

**MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE
ET DE L'ASSURANCE MALADIE
8, avenue de Ségur
75350 - Paris 07 SP**

Direction des Hôpitaux

Paris, le 27 juin 1995

Mission SIDA

Réf. : DH/EO2/FBn° 505
Affaire suivie par François Bourdillon
Tél : 40.56.52.77
Fax : 40.56.58.3

O Madame le Professeur F. BRUN-VEZINET
Hôpital Bichat Claude Bernard

et

Monsieur le Professeur J. DORMONT
Hôpital Antoine Béchère

Madame, Monsieur,

La mise à disposition d'une mesure de la charge virale (quantification de l'ARN plasmatique) pour les cliniciens est à l'ordre du jour. En effet, plusieurs travaux de recherche montrent l'existence d'une corrélation entre charge virale et évolution clinique. Les stratégies thérapeutiques en matière de prescription d'antirétroviraux pourraient en être modifiées.

Il apparaît nécessaire de réunir un groupe d'experts afin de procéder, à la lumière des acquis récents de la recherche, à un examen des indications de prescription de tests de charge virale et de leurs conséquences thérapeutiques. Je vous remercie d'avoir bien voulu accepter de présider un groupe d'experts sur les modalités de prescription de la charge virale chez les patients atteints par le VIH et ses conséquences en matière de suivi et de stratégie thérapeutique.

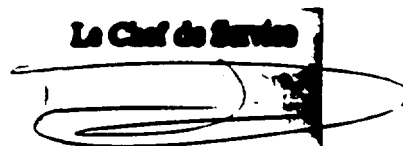
Je vous confirme que la première réunion du groupe aura lieu le **4 juillet 1995**, au :

**Ministère de la Santé Publique et de l'Assurance Maladie
8, avenue de Ségur
75007 - Paris**

**Salle 5001
de 9 h 30 à 12 h 00**

Je souhaite que des premières recommandations puissent m'être proposées dès le début de l'année 1996.

En vous remerciant de votre concours, veuillez agréer, Madame, Monsieur, à l'expression de toute ma considération.

Le Chef de Service

Jacques LENAIN

SOMMAIRE

I - Synthèse des recommandations	4
1 - Remarques préliminaires	
2 - Méthodes de mesure	
3 - Surveillance des personnes asymptomatiques non traitées	
4 - Surveillance des personnes traitées par les antirétroviraux	
5- Situations particulières (femmes enceintes, nouveau-nés, primo-infection symptomatique)	
6 - Suivi biologique	
 II - Annexes élaborées par le groupe d'experts	 11
1 - Méthodes de mesure	
2 - Personnes asymptomatiques non traitées	
3 - Patients traités par les antirétroviraux	
 III - Liste des experts	 25

**RAPPORT DU GROUPE D'EXPERTS
SUR LES MODALITES DE PRESCRIPTION DE LA MESURE DE LA CHARGE
VIRALE (ARN VIH plasmatique) CHEZ LES PERSONNES ATTEINTES PAR LE VIH
ET SES CONSEQUENCES EN MATIERE DE SUIVI
ET DE STRATEGIE THERAPEUTIQUE**

Janvier 1996

SYNTHESE DES RECOMMANDATIONS

1 - Remarques préliminaires

1.1 - Le groupe d'experts a établi, à la lumière des données disponibles, des recommandations relatives aux modalités d'utilisation de la charge virale comme outil de surveillance individuelle et d'aide à la décision thérapeutique chez les personnes atteintes par le VIH-1, à l'exclusion des études virologiques intégrées aux essais thérapeutiques.

1.2 - Le groupe d'experts assimile la mesure de la charge virale à la quantification de l'ARN VIH plasmatique, conformément à la plupart des publications. Cette approche semble actuellement la meilleure pour évaluer la réplication du VIH dans l'organisme. En effet, des méthodes quantitatives standardisées sont disponibles. D'autre part, il est établi que la charge virale ainsi définie est prédictive de l'évolution de l'infection par le VIH, indépendamment de l'information apportée par l'évolution du taux des lymphocytes CD4. On ne peut exclure, dans l'avenir, l'intérêt d'autres méthodes comme celle de la mesure de l'ADN viral cellulaire.

1.3 - La mesure de la charge virale doit être accessible, dans les conditions de qualité requises, aux laboratoires de virologie, notamment à ceux qui sont en relation avec les centres cliniques prenant en charge les personnes atteintes par le VIH. Il conviendra que soient mis en place des moyens en personnel et en fonctionnement permettant à chaque laboratoire de virologie d'appliquer les recommandations du présent rapport.

1.4 - Etant donné la variabilité liée à des paramètres techniques et cliniques, il est prudent de ne pas prendre de décision sur la seule mesure de charge virale et de confronter son résultat au contexte clinique et au taux des lymphocytes CD4.

1.5 - Compte tenu des difficultés de mesure et d'interprétation de la résistance aux antirétroviraux, le groupe d'experts considère qu'une telle recherche ne doit pas actuellement entrer dans la pratique médicale courante. La mesure de la charge virale est un moyen global de mettre en évidence l'échec thérapeutique quelle qu'en soit la cause.

1.6 - Pour éviter des doubles emplois et des examens devenus inutiles, le groupe d'experts a redéfini le suivi biologique des personnes atteintes par le VIH en déconseillant certains examens, sauf circonstances particulières.

1.7 - Conformément à la lettre de mission qu'ils ont reçue, les experts ont limité leur recommandations aux mesures de la charge virale et à leur interprétation. Ils n'ont pas abordé directement les indications thérapeutiques des antirétroviraux qui doivent faire l'objet d'un autre rapport d'experts.

1.8 - Les présentes recommandations mériteront d'être actualisées en fonction des progrès techniques et des acquis scientifiques ultérieurs.

2 - Méthodes de mesure et expression des résultats.

2.1 - Méthodes de mesure.

Parmi les techniques permettant la quantification de l'ARN plasmatique du VIH-1 seules les trousse commerciales bien standardisées et aptes à évaluer un grand nombre de prélèvements ont été considérées.

Trois trousse sont actuellement disponibles : Quantiplex HIV RNA (Chiron), Nasba QR System (Organon Teknika) et Amplicor HIV-1 Monitor (Roche Diagnostic Systems). Dans l'annexe 1 sont détaillées pour chacune d'elles : caractéristiques techniques, limites de détection, capacité à déceler les différents sous-types de VIH-1 groupe M. reproductibilité et conditions pratiques d'utilisation.

Chacune des trousse ayant des caractéristiques qui lui sont propres, il n'est pas possible de recommander plus particulièrement l'une d'elles. Les conditions d'utilisation de ces trousse sont différentes et doivent être strictement respectées par les utilisateurs (Cf. Annexe 1). Il faut souligner ce qui suit :

- la mesure de l'ARN doit s'effectuer sur du plasma à partir de sang recueilli sur citrate ou EDTA.

- le transport du sang total jusqu'au laboratoire ne doit pas excéder deux heures pour la trousse Organon, trois heures pour la trousse Roche et six heures pour celle de Chiron.

- dès sa réception au laboratoire, le sang doit être centrifugé et le plasma gardé à - 80° C.

- la variabilité totale incluant celle de la technique de mesure et la variabilité biologique est actuellement estimée à 0,5 log, c'est à dire une variation d'un facteur 3 entre deux prélèvements.

- des infections aiguës (par exemple grippe, herpès) et des vaccinations peuvent modifier transitoirement la charge virale. Il convient donc d'éviter toute mesure dans ces circonstances.

Il existe une bonne concordance des titres d'ARN plasmatique d'un même échantillon mesuré par les différentes trousse actuelles dans les limites de détection de chacune d'elles. Ceci démontre qu'il n'est pas nécessaire de répéter les mesures avec plusieurs trousse différentes dans le but de contrôler un résultat. Cependant, pour l'étude individuelle et séquentielle des titres d'ARN plasmatique chez un même patient, il est recommandé d'utiliser la même trousse.

2.2 - Expression des résultats par le laboratoire

Le laboratoire doit rendre les résultats avec les précisions suivantes :

- trousse utilisée,
- valeur seuil de la technique,
- nombre de copies ou d'équivalent copies par ml de plasma.

Il serait utile que les résultats antérieurs soient édités simultanément.

Chacune des trousse de mesure est susceptible d'évoluer à court terme. D'autres trousse commerciales seront proposées et devront faire l'objet d'une évaluation technique avant d'être soumises à l'enregistrement par l'Agence du Médicament.

3 - Surveillance des personnes asymptomatiques, non traitées.

3.1 - Chez l'adulte asymptomatique non traité, il est proposé, à titre de guide provisoire, de retenir les valeurs-seuil suivantes :

- une charge virale $> 10^5$ copies d'ARN/ml peut être considérée comme "élevée",
- une charge virale $< 10^4$ copies d'ARN/ml peut être considérée comme "basse".

Cependant, les données validant l'utilisation de la mesure de la charge virale dans la décision de mise en route d'un traitement antirétroviral sont encore insuffisantes. C'est pourquoi une indication de mise en route d'un tel traitement ne peut reposer sur la base exclusive d'une seule détermination de la charge virale. Le processus décisionnel doit intégrer les données cliniques, le taux (et l'évolution du taux) des lymphocytes CD4, le niveau (et l'évolution du niveau) de la charge virale.

3.2 - Il est proposé d'intégrer la mesure de la charge virale dans le bilan de surveillance des personnes atteintes par le VIH, sur la base d'une détermination semestrielle.

3.3 - Chez les personnes ayant un taux de lymphocytes CD4 $> 500/\text{mm}^3$, un niveau de charge virale $> 10^5$ copies d'ARN/ml, ce qui est peu fréquent, justifie de rapprocher la surveillance clinique et virologique.

3.4 - Chez les malades ayant un taux de lymphocytes CD4 $< 500/\text{mm}^3$:

- un niveau de charge virale $< 10^4$ copies d'ARN/ml justifie une surveillance simple, avec un suivi semestriel de la charge virale,
- un niveau de charge virale $> 10^5$ copies d'ARN/ml, contrôlé sur un deuxième prélèvement à un mois d'intervalle, constitue probablement un des arguments en faveur de la mise en route d'un traitement antirétroviral.

4 - Surveillance des personnes traitées par les antirétroviraux

4.1. - La mesure de la charge virale plasmatique peut permettre au clinicien d'apprécier l'effet antirétroviral du traitement administré et de détecter les situations d'échec thérapeutique.

4.2 - Compte tenu des limites des connaissances sur la valeur pronostique individuelle des valeurs et des modifications de la charge virale, il est proposé que puissent être effectuées, de manière non obligatoire (ou non systématique) et selon l'indication du médecin clinicien. chez un patient traité par antirétroviraux. entre une et au plus quatre mesures de charge virale par an.

Une première mesure de la charge virale sera réalisée à l'institution du traitement antirétroviral. Une autre mesure, effectuée dans les trois mois après l'initiation d'un traitement, permettra d'avoir une estimation de son effet antiviral. Le moment idéal des mesures ultérieures dépend du schéma thérapeutique proposé et du taux de lymphocytes CD4. La fréquence des mesures de charge virale doit être d'autant plus faible que l'effet attendu du traitement entrepris est prolongé (associations d'antirétroviraux). Dans tous les cas, l'interprétation de la charge virale devra prendre en compte l'état clinique et le taux de lymphocytes CD4.

Lorsque le résultat de la mesure de charge virale incite à modifier le traitement. et lorsque ce paramètre constitue le seul critère, il est conseillé de confirmer le résultat par une nouvelle mesure avant de changer de thérapeutique. Dans l'état actuel des connaissances. une absence de diminution de la charge virale ou le retour à la valeur de base et a fortiori une augmentation au delà de celle-ci, suggèrent l'inefficacité du traitement en cours.

4.3 - Chez les patients déjà en cours de traitement au moment où ces recommandations seront diffusées et pour lesquels la charge virale avant la mise en route du traitement n'est pas connue, il sera réalisé une mesure de charge virale qui servira de valeur de référence pour la surveillance thérapeutique ultérieure.

5 - Situations particulières : femme enceinte, nouveau-né et nourrisson, primo-infection symptomatique.

5.1 - Femme enceinte.

Il peut être important de déterminer la charge virale chez une femme infectée par le VIH et désireuse d'entreprendre une grossesse ou s'interrogeant sur l'opportunité de poursuivre une grossesse débutante. En effet, une charge virale élevée est associée à une majoration du risque de transmission materno-foetale du VIH.

La connaissance de la charge virale en cours de grossesse ne doit pas modifier les indications et les modalités du traitement antirétroviral visant à réduire le risque de transmission materno-foetale du VIH.

Après l'accouchement, la surveillance de la charge virale sera effectuée selon les recommandations générales définies pour le suivi de l'adulte et sera associée à la surveillance de l'évolution clinique et du taux des lymphocytes CD4.

5.2 - Nouveau-né et nourrisson.

Chez les enfants pour lesquels le diagnostic d'infection à VIH est établi, il paraît raisonnable de prévoir trois déterminations de la charge virale au cours de la première année de vie : vers l'âge de trois mois, six mois et un an. Par la suite, l'enfant sera suivi selon le même calendrier que l'adulte. Il n'est pas possible actuellement de définir chez le petit enfant des stratégies thérapeutiques en fonction de la charge virale.

5.3 - Personne présentant un syndrome de primo-infection symptomatique.

La détection de l'antigénémie p24 reste, avec la recherche des anticorps, l'élément fondamental du diagnostic. La mesure de la charge virale n'est pas utile à celui-ci.

Lorsqu'un traitement antirétroviral est entrepris, la détermination de la charge virale peut trouver sa place, notamment après quelques mois de traitement, pour adapter la conduite thérapeutique.

6 - Suivi biologique

Le groupe de travail a actualisé les examens recommandés dans le cadre du suivi biologique d'un adulte séropositif pour le VIH, à partir des données du rapport du groupe d'experts de l'année 1993¹. Cette actualisation a pour but d'éviter des examens devenus inutiles ou redondants par rapport à l'étude de la charge virale.

¹ Prise en charge des personnes atteintes par le VIH - Flammarion Médecine Sciences - 1993

6.1 - Bilan initial

a) Examens recommandés

- . Sérologie VIH. La séropositivité doit toujours être confirmée sur deux prélèvements et par un Western Blot (ou un autre test de confirmation homologué) sur l'un des prélèvements.
- . NFS avec plaquettes,
- . Typage lymphocytaire CD3/CD4 et éventuellement CD8,
- . Sérologie de la syphilis,
- . Sérologie des hépatites B et C,
- . Transaminases,
- . Sérologie de la toxoplasmose. Une sérologie négative justifierait un contrôle annuel et des mesures de prévention hygiéno-diététiques,
- . Sérologie du cytomégalo virus. Une sérologie négative justifierait des précautions transfusionnelles,
- . Radiographie du thorax,
- . IDR à la tuberculine (10 U),
- . Charge virale. Il convient d'être attentif aux circonstances dans lesquelles la mesure de la charge virale n'est pas souhaitable et devra être reportée : infection aiguë (par exemple. grippe, herpès), vaccinations, etc...

b) Examens devenus inutiles et déconseillés (sauf indications particulières).

- . Béta -2 -microglobuline.
- . Antigénémie p24. Cependant, ce test garde tout son intérêt en cas de primo-infection (voir 6.3),
- . Anticorps anti-p24.
- . Electrophorèse des protéides.
- . Dosage des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM),
- . Immunoélectrophorèse du sérum,
- . Néoptérine.

6.2 - *Suivi biologique.*

a) Examens recommandés

- . NFS plaquettes avec typage lymphocytaire CD3/CD4 et éventuellement CD8,
- . Ce bilan sera réalisé tous les six mois si le nombre de lymphocytes CD4 est > 500, et tous les trois mois s'il est compris entre 200 et 500. Chez les patients ayant moins de 50 lymphocytes CD4, non traités, la mesure des lymphocytes CD3/CD4 paraît inutile sauf si un nouveau traitement est envisagé,
- . Charge virale (voir rapport),
- . Détection virologique du cytomegalovirus (CMV). Aucune recommandation ne peut être actuellement formalisée. En revanche, la surveillance régulière du fond d'oeil doit être systématique chez les patients ayant moins de 50 CD4 et une sérologie CMV positive,
- . Sérologie de la toxoplasmose. Un contrôle annuel de cette sérologie est souhaitable chez des personnes dont la sérologie initiale était négative.

b) Examens devenus inutiles et déconseillés (sauf indications particulières).

Voir chapitre 6-1 b

6.3 - *Primo-infection*

Le groupe d'experts rappelle que la mesure de l'antigène p24, reste appropriée pour permettre un diagnostic de primo-infection. En effet, ce test peut être facilement réalisé a posteriori sur un prélèvement de sérum, sans équipement sophistiqué. De plus, il n'existe actuellement pas de données suffisantes pour connaître les sensibilités respectives de la mesure de l'antigénémie et de la charge virale dans cette circonstance.

ANNEXES

- Annexe 1 : Méthodes de mesure de la charge virale VIH-1
- Annexe 2 : Charge virale chez les personnes asymptomatiques non traitées
- Annexe 3 : Charge virale chez les patients traités par antirétroviraux

ANNEXE 1

Méthodes de mesure de la charge virale VIH-1 (ARN VIH plasmatique)

La quantification de l'ARN plasmatique du VIH-1, pour être effectuée selon des techniques standardisées permettant de tester un grand nombre de prélèvements, doit recourir à des trousseaux commerciaux. Nous n'avons donc pas retenu les techniques développées individuellement dans différents laboratoires de recherche. Trois trousseaux commerciaux sont actuellement disponibles :

- QUANTIPLEX HIV RNA (Chiron),
- NASBA QR System (Organon Teknika).
- AMPLICOR HIV1 - MONITOR (Roche Diagnostic Systems),

Sur demande de l'Agence du Médicament, les trois firmes concernées ont fait parvenir les documents décrivant les caractéristiques techniques et scientifiques de leurs trousseaux. Ce rapport est un résumé des données disponibles sur la sensibilité, la reproductibilité et les conditions techniques de leur utilisation. Au plan administratif seule la Société CHIRON, à la date du 17 janvier 1996, a déposé un dossier d'enregistrement de son réactif. Les deux autres Sociétés ont été invitées à déposer leur dossier dans les meilleurs délais.

1 - Principe et description des techniques

Les trois trousseaux utilisent des techniques différentes d'amplification pour la mesure de l'ARN plasmatique.

a) La technique Quantiplex HIV RNA (Chiron) utilise une amplification du signal d'hybridation moléculaire. L'ARN viral contenu dans l'échantillon à tester, après libération, est capturé sur une microplaque de 96 puits par des sondes constituées d'oligonucléotides de synthèse, complémentaires du gène pol.

Par utilisation de sondes d'ADN branché, marquées à la phosphatase alcaline, on obtient une amplification d'environ 1800 fois par molécule d'ARN viral. Après adjonction de substrat, la réaction de chimioluminescence est mesurée dans un luminomètre. Le nombre de photons émis est proportionnel à la quantité d'ARN présent dans l'échantillon. Chaque échantillon est analysé en double, le résultat n'est pas validé quand le coefficient de variation entre les duplicates est supérieur à 30 %. Une courbe d'étalonnage est obtenue à partir de quatre étalons contenant respectivement 1×10^4 , 4×10^4 , 2×10^5 et $1,6 \times 10^6$ molécules d'ADN simple brin. La quantité d'ARN de l'échantillon est calculée par un logiciel à partir de cette courbe d'étalonnage. Il n'y a pas de contrôle interne à chaque échantillon testé.

b) La technique Nasba QR System (Organon Teknika) utilise une amplification isotherme de l'ARN. L'ARN extrait de l'échantillon est rétrotranscrit en ADN, par la reverse transcriptase du virus de la myéloblastose aviaire, en utilisant des amorces qui reconnaissent 149 paires de bases du gène gag et une partie du gène pol. L'ARN est ensuite détruit par la RNase H. Puis l'ADN viral est transcrit en ARN par une T7 RNA polymérase, qui génère quelque 100 copies d'ARN à partir d'une copie d'ADN. Ces trois étapes génèrent, en quelques cycles répétés, une amplification d'environ 10^9 fois la quantité d'ARN présente dans l'échantillon. Cette technique d'amplification s'effectue en présence de trois contrôles internes, contenant respectivement 10^4 , 10^5 et 10^6 copies, qui sont mélangés à l'échantillon, et qui diffèrent de l'ARN du VIH par 20 nucléotides. En utilisant des sondes oligonucléotidiques différentes marquées par électroluminescence, les contrôles internes et le produit d'amplification sont détectés séparément. Le nombre de copies d'ARN contenues dans l'échantillon est calculé par un logiciel à partir du rapport du signal de l'échantillon et de chacun des trois contrôles internes.

c) La technique Amplicor HIV-1 Monitor (Roche Diagnostic Systems) est basée sur la technique classique de RT - PCR, utilisant une ADN polymérase thermostable (activité polymérase et reverse transcriptase) avec des amorces qui reconnaissent 142 paires de bases dans le gène gag et dont l'une est biotinylée en 5'. L'extraction de l'ARN du plasma s'effectue en présence d'un contrôle interne dont le nombre de copies d'ARN est connu et qui sert de standard de quantification. Après reverse transcription et amplification par PCR, la détection des produits amplifiés VIH et du contrôle interne s'effectue dans des cupules d'une microplaque, où sont fixées des sondes spécifiques de chacune d'entre elles. Six dilutions de raison 5 du produit amplifié sont analysées. La lecture s'effectue sur un spectrophotomètre, après révélation de la fixation des produits amplifiés sur différentes sondes et des contrôles internes par un système avidine-biotine. Le nombre de copies de chaque échantillon est calculé par rapport à son propre standard interne par un logiciel.

2 - Limites de détection

Les limites de détection des trois trousse sont différentes :

La trousse Quantiplex Chiron, actuellement disponible, a une limite inférieure de détection de 10 000 équivalents copies/ml de plasma. Les résultats sont interprétables jusqu'à $1,6 \times 10^6$ copies/ml. Lorsque la quantité d'ARN est supérieure, l'échantillon doit être retesté après dilution.

La trousse Nasba Organon a une limite inférieure de détection variable selon le volume initial de l'échantillon : 400 copies d'ARN/ml pour un volume initial de 1 ml et 4 000 copies d'ARN/ml pour un volume de 100 µl. Les résultats sont interprétables sans dilution supplémentaire jusqu'à 10^7 copies par ml.

La trousse Monitor Roche permet de détecter entre 400 et $1,5 \times 10^6$ copies d'ARN/ml. En fait, la limite inférieure de détection varie selon les résultats du contrôle interne entre 160 et 400 copies. Les échantillons contenant plus de $1,5 \times 10^6$ copies doivent être retestés après dilution.

3 - Détection des sous-types de VIH-1 groupe M

Les virus VIH-1 sont classés en sous-types ; actuellement 10 sous-types (A - J) ont été décrits. Plusieurs études ont montré que la trousse Quantiplex Chiron reconnaît les différents sous-types de A à F. La détection des différents sous-types, hormis le sous-type B, par la trousse quantitative Monitor, n'est pas évaluée avec précision. La trousse Amplicor qualitative Roche, utilisant les mêmes sondes, a un défaut de reconnaissance de certains sous-types, en particulier le sous-type A, fréquent en Afrique. La détection des différents sous-types par la trousse Nasba semble rencontrer les mêmes difficultés que celles de la trousse Roche.

Ces trois trousses ne peuvent quantifier que les VIH-1 groupe M ; ils ne détectent ni VIH-2, ni VIH-1 groupe O.

4 - Reproductibilité

La reproductibilité d'une trousse commerciale doit être étudiée en répétant la mesure d'un même échantillon :

- au cours de la même manipulation : reproductibilité intra-essai,
- au cours de différentes manipulations par un même manipulateur : reproductibilité inter-essai,
- au cours de différentes manipulations par des manipulateurs différents : reproductibilité inter-laboratoire,
- avec différents lots : reproductibilité inter-lot.

Les documents actuellement disponibles montrent que la reproductibilité des trois trousses a été diversement étudiée.

a) Trousse Quantiplex Chiron

La reproductibilité intra-essai a été évaluée à de nombreuses reprises : le coefficient de variation est compris entre 7 et 10 %. L'étude de la reproductibilité inter-essai montre un coefficient de variation compris entre 12 et 22 %.

Évaluée sur les mêmes 20 échantillons de plasmas de patients, que ceux décrits pour la trousse Monitor Roche (voir ci-après), la moyenne des écarts entre deux mesures du même échantillon a été de 0,16 log pour la reproductibilité intra-essai.

b) Trousse Nasba Organon

La reproductibilité de cette trousse, dont la diffusion est moins grande que celle des deux autres, est moins bien connue. La reproductibilité intra-essai varie entre 0,07 et 0,47 log.

c) Trousse Monitor Roche

Les études réalisées montrent sur des plasmas de patients les résultats suivants :

- une reproductibilité intra-essai (dix échantillons en duplicate), exprimée en coefficient de variation, comprise entre 3,5 et 27 %.
- une reproductibilité inter-essai comprise entre 9 et 45 %.
- une reproductibilité interlaboratoire comprise entre 18 et 43 %.

Exprimée en écart-type de la mesure exprimée en log (déviation standard), cette reproductibilité intra-essai et inter-essai est en moyenne de 0,09 log et inter-laboratoire de 0,23 log.

Une étude réalisée par la firme Roche à partir de 20 plasmas recueillis chez des patients, codés, et testés en duplicate montre un écart-type moyen de 0.19 log pour la reproductibilité inter-essai.

**Tableau de correspondance entre
la variation des titres en nombre de copies et la variation en log 10**

Variation du titre d'ARN	
Nombre de copies (multiplié ou divisé par)	en log 10 (augmentation ou diminution de)
1,5	0.18
2	0.30
3	0.48
4	0.60
5	0.70
6	0.78
7	0.85
8	0.90
9	0.95
10	1.00
100	2.00
1000	3.00

5 - Comparaison des trois trousse dans le cadre de l'essai Delta.

Une évaluation a comparé les trois trousse dans trois laboratoires européens sur des échantillons codés, comprenant :

- des dilutions de plasmas reconstitués (22), testées en duplicate au cours de la même manipulation et au cours de manipulations différentes.
- des échantillons de plasmas de 21 patients testés en duplicate au cours de la même manipulation.

Pour les dilutions de plasmas reconstitués, la reproductibilité inter-laboratoire exprimée en écart-type de la mesure exprimée en log est comprise : pour la trousse Monitor Roche entre 0,06 et 0,45 ; pour la trousse Quantiplex Chiron entre 0,05 et 0,12 ; pour la trousse Nasba Organon entre 0,09 et 0,49.

Pour les échantillons de patients, la reproductibilité inter-laboratoire est comprise entre 0,08 et 0,33 pour Monitor, 0,01 et 0,19 pour Quantiplex et 0,07 et 0,32 pour Nasba. Il faut remarquer que la reproductibilité des mesures est moins bonne pour les échantillons avec un nombre de copies d'ARN relativement faible, c'est à dire < 1000 copies/ml pour la trousse Monitor Roche et < 10 000 copies/ml pour la trousse Nasba Organon.

Pour ces trois trousse, il faut noter qu'il n'y avait pas de différence dans un même laboratoire entre la reproductibilité intra-essai et inter-essai.

Cette étude a montré que la trousse Quantiplex Chiron a la meilleure reproductibilité (mesure du coefficient de corrélation intra-classe). Les trousse Nasba et Roche ont une reproductibilité équivalente. Cette étude a également montré qu'il y avait une excellente concordance entre le nombre de copies d'ARN mesuré par les trois trousse dans les limites de détection de celles-ci. Cette étude n'a pas évalué la reproductibilité inter-lot de chaque trousse.

6 - Conditions pratiques des tests.

a) Volume de plasma

Le volume de plasma nécessaire à la réalisation de chaque test est de :

- 200 µl pour la trousse Monitor Roche
- 2 ml pour la trousse Quantiplex Chiron
- pour la trousse Nasba Organon : 100 µl pour une limite inférieure de détection de 4 000 copies et 1 ml pour une limite de 400 copies.

b) Anticoagulant

La trousse Monitor Roche impose l'utilisation de plasma collecté à partir de sang recueilli sur EDTA ou citrate. Il faut noter que les tubes citratés contenant 1 ml d'anticoagulant entraînent une dilution du plasma avec un rapport des titres EDTA/Citrate de l'ordre de 1,5 ; ce fait est valable pour les trois tests. La trousse Monitor ne peut pas être utilisée à partir de sang recueilli sur Héparine. Dans une étude comparant les titres obtenus à partir de 42 échantillons de sérums et plasmas, il a été montré que les titres sériques sont inférieurs de 0,7 à 5,5 fois ceux du plasma (en moyenne deux fois).

La trousse Quantiplex Chiron a été essentiellement testée sur des plasmas collectés à partir de sang recueilli sur EDTA ou citrate. Les données comparant les valeurs obtenues à partir d'échantillons sériques et plasmatiques seront bientôt disponibles. Il semblerait que lorsque les plasmas sont recueillis sur héparine, les titres d'ARN plasmatique soient plus bas. Les plasmas hémolysés ne doivent pas être utilisés.

La trousse Nasba Organon peut être utilisée également sur sérum ou sur plasma, ce dernier pouvant être recueilli à partir de sang prélevé sur héparine, citrate ou EDTA.

En conclusion, il est recommandé pour toute étude de l'ARN VIH plasmatique de réaliser les prélèvements de sang sur tube contenant du citrate ou de l'EDTA.

c) Transport

Le délai de transport entre le prélèvement du sang total et le recueil de plasma ne doit pas excéder 3 h pour la trousse Monitor Roche. 6 h pour la trousse Quantiplex Chiron. et 2 h pour la trousse Nasba Organon.

d) Prise en charge du prélèvement au laboratoire

Dès réception au laboratoire, le sang doit-être centrifugé et les échantillons de plasma stockés à - 80°C.

e) Nombre d'échantillons évaluable par jour

Un technicien plein temps et entraîné peut tester par jour vingt échantillons avec les trousse Monitor Roche et Quantiplex Chiron et environ dix échantillons avec la trousse Nasba Organon.

7 - Expression des résultats par le laboratoire

Le laboratoire doit rendre les résultats avec les précisions suivantes :

- trousse utilisée,
- valeur seuil de la technique,
- nombre de copies ou d'équivalent copies par ml de plasma.

Il serait utile que les résultats antérieurs soient édités simultanément.

Chacune des trousses de mesure est susceptible d'évoluer à court terme. D'autres trousses commerciales seront proposées et devront faire l'objet d'une évaluation technique avant d'être soumises à l'enregistrement par l'Agence du Médicament.

8 - Conclusion

Ce document n'est que le reflet de la situation actuelle. D'autres trousses commerciales seront proposées à court terme ; il conviendra alors de les soumettre au groupe d'experts "Biologie Moléculaire de l'Agence du Médicament".

Chacune de ces trois trousses présente des avantages et des inconvénients. Il n'est donc pas possible d'en recommander une pour toutes les situations. Il faut rappeler qu'il y a une bonne concordance des titres d'ARN plasmatique entre les trousses, dans leurs limites de détection. Ceci démontre qu'il n'est pas nécessaire de répéter les mesures sur plusieurs trousses, dans le but de confirmer un résultat. Cependant, pour l'étude séquentielle des titres d'ARN plasmatique chez un même patient, il est recommandé d'utiliser la même trousse.

Il faut enfin rappeler que chacune de ces trousses est susceptible d'évoluer à court terme.

ANNEXE 2

Charge virale chez les personnes asymptomatiques non traitées.

Les objectifs du groupe de travail étaient d'essayer d'établir, à la lumière des données scientifiques disponibles, des recommandations relatives aux modalités d'utilisation de la charge virale comme outil de surveillance et d'aide à la décision thérapeutique chez les personnes atteintes par le VIH, asymptomatiques ou ne recevant pas de traitement antirétroviral. Ce point est essentiel : il ne s'agit pas de développer des axes de recherche clinique mais d'utiliser au mieux les résultats actuels de cette recherche pour optimiser la prise en charge des malades dans la pratique médicale courante. Dans la réflexion du groupe et dans le présent document, la charge virale a été définie comme la mesure de l'ARN viral plasmatique.

Pour répondre à l'objectif assigné, le groupe a dans un premier temps identifié les problèmes posés en formulant les questions suivantes auxquelles il s'est attaché à répondre avant de formuler des recommandations.

- Quelle est la signification pronostique de la charge virale ?
- Comment tenir compte de cette information pronostique dans la prise en charge individuelle d'un patient particulier ?
- Quelle doit être la périodicité optimale des déterminations de la charge virale chez un patient donné ?
- Est-il possible de définir une valeur seuil de charge virale qui soit pertinente en terme de pronostic ?
- Indépendamment d'une valeur absolue de charge virale, est-il plus pertinent de s'intéresser à des variations de celle-ci ?
- Comment utiliser les résultats de la quantification virale dans la décision thérapeutique chez un malade donné ?

Le groupe a formulé des recommandations générales pour l'adulte atteint par le VIH, asymptomatique et/ou non traité par antirétroviraux et des recommandations spécifiques pour des situations particulières : femmes enceintes, nouveau-nés, malades présentant un syndrome de primo-infection symptomatique.

a) **Recommandations générales pour l'utilisation de la charge virale dans la surveillance et le traitement des personnes atteintes par le VIH, asymptomatiques, non traitées par antirétroviraux**

Il existe un nombre croissant de données publiées ou en cours de publication qui confirment que la charge virale a une signification pronostique et une bonne valeur prédictive de l'évolution de l'infection par le VIH. Une valeur élevée de charge virale est un facteur prédictif de progression de la maladie et inversement un bas niveau de charge virale est un facteur prédictif de stabilité relative de la maladie. D'autre part, une augmentation du niveau de charge virale est corrélée avec une augmentation du risque de progression de la maladie.

Il a été montré également que la valeur prédictive de la charge virale est indépendante de celle des lymphocytes CD4.

Cependant, la mesure de la charge virale est sujette à des variations intra-individuelles. On considère ainsi qu'une variation inférieure à 0,5 log n'est pas significative (NB : une augmentation de 0.5 log correspond à une multiplication du nombre de copies par un facteur 3). Cette variabilité de la mesure de la charge virale doit impérativement être prise en compte dans la détermination de valeurs - seuil. D'après les données de la littérature, et en tenant compte de cette variabilité, il est proposé de retenir les valeurs - seuil suivantes :

- une charge virale $> 10^5$ copies d'ARN/ml peut être considérée comme "élevée",
- une charge virale $< 10^4$ copies d'ARN/ml peut être considérée comme "basse".

Les remarques suivantes doivent de plus être faites préalablement à toute recommandation relative à l'utilisation de la charge virale dans la prise en charge thérapeutique d'un malade infecté par le VIH :

- les données validant l'utilisation de la charge virale dans la décision de mise en route d'un traitement antirétroviral sont encore insuffisantes,

- une indication de mise en route d'un traitement antirétroviral ne peut en conséquence reposer sur la base exclusive d'une seule détermination de la charge virale. **Le processus décisionnel doit intégrer les données cliniques, le taux (et l'évolution du taux) de lymphocytes CD4, le niveau (et l'évolution du niveau) de la charge virale,**
- les recommandations actuelles sont le reflet des connaissances à la fin de l'année 1995 et devront évoluer avec elles.

En l'état actuel des connaissances, il paraît possible d'émettre les recommandations suivantes pour l'adulte asymptomatique ou non traité :

- il est proposé d'intégrer la mesure de la charge virale dans le bilan de surveillance des malades infectés par le VIH, sur la base d'une détermination semestrielle,
- chez les malades ayant un taux de lymphocytes CD4 $> 500/\text{mm}^3$, un niveau de charge virale $> 10^5$ copies d'ARN/ml, ce qui est peu fréquent, justifie de rapprocher la surveillance clinique et virologique,
- chez les malades ayant un taux de lymphocytes CD4 $< 500/\text{mm}^3$:
 - * un niveau de charge virale $< 10^4$ copies d'ARN/ml justifie une surveillance simple, avec suivi semestriel de la charge virale.
 - * un niveau de charge virale $> 10^5$ copies d'ARN/ml, contrôlé sur un deuxième prélèvement, constitue probablement un des arguments en faveur de la mise en route d'un traitement antirétroviral.

b) **Recommandations pour l'utilisation de la charge virale dans des situations particulières.**

1 - Femme enceinte

Chez une femme infectée par le VIH et désireuse d'entreprendre une grossesse, la détermination de la charge virale est un élément d'appréciation du risque de transmission et peut aider cette femme dans les décisions qu'elle doit prendre. Une charge virale élevée est associée à une majoration du risque de transmission materno-foetale du VIH.

L'analyse des données de charge virale chez les femmes ayant transmis le virus à leur enfant comme chez les femmes n'ayant pas transmis montre une grande dispersion des virémies avec une importante zone de chevauchement entre les deux groupes, ce qui rend difficile à ce jour l'interprétation de résultats individuels.

Il faut également insister sur le fait que la connaissance de la charge virale ne doit pas modifier les indications de traitement antirétroviral au cours de la grossesse. Pendant celle-ci, il ne paraît pas utile de recommander de détermination de charge virale, au moins jusqu'à la mise en route du traitement antirétroviral visant à réduire le risque de transmission materno-foetale du VIH.

Après l'accouchement, la surveillance de la charge virale sera effectuée selon les recommandations générales définies pour le suivi de l'adulte, associée à la surveillance de l'évolution clinique et du taux de lymphocytes CD4.

2 - Nouveau-né et nourrisson

Les données concernant l'évolution de la charge virale chez les nouveau-nés contaminés au cours de la grossesse sont encore peu importantes. Il n'est donc pas possible actuellement de définir avec précision des stratégies thérapeutiques en fonction de la charge virale.

Pour le diagnostic d'infection à VIH chez un nouveau-né de mère atteinte par le VIH, les techniques *qualitatives* de recherche du VIH sont recommandées (PCR-ADN, culture virale, voire PCR-ARN). Pour affirmer le diagnostic d'infection par le VIH chez le nouveau-né, il est nécessaire de prendre en compte deux résultats positifs obtenus sur deux prélèvements différents.

Des résultats récents ont montré que chez les nourrissons, il peut exister deux profils de cinétique de charge virale :

- celui des enfants dont la réplication virale se maintient élevée dans les premiers mois de la vie (enfants à risque de développer une forme rapide et sévère),
- celui des enfants dont la réplication virale diminue dans les premiers mois de vie (enfants susceptibles de présenter une forme lentement évolutive).

De ce fait, il paraît raisonnable de prévoir trois déterminations de la charge virale au cours de la première année de vie vers l'âge de 3 mois, 6 mois et 1 an. Par la suite l'enfant sera suivi selon le même calendrier que l'adulte, c'est-à-dire deux fois par an tant qu'il reste peu symptomatique, davantage si l'évolution clinique le justifie.

3 - Syndrome de primo-infection symptomatique

La charge virale n'est pas un élément du diagnostic de la primo-infection. L'antigénémie p24 reste un élément fondamental du diagnostic, simple, accessible et peu coûteux dont la recherche doit être associée à celle des anticorps.

Au moment du syndrome de primo-infection, la charge virale est toujours élevée. Il n'y a pas lieu de tenir compte du résultat de la quantification virale pour la décision thérapeutique initiale. Lorsqu'un traitement antirétroviral a été entrepris, la détermination de la charge virale peut trouver sa place, notamment après quelques mois de traitement pour adapter la conduite thérapeutique.

ANNEXE 3

Charge virale (ARN VIH plasmatique) chez les patients traités par antirétroviraux

Le groupe d'experts considère que la quantification de la réplication virale appréciée par la mesure de l'ARN plasmatique est, en 1996, un paramètre utile à la décision thérapeutique individuelle. Les données récentes sur la dynamique de l'infection rétrovirale confirment l'intérêt de ce paramètre dans l'histoire naturelle de la maladie. D'autre part, l'analyse de quelques essais thérapeutiques accompagnés de mesure de la charge virale, a montré que cette mesure avait en moyenne un intérêt pour mesurer l'effet d'un médicament ou d'une stratégie thérapeutique. La difficulté est de passer d'une étude de population à l'individu. C'est le but poursuivi par le groupe d'experts.

Les objectifs principaux de la mesure de la charge virale chez un patient traité spécifiquement pour l'infection VIH sont :

- de vérifier l'effet antirétroviral d'un traitement. c'est à dire de mesurer l'impact virologique d'un traitement ;
- d'anticiper la perte d'efficacité d'un traitement appréciée sur l'augmentation progressive de la réplication virale, dans l'idée de proposer un changement ou un renforcement de la thérapeutique.

Le groupe d'experts rappelle que les résultats individuels de la mesure de la charge virale doivent être interprétés en tenant compte de la variabilité du test et des connaissances encore limitées sur sa valeur dans la surveillance thérapeutique. Le résultat de la détermination de la charge virale chez un patient donné est affecté d'une double incertitude : technique et biologique (voir Annexe 1).

Cette variabilité biologique entraîne un risque d'erreur dans l'interprétation d'un résultat individuel dès lors qu'on le compare à une valeur seuil ou que l'on se réfère à une variation dans le temps spontanée ou induite par le traitement. Ainsi, il ne devrait pas être rare d'observer des variations de la charge virale de l'ordre de 0,5 log d'une mesure à l'autre chez des patients parfaitement stables. Ceci se produira dans plus de 30 % des cas si l'écart-type de la différence entre 2 mesures est de 0,5 log et dans encore plus de 5 % des cas s'il n'est que de 0,3 log. Avant de conclure qu'il y a eu variation significative de la charge virale ou au contraire qu'un objectif thérapeutique donné n'a pas été atteint, il faudra donc spécifier les risques d'erreur que l'on accepte et préciser les marges de variation dans lesquelles on ne peut conclure avec une certitude suffisante. Pour y parvenir, il faudra attendre les résultats des essais Delta et ACTG 175.

L'implication de paramètres autres que l'aspect quantitatif de la charge virale doit être aussi considérée. Des études suggèrent la persistance d'une réduction du nombre de copies d'ARN plasmatique en dépit de la présence d'une population virale complètement résistante à l'antiviral administré et d'autres la persistance du bénéfice du traitement sur les lymphocytes CD4 pendant des semaines après le retour au niveau de départ de la charge virale.

Au cours de l'année 1996 de nombreuses données supplémentaires, issues de cohortes et d'essais thérapeutiques, devraient permettre de mieux interpréter les variations de charge virale, ses rapports avec les taux des lymphocytes CD4 et ses corrélations avec la thérapeutique. Dans l'état actuel des données, il est proposé les conclusions suivantes, qui restent nécessairement prudentes :

- Compte tenu des limites des connaissances sur la valeur pronostique individuelle des valeurs et des modifications de la charge virale, il est proposé que puissent être effectuées, de manière non obligatoire (ou non systématique) et selon l'indication du médecin clinicien, chez un patient traité par antirétroviraux, entre une et au plus quatre mesures de charge virale par an.
Une première mesure de la charge virale sera réalisée à l'institution du traitement antirétroviral. Une mesure effectuée dans les trois mois après l'initiation d'un traitement permettra d'avoir une estimation de son effet antiviral. Le moment idéal des mesures ultérieures dépend du schéma thérapeutique proposé et du taux de lymphocytes CD4. La fréquence des mesures de charge virale doit être d'autant plus faible que l'effet attendu du traitement entrepris est prolongé (associations d'antirétroviraux). Dans tous les cas, l'interprétation de la charge virale devra prendre en compte l'état clinique et le taux de lymphocytes CD4.
Lorsque le résultat de la mesure de charge virale incite à modifier le traitement, et lorsque ce paramètre constitue le seul critère, il est conseillé de confirmer le résultat par une nouvelle mesure, avant de changer de thérapeutique. Dans l'état actuel des connaissances, une absence de diminution la charge virale ou le retour à la valeur de base et a fortiori une augmentation au delà de celle-ci, suggèrent l'inefficacité du traitement en cours.
- Chez les patients déjà en cours de traitement au moment où ces recommandations seront diffusées et pour lesquels la charge virale avant la mise en route du traitement n'est pas connue, il sera réalisé une mesure de charge virale qui servira de valeur de référence pour la surveillance thérapeutique ultérieure.

GROUPE D'EXPERTS "CHARGE VIRALE"

<i>ABOULKER Jean -Pierre</i>	<i>INSERM SC10</i>
<i>AGUT Henri</i>	<i>Hôpital de la Pitié Salpêtrière</i>
<i>BAZIN Claude</i>	<i>C.H.U. de Caen</i>
<i>BOURDILLON François</i>	<i>Mission Sida - Direction des Hôpitaux</i>
<i>BRUN- VEZINET Françoise</i>	<i>Hôpital Bichat- Claude Bernard</i>
<i>COSTAGLIOLA Dominique</i>	<i>INSERM SC4</i>
<i>DORMONT Jean</i>	<i>Hôpital Antoine Béchère</i>
<i>HOEN Bruno</i>	<i>C.H.U. Nancy</i>
<i>JANOT Christian</i>	<i>Agence du Médicament</i>
<i>KATLAMA Christine</i>	<i>Hôpital de la Pitié Salpêtrière</i>
<i>KAZATCHKINE Michel</i>	<i>Hôpital Broussais</i>
<i>MOLINA Jean -Michel</i>	<i>Hôpital Saint Louis</i>
<i>MORLAT Philippe</i>	<i>C.H.U. de Bordeaux</i>
<i>NADAL Jean-Marc</i>	<i>Mission SIDA - Direction des Hôpitaux</i>
<i>PARRA Jean -Pierre</i>	<i>Division Sida - Direction Générale de la Santé</i>
<i>PIALOUX Gilles</i>	<i>Hôpital de l'Institut Pasteur</i>
<i>PUEL Jacqueline</i>	<i>C.H.U. de Toulouse</i>
<i>RAFFI François</i>	<i>C.H.U. de Nantes</i>
<i>ROUZIOUX Christine</i>	<i>Hôpital Necker - Enfants Malades</i>
<i>ROZENBAUM Willy</i>	<i>Hôpital Rothschild</i>
<i>SEIGNEURIN Jean-Marie</i>	<i>C.H.U. de Grenoble</i>
<i>SOBEL Alain</i>	<i>Conseil National du Sida</i>
<i>VITTECOQ Daniel</i>	<i>Hôpital Paul Brousse</i>
<i>YENI Patrick</i>	<i>Hôpital Bichat - Claude Bernard</i>

ont participé aux groupes :

Asymptomatique non traités :

Pr. Stéphane BLANCHE	Hôpital Necker - Enfants Malades
Mme Dominique COSTAGLIOLA	INSERM SC4
Pr. Bruno HOEN	C.H.U. de Nancy
Pr. Michel KAZATCHKINE	Hôpital Broussais
Pr. Christine ROUZIOUX	Hôpital Necker - Enfants Malades
Pr. Willy ROZENBAUM	Hôpital Rothschild
Pr. Patrick YENI	Hôpital Bichat - Claude Bernard

Méthodes de mesure :

Pr. Françoise BRUN-VEZINET	Hôpital Bichat - Claude Bernard
Mme Dominique COSTAGLIOLA	INSERM SC4
Pr. Christian JANOT	Agence du Médicament
Pr. Jean-Claude NICOLAS	Hôpital Rothschild
Pr. Jean-Marie SEIGNEURIN	C.H.U. de Grenoble
Dr. Daniel VITTECOQ	Hôpital Paul Brousse

Suivi biologique :

Dr. Jean-Pierre ABOULKER	INSERM SC10
Pr. Françoise BRUN-VEZINET	Hôpital Bichat - Claude Bernard
Pr. Claude BAZIN	C.H.U. de Caen
Pr. Jean DORMONT	Hôpital Antoine Bécère
Dr. Jean-Michel MOLINA	Hôpital Saint Louis
Pr. Alain SOBEL	Hôpital Henri Mondor

Patients traités :

Dr. Jean-Pierre ABOULKER	INSERM SC10
Pr. Henri AGUT	Hôpital Pitié Salpêtrière
Pr. Christine KATLAMA	Hôpital Pitié Salpêtrière
Dr. Philippe MORLAT	C.H.U. de Bordeaux
Dr. Gilles PIALOUX	Hôpital de l'Institut Pasteur
Pr. Jacqueline PUEL	C.H.U. de Toulouse
Pr. François RAFFI	C.H.U de Nantes