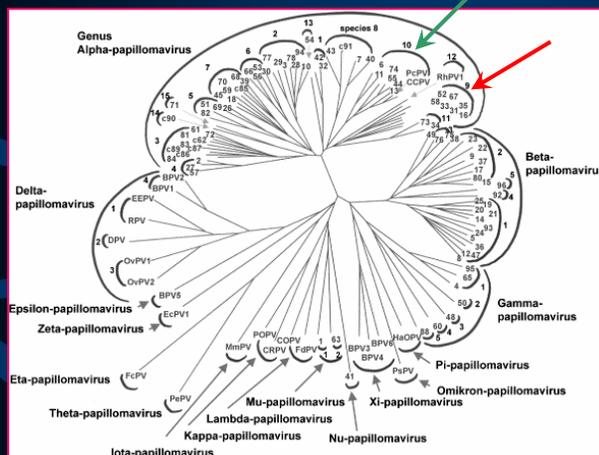


Les tests viraux pour le VPH: possibilités et limites

François Coutlée MD FRCP
Laboratoire de Virologie Moléculaire
Centre de Recherche, CHUM
Département de Microbiologie,
Université de Montréal

Novembre 2005

Classification des *Papillomaviridae*: une famille virale complexe



Degré d'homologie L1:

- >60% même genre
- 60-90% même espèce
- >90% même type
- 90-98% même sous-type
- >98% variants

16 genres de PV classifiés en espèce puis en types
VPH-16: espèce 9 du genre des alpha-papillomavirus

Cette présentation a été effectuée le 16 novembre 2005, au cours de la journée « Le virus du papillome humain : comment mieux prévenir les infections et les cancers qui lui sont associés ? » dans le cadre des Journées annuelles de santé publique (JASP) 2005. L'ensemble des présentations est disponible sur le site des JASP, à l'adresse <http://www.inspq.qc.ca/jasp/archives/>.

La grande famille des VPH génitaux



- > 100 génotypes VPH caractérisés
- Génotypes cutanés à définir
- ± 40 génotypes génitaux
- **Définition des génotypes:**
basée sur l'homologie de séquence d'ADN de L1.

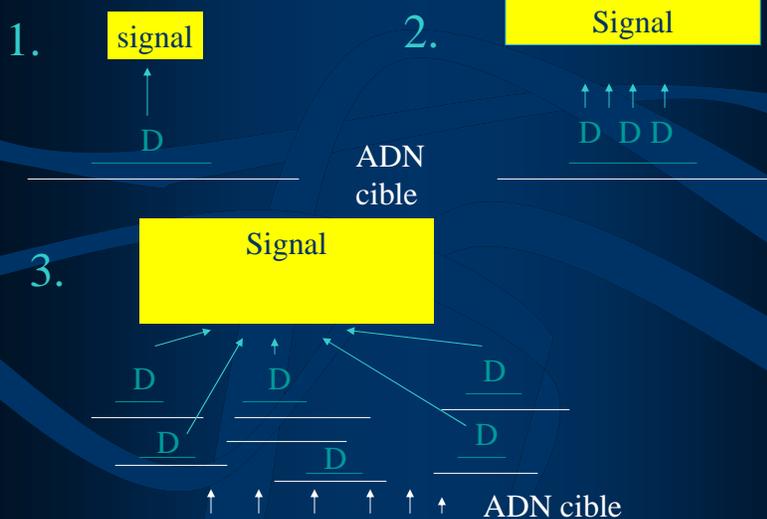
Table 5. Phylogenetic and Epidemiologic Classification of HPV Types.

Phylogenetic Classification	Epidemiologic Classification	
	High risk	Low risk
High risk	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26,* 53,* 56*	70
Low risk	73	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, CP6108

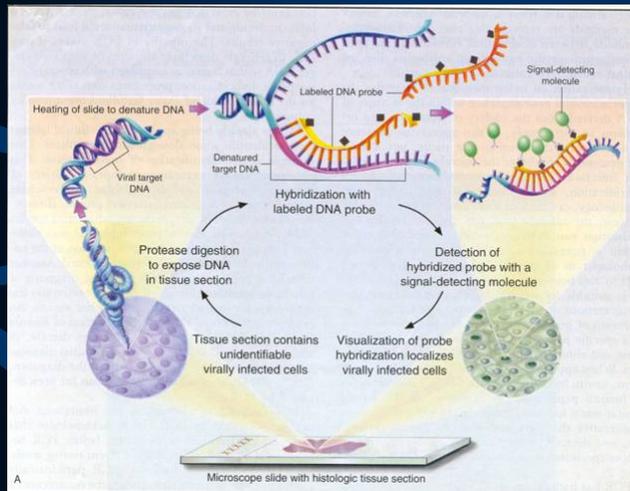
* The epidemiologic classification of these types as probable high-risk types is based on zero controls and one to three positive cases.

Munoz et al. NEJM 2003; 348

Méthodes de détection des acides nucléiques



Méthode de détection directe: Hybridation in situ



- sur des biopsies
- corrélation histo-VPH
- Utilité limitée
- Peu sensible
- Génotypage limité

Triage et Dépistage des lésions de haut grade

- 1) Types de VPH impliqués dans le cancer du col
- 2) Tests de triage des ASCUS
- 3) Tests de dépistage primaire

Types de VPH impliqués dans le cancer invasif du col utérin

(Métaanalyse de GM Clifford et al, British J. of Cancer 2003 88: 63-73.)

- Distribution des types de VPHs dans les cancers invasifs du col en Amérique du Nord:

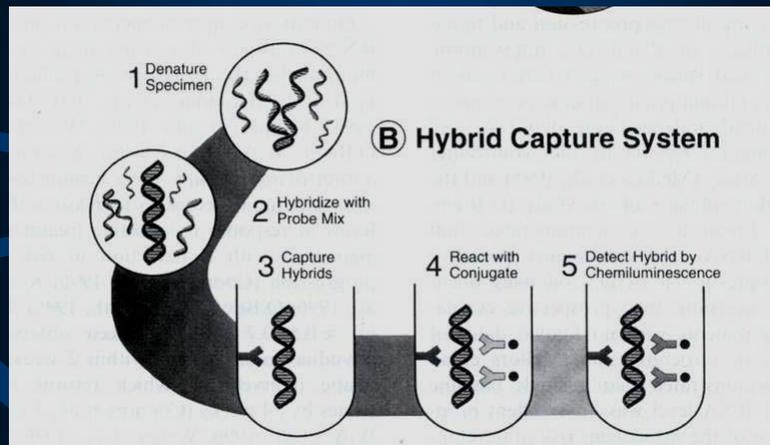
- Type 16 62%
- Type 18 13%
- Type 31 4%
- Type 33 3%
- Type 45 2%
- Type 52 1.5%

85% des cancers invasifs

- Ordre de Fréquence des types (mondialement)

16,18,45,31,33,58,52,35,59,56,6,51,68,39,82,73,66,70

Amplification de signal des VPH par Hybrid capture (HC2, Digene)



HC2: Test de détection semi-quantitatif des VPH HR et LR

Détection des VPH par HC2

- Protocole standardisé
- Bonne formation offerte et épreuve de compétence
- Suivi adéquat des problèmes
- Format de test facilement applicable en diagnostic.
- Seuil de positivité: 1 pg/ml=5000 copies virales, mais parfois plus sensibles que PCR consensus
- concordance/corrélation inter- et intralaboratoire de très bonne à excellente ($k > 0.80$).
- Test appliqué sur des spécimens prélevés dans le
 - STM (Specimen Transport Medium)
 - Cytologie liquide (Preservcyt)
 - faux positifs plus fréquents
 - corrélation inter laboratoire plus faible

Détection des VPH HR avec HC2

- Mélange de sondes HR pour 13 types:
 - 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.
 - Approuvé par la FDA pour le triage des ASCUS
 - en cours d'évaluation pour:
 - dépistage primaire du cancer du col
 - modification de l'intervalle de dépistage
 - réponse au traitement des CIN2-3
 - auto-prélèvement
- Mélange de sondes LR pour 5 types
 - 6, 11, 42, 43, 44.
 - Utilité reste à définir ==> peu utilisé

Détection des VPH HR avec HCII

- Mélange de sondes HR pour 13 types:
 - Réaction croisée avec
 - types HR (26,53,66)
 - types LR (6,42,54,67,71,73)
 - Zone grise de positivité (RLU 1.0-3.0)
 - résultats moins reproductibles
 - résultats moins fréquemment confirmés par PCR
 - plus fréquent avec spécimens de cytologie liquide
 - spécimens à confirmer par
 - retester
 - autre technique
 - Pas d'identification individuelle des types
 - importance de HPV-16 (à évaluer séparément?)
 - évaluation de la persistance plus difficile

Évolution du test HC2

- Hybrid Capture 3
 - technologie similaire au HC2
 - capture des hybrides par des sondes oligonucléotidiques + 'sondes interférentes'
 - ↓ des résultats faux-positifs causés par la détection d'hybrides non-spécifiques (traitement alcalin incomplet)
 - Plus sensible que HC2 pour détecter les CIN2-3.
 - Moins de réaction croisée que HC2
- Rapid capture
 - Analyse à haut débit
 - Automatisation du test post-traitement des spécimens.

Détection des VPH HR par PCR (Amplior)

- PCR consensus avec amorces non-dégénérées (fragment de 170 pb)
- 13 génotypes HR idem HC2
- Bonne formation offerte et épreuve de compétence
- Test sensible et spécifique (analytique).
- Format de test en microplaque de 96 puits identique aux tests Amplior (Chlamydia)
- Semi-automatisé (< Cobas Amplior)
- **Problème de contamination:** problème contrôlé
- **Contrôle de la qualité du spécimen** fait (absent pour HC2)
- **Traitement des spécimens plus fastidieux que HC2**
- **En évaluation: prometteur.**

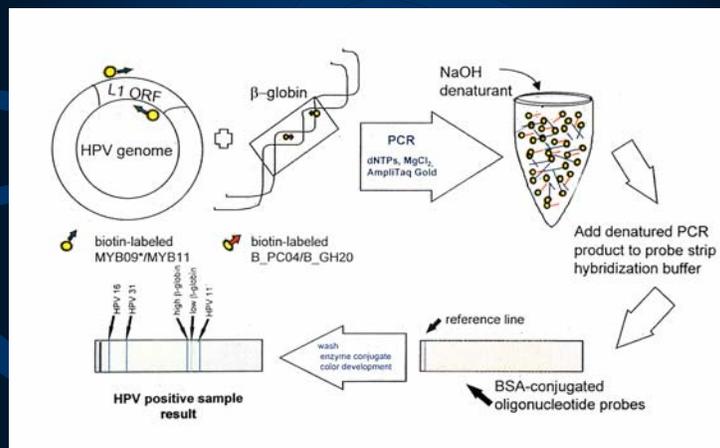
Détection de l'ARNm des VPH (PreTect HPV-Proofer).

- Technique NASBA déjà utilisée pour d'autres agents (VIH, CMV) pour détecter l'ARNm
- Types identifiés: 16, 18, 31, 33, 45
- Permettrait de différencier entre une infection sans lésion et avec lésion par l'expression des oncogènes des VPHs
- Valeur dans le triage des ASCUS:
 - Bonne sensibilité équivalente au PCR
 - spécificité possiblement meilleure que PCR
- **Évaluations à poursuivre. Peu en Amérique.**

PCR spécifique de type

- Aucune méthode commercialisée
- Par PCR conventionnel ou en temps réel
- Plus sensible que les tests PCR consensus
- Spécifique d'un seul type
- Fastidieux pour la sphère génitale (40 types)
- Utile pour
 - confirmation de PCR consensus avec sondes croisées
 - post-vaccinal
 - discordance de résultats (persistance, transmission)

Génotypage par PCR avec amorces consensus: Principe de test



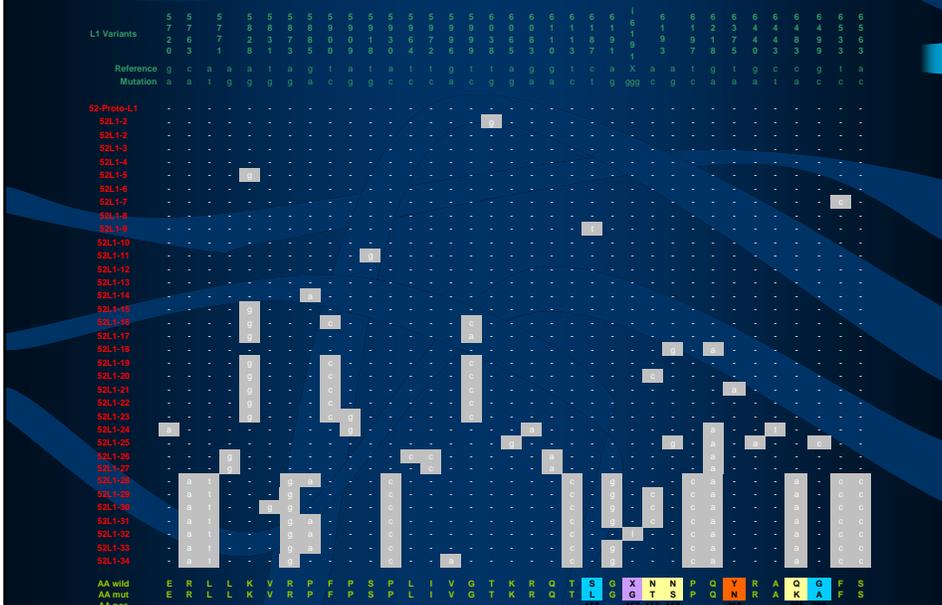
PCR consensus avec géotypage: tests les plus standardisés

PCR	Primers	#types	standardisé	Screening HPV DNA	contrôle qualité
PGMY -LA	mixte	37	+	-	+
SPF10	mixte	43	+	+	-
GP5/6	dégén.	37	-	-	-

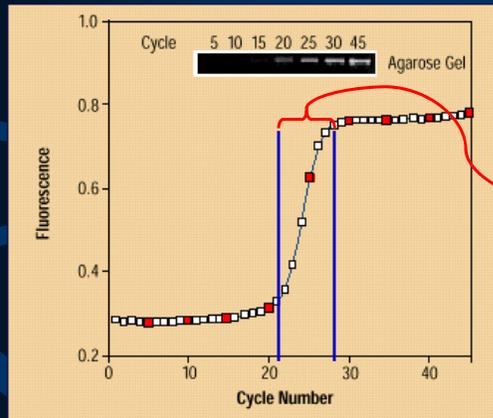
PGMY > SPF : types 42, 56, 59

SPF > PGMY : types 31, 52

PCR-séquencage: Polymorphisme de VPH-52 L1



PCR en temps réel: Méthode de quantification précise des VPHs



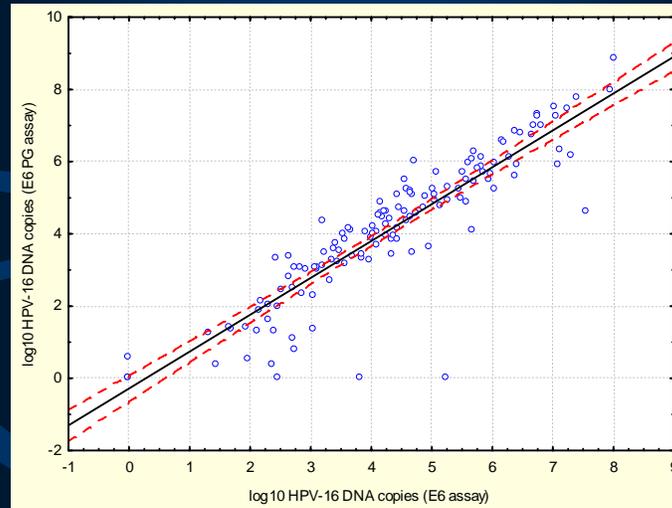
Souvent la quantification en PCR standard a lieu alors que le système est saturé

Noter que la phase linéaire est présente pendant seulement 4 à 5 cycles

Le PCR en temps réel: mesure de la charge virale

- Aucun test commercialisé
- Méthode quantitative démontrée.
- Relation linéaire entre le signal et la quantité de cible sur > 9 logs.
- Mesure spécifique de type désirable.
- Contrôle de la quantité de cellules analysées pour la charge virale.
- Contrôle pour la présence d'inhibiteurs par un contrôle interne
- Mesure de l'intégration des VPHs: un biomarqueur de progression?

Corrélation entre HPV-16 E6 et E6 PG (n= 142 échantillons)



$r= 0.89$ and $\rho=0.92$ ($p < 0.001$).

Indications des tests de détection VPH

- Outils diagnostics

- Hybridation in situ: diagnostic pathologique
- Amplification signal (HCII): triage, dépistage primaire, augmenter l'intervalle de dépistage?
- PCR consensus (Amplicor): triage, dépistage?
- PCR mRNA (HPV-Proofer): triage?

- Outils de recherche

- PCR spécifique de type: confirmation et vaccins
- PCR consensus: typage étendu
- PCR-séquencage et Chips : typage, polymorphisme
- PCR temps réel: charge virale et intégration