threshold* ou cycle seuil) sont converties en résultats quantitatifs par comparaison à une courbe de calibration mémorisée ou à la quantification d'un standard ajouté en concentration connue qui est amplifié en parallèle. Les valeurs obtenues doivent être exprimées en UI/ml, idéalement en Log UI/ml, afin de pouvoir comparer les résultats émanant de différents laboratoires et utilisant des techniques de détection et de quantification différentes. Ces techniques bénéficient d'un large intervalle de quantification linéaire, adapté à la mesure des valeurs observées en pratique clinique, en l'absence comme au cours des traitements antiviraux. Elles sont plus sensibles que les techniques de PCR classiques, n'exposent pas au risque de faux-positifs liés à des contaminations et peuvent être entièrement automatisées, ce qui réduit le temps d'analyse.

- TMA en temps réel

Contrairement à la PCR qui utilise plusieurs températures et une ADN polymérase thermostable, la TMA en temps réel est isothermique et utilise deux enzymes, une transcriptase inverse et une T7 ARN polymérase. Sur le même principe que la PCR en temps réel, il est possible de quantifier le génome viral présent initialement dans l'échantillon grâce à une sonde fluorescente. Les trousseaux de TMA en temps réel sont en développement.

Détection et quantification de l'ADN du VHB

La détection et la quantification de l'ADN du VHB sont indispensables en pratique clinique afin de poser le diagnostic d'hépatite chronique B, d'évaluer le pronostic de l'atteinte hépatique et le risque d'évolution vers la cirrhose ou le cancer primitif du foie, d'identifier les patients qui ont une indication de traitement, d'évaluer la réponse aux traitements antiviraux et de détecter l'émergence de variants viraux résistants [34]. Plusieurs trousseaux commerciaux de PCR en temps réel sont disponibles comme COBAS TaqMan HBV test v2.0, COBAS Ampliprep-COBAS TaqMan (CAP/CTM) HBV test v2.0 (Roche), RealTime HBV (Abbott) et Artus HBV QS-RGQ assay (Qiagen). Les performances analytiques de ces tests de quantification sont satisfaisantes [35, 36].

Détection et quantification de l'ARN du VHC

La détection et la quantification de l'ARN du VHC sont indispensables en pratique clinique afin de poser le diagnostic d'hépatite C, d'identifier les patients qui ont une indication de traitement, d'évaluer la réponse aux traitements antiviraux et de détecter l'émergence de variants viraux résistants au cours des traitements sans interféron [37, 38]. Plusieurs trousseaux commerciaux de PCR en temps réel sont disponibles comme COBAS TaqMan HCV test v2.0, COBAS Ampliprep-COBAS TaqMan (CAP/CTM) HCV test v2.0 (Roche), RealTime HCV (Abbott), Artus HCV QS-RGQ assay (Qiagen) et VERSANT HCV RNA 1.0 assay (kPCR, Siemens). Les performances analytiques de ces tests de quantification sont satisfaisantes [39-42].

Détection et quantification de l'ARN du VHD

La détection et la quantification de l'ARN du VHD sont indispensables en pratique clinique afin de poser le diagnostic d'infection aiguë ou chronique et d'évaluer la réponse au traitement antiviral. Le premier test de quantification de l'ARN du VHD a été développé en 2005 [43]. Depuis, d'autres techniques artisanales et des trousseaux commerciaux de PCR en temps réel ont été développées [44, 45]. Leurs performances varient en fonction du génotype du VHD. La plupart des méthodes quantifient de façon équivalente les souches de génotype 1 d'origine européenne ou asiatique. En revanche, les souches de génotype 1 d'origine africaine et les souches de génotypes 3 à 8 sont généralement

sous-quantifiées et certaines d'entre elles ne sont pas détectées [46]. La mise à disposition d'un standard international devrait permettre la standardisation des techniques.

Analyse des séquences nucléotidiques du génome viral

L'analyse des séquences du génome viral est indispensable pour la détermination du génotype du VHC avant la mise sous traitement, pour l'identification des substitutions amino-acidiques responsables d'une diminution de sensibilité aux analogues nucléos(t)idiques utilisés dans le traitement de l'infection chronique B et pour l'identification de résistances du VHC aux traitements antiviraux sans interféron. L'analyse des séquences nucléotidiques a longtemps été fondée sur la méthode des terminateurs de chaîne, décrite par Sanger *et al.* [47]. Désormais, de nouvelles méthodes de séquençage (séquençage à haut débit, dit de nouvelle génération) sont disponibles. Elles génèrent un nombre très important de séquences (plusieurs millions) ; le principal souci est le traitement des données obtenues, qui nécessite des outils bio-informatiques puissants.

Principes des méthodes d'analyse des séquences nucléotidiques du génome viral

Le séquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment donné du génome viral.

- Séquençage classique

La méthode de Sanger *et al.* [47] repose sur une synthèse enzymatique qui consiste à initier la polymérisation de la séquence virale d'intérêt à l'aide d'un oligonucléotide de petite taille (amorce) complémentaire de la séquence devant être déterminée. L'élongation de l'amorce est réalisée par une enzyme (ADN polymérase) en présence d'un mélange de désoxyribonucléotides et de didésoxynucléotides associés à un marqueur fluorescent. Les fragments d'ADN de tailles croissantes synthétisés sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire. Le traitement informatique des données permet la reconstruction de la séquence nucléotidique.

- Hybridation inverse

Le principe des méthodes d'hybridation inverse (LiPA ou *Line Probe Assay*) est fondé sur l'hybridation spécifique de l'ADN amplifié biotinylé à des sondes oligonucléotidiques spécifiques, immobilisées en lignes parallèles sur une bandelette de nitrocellulose. Après hybridation, les hybrides biotinylés sont détectés à l'aide de la phosphatase alcaline dont l'addition du substrat spécifique, la streptavidine, permet la visualisation de bandes colorées. Ces méthodes sont plus rapides et sensibles que les méthodes de séquençage classique. En effet, alors que le séquençage direct permet de détecter les variants viraux s'ils représentent 20 % à 25 % de l'ensemble des virus circulants, les méthodes LiPA permettent la détection de variants minoritaires, représentant moins de 5 % des variants présents dans la population virale. Néanmoins, ces méthodes ne permettent d'appréhender qu'un nombre limité de polymorphismes déjà connus, contrairement aux méthodes de séquençage classique qui fournissent une cartographie complète du gène d'intérêt.

- Séquençage de nouvelle génération

Le séquençage dit de nouvelle génération regroupe un ensemble de techniques (pyroséquençage, séquençage à l'aide de terminateurs réversibles, séquençage par ligation) dont les principes sont proches et comprennent trois étapes. La première étape consiste en la préparation et l'amplification des molécules d'ADN à analyser. La seconde étape permet l'incorporation des bases complémentaires du fragment à séquencer. La dernière étape comprend la lecture de la séquence nucléotidique proprement dite. Le champ d'application de ces nouvelles méthodes est vaste. Dans le cadre des hépatites virales, le principal avantage de ces techniques est leur capacité à détecter les populations virales

minoritaires, dont la signification clinique reste cependant à déterminer. Disposer d'outils bioinformatiques d'analyse des données puissants est essentiel, afin de traduire les millions de séquences générées en un message clinique simple.

Détermination du génotype viral

La méthode de référence pour la détermination du génotype viral est l'analyse phylogénique de la séquence nucléotidique d'une portion du génome viral. Cela permet de comparer les séquences obtenues avec les séquences de souches prototypes disponibles dans les banques. C'est la seule méthode qui permette l'identification de nouveaux génotypes ou de souches recombinantes entre des virus de génotypes différents. Néanmoins les méthodes fondées sur l'hybridation inverse (plus rapides et plus sensibles que les méthodes de séquençage) sont largement utilisées dans les laboratoires de biologie.

- Détermination du génotype du VHB

Il existe huit génotypes du VHB (A à H). Bien que de nombreuses études aient montré que le génotype C était associé à une évolution plus rapide de la maladie hépatique vers la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire et que le génotype A était associé à une meilleure réponse au traitement par l'interféron α que les autres génotypes, l'utilité de la détermination du génotype du VHB pour orienter le choix thérapeutique est actuellement discutée. En effet, la valeur prédictive individuelle du génotype sur la réponse au traitement est faible du fait, entre autres, d'une relation très étroite entre génotype, ethnie et zone géographique de diffusion, qui sont d'importants facteurs confondants [48, 49].

- Détermination du génotype du VHC

Les souches de VHC se répartissent en sept génotypes, susceptibles de répondre différemment aux traitements antiviraux. La détermination du génotype est essentielle avant mise sous traitement afin de choisir le traitement le plus approprié. Différentes trousse commerciales sont disponibles : Trugene HCV 5'NC Genotyping (Siemens) fondée sur le séquençage direct d'une portion de la région 5' non codante (NC) ; INNO-LiPA HCV 2.0 (Siemens), technique d'hybridation inverse qui utilise des sondes dirigées contre la région 5'NC et contre la région codant la protéine de capsid du VHC, permettant une bonne différenciation des sous-types 1a et 1b d'une part, des génotypes 6 et 1 d'autre part ; Abbott RealTime HCV Genotype II (Abbott), méthode fondée sur la PCR en temps réel utilisant des amorces spécifiques de génotype dirigées contre la région 5'NC et celle codant la protéine NS5B.

- Détermination du génotype du VHD

Il existe huit génotypes, 1 à 8, du VHD. La détermination du génotype du VHD repose sur le séquençage de la totalité du génome viral ou de la région R0 codant la partie terminale de l'Ag-HD, suivi d'une analyse phylogénique par rapport à des séquences de référence [50]. Cependant, la détermination du génotype du VHD n'a pas à ce jour d'indication en pratique clinique.

Identification des mutations de résistance aux traitements antiviraux

La méthode de référence pour l'identification des mutations de résistance aux traitements antiviraux est le séquençage du gène codant la protéine ciblée par l'agent antiviral. La comparaison des séquences obtenues avec celles de souches sauvages sensibles au médicament disponibles dans les banques permet d'identifier des substitutions non décrites dans la littérature. La comparaison de la séquence pré-thérapeutique avec celle obtenue au moment de la suspicion de résistance doit être réalisée pour mettre en évidence le changement amino-acidique. D'autres méthodes sont utilisées en pratique clinique,

comme celles fondées sur l'hybridation inverse, qui ne permettent d'identifier que des substitutions connues pour conférer la résistance.

- Résistance du VHB aux antiviraux

Les profils mutationnels pouvant être sélectionnés au cours du traitement par les différents analogues nucléos(t)idiques sont connus. Plusieurs trousseaux commerciales sont disponibles, comme Trugene® HBV Genotyping Kit (Siemens) et HBV Sequencing Assay (Abbott), toutes deux fondées sur le séquençage direct de la phase ouverte de lecture chevauchante d'une portion du domaine de la transcriptase inverse de l'ADN polymérase et la région centrale de l'AgHBs et la trousse INNO-LiPA HBV DR v3 (Siemens), fondée sur l'hybridation inverse à l'aide de sondes permettant de détecter la présence de mutations associées à la résistance aux analogues nucléos(t)idiques.

- Résistance du VHC aux antiviraux

De nombreux inhibiteurs directs du VHC ciblant différentes protéines virales (protéase, polymérase, protéine NS5A) sont en développement. Avec la trithérapie associant interféron pégylé, ribavirine et télaprévir ou bocéprévir, le succès du traitement dépendait essentiellement de la capacité de l'interféron et de la ribavirine à induire un fort effet antiviral chez le patient. En pratique clinique, il n'y pas d'indication des tests de résistance génotypique (ni avant l'instauration du traitement ni en cas d'échec thérapeutique). Cela restera vrai pour toutes les options thérapeutiques incluant l'interféron α . Les indications des tests de résistance du VHC aux antiviraux vont sans doute évoluer avec l'arrivée des traitements sans interféron.

Utilisation pratique des tests sérologiques standard pour le dépistage des hépatites virales B et C

Dépistage des infections par le VHB

Plusieurs stratégies de dépistage biologique de l'hépatite B ont été proposées par la Haute autorité de santé (HAS) en 2011. La première stratégie est la recherche d'emblée de trois marqueurs : AgHBs, anticorps anti-HBs et anticorps anti-HBc totaux. Cette stratégie a l'avantage de définir précisément le statut immunitaire du sujet. La seconde stratégie correspond au contrôle avant vaccination inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM), avec la recherche des anticorps anti-HBc et anti-HBs. La troisième stratégie consiste à rechercher l'AgHBs et les anticorps anti-HBs. C'est la recherche d'emblée des trois marqueurs qui a eu la faveur du groupe de travail et du groupe de lecture de la HAS, car c'est la stratégie la plus simple, la plus efficace et la plus documentée en terme d'orientation. En cas de positivité de l'AgHBs, la HAS recommande une nouvelle détermination sur un deuxième prélèvement, comme le prévoit la NABM.

Dépistage des infections par le VHC

Le dépistage de l'hépatite C implique la détection des anticorps anti-VHC à l'aide d'un test EIA de troisième génération. Selon le résultat, deux situations sont à envisager.

- En cas de résultat négatif et en l'absence de contexte d'exposition récente ou d'immunodépression sévère, il est conclu à l'absence de contact avec le VHC. Dans un contexte de suspicion d'infection récente, la HAS recommande de réaliser à nouveau la détection des anticorps anti-VHC après une période de trois mois. Chez une personne

immunodéprimée, la recherche de l'ARN du VHC par une méthode sensible de biologie moléculaire sur le premier prélèvement est recommandée.

- En cas de résultat positif, le contrôle de la sérologie est recommandé par un nouveau test EIA à l'aide d'un autre réactif sur un deuxième prélèvement (acte 3785 de la NABM). En cas de sérologie de contrôle positive sur le deuxième prélèvement, le contact avec le VHC est avéré. Dans cette situation, la HAS recommande la recherche de l'ARN du VHC sur le deuxième prélèvement (http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1050355/fr/strategies-de-depistage-biologique-des-hepatites-virales-b-et-c).

Contrairement à ce qui a été recommandé pour le VIH, les tests de détection combinée de l'antigène de capsid et des anticorps anti-VHC n'ont pas fait l'objet de recommandations particulières. Ainsi, leur emploi, qui peut être justifié si le recrutement du laboratoire comprend des sujets à risque, est laissé à l'initiative du biologiste.

Utilisation pratique des TROD pour le dépistage des infections virales B et C

Performances des TROD disponibles pour le dépistage des infections par le VHB

De nombreux TROD ont été développés pour la détection des marqueurs du VHB tels que l'AgHBs, les anticorps anti-HBc et les anticorps anti-HBs. La plupart utilisent des matrices biologiques telles que le sérum, le plasma ou le sang total prélevé au pli du coude. À ce jour, trois TROD disposent d'un marquage CE pour la détection de l'AgHBs : les tests VIKIA[®] HBsAg (Biomérieux), DRW-HBsAg v2.0 assay (Diagnostics for the Real World[™]) et TOYO HBsAg test (Türklab). Deux de ces trois dispositifs acceptent le sérum, le plasma et le sang total comme matrices biologiques. Le TROD DRW-HBsAg n'est pas validé pour le sang total.

Les performances analytiques de ces tests varient selon la matrice biologique [51]. Deux études récentes ont montré que le test VIKIA[®] avait des valeurs prédictives positive et négative très satisfaisantes (97,6 % et 99,9 %) à partir de sang total veineux prélevé au pli du coude, tandis que le test DRW-HBsAg v2.0 réalisé à partir de sérum ou plasma pouvait être utilisé avec confiance pour la détection de l'AgHBs dans les populations de forte ou faible endémicité pour le VHB (spécificité : 97,8 % à 98,8 % ; sensibilité : 95,2 % à 100 %) [52, 53].

Performances des TROD disponibles pour le dépistage des infections par le VHC

À ce jour, trois TROD disposent d'un marquage CE pour la détection des anticorps totaux anti-VHC : les tests OraQuick[®] HCV Rapid Antibody Test (OraSure Technologies), TOYO[®] anti-HCV test (Türklab) et Labmen HCV test (Türklab).

Les performances analytiques de ces tests pour la détection des anticorps anti-VHC sont variées [54, 55]. L'étude du Centre national de référence des hépatites virales B, C et D, soutenue par l'ANRS et le ministère de la Santé, a permis d'évaluer les performances des trois TROD (OraQuick[®] HCV rapid antibody test, TOYO[®] anti-HCV test et Labmen HCV test) chez plus de 500 personnes séropositives ou séronégatives pour le VHC à partir de sang total prélevé au bout du doigt par auto-piqûre et de liquide cravculaire. Les résultats intermédiaires ont montré une spécificité satisfaisante (98,3 % à 100 %) et ce, quels que soient le TROD et la matrice biologique considérés. En terme de sensibilité, les performances étaient globalement satisfaisantes sur sang total capillaire (95,9 % à

99,1 %) et liquide cravculaire (97,8 %), excepté pour le test Labmen HCV effectué à partir du sang total (sensibilité de 63,1 %) [56]. Ces résultats sont en accord avec une méta-analyse récente [55]. Les TROD VHC sont moins performants dans certaines populations, en particulier les patients co-infectés par le VIH [57].

Utilisation des TROD pour le dépistage des infections par le VHB et le VHC

Bien qu'il n'existe pas, à ce jour, de recommandations quant à l'utilisation des TROD pour le dépistage des infections virales B ou C, ces tests pourraient constituer un outil complémentaire des méthodes sérologiques classiques, permettant d'atteindre des populations particulièrement exposées au risque de transmission du VHB ou du VHC et/ou ayant des difficultés d'accès aux soins, en particulier grâce à l'utilisation de matrices biologiques non usuelles (liquide cravculaire et sang total capillaire). Un avis de la HAS sur la place de ces tests dans la stratégie de dépistage des hépatites B et C sur ce sujet sera rendu très prochainement en vue d'un arrêté fixant les conditions de réalisation de ces tests. À ce jour, les tests rapides effectués à partir de sérum ou plasma sont seulement utilisés par les biologistes dans les laboratoires.

Utilisation pratique des outils virologiques pour le diagnostic et le suivi de l'hépatite virale B

Diagnostic de l'hépatite aiguë B

Seuls deux marqueurs sont recommandés pour le diagnostic de l'hépatite aiguë. Il s'agit de l'AgHBs et des anticorps anti-HBc de type IgM. La présence simultanée d'AgHBs et d'IgM anti-HBc dans un contexte d'hépatite aiguë signe le diagnostic d'hépatite aiguë B. Toutefois, des IgM anti-HBc sont parfois décelables, le plus souvent à un faible titre, chez les patients ayant une infection chronique. Le diagnostic différentiel se fera alors sur les signes cliniques. La disparition de l'AgHBs est le critère sérologique de guérison d'une hépatite aiguë B. Elle est habituellement suivie, 2 à 4 mois plus tard, par l'apparition des anticorps anti-HBs. La présence d'IgM anti-HBc en l'absence d'AgHBs et d'anticorps anti-HBs peut être observée pendant la période qui suit la disparition de l'AgHBs. Dans ce cas, la présence des IgM anti-HBc permet de poser le diagnostic, qui est confirmé par l'apparition ultérieure des anticorps anti-HBs. La persistance de l'AgHBs au-delà de 6 mois caractérise l'évolution vers l'infection chronique. En cas de contamination récente (moins d'un mois environ), ces marqueurs sérologiques peuvent être absents (« fenêtre silencieuse »). En cas de suspicion d'hépatite aiguë, il conviendra alors de rechercher l'ADN viral. L'infection sera attestée par la mise en évidence ultérieure de l'AgHBs et/ou des anticorps anti-HBc.

Diagnostic de l'hépatite chronique B

Le portage chronique du VHB est défini par la persistance pendant plus de 6 mois de l'AgHBs. L'hépatite chronique B associée au portage de l'AgHBs associe une répllication virale élevée (>2 000 UI/ml), une augmentation permanente ou intermittente de l'activité sérique des aminotransférases et une activité nécrotico-inflammatoire à l'examen histologique du foie. Chez un porteur chronique du VHB, le niveau de la répllication virale doit être systématiquement mesuré. C'est un déterminant majeur de la progression de l'hépatopathie chronique vers la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire (CHC) et un élément très important de la décision thérapeutique. Au cours de l'infection chronique,

l'AgHBs et les anticorps anti-HBc totaux sont présents, associés ou non à l'AgHBe. La présence de l'AgHBe dans le sérum est généralement associée à un niveau de réplication élevé et à une forte infectiosité des fluides. L'hépatite chronique à AgHBe négatif est la plus fréquente en France. Elle est caractérisée par la présence habituelle d'anticorps anti-HBe et une réplication virale généralement plus faible que l'hépatite chronique à AgHBe positif. Au cours de l'infection chronique par le VHB, l'AgHBs peut ne pas être détecté. C'est le cas de porteurs inactifs du VHB ayant un très faible niveau de réplication virale, de patients infectés par des souches virales portant des substitutions amino-acidiques de l'AgHBs, de patients ayant une infection B occulte, de patients ayant une hépatite chronique B recevant un traitement antiviral efficace ou de patients co-infectés par le VHB et le VHD.

Évaluation de la sévérité et du pronostic de l'infection chronique par le VHB

Le niveau de la charge virale et l'activité sérique des aminotransférases sont des critères importants d'évaluation de l'atteinte hépatique. Il n'existe pas de corrélation entre le niveau de la charge virale et la sévérité de la maladie. Néanmoins, une charge virale élevée est associée à un pronostic à long terme plus sévère. La concentration circulante d'AgHBs n'est pas corrélée à l'atteinte hépatique.

Suivi des infections par le VHB ne nécessitant pas de traitement antiviral

Le traitement n'est habituellement pas recommandé chez les porteurs inactifs du VHB, les sujets immunotolérants et les patients ayant une hépatite chronique B minime (score METAVIR <A2F2) (*cf.* thématique « Conséquences cliniques et traitement de l'hépatite B »). Néanmoins, la surveillance régulière est conseillée. Elle comprend une surveillance virologique, biochimique (activité sérique des transaminases) et histologique lorsque l'activité sérique des aminotransférases est augmentée, de façon intermittente ou permanente. Chez les porteurs chroniques inactifs du VHB, la quantification de l'ADN du VHB est utile tous les six mois afin de détecter une augmentation de la réplication virale et de reconsidérer l'indication thérapeutique. La détermination de la concentration d'AgHBs circulant peut constituer un outil supplémentaire afin de différencier les personnes AgHBe-négatif ayant une hépatite chronique active des porteurs inactifs. En effet, l'association : (a) d'un titre d'AgHBs inférieur à 100 UI/ml lorsqu'il s'agit de génotypes B ou C ou à 1 000 UI/ml lorsqu'il s'agit du génotype D et (b) d'une charge virale inférieure à 2 000 IU/ml permettrait de distinguer avec une exactitude de plus de 90 % les porteurs inactifs des patients ayant une hépatite chronique active à AgHBe négatif [8, 58]. De nouvelles études prospectives seront toutefois nécessaires pour affiner les « seuils » en fonction du génotype.

Prise en charge thérapeutique de l'hépatite chronique B

Décision de traiter

Chez les malades non cirrhotiques ayant une hépatite chronique B, la décision thérapeutique est fondée sur l'évaluation de multiples paramètres cliniques, biologiques et pronostiques, dont les plus importants sont le niveau de la charge virale, le niveau d'activité sérique des aminotransférases et la sévérité de l'atteinte hépatique (*cf.* thématique « Conséquences cliniques et traitement de l'hépatite B »). *L'European association for the study of the liver* (EASL) recommande d'initier le traitement chez tous les patients non cirrhotiques ayant une charge virale >2 000 UI/ml, une augmentation de l'activité sérique des transaminases au-dessus de la limite supérieure de la normale et une évaluation de la sévérité de la maladie hépatique montrant une activité et/ou une fibrose (METAVIR

$\geq A2$ et/ou $\geq F2$) [34]. Le traitement antiviral doit être considéré chez tous les patients ayant une activité nécrotico-inflammatoire et/ou une fibrose modérée à sévère à l'examen histologique du foie, même si le niveau de répllication virale est faible. Il est également important de déterminer le statut vis-à-vis du VHD, qui lorsqu'il est présent est un facteur d'aggravation de la maladie hépatique.

Choix du schéma thérapeutique

Deux stratégies thérapeutiques sont disponibles. L'une repose sur un traitement par interféron α pégylé pour une durée déterminée et l'autre sur l'utilisation d'analogues nucléos(t)idiques pour une durée longue, probablement à vie dans la plupart des cas. Le choix du schéma thérapeutique est fonction de l'appréciation de nombreux critères dont les plus importants sont le statut HBe, le niveau de la charge virale, l'activité sérique des transaminases et d'autres marqueurs biologiques (taux de prothrombine, plaquettes), ainsi que des critères démographiques (âge, sexe, index de masse corporelle) et de l'existence ou non de contre-indications (*cf.* thématique « Conséquences et traitement de l'hépatite B »).

Suivi du traitement antiviral anti-VHB

Quels que soient le statut sérologique HBe et le traitement entrepris, l'évaluation de l'efficacité du traitement antiviral est fondée sur des mesures répétées de la charge virale et de l'activité sérique des aminotransférases, en principe tous les trois à six mois. Chez les patients AgHBe-positif, la détermination du statut HBe sera réalisée tous les six mois. La détermination du statut HBs sera réalisée tous les 12 mois après séroconversion HBe ou un ADN du VHB devenu indétectable.

Chez les patients traités par interféron α pégylé, le titre de l'AgHBs pourrait être un facteur de réponse au traitement, en association ou non avec la valeur de la charge virale. En effet, chez les patients AgHBe-positif, un arrêt du traitement peut être considéré si le titre de l'AgHBs reste $>20\ 000$ UI/ml 24 semaines après le début du traitement car les patients n'ont pratiquement aucune chance de répondre au traitement [11]. Chez les patients AgHBe-négatif, l'évaluation du niveau d'AgHBs et de l'ADN du VHB à la semaine 12, par comparaison aux valeurs préthérapeutiques, pourrait constituer une règle d'arrêt [8-10].

Chez les patients sous analogues nucléos(t)idiques, le suivi du titre de l'AgHBs pourrait être utile pour identifier les patients susceptibles d'éliminer leur AgHBs à long terme, car aucun facteur prédictif de réponse au traitement n'a été clairement identifié. Chez les patients ayant une bonne observance et qui répondent au traitement, la sélection de variants résistants doit être suspectée devant tout échappement virologique, défini comme une réascension de la répllication virale (>1 Log ou plus au-dessus du nadir) ou une charge virale détectable chez un patient devenu indétectable (confirmée sur un deuxième prélèvement) [59]. Les tests de résistance génotypique sont indiqués chez les patients compliants sous traitement ayant une réponse virologique partielle ou suboptimale (charge virale en plateau) ou un échappement virologique confirmé [34, 60] (*Tableau 1*).

Prise en charge de la réactivation virale B

La réactivation de l'hépatite B est définie par la reprise de la répllication du VHB chez un patient dont l'infection était auparavant contrôlée. Cette situation peut survenir chez un patient immunodéprimé ayant ou non perdu l'AgHBs, que l'immunodépression soit modérée ou sévère. Chez un patient AgHBs-positif, la réactivation est caractérisée par une augmentation significative de la charge virale (≥ 1 Log UI/ml). Le suivi est fondé

Tableau 1. Suivi virologique des patients traités par interféron α pégylé ou analogues nucléos(t)idiques d'après les recommandations de l'EASL [34].

Monitoring virologique	
Traitement par interféron α pégylé	
<i>Pendant le traitement</i>	
Toutes les 24 semaines (pré-thérapeutique, S24, S48)	ADN du VHB AgHBe/Anti-HBe
Préthérapeutique, S12 et S24	HBsAg quantitatif ¹
<i>Après le traitement</i>	
Toutes les 24 semaines	ADN du VHB AgHBe/anti-HBe
Toutes les 48 semaines après séroconversion HBe ou ADN du VHB devenu indétectable	AgHBs/anti-HBs ²
Traitement par analogues nucléos(t)idiques	
Toutes les 12-24 semaines	ADN du VHB
Toutes les 24 semaines	AgHBe/anti/HBe
Toutes les 48 semaines après séroconversion HBe	AgHBs

¹ Quantification de l'AgHBs en UI/ml.

² Les patients devenus AgHBs-négatif doivent être testés vis-à-vis des anticorps anti-HBs.

sur des mesures répétées de la charge virale du VHB. Chez un sujet AgHBs-négatif avec des anticorps anti-HBc et des anticorps anti-HBs, la réactivation virale B est caractérisée par un ADN du VHB qui devient détectable et une séroréversion de l'AgHBs. La détection de marqueurs du VHB doit faire discuter la mise en route d'un traitement préemptif avant la survenue de la cytolysé hépatique (*cf.* thématique « Conséquences cliniques et traitement de l'hépatite B »). Le suivi virologique est fondé sur des mesures de la charge virale répétées, mensuelles jusqu'à l'indétectabilité de l'ADN viral, puis trimestrielle ou semestrielle.

Utilisation pratique des outils virologiques pour le diagnostic et le suivi de l'hépatite virale C

Diagnostic de l'hépatite aiguë C

La recherche des anticorps anti-VHC à l'aide d'une trousse EIA de troisième génération et celle de l'ARN du VHC doivent être réalisées pour le diagnostic d'une hépatite aiguë. Si la sérologie anti-VHC est positive, la nomenclature des actes biologiques recommande que le résultat soit confirmé sur un second prélèvement en utilisant une technique différente. La recherche de l'ARN du VHC doit être également réalisée sur le second prélèvement par une méthode sensible ayant un seuil de détection de l'ordre de 10-15 UI/ml. La présence simultanée des anticorps anti-VHC et de l'ARN viral permet d'affirmer l'existence d'une contamination par le VHC, mais ne permet pas de distinguer l'infection aiguë de l'infection chronique. Lorsque les anticorps sont absents mais l'ARN

du VHC présent, le diagnostic d'hépatite aiguë C est certain et sera confirmé par l'apparition des anticorps anti-VHC sur un prélèvement réalisé quelques semaines plus tard. En l'absence des deux marqueurs et en dehors d'une suspicion d'infection très récente, le diagnostic d'hépatite aiguë C peut être éliminé avec certitude.

Diagnostic de l'hépatite chronique C

La persistance de l'ARN du VHC au-delà de six mois définit l'infection chronique par le VHC. L'hépatite chronique C est caractérisée par la présence simultanée d'anticorps anti-VHC et de l'ARN viral (recherché par une technique sensible avec un seuil de détection de 10-15 IU/ml) chez des sujets ayant des signes cliniques et/ou biologiques d'hépatopathie chronique. Les anticorps anti-VHC peuvent, rarement, être indétectables chez des sujets hémodialysés ou des malades ayant une immunodépression sévère.

Prise en charge de l'infection par le VHC

Suivi des infections par le VHC ne nécessitant pas de traitement antiviral

Lorsqu'il n'y a pas d'indication de traitement ou lorsqu'il y a une contre-indication à un traitement antiviral, aucun examen virologique n'est nécessaire. Une évaluation annuelle de la sévérité de l'atteinte hépatique est recommandée.

Décision de traiter et indication de traitement

Hépatite aiguë C

Les méta-analyses publiées confirment le bénéfice du traitement antiviral. Le traitement par interféron α administré en monothérapie induit un taux de réponse virologique prolongée élevé (>90 %), et ce quel que soit le génotype. La ribavirine ne semble pas avoir d'impact sur le taux de guérison. Compte tenu d'une clairance virale spontanée possible dans un délai de 8 à 12 semaines après la contamination (10 %-50 % des cas), un délai d'attente de trois mois en moyenne semble raisonnable avant de débiter le traitement antiviral. L'EASL recommande un suivi virologique toutes les quatre semaines après le diagnostic de l'infection aiguë et seuls les patients ayant un ARN détectable à la semaine 12 sont éligibles au traitement. L'efficacité et la tolérance des nouveaux agents antiviraux disponibles et en développement devront être évalués dans cette situation.

Hépatite chronique C

L'indication du traitement est posée en fonction du degré de fibrose hépatique et non sur des critères virologiques. Le traitement doit être débuté rapidement chez les patients ayant des lésions de fibrose classées $\geq F2$. En revanche, chez les patients ayant une fibrose classée F0-F1, la décision est prise au cas par cas, en fonction de l'existence ou non de cofacteurs d'aggravation (*cf.* thématique « Conséquences cliniques et traitement de l'infection virale C »).

Suivi du traitement antiviral anti-VHC

Monitoring de l'efficacité du traitement

Le monitoring de l'efficacité du traitement est fondé sur des mesures répétées de la charge virale (ARN du VHC), à l'aide d'une méthode moléculaire sensible ayant un large intervalle de quantification linéaire. Les patients doivent être suivis avec le même test réalisé dans le même laboratoire. La mesure de la charge virale doit être faite à différents temps afin d'évaluer l'adhésion au traitement (mesure de la charge virale à la semaine 2), un arrêt prématuré du traitement (règles d'arrêt), de modifier la durée du traitement

(traitement adapté à la réponse) ou encore d'évaluer le succès du traitement (réponse à la fin du traitement ou réponse virologique soutenue).

Pour les patients recevant le sofosbuvir en combinaison avec l'interféron pégylé et la ribavirine pendant 12 semaines, la mesure de la charge virale doit être réalisée avant la mise sous traitement, et aux semaines 4, 12 (fin de traitement) et aux semaines 12 et 24 après l'arrêt du traitement.

Pour les patients recevant le siméprévir en association avec l'interféron pégylé et la ribavirine pendant 12 semaines suivies de 12 ou 36 semaines supplémentaires de bithérapie pégylée, la mesure de la charge virale doit être réalisée avant la mise sous traitement, aux semaines 4, 12, 24 (fin de traitement pour les patients naïfs et rechuteurs), 48 (fin de traitement pour les répondeurs partiels et les répondeurs nuls) et aux semaines 12 et 24 après l'arrêt du traitement.

Pour les patients recevant le daclatasvir en combinaison avec l'interféron pégylé et la ribavirine pendant 24 semaines (12 semaines de trithérapie suivie de 12 semaines supplémentaires de bithérapie pégylée ou 24 semaines de trithérapie), la mesure de la charge virale doit être réalisée avant la mise sous traitement, aux semaines 4, 10, 24 (fin de traitement) et aux semaines 12 et 24 après l'arrêt du traitement.

Pour les patients recevant un traitement sans interféron (sofosbuvir plus siméprévir avec ou sans ribavirine pendant 12 semaines ou sofosbuvir plus daclatasvir avec ou sans ribavirine pendant 12 ou 24 semaines ou sofosbuvir plus ribavirine pendant 12 ou 24 semaines), la mesure de la charge virale doit être réalisée avant la mise sous traitement, aux semaines 2 (évaluation de l'adhérence), 12 ou 24 (fin de traitement) et aux semaines 12 et 24 après l'arrêt du traitement.

Règles d'arrêt

Les règles d'arrêt ont été définies uniquement pour les patients recevant du siméprévir en association avec l'interféron pégylé et la ribavirine. Le traitement devra être arrêté si l'ARN est supérieur ou égal à 25 UI/ml à partir de la fin de la 4^e, de la 12^e ou de la 24^e semaine.

Traitement adapté à la réponse virologique

Le traitement adapté à la réponse virologique est utilisé uniquement pour les patients recevant le daclatasvir en combinaison avec l'interféron pégylé et la ribavirine. La trithérapie sera administrée pendant 24 semaines si la charge virale reste détectable (ARN du VHC > 25 UI/ml) à la semaine 4 et devient indétectable à la semaine 10. En revanche le daclatasvir sera administré en combinaison à l'interféron pégylé et la ribavirine pendant 12 semaines suivies de 12 semaines de bithérapie pégylée chez les patients dont la charge virale est indétectable à la semaine 4 et 10.

Utilisation pratique des outils virologiques pour le diagnostic et le suivi de l'hépatite virale D

Diagnostic de l'hépatite D aiguë

Par définition, l'infection ne survient que chez des patients infectés par le VHB. On distingue deux situations : l'infection simultanée par les deux virus (dite co-infection) et l'infection par le VHD chez un sujet déjà porteur du VHB (dite surinfection). La

distinction entre les deux situations est importante pour le pronostic et pour la prise en charge [61].

Co-infection VHB-VHD

La co-infection B-D est responsable d'une hépatite modérée évoluant le plus souvent vers l'élimination du VHB et du VHD. La présence des acides nucléiques (ADN du VHB, ARN du VHD) et celle des antigènes (AgHBs et Ag-HD) sont contemporaines du pic de transaminases. Il s'ensuit une augmentation rapide du titre des anticorps anti-HD totaux et de type IgM, les anticorps IgM anti-HBc associés à l'ADN du VHB témoignant de l'infection aiguë B. En cas de co-infection peu sévère, la virémie VHD est faible et la réponse anticorps IgM et IgG est rapide mais de faible ampleur, suggérant la résolution de l'infection VHB-VHD. Les anticorps IgG anti-HD peuvent persister, témoignant d'une infection ancienne résolutive.

Surinfection VHB-VHD

La surinfection par le VHD est caractérisée par une hépatite aiguë sévère avec des niveaux de virémie VHD et de transaminases (suivant le pic de virémie) très élevés. Elle est caractérisée par une augmentation rapide et importante des taux des anticorps anti-HD IgM et IgG. En revanche, les anticorps IgM anti-HBc et l'ADN du VHB sont habituellement indétectables. Plus de 70 % des cas de surinfection aiguë évoluent vers une hépatite D chronique dont le pronostic est sévère.

Diagnostic de l'hépatite chronique D

L'hépatite chronique D se caractérise par la persistance de la virémie ainsi que des anticorps IgM et IgG anti-HD. On observe en général une inhibition de la réplication du VHB [62].

Traitement de l'hépatite chronique D

Décision de traiter et indication du traitement

Chez les malades ayant une hépatite chronique à virus B et D, le traitement antiviral doit être envisagé s'il existe une activité nécrotico-inflammatoire et/ou une fibrose hépatique modérée à sévère, en sachant que la surinfection par le VHD est un facteur d'aggravation de l'hépatopathie chronique B.

Suivi du traitement anti-VHD

Le suivi du traitement par interféron α est fondé sur la mesure de la charge virale D. Cette quantification n'est actuellement disponible que dans quelques laboratoires spécialisés et sa standardisation est en cours. La négativation ou la diminution d'au moins 3 Log de l'ARN du VHD au sixième mois de traitement serait un facteur prédictif de réponse virologique prolongée [63]. La cinétique de décroissance de l'AgHBs au cours du traitement de l'hépatite chronique B-D pourrait permettre de définir la durée optimale du traitement. En pratique, il est recommandé de quantifier tous les trois mois l'ARN du VHD, l'ADN du VHB et l'AgHBs. À la semaine 48, le traitement peut être interrompu si l'ARN du VHD est devenu indétectable (réponse virologique) ou si l'ARN du VHD n'a pas diminué (échec thérapeutique). Si l'ARN du VHD a diminué mais est resté détectable, le traitement doit être poursuivi jusqu'à la semaine 72 ou 96.

Perspectives

Le diagnostic des hépatites virales B, C et D a évolué de façon spectaculaire au cours des vingt dernières années, en particulier grâce à l'essor des techniques fondées sur la biologie moléculaire et en parallèle aux développements thérapeutiques qui révolutionnent la prise en charge. Dans l'avenir, plusieurs défis sont à relever. Le plus important est certainement l'accès de tous au dépistage, au diagnostic et au traitement. À cet égard, l'extension des campagnes de dépistage, l'utilisation des TROD et celle de matrices biologiques alternatives représentent un progrès considérable, qu'il faudra savoir utiliser en pratique quotidienne. La simplification de la prise en charge et l'accès large au traitement pourraient bénéficier de l'arrivée de nouveaux marqueurs, dans le cadre de nouvelles approches thérapeutiques, en particulier sans interféron. On pourra demain traiter sans détermination préalable du génotype, avec des schémas thérapeutiques efficaces sur tous les génotypes. On peut aussi imaginer que la recherche d'antigène de capsid du VHC puisse, à terme, remplacer le suivi de la charge virale dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique : détectable en début de traitement, indétectable 12 ou 24 semaines après son arrêt.

À l'autre extrême du spectre, l'arrivée des techniques de séquençage de nouvelle génération permet de générer des quantités impressionnantes d'informations sur les séquences virales, qu'elles soient majoritaires ou minoritaires. Elle se heurte cependant au manque d'outils informatiques permettant d'analyser facilement les millions de séquences générées et de transcrire l'information brute en une information utile au clinicien. Le défi est donc à la fois de développer de tels outils et de définir, à travers des études cliniques de qualité, le niveau d'information nécessaire et suffisant à la prise de décision thérapeutique. Le problème de la résistance aux antiviraux semble assez bien contrôlé dans le domaine du VHB avec les analogues nucléos(t)idiques utilisés aujourd'hui. On ne peut cependant préjuger de problèmes qui pourraient survenir au-delà de dix à vingt ans d'administration d'une même molécule, la vigilance devant rester de mise. L'arrivée massive et éventuellement désordonnée de nouveaux traitements de l'hépatite C sans interféron, permettra de guérir une majorité de patients, mais risquera d'ouvrir un nouveau front dans le domaine de la résistance aux antiviraux pour une minorité qui pourrait se trouver infectée par des souches virales multirésistantes. Des études cliniques et la mise en place de stratégies de détection des variants viraux avant le début du traitement et/ou en cas d'échec pourront être nécessaires.

À côté du VHB et du VHC, objets de toutes les attentions des développeurs de médicaments et de tests virologiques, le VHD fait figure de parent pauvre : aucun traitement spécifique vraiment efficace, des tests moléculaires artisanaux non standardisés. Le développement prochain d'un standard OMS devrait permettre l'arrivée de trousse de détection et de quantification de l'ARN du VHD sensibles, précises, quantifiant de façon égale l'ensemble des génotypes du virus. Aucun développement thérapeutique ne pourra être envisagé dans le domaine de l'hépatite chronique D sans un outil fiable et reproductible de mesure de l'efficacité thérapeutique.

Les tests virologiques pour le diagnostic et le suivi des patients infectés par les virus des hépatites B, C et D

Points-clés

1. Des outils sérologiques et moléculaires sont disponibles pour le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des infections par les virus des hépatites B, C et D.
2. Des techniques sensibles de biologie moléculaire fondées sur la PCR en temps réel sont disponibles pour la détection et la quantification des génomes des virus des hépatites.
3. De nouveaux outils sérologiques tels que les quantifications de l'AgHBs et de l'AgHBe (pour le VHB) et de l'Ag-HC (pour le VHC) pourraient être utiles dans le diagnostic et le suivi des patients atteints d'hépatite virale B et C.
4. Des matrices biologiques alternatives au prélèvement veineux au pli du coude, telles que le liquide cravculaire (prélevé entre le sillon antérieur de la gencive et la lèvre) et le sang total capillaire (prélevé au bout du doigt), permettent la réalisation de tests biologiques en allant au-devant du patient (*point-of-care testing*).
5. Les tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) utilisant des matrices biologiques alternatives au prélèvement veineux au pli du coude sont en plein essor dans le champ des hépatites virales et pourraient avoir rapidement une place majeure dans l'offre de dépistage.
6. Un avis de la HAS sur la place des TROD dans la stratégie de dépistage des hépatites B et C sur ce sujet sera rendu en 2014 en vue d'un arrêté fixant les conditions de réalisation de ces tests.
7. Le buvard (*dried blood spot*) pourrait représenter un support de prélèvement alternatif pour le diagnostic des hépatites virales, en particulier pour les populations n'ayant pas accès aux structures classiques de soins et les pays en développement.

Recommandations

1. **Finaliser l'évaluation des méthodes alternatives au prélèvement veineux classique, telles que les TROD sur liquide cravculaire, ou du prélèvement sur buvard**, pour le dépistage et le diagnostic des hépatites virales, y compris la détection de marqueurs moléculaires.
2. **Finaliser le développement des TROD « multiplex »** permettant la détection des anticorps anti-VIH, des anticorps anti-VHC, de l'AgHBs, voire de la syphilis.
3. **Respecter les conditions techniques de réalisation des tests alternatifs** pour ne pas perdre en sensibilité et spécificité, en accompagnant leur mise en place et en formant de façon spécifique les intervenants non médicaux impliqués.
4. **Confirmer les résultats positifs des TROD par un test de référence ELISA** à partir d'un prélèvement de sang veineux.
5. **Mobiliser les structures de dépistage et d'accueil des personnes exposées (CDAG et CARUD) et les associations de patients** pour une information et une diffusion appropriées des méthodes de dépistage alternatives auprès des populations qui ne vont pas spontanément se faire dépister.

6. **Évaluer l'intérêt des tests de résistance génotypique dans l'infection à VHC** en fonction de l'arrivée de nouveaux antiviraux directs et des schémas thérapeutiques sans interféron.
7. **Réaliser des tests de résistance génotypique pour le VHB** chez les patients dont l'observance au traitement a été vérifiée et qui ont une réponse virologique partielle ou suboptimale ou un échappement virologique confirmé.
8. **Garantir la qualité des trousse de détection et de quantification de l'ARN du VHD**, avec le développement d'un standard OMS.

Virological tests for the diagnosis and follow-up of patients infected with HBV and HCV

Key points

1. Serological and molecular tools are available to the clinician for the diagnosis and treatment of hepatitis B, C and D virus infections.
2. Sensitive molecular biology techniques based on real time PCR are now available for the detection and quantification of the viral hepatitis genomes.
3. New serological tools such as HBsAg, HBeAg and HCAg quantification could play a role in the diagnosis and follow-up of viral hepatitis.
4. Alternative biological matrices to venous blood samples such as gingival crevicular fluid (taken from the lip and gum) and total capillary blood (taken from the finger) allow biological testing of the patient in his/her own environment (point of care testing).
5. Rapid diagnostic tests using non-traditional biological matrices are rapidly evolving and could become an option for diagnostic testing in the field of viral hepatitis.
6. The French national health authority ("HAS") will publish its opinion on the role of rapid diagnostic tests for the diagnostic screening of HBV and HCV to describe the conditions for performing these tests.
7. The dried blood spot technique could be an alternative option for the diagnosis of viral hepatitis, especially in populations in the developing countries that do not have access to healthcare facilities.

Recommendations

1. **Finalize evaluation of alternative blood testing methods**, including rapid diagnostic tests on gingival crevicular fluid, or the dried blood spot test, for the diagnosis of viral hepatitis including the detection of molecular markers.
2. **Finalize development of "multiplex" rapid diagnostic tests** for the detection of anti-HIV and anti-HCV antibodies, HBsAg, and even syphilis.
3. **Respect technical conditions when performing alternative testing methods to ensure specificity and sensitivity**, by supporting implementation of these techniques and providing specific training to non-medical personnel.
4. **Confirm rapid diagnostic tests with a reference ELISA test from a venous blood sample.**

5. **Mobilize diagnostic testing facilities for exposed individuals** (“CDAG” and “CARUD”) **and patient associations** to provide appropriate information on alternative testing methods to populations that would not normally consult for testing.
6. **Determine the indication for tests for HCV resistance-mutations** in relation to new direct acting antivirals and future therapeutic protocols without interferon.
7. **Determine HBV antiviral drug resistance** in compliant patients receiving treatment who have a partial or suboptimal virological response or with confirmed virological escape.
8. **Develop WHO norms to standardize HDV RNA detection kits and quantification kits.**

Références

1. Kettler H, White K, Hawkes S. *Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections*. Geneva : WHO/TDR, 2004.
2. Villar LM, de Oliveira JC, Cruz HM, Yoshida CF, Lampe E, Lewis-Ximenez LL. Assessment of dried blood spot samples as a simple method for detection of hepatitis B virus markers. *J Med Virol* 2011 ; 83 : 1522-9.
3. Larrat S, Bourdon C, Baccard M, Garnaud C, Mathieu S, Quesada JL, *et al.* Performance of an antigen-antibody combined assay for hepatitis C virus testing without venipuncture. *J Clin Virol* 2012 ; 55 : 220-5.
4. Mohamed S, Raimondo A, Penaranda G, Camus C, Ouzan D, Ravet S, *et al.* Dried blood spot sampling for hepatitis B virus serology and molecular testing. *PLoS One* 2013 ; 8 : e61077.
5. Tuaillon 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 : 752-8.
6. McKie A, Vyse A, Maple C. Novel methods for the detection of microbial antibodies in oral fluid. *Lancet Infect Dis* 2002 ; 2 : 18-24.
7. Biswas R, Tabor E, Hsia CC, Wright DJ, Laycock ME, Fiebig EW, *et al.* Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 2003 ; 43 : 788-98.
8. Chan HL, Thompson A, Martinot-Peignoux M, Piratvisuth T, Cornberg M, Brunetto MR, *et al.* Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011. A core group report. *J Hepatol* 2011 ; 55 : 1121-31.
9. Marcellin P, Bonino F, Yurdaydin C, Hadziyannis S, Moucari R, Kapprell HP, *et al.* Hepatitis B surface antigen levels: association with 5-year response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e-antigen-negative patients. *Hepatology* 2013 ; 7 : 88-97.
10. Rijckborst V, Hansen BE, Ferenci P, Brunetto MR, Tabak F, Cakaloglu Y, *et al.* Validation of a stopping rule at week 12 using HBsAg and HBV DNA for HBeAg-negative patients treated with peginterferon alfa-2a. *J Hepatol* 2012 ; 56 : 1006-11.
11. Sonneveld MJ, Hansen BE, Piratvisuth T, Jia JD, Zeuzem S, Gane E, *et al.* Response-guided peginterferon therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B using serum hepatitis B surface antigen levels. *Hepatology* 2013 ; 58 : 872-80.
12. Jack AD, Hall AJ, Maine N, Mendy M, Whittle HC. What level of hepatitis B antibody is protective? *J Infect Dis* 1999 ; 179 : 489-92.

13. Poovorawan Y, Chongsrisawat V, Theamboonlers A, Crasta PD, Messier M, Hardt K. Long-term anti-HBs antibody persistence following infant vaccination against hepatitis B and evaluation of anamnestic response: a 20-year follow-up study in Thailand. *Hum Vaccin Immunother* 2013 ; 9 : 1679-84.
14. Werner JM, Abdalla A, Gara N, Ghany MG, Rehermann B. The hepatitis B vaccine protects re-exposed health care workers, but does not provide sterilizing immunity. *Gastroenterology* 2013 ; 145 : 1026-34.
15. Huzly D, Schenk T, Jilg W, Neumann-Haefelin D. Comparison of nine commercially available assays for quantification of antibody response to hepatitis B virus surface antigen. *J Clin Microbiol* 2008 ; 46 : 1298-306.
16. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, *et al.* Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2008 ; 49 : 652-7.
17. InVS. Surveillance nationale de l'hépatite B chronique à partir des pôles de référence et réseaux hépatites volontaires. 2013 [cited ; Available from : <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Hepatitis-virales/Hepatitis-B/Surveillance-nationale-de-l-hepatite-B-chronique-a-partir-des-poles-de-reference-et-reseaux-hepatites-volontaires/Donnees-epidemiologiques-2008-2011>].
18. Kwon JH, Jang JW, Lee S, Lee J, Chung KW, Lee YS, *et al.* Pretreatment HBeAg level and an early decrease in HBeAg level predict virologic response to entecavir treatment for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2012 ; 19 : e41-7.
19. Zhang X, Lin SM, Ye F, Chen TY, Liu M, Chen YR, *et al.* An early decrease in serum HBeAg titre is a strong predictor of virological response to entecavir in HBeAg-positive patients. *J Viral Hepat* 2011 ; 18 : e184-90.
20. Fried MW, Piratvisuth T, Lau GK, Marcellin P, Chow WC, Cooksley G, *et al.* HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2008 ; 47 : 428-34.
21. Mederacke I, Potthoff A, Meyer-Olson D, Meier M, Raupach R, Manns MP, *et al.* HCV core antigen testing in HIV- and HBV-coinfected patients, and in HCV-infected patients on hemodialysis. *J Clin Virol* 2012 ; 53 : 110-5.
22. Ottiger C, Gygli N, Huber AR. Detection limit of architect hepatitis C core antigen assay in correlation with HCV RNA, and renewed confirmation algorithm for reactive anti-HCV samples. *J Clin Virol* 2013 ; 58 : 535-40.
23. Ross RS, Viazov S, Salloum S, Hilgard P, Gerken G, Roggendorf M. Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification. *J Clin Microbiol* 2010 ; 48 : 1161-8.
24. Medici MC, Furlini G, Rodella A, Fuertes A, Monachetti A, Calderaro A, *et al.* Hepatitis C virus core antigen: analytical performances, correlation with viremia and potential applications of a quantitative, automated immunoassay. *J Clin Virol* 2011 ; 51 : 264-9.
25. Humar A, Morris M, Blumberg E, Freeman R, Preiksaitis J, Kiberd B, *et al.* Nucleic acid testing (NAT) of organ donors: is the best test the right test ? A consensus conference report. *Am J Transplant* 2010 ; 10 : 889-99.
26. Kalantar-Zadeh K, Miller LG, Daar ES. Diagnostic discordance for hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005 ; 46 : 290-300.
27. 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 : 575-7.

28. Hellstrom UB, Sylvan SP, Decker RH, Sonnerborg A. Immunoglobulin M reactivity towards the immunologically active region sp75 of the core protein of hepatitis C virus (HCV) in chronic HCV infection. *J Med Virol* 1993 ; 39 : 325-32.
29. Negro F, Troonen H, Michel G, Giostra E, Albrecht M, Perrin L, *et al.* Lack of monomeric IgM anti-hepatitis C virus (HCV) core antibodies in patients with chronic HCV infection. *J Virol Methods* 1996 ; 60 : 179-82.
30. Laperche S, Elghouzzi MH, Morel P, Asso-Bonnet M, Le Marrec N, 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 : 1965-72.
31. Mederacke I, Yurdaydin C, Dalekos GN, Bremer B, Erhardt A, Cakaloglu Y, *et al.* Anti-HDV immunoglobulin M testing in hepatitis delta revisited: correlations with disease activity and response to pegylated interferon-alpha2a treatment. *Antivir Ther* 2012 ; 17 : 305-12.
32. Poggio PD, Colombo S, Zaccanelli M, Rosti A. Immunoglobulin M anti-hepatitis D virus in monitoring chronic hepatitis delta. *Liver Int* 2011 ; 31 : 1598.
33. Lunel-Fabiani F, Mansour W, Amar AO, Aye M, Le Gal F, Malick FZ, *et al.* Impact of hepatitis B and delta virus co-infection on liver disease in Mauritania: a cross sectional study. *J Infect* 2013 ; 67 : 448-57.
34. EASL clinical practice guidelines. Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012 ; 57 : 167-85.
35. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Laperche S, Hezode C, Pawlotsky JM. Performance of version 2.0 of the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantification. *J Clin Microbiol* 2010 ; 48 : 3641-7.
36. Thibault V, Pichoud C, Mullen C, Rhoads J, Smith JB, Bitbol A, *et al.* Characterization of a new sensitive PCR assay for quantification of viral DNA isolated from patients with hepatitis B virus infections. *J Clin Microbiol* 2007 ; 45 : 3948-53.
37. EASL clinical practice guidelines. Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011 ; 55 : 245-64.
38. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011 ; 54 : 1433-44.
39. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM. Performance of the Abbott real-time PCR assay using m2000sp and m2000rt for hepatitis C virus RNA quantification. *J Clin Microbiol* 2009 ; 47 : 1726-32.
40. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Rodriguez C, Soulier A, Poveda JD, Pawlotsky JM. The Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV test, version 2.0, real-time PCR assay accurately quantifies hepatitis C virus genotype 4 RNA. *J Clin Microbiol* 2013 ; 51 : 1078-82.
41. Drexler JF, Reber U, Wuttkopf A, Eis-Hubinger AM, Drosten C. Performance of the novel Qiagen artus QS-RGQ viral load assays compared to that of the Abbott real-time system with genetically diversified HIV and hepatitis C virus plasma specimens. *J Clin Microbiol* 2012 ; 50 : 2114-7.
42. Zitzer H, Heilek G, Truchon K, Susser S, Vermehren J, Sizmman D, *et al.* Second-generation Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV quantitative test for viral load monitoring: a novel dual-probe assay design. *J Clin Microbiol* 2013 ; 51 : 571-7.
43. Le Gal F, Gordien E, Affolabi D, Hanslik T, Alloui C, Deny P, *et al.* Quantification of hepatitis delta virus RNA in serum by consensus real-time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients. *J Clin Microbiol* 2005 ; 43 : 2363-9.
44. Katsoulidou A, Manesis E, Rokka C, Issaris C, Pagoni A, Sypsa V, *et al.* Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of hepatitis D virus RNA to study viral kinetics in chronic hepatitis D. *J Viral Hepat* 2013 ; 20 : 256-62.

45. Kodani M, Martin A, Mixson-Hayden T, Drobeniuc J, Gish RR, Kamili S. One-step real-time PCR assay for detection and quantitation of hepatitis D virus RNA. *J Virol Methods* 2013 ; 193 : 531-5.
46. Brichler S, Le Gal F, Butt A, Chevret S, Gordien E. Commercial real-time reverse transcriptase PCR assays can underestimate or fail to quantify hepatitis delta virus viremia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013 ; 11 : 734-40.
47. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977 ; 265 : 687-95.
48. Buster EH, Janssen HL. The importance of HBV genotype in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients in whom sustained response is pursued. *J Hepatol* 2011 ; 54 : 395-6.
49. Raimondi S, Maisonneuve P, Bruno S, Mondelli MU. Is response to antiviral treatment influenced by hepatitis B virus genotype? *J Hepatol* 2010 ; 52 : 441-9.
50. Le Gal F, Gault E, Ripault MP, Serpaggi J, Trinchet JC, Gordien E, *et al.* Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis* 2006 ; 12 : 1447-50.
51. Shivkumar S, Peeling R, Jafari Y, Joseph L, Pai NP. Rapid point-of-care first-line screening tests for hepatitis B infection: a meta-analysis of diagnostic accuracy (1980-2010). *Am J Gastroenterol* 2012 ; 107 : 1306-13.
52. Bottero J, Boyd A, Gozlan J, Lemoine M, Carrat F, Collignon A, *et al.* Performance of rapid tests for detection of HBsAg and anti-HBsAb in a large cohort, France. *J Hepatol* 2013 ; 58 : 473-8.
53. Chevaliez S, Challine D, Naija H, Luu T, Laperche S, Nadala L, *et al.* Performance of a new rapid test for the detection of hepatitis B surface antigen in various patient populations. *J Clin Virol* 2014 ; 59 : 89-93.
54. Kant J, Moller B, Heyne R, Herber A, Bohm S, Maier M, *et al.* Evaluation of a rapid on-site anti-HCV test as a screening tool for hepatitis C virus infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013 ; 25 : 416-20.
55. Shivkumar S, Peeling R, Jafari Y, Joseph L, Pant Pai N. Accuracy of rapid and point-of-care screening tests for hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012 ; 157 : 558-66.
56. Chevaliez S, Poiteau L, Rosa I, Soulier A, Roudot-Thoraval F, Hézode C, *et al.* Performance of rapid diagnostic tests (RDT) for broad-scale HCV screening. *Hepatology* 2014 (sous presse).
57. 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 : 825-31.
58. Liaw YF. Utility of hepatitis B surface antigen quantitation in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2011 ; 53 : 2121-9.
59. Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang TJ, *et al.* Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology* 2008 ; 134 : 405-15.
60. Zoutendijk R, Reijnders JG, Brown A, Zoulim F, Mutimer D, Deterding K, *et al.* Entecavir treatment for chronic hepatitis B: adaptation is not needed for the majority of naive patients with a partial virological response. *Hepatology* 2011 ; 54 : 443-51.
61. Olivero A, Smedile A. Hepatitis delta virus diagnosis. *Semin Liver Dis* 2012 ; 32 : 220-7.
62. Williams V, Brichler S, Radjef N, Lebon P, Goffard A, Hober D, *et al.* Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *J Gen Virol* 2009 ; 90 : 2759-67.
63. Castelnau C, Le Gal F, Ripault MP, Gordien E, Martinot-Peignoux M, Boyer N, *et al.* Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology* 2006 ; 44 : 728-35.