

Séroprévalence du VHC au Niger dans la population générale et chez des malades atteints d'hépatopathies chroniques : comparaison de différents tests de seconde génération et de la PCR.

D. De Groof (1), P. Michielsens (2), A. Hassane (3), N. Leyssens (4), A. Ramon (2, 4) & P. Pelckmans (2) (5)

(1) Coopération médicale nigéro-belge, Ministère de la santé publique, B.P.457, Niamey, Niger

(2) Service de gastro-entérologie, Universitair Ziekenhuis Antwerpen, Belgium

(3) Faculté des sciences de la santé, Niamey, Niger

(4) International Institute of Immunopathology, Cologne, R.F.A.

(5) Manuscrit n° 1716. « Virologie ». Accepté le 20 mai 1997.

Summary: Seroprevalence of Hepatitis C in general population and patients with chronic liver disease in Niger: comparative evaluation of second generation tests and PCR

Key-words: Hepatitis C - Screening tests ELISA - Immunoblotting test - Polymerase chain reaction - Liver cirrhosis - Liver tumour - Hospital - Niger

The aim of our study in Niger was to compare the seroprevalence of hepatitis C in a rural "normal" population and in a group of patients presenting at the hospital with signs of chronic liver disease: to estimate this seroprevalence, we used 4 second generation ELISA screening and 3 confirmatory tests (LIA, RIBA and PCR); genotyping was performed on PCR positive sera, using Inno-LIPA HCV. We could not find a statistically significant difference (Fisher's exact test) between the two groups of healthy and sick people (2,5 versus 5,4 % for seroprevalence and 2,5 versus 3,2 % for viremia). Our study didn't find any relationship between hepatitis C infection, blood transfusion or surgery; other major ways of transmission of hepatitis C have to be considered. The predominant genotype detected was 2a.

Résumé :

Mots-clés : Hépatite C - Tests de dépistage ELISA - Test Immunoblot - Polymérase Chain Réaction - Cirrhose hépatique - Génotype - Tumeur primitive du foie - Hôpital - Niger

Cette étude faite au Niger a eu comme objectif de comparer la prévalence de l'hépatite C dans la population rurale "normale" et un groupe de malades se présentant avec des signes d'hépatopathie chronique, ceci en utilisant différents tests sérologiques ELISA de dépistage de deuxième génération et des tests de confirmation (RIBA, LIA, PCR). Sur les échantillons PCR positifs, le génotype du VHC a été défini. Nous n'avons pas pu trouver une différence statistiquement significative entre la prévalence du VHC dans la population normale (2,5 %) et les malades avec une hépatopathie chronique (5,4 %). En ce qui concerne le mode de transmission, notre étude n'a pas pu trouver une relation éventuelle entre transfusion sanguine, intervention chirurgicale et infection avec le HCV : une transmission autre que la transfusion sanguine n'est pas à exclure. Le génotype 2a a été retrouvé dans 4 des 6 sérums PCR positifs.

Introduction

Le virus de l'hépatite C (VHC) est responsable de la majorité des cas d'hépatites non A, non B transmises par voie parentérale. Il est probablement impliqué dans le développement d'un nombre important de maladies et de certaines complications hépatiques (4, 6, 10). En Afrique, les résultats des différentes études sur la séro-prévalence de l'hépatite C donnent des résultats très divergents en fonction des pays où les recherches ont été faites, des personnes incluses dans les études, de la méthode de conservation des échantillons de sang, des tests sérologiques utilisés. Les taux élevés incitent quand-même à penser que le continent africain se situe dans une zone de haute prévalence (1, 3, 9). Au début de années 1990, des tests ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) de première génération ont été développés: leur manque de sensibilité et spécificité a nécessité le développement de tests ELISA de deuxième génération. Les tests de confirmation par blotting de deuxième génération permettent maintenant de détecter séparément des anticorps contre les différents antigènes viraux. L'interprétation des résultats indéterminés reste

un problème (8, 11). Récemment, des tests ELISA et blotting de troisième génération ont été développés (13). L'utilisation de l'amplification génomique par PCR (polymerase chain reaction) pour la mise en évidence d'ARN viral dans le sérum ou dans le foie apparaît actuellement comme la seule méthode capable de détecter le génome du VHC et de confirmer une infection actuelle par le VHC. Malheureusement, il s'agit encore d'une méthode lourde qui se heurte à des problèmes importants (7, 11, 12).

Il est à noter également que, dans certaines situations, les tests sérologiques peuvent donner un résultat positif avec une PCR négative: on peut en effet observer des diminutions temporaires de la virémie (liée à l'évolution de la maladie) et des résultats faux négatifs causés par une mauvaise technique de prélèvement et/ou conservation du sang ou exécution du test.

Notre étude a eu lieu au Niger et a eu comme objectif d'étudier et de comparer la séroprévalence du VHC chez des donneurs de sang en bonne santé et chez des personnes se présentant à l'hôpital avec une pathologie hépatique (cirrhose et/ou cancer primitif du foie) afin d'évaluer une relation éventuelle entre certaines hépatopathies et la présence du VHC.

Patients et méthodes

Lieu de l'étude

L'étude a eu lieu au Niger, à l'hôpital départemental de Dosso. Ce département est situé au sud-ouest de la république du Niger. Il s'agit d'une région soudano-sahélienne avec une population sédentaire (Djermas et Haoussa) et semi-nomade (Peuls). L'activité économique est essentiellement agro-sylvo-pastorale.

Sélection des patients

D'abord, des prélèvements de sang ont été effectués chez des personnes originaires des zones rurales accompagnant un malade à l'hôpital: on leur demande systématiquement de fournir une unité de sang, ce qui permet de renouveler les stocks sanguins au niveau de la banque de sang: les donneurs "professionnels" (militaires, étudiants, fonctionnaires) ont été exclus. En même temps, du sang a été prélevé chez des malades se présentant à l'hôpital avec des signes cliniques d'une hépatopathie chronique :

- hypertension portale avec circulation veineuse collatérale,
- insuffisance hépatocellulaire ou cirrhose décompensée avec ictère, ascite et/ou oedèmes des membres inférieurs,
- hépatomégalie et/ou palpation d'une ou plusieurs masses hépatiques.

L'examen clinique complet a été suivi d'une échographie abdominale (volume et contours du foie, aspect échogène du tissu hépatique, recherche d'ascite et d'un ou plusieurs nodules, présence éventuelle d'autres tumeurs abdominales ou pelviennes) et d'une prise de sang (contrôle de la bilirubine, transaminases et temps de saignement). Il était prévu d'effectuer systématiquement une biopsie hépatique chez chaque malade afin de pouvoir confirmer le diagnostic. Pour des raisons éthiques, ces ponctions n'ont pas été faites: il a été trouvé inacceptable de faire subir une telle ponction (avec les risques inhérents) pour des raisons uniquement diagnostiques: le diagnostic d'hépatopathie chronique a donc été posé sur des signes cliniques, les résultats de la biochimie de routine effectuée au niveau du laboratoire et de l'échographie; L'alphafetoprotéine n'a pas été mesurée dans cette étude. Les prélèvements ainsi recueillis étaient centrifugés et le sérum prélevé. Ces sérums ont été gardés congelés à -20 ° C au niveau du laboratoire à Dosso et expédiés ensuite à l'Université d'Anvers (U.I.A.), Belgique. L'expédition se faisait en état congelé dans un box frigo avec des accumulateurs de froid.

Les tests utilisés

Un bilan biologique sanguin comportant une goutte épaisse, un test HIV (ELAVIA Mixt, diagnostics Pasteur) et des tests hépatiques, a été fait. Une recherche des marqueurs d'infection par le VHB n'a pas été effectuée: ce n'était pas l'objectif de cette étude et une interrelation éventuelle entre cette infection et l'apparition d'une cirrhose et/ou un cancer primitif du foie a été recherchée dans d'autres études (4).

Ensuite, toutes les personnes retenues pour l'étude ont été testées avec 4 tests ELISA de deuxième génération: Abbott HCV[®], contenant deux antigènes recombinants de la région non-structurale et une de la région structurale (noyau) du virus, Innotest[®] (Innogenetics) utilisant un mélange d'antigènes HCV synthétiques (noyau, NS4 et NS5), Organon-UBI[®] contenant deux peptides synthétiques du noyau et de la région NS3-NS4 et Ortho HCV[®] utilisant des protéines recombinants non-structuraux (C-200) et structuraux (noyau). Tous

les sérums ont été soumis ensuite à des tests de confirmation Inno-LIA[®] (line immunoassay) contenant plusieurs épitopes synthétiques NS4,NS5 et noyau et Ortho RIBA II[®] (recombinant immunoblot assay) utilisant les antigènes recombinants C33c, C22-3, C-100 et 5-1-1 pour détection séparée des différents anticorps contre le VHC. Enfin un test PCR (Amplicor HCV-PCR Roche) était effectué dont la cible d'amplification était la région 5' non codante du VHC définie par les primers KY 80, nucléotide 56 à 79 et KY 78, nucléotide 276 à 299: ce test PCR a été réalisé en double avec des témoins d'extraction positifs et négatifs.

Etaient considérés comme séropositifs: les personnes avec un (ou plusieurs) tests ELISA positifs confirmés par
- deux immunoblots positifs (avec PCR positif ou négatif);
- un test PCR positif (avec immunoblot positif, indéterminé ou négatif).

Un test INNO-LIPA HCV (Innogenetics, Belgique), permettant de classer les 5 génotypes les plus fréquents du VHC a été effectué sur les échantillons PCR positifs.

Résultats

Chez les accompagnants des malades

Chez 122 personnes, des prises de sang ont été effectuées: l'âge médian de ce groupe était de 32 ans; il s'agissait surtout d'hommes (91 %) d'ethnie djerma ou haoussa représentant les deux grandes ethnies du pays.

Trois donneurs de sang étaient positifs pour les quatre tests ELISA et PCR positifs; de ces trois personnes, 1 était positive pour les 2 immunoblots (génotype 2a), 1 était Inno LIA positive et ortho RIBA indéterminée (génotype indéterminé), et la troisième était Ortho RIBA indéterminée et Inno LIA négative (génotype indéterminé). Dix-neuf autres donneurs de sang étaient positifs pour un ou plusieurs des tests ELISA, mais négatifs pour les immunoblots et la PCR: 15 personnes étaient positives pour un test de dépistage, 3 pour 2 tests et 1 pour 3 tests. Des trois personnes confirmées par PCR, aucune n'a mentionné une transfusion sanguine ou une intervention chirurgicale antérieure.

Tableau I.

Résultats des tests ELISA de deuxième génération, les tests de confirmation et PCR chez les donneurs de sang positifs pour les tests immunoblot et/ou PCR.

ident.	abbott	inno	organ.	ortho	innol.	ortho RIBA	PCR
1.	+	+	+	+	+	+	+
2.	+	+	+	+	+	indét.	+
3.	+	+	+	+	-	indét.	+

Chez les malades avec une hépatopathie (93 cas)

Quatre-vingt-treize patients hospitalisés au Centre hospitalier départemental atteints d'hépatopathie chronique ont été inclus dans notre étude: il s'agissait de 54 malades souffrant de cirrhose hépatique (58 %) et de 39 malades atteints d'une tumeur du foie (42 %); l'âge médian était de 40 ans; il y avait 62 hommes (67 %) et 31 femmes. Nous avons essayé de ne retenir que les tumeurs primitives du foie; par le fait que l'alphafetoprotéine n'a pas été déterminée et qu'une biopsie hépatique et un examen anatomopathologique n'ont pas pu être effectués, un diagnostic différentiel exact entre tumeur primitive du foie et métastase hépatique ne peut pas être garanti. Les résultats des différents tests VHC positifs dans le groupe des personnes avec hépatopathie sont représentés dans le tableau II.

Trois malades étaient positifs pour les quatre tests ELISA, les deux immunoblots et la PCR (génotype 2a). Deux autres malades étaient positifs pour les 4 tests ELISA et les deux

immunoblots, mais PCR négatifs. Quatre autres malades étaient positifs pour deux tests ELISA, mais négatifs pour les immunoblots et la PCR. Dans ce groupe, 5 malades peuvent être considérés comme séropositifs.

Tableau II.

Résultats des tests ELISA de deuxième génération, les tests de confirmation et PCR chez les malades positifs pour un des tests utilisés.

données cliniques	abbott	innotest	organon	ortho	Innolia	ortho riba	amplicor
1. cirrhose	+	+	+	+	+	+	+
2. cirrhose	+	+	+	+	+	+	+
3. TPF	+	+	+	+	+	+	+
4. TPF	+	+	+	+	+	+	-
5. TPF	+	+	+	+	+	+	-
6. cirrhose	-	+	+	-	-	-	-
7. cirrhose	+	-	-	+	-	-	-
8. cirrhose	-	+	+	-	-	-	-
9. cirrhose	-	+	+	-	-	-	-

TPF : tumeur primitive du foie

Aucun des 11 malades se rappelant d'antécédents de transfusion sanguine ou des 6 patients ayant subi une intervention (4 laparotomies et 2 césariennes) n'était positif pour les anti-VHC.

Discussion

L'agent responsable des hépatites virales de type C n'a été découvert que relativement récemment: ceci explique que la connaissance de l'épidémiologie et son influence sur le développement de certaines complications hépatiques sont encore mal connues (2,3). Afin d'estimer l'ampleur de l'infection à VHC au sein de la population nigérienne et d'évaluer une influence éventuelle sur le développement de certaines hépatopathies, notre étude a essayé de comparer la prévalence du VHC dans une population apparemment saine (donneurs de sang) et dans un groupe de personnes se présentant à l'hôpital avec une pathologie hépatique. Notre étude a trouvé une séroprévalence de 2,5 % chez les donneurs de sang, chiffre nettement plus important que le chiffre de 0,5% trouvé dans une autre étude faite en 1990 (5). La séroprévalence de 5,4 %, trouvée chez les patients, ne diffère pas d'une manière significative de celle de la population "normale" (Chi carré avec Fisher's Exact Test > 0.05). Les individus qui n'étaient positifs que pour un ou plusieurs tests ELISA étaient considérés comme des faux positifs. La virémie était de 2,5 % chez les donneurs de sang et de 3,2 % chez les malades. Le génotype 2a d'après la classification de SIMMONDS était retrouvé dans 4/6 serums positifs pour la PCR. Il est à noter que le sex ratio et l'âge médian des deux populations étudiées était différent: ceci est dû au fait que dans le groupe des donneurs de sang,

seulement les jeunes (et surtout les hommes) acceptent de donner du sang. Dans notre étude, nous n'avons pas pu établir une relation éventuelle entre une séroprévalence ou virémie positive et développement d'une pathologie hépatique chronique. Nos résultats diffèrent donc d'un certain nombre d'autres études antérieures qui ont trouvé une prévalence plus élevée du VHC chez les malades atteints d'une hépatopathie chronique (10)

Notre étude n'a pas pu trouver non plus une relation éventuelle entre transfusion sanguine, intervention chirurgicale et infection avec le virus de l'hépatite C. En ce qui concerne le mode de transmission du virus de l'hépatite C, le dernier mot n'est probablement pas dit, et une transmission importante, autre que la transfusion sanguine, n'est certainement pas à exclure.

Références bibliographiques

- ACETI A & TALIANI G - Hepatitis C virus testing in African sera. *Ann Intern Med* 1992, **116**, 427.
- ALBERTI A - Diagnosis of Hepatitis C: facts and perspectives. *J Hepatol*, 1991, **12**, 279-282.
- COURSAGET P, BOURDIL C, KASTALLY R *et al* - Prevalence of hepatitis C virus infection in Africa. *Res Virol*, 1990, **141**, 449-454.
- COURSAGET P, LEBOLLEUX D, LE CANN P *et al* - Hepatitis C virus infection in cirrhosis and primary hepatocellular carcinoma in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1992, **86**, 552-553.
- DEVELOUX M, MEYNARD D & DELAPORTE E - Low rate of hepatitis C virus antibodies in blood donors and pregnant women from Niger. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1992, **86**, 553.
- HIDEAKI TSUKUMA MS, TOMOHIKO H., SACHIKO T. *et al* - Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *New Engl J Med*, 1993, **328**, 1797-1801.
- LAURENT C, LI J-S, BREBY F *et al* - Détection par PCR de l'ARN viral dans le sérum des infections à VHC aiguës et chroniques. *Gastroenterol Clin Biol*, 1992, **16**, 7.
- MARCHAND F, DEFORGES L & GIROLLET PP - Evaluation comparée des tests ELISA et RIBA ORTHO et du test ABBOTT pour la mise en évidence des anticorps anti-VHC. *Gastroenterol Clin Biol*, 1991, **15**, 96.
- NIANG A & KLOTZ F - Le virus C en Afrique, *Méd trop*, 1993, **53**, 101-104.
- SIMONETTI R, CAMMA C, FIORELLO F, COTTONE M & RAPICETTA M - Hépatite C, cirrhose et carcinome hépatocellulaire : une trilogie désormais bien établie. *Ann Intern Med*, 1992, **116**, 97-102.
- YOUNG KKY, RESNICK RM & MYERS TW - Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**, 882-886.
- ZAAIJER HL, CUYPERS HTM & REESINK HW - Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet*, 1993, **341**, 722-724.
- ZAAIJER HL, VRIELINK H, VAN EXEL-OEHLERS PJ, CUYPERS HTM & LELIE PN - Confirmation of hepatitis C infection: a comparison of five immunoblot assays. *Transfusion*, 1994; **34**, 603-607.