

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine Vétérinaire

Titre de la thèse en français : Détection des contaminants viraux sanguins chez l'homme par PCR

Titre de la thèse en anglais : PCR detection of blood-borne viruses in humans

Candidat : Isabelle Thomas

Promoteur : Prof. P. P. Pastoret

Département et Service : service de Virologie, Institut Scientifique de Santé Publique

Date de la défense publique : le 13 décembre 2002

Composition du Jury : G. Meulemans, P.-P. Pastoret, J.-P. Allain, P. Caillet-Fauquet, E. Thiry, M. Georges, J. Mainil, B. Losson, P. Lekeux.

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

De nombreux virus peuvent être transmis par le sang ou les produits sanguins. C'est en principe vrai pour toutes les infections virales qui donnent lieu à une phase de virémie. Les plus importants d'un point de vue pathologique sont les virus de l'immunodéficience acquise (HIV), de l'hépatite C (HCV) et de l'hépatite B (HBV). Pour ces virus, il existe des tests de dépistage qui permettent de repérer les donneurs infectés et les écarter du don de sang. D'autres virus peuvent également être transmis par le sang. C'est les cas notamment du virus de l'hépatite A (HAV), du cytomégalo-virus (CMV) et du parvovirus B19. Ce dernier, très répandu dans la population de donneurs, peut poser de graves problèmes chez certains individus, notamment les patients immunodéprimés et les femmes enceintes (Anand *et al.* 1987). De plus, la crainte de l'apparition de nouveaux pathogènes émergents qui pourraient affecter la sécurité du sang persiste. Depuis le développement récent des techniques de biologie moléculaire, toute une série de nouveaux virus ont été découverts et leur importance au niveau transfusionnel doit être déterminée en fonction de différents critères tels que la pathogénicité, la prévalence, la transmissibilité, la persistance ainsi que l'existence de moyens de détection.

Pour minimiser au maximum les risques de contamination virales par transfusion, l'utilisation des tests d'amplification des acides nucléiques (NAT) a été proposée en complément des tests sérologiques utilisés en routine. Les avantages de ces techniques sont leur grande sensibilité, leur spécificité, leur capacité à détecter directement le génome viral au lieu des anticorps ou des antigènes. L'avantage le plus important dans le domaine de la transfusion est leur capacité à réduire fortement la période fenêtre (avant l'ap-

parition des anticorps). Le dépistage en PCR des donneurs de sang réduit la période fenêtre d'une moyenne de 59 jours pour HCV, de 25 jours pour HBV et de 11 jours pour HIV (Schreiber *et al.* 1996).

Une fois correctement validées et standardisées, les méthodes NAT peuvent être appliquées à différents niveaux pour le contrôle du sang :

Pools de fractionnement : l'application des tests au niveau des pools de fractionnement et l'élimination des pools contaminés au delà d'un seuil de détection déterminé permet de garantir une charge virale minimale compatible avec les techniques d'inactivation/élimination virale utilisées. La sensibilité exigée varie fortement en fonction du type de virus. Le nombre de tests est réduit, ce qui diminue fortement les coûts. Cependant, la perte engendrée par la destruction d'un grand pool de fractionnement est importante d'un point de vue économique et éthique (perte d'un grand nombre de dons non infectieux).

Dons individuels : l'idéal serait bien sûr de tester les dons individuels, pour permettre l'élimination directe des dons contaminés et la notification rapide des donneurs. Actuellement pour des raisons de coûts et de logistique, ces tests individuels ne sont pas encore applicables en routine à de grandes quantités d'échantillons.

Minipools : les tests effectués sur « minipools » permettent de réduire le nombre de tests à effectuer sans trop affecter la sensibilité (dilution des échantillons). La sensibilité du test à utiliser et la taille des « minipools » doivent être établis en fonction du type d'agent à rechercher. Différentes tailles de pools (8 à 500), différents systèmes de pooling (2, 3 dimensions) ont été développés et testés. Chaque pool trouvé positif doit être résolu pour identifier le don responsable de la contamination.

RESULTATS

Dans le cadre de ce travail quatre virus transmissibles par le sang ont été abordés plus particulièrement. Chacune des études réalisées est résumée ci-dessous

HCV

Détection par PCR de l'ARN du virus HCV dans des pools de plasma

Durant la période fenêtre, estimée à 70 jours pour le virus HCV, les donneurs infectés peuvent transmettre l'infection (Vrieling *et al.* 1995). La durée de cette période fenêtre peut être considérablement réduite par l'utilisation des tests NAT.

Les objectifs de l'étude étaient de déterminer la prévalence des pools positifs en PCR pour HCV, de valider notre méthode PCR et d'améliorer la sécurité des produits plasmatiques.

Trois cent soixante sept pools de plasma (chacun constitués de 5000 dons individuels) du DCF (Croix-Rouge de Belgique) ont été testés d'avril 1996 à décembre 1998. Deux pools d'entre eux ont été trouvés HCV ARN positifs et éliminés. D'autre part, trois dons successifs d'un donneur ayant présenté une séroconversion au mois de mai 1997 nous ont été envoyés pour analyse. Le 3^e don ainsi que le 2^e étaient positifs en PCR. Le 3^e don, positif en sérologie, avait été éliminé mais le deuxième, négatif en sérologie (don de préséroconversion), avait été incorporé dans un pool. La procédure de «look back» a permis d'identifier ce pool, qui était en fait l'un des deux pools trouvés positifs précédemment. Le génotype de ce pool et du don a été déterminé: il était pour les deux du type 5a, un génotype rare en Europe. L'application de la PCR HCV aux plasmas de fractionnement permet de détecter de rares cas positifs ayant échappé à toute la procédure de dépistage et de garantir ainsi une charge virale minimale compatible avec les procédures d'inactivation utilisées pendant la fabrication des produits.

Détection de l'ARN du virus HCV chez des donneurs à profil sérologique indéterminé

Les pratiques des tests de dépistage du virus HCV dans les centres de transfusion sont pratiquement identiques dans tous les pays d'Europe. Un premier **test de dépistage** de type ELISA est réalisé et répété deux fois si le résultat est positif. Si deux tests sur les trois sont positifs, un **test de confirmation** est réalisé basé sur une technique d'immunoblotting (RIBA). Si le résultat du test est positif, le don est éliminé et le donneur est prévenu. Si le résultat du test est négatif, le don correspondant est éliminé mais le donneur, considéré comme sain, sera rappelé pour un don ultérieur. Dans certains cas, le résultat reste indéterminé et la seule manière de déterminer le statut virémique ou non du donneur est l'utilisation d'une PCR.

Les objectifs de notre étude étaient de déterminer la proportion de donneurs RIBA indéterminés positifs pour l'ARN HCV, en relation avec la protéine réactive.

Deux cent et six échantillons nous ont été envoyés pour analyse PCR HCV à la suite d'un résultat positif pour le dépistage ELISA anti-HCV. Tous les échantillons testés se sont révélés négatifs en PCR quel que soit leur profil sérologique. D'autres études réalisées dans ce domaine ont montré que dans la majorité des cas, les donneurs présentant une réactivité unique vis-à-vis des antigènes NS4 ou NS5 ne sont pas infectieux alors qu'un très faible pourcentage de donneurs réactifs soit vis-à-vis du core ou de l'antigène NS3 sont positifs en PCR (Dow *et al.* 1996).

L'utilisation de la PCR a permis de rassurer les donneurs concernés et d'empêcher leur exclusion du circuit du don de sang.

HBV

Détection du virus HBV par PCR chez des donneurs anti-HBc positifs

L'infection à HBV est normalement associée à la présence de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg) dans le sérum. Depuis la généralisation des tests de dépistage de l'HBsAg chez les donneurs, l'incidence des hépatites post-transfusionnelles à HBV a fortement diminué sans totalement disparaître. Il persiste des cas qui peuvent être expliqués par des dons effectués durant la période fenêtre avant l'apparition de l'antigène HBsAg, par le caractère parfois transitoire de l'antigénémie, par la présence du marqueur HBsAg à des taux inférieurs au seuil de détection chez les porteurs HBV chroniques ou par l'existence de mutants. En Belgique, les tests anti-HBc sont obligatoires pour les nouveaux donneurs et en cas de positivité pour ce marqueur, les donneurs sont exclus dès que le taux d'anticorps anti-HBs est inférieur à 50 mUI/ml. Le problème principal associé à ces tests est leur faible spécificité.

Les objectifs de cette étude étaient d'estimer la prévalence de l'ADN HBV dans différentes populations de donneurs, et d'estimer la charge virale des donneurs positifs.

Parmi les 473 donneurs testés 378 ont été confirmés anti-HBc positifs. Tous les nouveaux donneurs positifs pour l'HBsAg ont été détectés positifs en PCR.

Un échantillon PCR positif anti-HBc négatif, était un échantillon de séroconversion.

Les deux autres échantillons PCR positifs provenaient de donneurs anti-HBc positifs. Les charges virales de ces deux échantillons étaient faibles (100 à 1000 geq/ml). Il pourrait s'agir de donneurs chroniques dépourvus d'HBsAg.

HAV

Détection de l'ARN du virus HAV dans le sang et les produits sanguins

L'hépatite A reste un problème de santé publique préoccupant. La voie principale de contamination est la voie fécale orale. La transmission par le sang est également possible puisqu'il existe une phase de virémie transitoire au début de l'infection. Le virus est non enveloppé et particulièrement résistant aux processus d'inactivation virale utilisés

couramment. Il peut donc se retrouver dans les produits finis. Des épidémies liées à l'administration de facteurs de coagulation chez des patients hémophiles ont été rapportées dans différents pays européens.

Les objectifs de notre étude étaient de rechercher la présence du génome viral dans différents types d'échantillons : échantillons de patients à profils sérologiques HAV déterminés, pools de fractionnement, facteurs de coagulation (lots impliqués dans des cas de contamination chez des patients hémophiles en Belgique.)

Tous les échantillons de patients négatifs pour les IgM anti-HAV (IgTot positifs ou IgTot négatifs) étaient négatifs en PCR. Tous les échantillons de patients positifs pour les IgM anti-HAV étaient positifs en PCR. Ces données suggèrent que la phase de virémie pourrait être relativement longue.

Les trente pools de fractionnement (5000 dons individuels) testés, étaient tous négatifs en PCR.

Quatre lots de facteur VIII suspectés dans des cas de contaminations, ainsi que les pools de plasma correspondants ont été testés et trouvés négatifs en PCR. Ces résultats suggèrent que la contamination des concentrés de facteur VIII par le virus HAV reste un événement rare.

Quoi qu'il en soit, le fait de l'existence d'une période de virémie de durée non négligeable, impose de rester très attentif au risque. En absence de traitement qui inactive le virus, du sang contaminé par HAV, collecté chez des donneurs asymptomatique peut transmettre l'infection.

Parvovirus B19

Détection du Parvovirus B19 par PCR dans des pools de plasma et corrélation avec le statut sérologique des donneurs positifs.

Le parvovirus humain B19 est actuellement reconnu comme un contaminant majeur du sang et des produits sanguins. Pour réduire le risque de contamination, le dépistage au niveau des pools de plasma et l'exclusion des dons à charge virale élevée ont été recommandés. Des pools de tailles différentes ont été testés pour B19 à l'aide d'une nested-PCR très sensible. Les pools positifs ont été résolu jusqu'au don individuel, la charge virale et les marqueurs sérologiques ont été déterminés. Sur 16.850 dons, 27 (1/625) étaient positifs pour l'ADN B19 avec des charges virales variant de 10^2 à plus de 10^7 UI/ml. Parmi les dons positifs testés vis-à-vis des protéines VP, 32 % étaient dépourvus d'anticorps et étaient donc probablement soit en période fenêtrée de préséroconversion soit des porteurs chroniques dépourvus d'anticorps détectables. Les 28 % donneurs IgM positifs peuvent être considérés comme étant en phase précoce de l'infection. Les 40 % donneurs restants (IgM négatifs, IgG positifs) sont probablement porteurs d'infection persistante (PCR positifs malgré la présence des anticorps IgG) comme suggéré par la faible charge virale. Parmi les 36 « Major pools » testés, 12 étaient positifs en nested-PCR et seulement 3 en simple PCR suggérant une charge virale supérieure à 10^4 IU/ml. La réalisation de tests à l'aide d'une réaction de PCR sur des pools de 480,

la résolution des pools positifs et l'élimination des dons contaminés assurent que la charge virale au niveau des pools de fractionnement (5000 dons) reste inférieure à 10^3 UI/ml, une charge virale compatible avec l'efficacité des procédures d'inactivation.

CONCLUSIONS

Les tests NAT peuvent être utilisés pour détecter la plupart des virus transmis par le sang. Cependant, l'utilité, l'importance et les modalités d'utilisation des tests dépendent de différents facteurs spécifiques au type de virus. Ces facteurs importants sont la prévalence, la pathogénicité, la charge virale durant la phase de virémie, le temps de multiplication du virus et la dose infectieuse. Pour les plus importants de ces virus, les études que nous avons réalisées ainsi que la revue de la littérature nous permettent de tirer certaines conclusions.

Le virus HCV a été le premier à être envisagé pour l'utilisation des tests NAT, à cause de sa prévalence élevée, la durée de sa période fenêtrée, et la charge virale élevée durant la phase de virémie (de 10^5 à 10^7 UI/ml). Les premières estimations des risques résiduels étaient élevées, de l'ordre de 1/130.000 dons testés avec les méthodes sérologiques courantes. Les premiers tests réalisés sur des pools de fractionnement ont montré que de 0 % à 19 % des pools européens et jusqu'à 51 % des pools provenant des États-Unis étaient positifs en PCR. Dès lors, une réglementation du CPMP de l'agence européenne du médicament (EMA) a été établie et impose que seuls les produits issus des pools de fractionnement testés et trouvés négatifs par une technique NAT d'une sensibilité de 100 UI/ml peuvent être mis sur le marché. Lors de notre étude sur les pools de fractionnement de la Croix-Rouge en Belgique, de avril 1996 à décembre 1998, nous avons trouvé 2/367 pools positifs (0,6 %). Depuis cette période, plus de 800 pools de production ont été testés et un seul a été trouvé HCV PCR positif. A vrai dire, en raison du facteur de dilution, un résultat négatif ne permet pas de prouver l'absence de contamination. Cependant, l'application de ces tests permet d'assurer une charge virale minimale compatible avec les méthodes d'élimination/inactivation virale utilisées durant la fabrication des produits. La perte engendrée par la destruction d'un grand pool est importante, non seulement d'un point de vue économique, mais également d'un point de vue éthique car elle entraîne l'élimination d'un grand nombre d'unités qui pourraient être transfusées en toute sécurité. Pour résoudre ce problème, les producteurs sont encouragés à tester dans une première étape des minipools. Dans de nombreux pays, les tests NAT pour HCV sont devenus obligatoires au niveau des centres de transfusion pour la libération des globules rouges et des plaquettes. Actuellement, en attendant le développement de techniques qui permettraient les tests individuels, ces tests sont réalisés en minipools de tailles variables. Jusqu'à présent les résultats rapportés par la plupart des pays suggèrent que le nombre d'échantillons en période fenêtrée est beaucoup plus faible qu'initialement prévu.

Pour le virus HIV, le risque résiduel de contamination est moins élevé que pour HCV. Ce qui peut être expliqué en partie par sa plus faible prévalence au niveau de la population de donneurs, la durée plus courte de la période fenêtre et la charge virale moins élevée avant séroconversion. Des études réalisées ont montré que le coût bénéfique de ces tests était très élevé, du moins dans les pays à faible prévalence. Malgré cela, de nombreux producteurs réalisent les tests sur les pools de fractionnement. Les tests sont également réalisés sur des minipools dans les centres de transfusion de plusieurs pays européens. Le problème de la taille de ces pools est cependant très important si l'on veut atteindre une sensibilité suffisante. Un exemple du problème s'est présenté récemment en France où les tests PCR pour HCV et HIV sont obligatoires depuis juillet 2001. Malgré l'utilisation des tests, un cas de contamination a été noté et un échantillon positif en sérologie n'a pas été détecté. L'analyse rétrospective des échantillons a démontré une charge virale extrêmement faible pour ces deux échantillons, qui n'auraient pu être détectés qu'avec une méthode très sensible et en testant le don individuel.

Le risque résiduel de transmission du **virus HBV** est du même ordre de grandeur que pour le virus HCV. En plus de la période fenêtre qui constitue le problème le plus important, il existe des porteurs chroniques à très faible taux d'HBsAg et des mutants non détectés par les tests de routine. Le temps de multiplication (temps de doublement) du virus est faible (4 jours) et la charge virale est plus faible durant la séroconversion que pour HCV et HIV. Le virus est donc très difficile à détecter dans les grands pools de production et même dans les minipools et seul le dépistage au niveau individuel vaut la peine d'être envisagé. Lors de notre étude effectuée chez des donneurs négatifs pour HBsAg nous avons détecté un échantillon en période de préséroconversion et deux échantillons PCR positifs qui pourraient être des porteurs chroniques à charge virale très faible.

Le virus HAV est non enveloppé, non détecté par sérologie chez les donneurs et peut contaminer des pools de plasma et des produits. Il existe en effet une période de virémie qui semble plus longue qu'on ne le pensait au départ et durant laquelle la charge virale peut atteindre 10^5 geq/ml. Des cas de contaminations ont été notés principalement chez des hémophiles traités par des facteurs de coagulation. Cependant la maladie est en général assez bénigne et il existe des vaccins disponibles qui peuvent être administrés aux receveurs à haut risque tels que les hémophiles et les polytransfusés. A l'heure actuelle, les tests NAT ne sont donc pas recommandés pour ce virus. Cependant, ils se sont révélés très utiles dans les études épidémiologiques pour mettre en évidence la transmission du virus chez certains patients (détection du virus dans les pools, les produits et chez les patients et séquençage ultérieur de la souche).

Le Parvovirus B19 ne provoque en général pas de maladie grave chez les patients immunocompétents, par contre il peut entraîner des problèmes très graves chez les femmes enceintes et chez les patients immunodéprimés. Ce virus

est clairement transmissible par le sang. Il est non enveloppé, et présent dans les plasmas individuels (prévalence 1/625 dans notre étude), dans les pools de fractionnement ainsi que dans la plupart des produits. Des charges virales élevées peuvent être détectées au niveau des pools. Des séroconversions ainsi que des signes cliniques ont été notés chez des receveurs à partir de charges virales supérieures à $10^{3.5}$ copie/ml. C'est pourquoi la FDA recommande de tester les pools de fractionnement de manière à ne garder que ceux dont la charge est inférieure à 10^4 copies/ml.

L'étude réalisée nous a permis de mettre au point une stratégie de dépistage du Parvovirus B19 au niveau des pools qui est déjà utilisée en routine par le Département Central de Fractionnement de la Croix-Rouge de Belgique. Une première PCR (sensibilité de 4000 UI/ml) est réalisée sur les pools de 480. Les poches correspondant aux pools négatifs sont directement libérées pour le fractionnement. Les pools positifs sont résolus jusqu'au don individuel. Jusqu'à présent, plus de 50.000 dons ont été testés et 4 pools positifs ont été détectés.

PERSPECTIVES

La sécurité du sang n'a jamais été aussi élevée qu'actuellement, surtout au niveau des risques virologiques. Malgré toutes les mesures de précaution appliquées, de faibles risques résiduels persistent et les tests NAT peuvent contribuer à les réduire encore considérablement. Des réglementations ont été établies pour assurer la sécurité virale des produits et des dons destinés à la transfusion. Les tests NAT sont devenus obligatoires sur les pools de fractionnement pour les virus de l'hépatite C et pour le parvovirus B19 (préparation des immunoglobulines anti-D). Au niveau des centres de transfusion, les tests sont devenus obligatoires pour les virus HCV et HIV, dans plusieurs pays européens. De nombreuses études ont été réalisées depuis quelques années et les progrès dans la standardisation et la validation permettent d'envisager l'établissement des tests à une plus grande échelle. La difficulté de leur mise en application nécessite une attention constante qui doit être focalisée sur la réduction du nombre de faux positifs, de faux négatifs ainsi que des séries de tests invalides. Quels que soient ces problèmes, l'épidémiologie de ces infections transmissibles par le sang doit être étudiée et évaluée régulièrement et les techniques de biologie moléculaires représentent un outil particulièrement approprié.

RÉFÉRENCES

- ANAND A, GRAY ES, BROWN T, CLEWLEY JP, COHEN BJ. Human parvovirus infection in pregnancy and hydrops fetalis. *N. Engl. J. Med.*, 1987, **316**, 183-6.
- DOW BC, BUCHANAN I, MUNRO H, FOLLETT EA, DAVIDSON F, PRESCOTT LE, YAP PL, SIMMONDS P. Relevance of RIBA-3 supplementary test to HCV PCR positivity and genotypes for HCV confirmation of blood donors. *J. Med. Virol.*, 1996, **49**, 132-6.
- SCHREIBER GB, BUSCH MP, KLEINMAN SH, KORELITZ JJ. The Risk of Transfusion-Transmitted Viral Infections. *N. Engl. J. Med.*, 1996, **334**, 1685-90.
- VRIELINK H, VAN DER POEL CL, REESINK HW, ZAAIJER HL, LELIE PN. Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV-negative blood transfusion. Case report. *Vox Sang.*, 1995, **68**, 55-6.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- Thomas I, Branckaert T, Mathys E, Vranckx R., Laub R. PCR detects HCV genotype 5a in a plasma pool contaminated by a single preseroconverted donation *Vox Sang.*, 2000, **79**, 69-71.
- Thomas I, Mathys E, Gerard C. The use of nucleic acid amplification techniques to increase the viral safety of blood. *Clin Lab.*, 2002, **48**, 155-60.
- Allain J.P. Thomas I, Sauleda S., Nucleic acid testing for emerging viral infections. *Transf. Med.*, 2002, **12**, 275-283.
- Thomas I, Di Giambattista M., Gérard C., Mathys E., Hougardy V., Latour B., Branckaert Th., and Laub R. Prevalence of human erythrovirus B19 DNA in healthy Belgian blood donors and correlation with specific antibodies against structural and nonstructural viral proteins *Vox Sang.*, 2003, **84**, 300-307.