



HAL
open science

Co-infection VIH/VHC : développement et mise en oeuvre d'outils paracliniques pour la prise en charge dans le pays à ressource limitée et la personnalisation thérapeutique

Truong Tam Nguyen

► **To cite this version:**

Truong Tam Nguyen. Co-infection VIH/VHC : développement et mise en oeuvre d'outils paracliniques pour la prise en charge dans le pays à ressource limitée et la personnalisation thérapeutique. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT3508 . tel-02990451

HAL Id: tel-02990451

<https://theses.hal.science/tel-02990451>

Submitted on 5 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER UFR-PHARMACIE**

Préparée au sein de l'école doctorale
SCIENCES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES POUR LA SANTE
Et de l'unité de recherche
INSERM UMR 1058 - UNIVERSITE MONTPELLIER

Spécialité : **BIOLOGIE - SANTE**

Présentée par Monsieur **Truong Tam NGUYEN**

TITRE DE LA THESE :

Co-infection VIH/VHC : développement et mise en œuvre d'outils paracliniques pour la prise en charge dans le pays à ressources limitées et la personnalisation thérapeutique

Soutenue le **17 décembre 2015** devant le jury composé de

Monsieur **Edouard TUAILLON**, MCU-PH

Directeur de thèse

Madame **Maud LEMOINE**, PH

Co-directeur de thèse

Monsieur **Stéphane CHEVALIEZ**, PU-PH

Rapporteur

Monsieur **Michel MOUTSCHEN**, PU-PH

Rapporteur



Remerciements :

Je tiens à remercier ici :

Monsieur le Docteur Edouard TUAILLON, mon directeur de thèse : un grand remerciement pour sa direction, son précieux encadrement tout au long de mon travail, son encouragement en permanence, sa bienveillance afin que je puisse finir mon projet à terme.

Madame le Docteur Maud LEMOINE, mon co-directeur de thèse, pour son encouragement tout au long de mes trois années de thèse. Elle m'a donné l'occasion de travailler avec une équipe de recherche pluridisciplinaire, en particulier dans son projet Pilote ANRS 12262, au Vietnam.

Monsieur le Professeur Michel MOUTSCHEN et à Monsieur le Professeur Stéphane CHEVALIEZ pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer ce travail, et d'être rapporteurs de thèse.

Monsieur le Professeur Philippe VAN DE PERRE de m'avoir accepté au sein de son équipe de recherche.

Un grand merci aux Docteur Didier LAUREILLARD et Docteur Nicolas NAGOT pour leur soutien sans cesse tout au long de mon travail de thèse

Un grand remerciement à toute l'équipe de recherché ANRS Site Vietnam :

Le Professeur Françoise BARRE-SINOUSI

Le Professeur TRUONG Thi Xuan Lien

Le Professeur Laurence WEISS

Le Professeur Pierre DUJOLS

Le Docteur Nicolas NAGOT

Le Docteur Didier LAUREILLARD

Le Docteur Karine LACOMBE

Madame Catherine QUILLET

Le Docteur NGUYEN Van Vinh Chau

Le Docteur DUONG HuongThi

Le Docteur VO Thi Tuyet Nhung

Le Docteur VU Hai Vinh

Le Docteur HOANG Huynh Khanh Thu

Le Docteur LUONG Que Anh

Je remercie l'ensemble du personnel et toute l'équipe de l'UMR – INSERM U1058 du Professeur Philippe Van de Perre et le laboratoire de Virologie du CHU Lapeyronie de Montpellier pour leur gentillesse et accueil chaleureux.

Merci à tous mes collègues de l'équipe de recherche l'IRB :

Karine BOLLORE

Dramane KANIA

Sylvie ZIDA

à toutes celles et ceux qui m'ont accompagné dans ce travail, m'ont encouragé et ont mis toutes leurs compétences et leur savoir à profit pour faire avancer mon travail. Merci pour leur disponibilité de tous les instants.

Table des matières

Remerciements :	1
Table des matières	3
Liste des figures :	5
Liste des abréviations et sigles :	6
Résumé :	8
Abstract:	10
I. Introduction	13
I.1. Situation épidémiologique des infections à VIH et à hépatite C dans le monde, en Asie et au Vietnam	13
I.1.a. La pandémie VHC	13
I.1.b. L'épidémie VHC au Vietnam :	13
I.1.c. L'épidémie VIH au Vietnam	14
I.1.d. Usagers de drogues par voie intraveineuse - groupe à risque majeur au Vietnam	14
1.2. Prévention de la transmission du VHC et réduction des risques chez les UDI	16
II. Généralité sur la prise en charge du VIH, du traitement de substitution et de l'hépatite C dans le monde et au Vietnam	19
II.1. Prise en charge thérapeutique du VIH dans le monde et au Vietnam	19
II.2. Brève historique de la prise en charge thérapeutique du VIH et situation actuelle au Vietnam.	19
II.3. Prise en charge des UDI et programme Méthadone au Vietnam	20
II.4. Contexte thérapeutique de l'hépatite virale C	22
II.5. Evolution de la maladie hépatique chez les patients co-infectés VIH et VHC	24
II.6. Dépistage et prise en charge du VHC dans les pays du Sud et au Vietnam	25
II.7. Les obstacles empêchant l'accès au soin chez les IDU pour le traitement VHC.	27
III. Outils et moyens de la cascade de la prise en charge de l'hépatite C chez les co-infectés :	30
III.1. Tests de diagnostic rapide VHC et VIH	30
III.1.a. Les TRD du VIH :	30
III.1.b. Les TRD du VHC	32
III.2. PCR du VHC et antigène (Ag) de capside	33
III.3. Tests de diagnostic VIH et VHC sur DBS	33
III.3.a. Avantage du prélèvement de sang sur DBS :	33
III.3.b. Analyses VIH sur DBS :	33
III.3.c. Analyses VHC sur DBS	34
IV. Personnalisation thérapeutique dans la prise en charge de l'hépatite C	38
IV.1. Evaluation de l'atteinte hépatique (fibrose hépatique, activité inflammatoire)	38
IV.1.a. Tests biochimiques	38

IV.1.b	Méthode non invasive d'évaluation de la fibrose par élastométrie (Fibroscan®).....	39
IV.1.c	Ponction-biopsie hépatique (PBH).....	40
IV.2.	Facteurs de prédiction avec les associations pegIFN/ribavirine.....	40
IV.2.a	Les facteurs de prédiction virologique :.....	40
IV.2.b	Facteurs de prédiction métabolique:.....	40
IV.2.c	Facteurs de prédiction génétiques et immunologiques :.....	41
IV.3.	Obstacles à l'amélioration de la prise en charge de l'hépatite C au Vietnam	41
V.	Objectifs de la thèse	44
VI.	Objectifs spécifiques.....	44
	Travail 1 :	45
	Travail 2 :	67
	Travail 3:	76
VII.	Discussions	84
VIII.	Conclusion et perspectives pour la prise en charge de l'hépatite C au Vietnam	87
	Références.....	88

Liste des figures :

La figure 1 : Répartition des génotypes du VHC en Asie du Sud Est

Figure 2 : Prévalence du VHC chez les UDI

Figure 3 : Répartition des co-infections VHC/VIH à Thai Nguyen, Vietnam

Figure 4 : Proportion de sujets traités : plus de 80% de nouveaux cas VHC chez les UDI, mais seulement 1-2% des patients bénéficiaires du traitement antiVHC par an

Figure 5 : Proportion d'UDI infectés par le VHC traités en 2012

Figure 6 : Efficacité des stratégies de réduction des risques sur l'épidémie VIH au Vietnam

Figure 7 : Nombre des patients inclus dans le programme Méthadone au Vietnam

Figure 8 : Nombre des cliniques Méthadone répartis sur toutes les provinces du Vietnam

Figure 9 : Evolution thérapeutique du VHC avec taux de succès thérapeutique

Figure 10 : Nombre de décès/an des principales pandémies.

Figure 11 : Budget du fond mondial attribué aux maladies infectieuses

Figure 12 : Barrières de l'accès aux soins du VHC chez les UDI

Figure 13 : Place des tests rapide HIV dans le dépistage selon les structures de soins

Figure 14 : Algorithme diagnostique du VIH des tests rapides recommandé par l'OMS

Figure 15 : Sensibilité de la détection de l'ARN VHC sur DBS

Figure 16 : Spécificité de la détection de l'ARN VHC sur DBS

Figure 17 : Stratégie possible de dépistage décentralisé combinant tests POC, DBS, test de laboratoire et rendu de résultats par sms.

Figure 18 : Facteurs associés à la réponse thérapeutique du traitement anti-VHC

Figure 19 : Estimation de la cascade de soins (VHC) des patients infectés par le VIH au Vietnam

Tableau 1 : Nombre de personnes vivant avec le VIH traitées par ARV au Vietnam

Tableau 2: Indication thérapeutique du VHC, recommandation européenne EASL 2015

Liste des abréviations et sigles :

AASLD : American Association for the Study of Liver

Ac : anticorps

Ac anti-HBe : anticorps dirigé contre l'antigène e du virus de l'hépatite B

Ac anti-HBs : anticorps dirigé contre l'antigène de surface du virus de l'hépatite B

Ag : antigène

AgHBc : antigène de core du virus de l'hépatite B

AgHBe : antigène e du virus de l'hépatite B

AgHBs : antigène de surface du virus de l'hépatite B

ALAT : alanine-aminotransférase ADN : acide désoxyribonucléique

ANRS : France REcherche Nord & sud Sida-hiv Hépatites

APRI : AST to Platelet Ratio Index

ARV : antiretroviral

ASAT : aspartate aminotransférase

CHC : carcinome hépatocellulaire

DAA : direct acting antiviral drug

DBS : Dried Blood Spot

DBS : Dried Blood Spot

DNA : deoxyribonucleic acid

DPS : Dried Plasma Spot

DSS : Dried Serum Spot

EASL : European Association for the Study of the Liver

ESTHER : ensemble pour une solidarité thérapeutique hospitalière

HAART : highly active antiretroviral therapy

HBV : hepatitis B virus

HCV: hepatitis C virus

HIV: human immunodeficiency virus

HSH : hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes

IFN α -pégylé : interféron alpha pégylé

IDSA : Infectious Diseases Society of America

IgG : immunoglobuline de type G

IgM : immunoglobuline de type M

IP : inhibiteur de protéase

IP-10 (CXCL-10): Interferon gamma-induced protein 10 (C-X-C motif chemokine 10)

Log : logarithme

MCP-1 (CCL-2) : monocyte chemotactic protein 1 (chemokine C-C motif ligand 2)

OMS : Organisation mondiale de la santé

OPC : Out Patient Clinic

p24 : protéine 24

PCR : polymerase chain reaction

PEPfar : President's Emergency Plan for AIDS

POCT : point-of-care testing

TROD : tests rapides d'orientation diagnostic

TAsP: Treatment as prevention

TDR : test de diagnostic rapide

UDI : Usagers de drogue par voie intraveineuse

VAAC : Vietnam Administration of HIV/AIDS control

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

VHD : virus hépatite Delta

VIH : virus de l'immunodéficience

WB : western blot

WHO : World Health Organization

Résumé :

Les hépatites virales constituent un problème majeur de santé publique dans le monde. L'enjeu pour les pays du Sud est de mettre en œuvre des stratégies de dépistage et de prise en charge des hépatites virales, en particulier pour l'hépatite C chez les usagers de drogues par voie intraveineuse dans les pays à ressources limitées.

La première étude est une évaluation clinico-virologique chez les patients co-infectés VIH/VHC à Haiphong, au Nord du Vietnam (ANRS 12262). Pour la première fois au Vietnam, une étude est menée pour l'évaluation des caractéristiques clinico-virologiques, en particulier le degré de fibrose hépatique chez des sujets co-infectés VIH/VHC. Cent quatre patients co-infectés VIH/VHC (confirmation sérologique, avec présence de l'Ac Anti-VHC) ont été inclus. L'évaluation clinique, biologiques et virologique et celle de la fibrose par élastographie hépatique (Fibroscan®, Echosens) ont été réalisées le jour d'inclusion dans l'étude. Parmi, 93 (89,4%) patients étaient positifs pour l'ARN VHC avec médiane 6,19 (4,95 à 6,83 log₁₀ UI/mL). La plupart des patients étaient infectés par les génotypes 1a/1b (69%) et les génotypes 6a/6e (26%). 43 patients (41,3%) présentaient une fibrose significative (\geq F2), dont 24 patients (23,1%) avec une fibrose extensive (F3) et/ou une cirrhose hépatique (F4). L'évaluation de la fibrose hépatique par l'élastométrie (Fibroscan®) a été utilisée comme technique de référence et les résultats ont été comparés avec le test APRI (AST-to-platelet ratio index) recommandé par l'OMS pour la prise en charge des patients infectés par le VHC dans les pays à ressources limitées. En utilisant le fibroscan comme gold standard, le cut-off de l'APRI supérieur ou égal à 2 permettait de classer les patients avec fibrose sévère/cirrhose avec une sensibilité de 90% et une spécificité de 84% (AUROC = 0,93, IC 95%: 0,86 à 0,99).

Dans la deuxième étude nous avons étudié la réponse immunitaire à la bithérapie PegIFN α -ribavirine chez 30 patients co-infectés VIH/VHC. Nous avons mesuré la réponse de 25 cytokines et l'activation T CD8 chez ces patients afin de mieux comprendre les déterminants du succès thérapeutique. Les résultats ont été comparés entre les patients classés « RVS » (réponse virologique soutenue) (RVS, n = 19) et les non-répondeurs à la bithérapie pégylée (NR, n = 11). Le changement en concentration des cytokines lié à la thérapie PegIFN α -ribavirine a été observé chez les patients RVS et NR avec une réponse plus variée, polyfonctionnelle et plus intense qui signait la bonne

réponse dans le groupe RVS. Le changement en concentration sérique de l'IL-8, MIP-1 β et MCP-1 pourrait être associé à l'efficacité de la bithérapie PegIFN α -ribavirine chez les patients co-infectés par le VIH et le VHC.

Notre dernière étude portait sur l'évaluation de la performance diagnostique de la primo-infection du VIH avec le support DBS (Dried Blood Spot) par rapport aux tests rapides. Cette étude a été rétrospectivement réalisée chez 39 cas diagnostiqués pour une primo-infection par le VIH au CHU de Montpellier. Le dépistage de la primo infection VIH sur DSS présentait une sensibilité de 87.2% (34/39) avec le test Ag/Ac combiné 4^e Generation (ElecsysCombi PT test reactive et Liaison XL test reactive) témoignant de la bonne performance de cette approche. Ces résultats montrent pour la première fois que le dépistage de l'infection précoce à VIH sur papier buvard est un complément et/ou une alternative possible aux tests rapides qui sont insuffisamment sensibles dans cette situation.

En médecine, la technique doit être au service de l'optimisation diagnostique et thérapeutique. Les trois études abordées dans ce travail de thèse illustrent des voies de progrès possibles dans la prise en charge de la co-infection VIH/VHC par une amélioration du dépistage, du bilan pré-thérapeutique, et du suivi thérapeutique.

Mot clés : Co-infection HIV-VHC, usagers de drogues par voie intraveineuse, dried blood spot, fibrose hépatique, fibroscan, APRI, interféron pégylé, Vietnam.

Abstract:

Chronic viral hepatitis is a major public health issue worldwide in the field of infectious diseases and mostly affects resource-limited countries. The challenge for the resource-limited countries is to implement the strategies for screening and management of viral hepatitis, particularly for hepatitis C among people who inject drugs.

We conducted for the first time a cross-sectional study aimed to assess the proportion of clinically significant fibrosis in HIV/HCV-co-infected patients followed in Viet Tiep Hospital in Haiphong, Northern Vietnam. We also identified epidemiological, virological and clinical characteristics associated with extensive fibrosis/cirrhosis. Since WHO ranked the aspartate transaminase (AST)-to-platelet ratio index (APRI) as a preferred non-invasive marker of extensive fibrosis and cirrhosis in resource-limited settings. We also evaluated its diagnostic performance in this HIV-HCV co-infected population using hepatic transient elastography (Fibroscan® Echosens) as a gold standard. From February to March 2014, 104 HIV-HCV co-infected patients receiving antiretroviral therapy (ART) were prospectively enrolled. 93 (89.4%) had detectable HCV RNA, median 6.19 (4.95-6.83 Log₁₀ IU/mL). Patients were mainly infected with genotypes 1a/1b (69%) and genotypes 6a/6e (26%). 43 patients (41.3%) had fibrosis \geq F2 including 24 patients (23.1%) with extensive fibrosis (F3) and/or cirrhosis (F4). Using Fibroscan® as a gold standard, the high threshold (2) of AST-to-platelet ratio index (APRI) had very good performances for the diagnosis of extensive fibrosis/cirrhosis (Se: 90%, Sp: 84%, AUROC=0.93, 95%CI: 0.86-0.99).

Pegylated interferon (PegINF) and ribavirin therapy still were the antiviral treatment of hepatitis C for a long time. This combination antiviral therapy induces important changes on cytokine release and T cell activation. Immune response to pegIFN α -ribavirin therapy was explored in patients co-infected by HCV and HIV. Concentrations of 25 cytokines and CD8+ T cell activation were monitored in HCV/HIV co-infected patients. Results were compared between patients retrospectively classified as sustained virological responders (SVR, n=19) and non-responders (NR, n = 11). High pretreatment concentrations of IP-10 (CXCL-10) and MCP-1 (CCL-2) were associated with poor anti-HCV response. Highest rise in MIP-1 β and MCP-1 levels was observed

four weeks after anti-HCV treatment initiation in SVR compared to NR, whereas a decrease of IL-8 concentration was associated with treatment failure ($p= 0.052$).

The last study is related to evaluation the diagnostic performances for detection of early HIV infections on filter paper (DSS – Dried serum spot) compared with rapid tests. A total of 39 serum samples from newly diagnosed HIV infected persons collected of early phases of infection, between 2002 and 2012. Fourth generation immunoassays (ElecsysCombi PT test reactive and Liaison XL test reactive) identified 34 out of 39 HIV early infections using dried serum spot, whereas the DetermineTMHIV-1/2 rapid test detected 24 out of 39 HIV positive serum (87.2% vs 61.5% respectively, $p = 0.009$). Fourth generation Ag/Ab immunoassays performed on dried serum spot had good performance for HIV testing during the early phases of HIV infection.

New techniques should be at the service of diagnostic and therapeutic optimization. The three studies discussed in this thesis illustrate potential strategies to improved access and care in the setting of HIV-HCV co-infection: improved screening, pre-therapeutic assessment, therapeutic monitoring.

Key word : Co-infection HIV-HCV, IV drug user, dried blood spot, liver fibrosis, fibroscan, APRI, Pegylated interferon, Vietnam.

INTRODUCTION

I. Introduction

I.1. Situation épidémiologique des infections à VIH et à hépatite C dans le monde, en Asie et au Vietnam

I.1.a. La pandémie VHC

Environ 170 millions de personnes sont porteurs d'une infection chronique par le virus de l'hépatite C (VHC) soit environ 3% de la population mondiale. La pandémie du VHC constitue de ce fait un enjeu majeur de santé public dans le domaine des maladies infectieuses [1]. Le VHC serait la cause de 499.000 décès/an [2]. La prévalence de l'hépatite C chronique est globalement plus élevée au Sud qu'au Nord [3-5]. Les prévalences les plus élevées sont observées dans certains pays d'Afrique comme en Egypte (14.7%), le pays le plus endémique au monde [6], et en Asie du Sud où la prévalence est estimée à 3.4% [7-9]. En l'absence de traitement, la gravité de l'infection par le VHC est étroitement liée au risque d'évolution vers la cirrhose, l'insuffisance hépatique et le carcinome hépatocellulaire (CHC) [10, 11]. Entre 15 et 30% des sujets infectés par le VHC risquent de développer une cirrhose sur une période de 20 ans [12] avec un risque de CHC estimé entre 2 et 4% par an selon les études [13]. De nombreuses études ont démontré que la co-infection avec le VIH accélère la progression de la fibrose et augmente le risque de cirrhose et de CHC chez les sujets infectés par le VHC [14]

I.1.b. L'épidémie VHC au Vietnam :

Prévalence : le Vietnam présente une séroprévalence estimée entre 1 et 5% dans la population générale. Ainsi dans la province de Binh Thuan, au centre du pays, une étude récente réalisée chez 506 adultes a rapporté une séroprévalence de 3.3% avec 1.8% de personnes virémiques [15]. Ces résultats sont proches de ceux précédemment décrits avec des chiffres variant entre 0.38% et 4.3% [16].

Génotype du VHC : la distribution génotypique de l'hépatite C en Asie présente des particularités remarquables comparativement à l'Europe et à l'Afrique. En effet, plusieurs études ont mis en évidence la prédominance du génotype 6 en Chine, au Myanmar, Laos, Vietnam, Cambodge [17-21] (Figure 1). En revanche, en Thaïlande, pays voisin du Vietnam, le génotype 3 semble prédominant (36,4%), avant le génotype 1 (27-36%) et enfin le 6 (21%) [20].

Au Vietnam, une étude publiée en 2010 réalisée à Ho Chi Minh Ville (Sud du Vietnam) chez 842 patients infectés par le VHC, a montré une prédominance du génotype 6 (54.4%), devant le génotype 1 (30.4%) et le génotype 2 (15.2%) [22]. En revanche, une étude réalisée chez 114 usagers de drogues, à Hai Phong, une ville dans le Nord du Vietnam a montré la présence prédominante du génotype 1 (65.8%) ; le génotype 6 arrivant en 2^e position (24.5%) [23]. (Figure 1 : répartition des génotypes du VHC dans la région de l'Asie du Sud publiée en Asie du Sud Est. [24-27]). La réponse du génotype 6 à la bithérapie pegIFN/ribavirine semble assez bonne avec des résultats encourageant de quelques essais thérapeutiques chez les patients mono-infectés du génotype 6 au

Vietnam, avec un taux de réponse virologique soutenue (RVS) estimé à 71% et 60 % après 48 semaines et 24 de traitement respectivement [28]

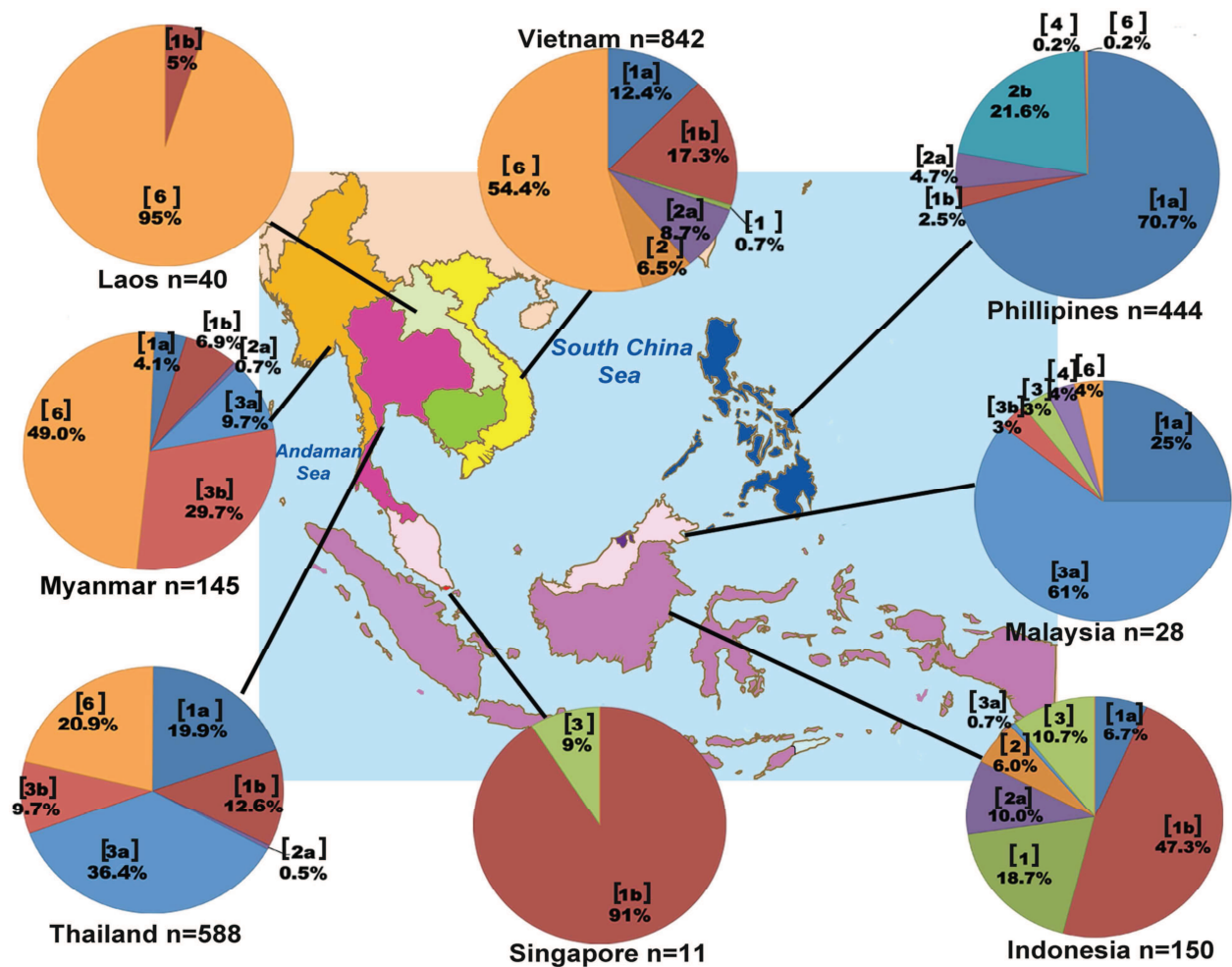


Figure 1 : Répartition des génotypes du VHC en Asie du Sud Est. *Wasitthankasem, R. PLoS One, 2015 [20]*.

I.1.c. L'épidémie VIH au Vietnam

La prévalence du VIH au Vietnam dans la population générale est d'environ 0.5% [29], avec 350 000 personnes infectées (estimation du Vietnam Administration of HIV/AIDS Control - VAAC 2015). Depuis le 1er cas documenté en 1990 [30], 224 223 patients ont été diagnostiqués à ce jour dans le pays. L'épidémie de VIH est concentrée au sein de groupes à risque : travailleurs du sexe (prévalence de 2,6 – 8.6%) [31], chez les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH) (3,7%) et usagers de drogue par voie intraveineuse (UDI) (voir le paragraphe ci-dessous et Figure 2)

I.1.d. Usagers de drogues par voie intraveineuse - groupe à risque majeur au Vietnam

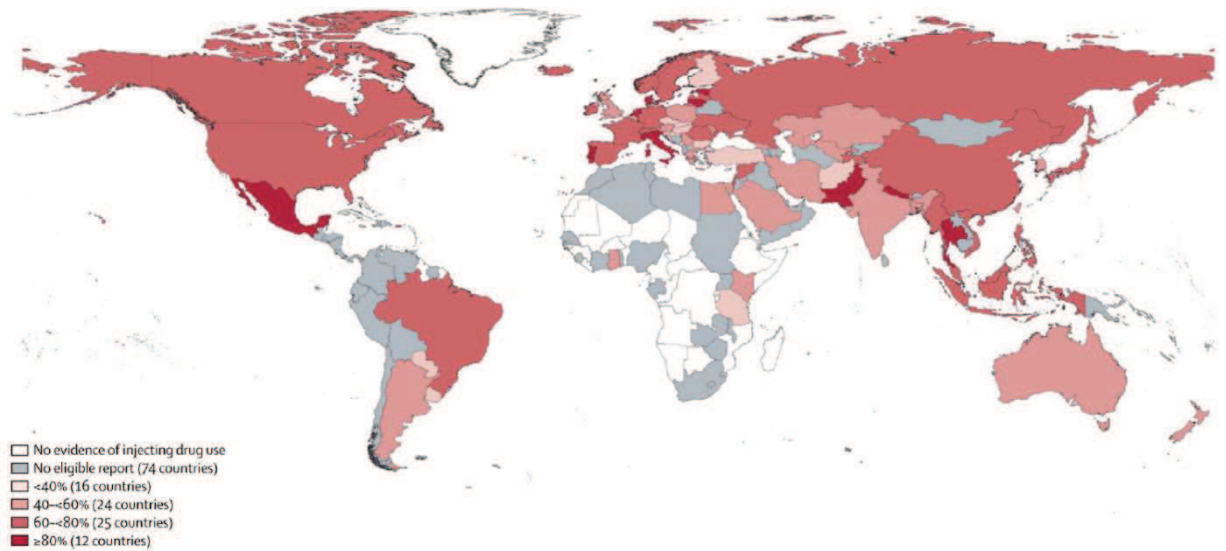


Figure 2 : Prévalence du VHC chez les UDI. Nelson, P.K. *The Lancet*, 2011 [32]

Prévalence du VHC et du VIH/UDI: Le partage des modes de contamination et en particulier de la transmission par usage de drogues IV (UDI) explique la fréquence élevée des co-infections VHC et VIH dans le monde (Figure 2). On estime que 13 millions de personnes dans le monde injectent des drogues par voie intraveineuse [33].

La co-infection VIH/VHC est associée à, une augmentation du risque de passage à la chronicité et de CHC. Au cours de la dernière décennie, l'accès aux soins du VIH / SIDA et la thérapie antirétrovirale (ART) a été grandement améliorée dans les pays à ressources limitées et le nombre de décès liés au sida est en diminution constante au niveau mondial depuis 2005 [34]. Dans ce contexte, L'hépatite C [35] a émergé comme une cause majeure de morbidité et de mortalité dans cette population [36].

Au Vietnam, dans le groupe des UDI, la prévalence du VHC est considérablement plus élevée que dans la population générale. Le Vietnam est un des six pays comptant le plus d'UDI dans le monde [37, 38]. Ainsi il est estimé qu'environ 171 000 des adultes ont déjà consommé de la drogue par voie intraveineuse en 2012 [39] et 204 000 au Vietnam en 2015 (Présentation de Oanh Khuat at International Harm Reduction Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, 20/10/2015), avec augmentation importante de la prévalence sur 10 ans (135 000 en 2005) [40].

La prévalence des UDI était moins importante (146 731 en 2010) [41]. Une première étude publiée en 2009 a retrouvé une prévalence du VHC de 74.1% parmi 309 UDI. L'étude de Zhang et al, publié en 2015 a rapporté une prévalence du VHC plus élevée à 88.8% parmi 1 434 UDI. L'étude de Huong et al. chez les UDI à Hanoi et Ho Chi Minh Ville a observé une séroprévalence de 58% [42], un peu moins à 53.8% chez 3 010 UDI de 10 provinces du Vietnam dans l'étude de Nadol et al [43]. Enfin, elle reste très élevée chez les UDI, entre 31% et 97.2% [16]. Concernant l'infection par le VIH chez les UDI au Vietnam, la prévalence est estimée entre 10.3 - 42.4% selon les études [29, 42, 44-46].

Dans ces groupes d'UDI infectés par le VHC, la prévalence de la co-infection avec le VIH varie entre 40 et 90% selon les études [16, 43, 47]. Ainsi l'étude de Zhang et al [47], réalisée chez 1 434 UDI à Thai Nguyen au Vietnam, a montré une prévalence du virus hépatite C de 88.8%, co-infectés avec le VIH 499/1 434 (34.8%), HCV en mono-infection 773 (53.9%), 99% HIV co-infectés avec VHC (Figure 3)

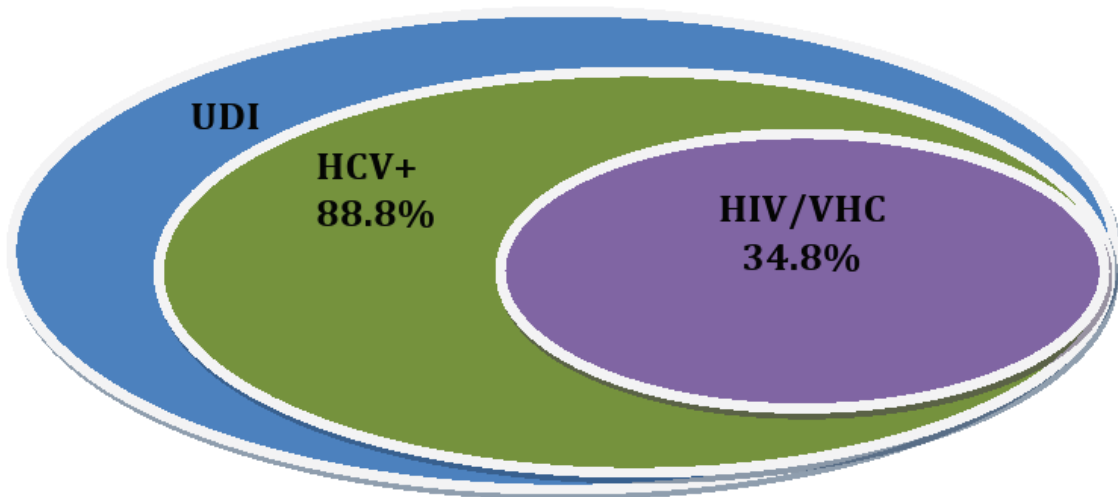


Figure 3 adaptée de Zhang et al. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2015 : Répartition des co-infections VHC/VIH à Thai Nguyen, Vietnam [47]

Incidence du VHC: les taux d'incidence du VHC varient de 2,7 à 66/100 années-personnes (médiane 13/100 AP) [48] et la prévalence du VHC parmi les UDI est globalement estimée à 67% [49]

Les taux d'infection du VIH et du VHC étaient de 28,4% et 56,9%, respectivement, parmi les 965 patients éligibles à un programme de substitution par Méthadone à Ho Chi Minh-Ville et Hai Phong dans la première année du projet pilote Méthadone [50]. (HoàngĐìnhCảnh, VAAC 2013). Selon les premiers résultats d'une cohorte prospective en cours chez les UDI à Hai Phong, le taux d'infection du VHC pendant la première année est à peu près 30%. L'étude de Clatts et al. a montré que la prévalence du VHC chez les nouveaux injecteurs est estimée à 30% pendant les dix premiers mois d'injection, et augmente à 70% après 30 mois d'injection, et cela montre que le délai d'infection par le VHC est beaucoup court chez les nouveaux injecteurs [51].

1.2 Prévention de la transmission du VHC et réduction des risques chez les UDI

Limiter la diffusion du VHC au sein des groupes à risque est un des principaux moyens de lutte contre l'épidémie. Chez les UDI, l'efficacité des deux principaux outils de réduction des risques que sont les traitements de substitution aux opiacés [32] et les

programmes d'échanges de seringues [52] est bien démontrée. Les études réalisées dans les pays du Nord montrent que les programmes d'échange de seringues, et le traitement de substitution par Méthadone, permettent en les associant de réduire la prévalence du VHC d'environ 30% [53-57].

Bien qu'intéressante, l'efficacité de la prophylaxie basée sur la réduction des risques apparaît insuffisante, réduction de la prévalence de moins de 30% [54]. Les études de modélisation indiquent qu'une réduction sensible de la prévalence de l'hépatite C pourrait être obtenue en traitant des UDI infectés (traitement comme prévention : « TAsP »), permettant une réduction de la prévalence plus importante jusqu'à 70% [58]. L'étude de modélisation mathématique de Durier et al [59] a montré qu'avec une couverture antivirale du VHC de 25, 50 et 75% chez les UDI au Vietnam (4 ans d'infection), on pourrait réduire la prévalence du VHC virémique, respectivement de 21, 37 et 50%. Avec 50% de couverture antivirale associée à un traitement précoce 3, 2 et 1 an après l'infection, on pourrait réduire la prévalence du VHC virémique de 46, 60 et 85%, respectivement [59]. Cette étude basée sur une modélisation prenant en compte l'efficacité préventive du traitement des cas en l'absence de programme les programmes d'échange de seringue et d'une couverture du programme de Méthadone insuffisante.

Cette approche serait donc potentiellement plus efficace que la prophylaxie basée sur la réduction de risque [54]. Selon les recommandations de l'European Association for the Study of the Liver (EASL), les UDI font partie des sujets à traiter prioritairement afin de limiter les nouvelles transmissions. Cependant, en 2013, seule une faible proportion des UDI avaient bénéficié d'un traitement anti-VHC, estimé à seulement 1 - 2% des UDI par an [60-63] (voir les figures 4, 5). Ces chiffres sont insuffisants pour que le traitement des personnes infectées ait une répercussion sur l'incidence [58].

Actuellement au Vietnam aucun traitement anti-VHC n'est mis à disposition des patients co-infectés VHC/VIH dans les établissements de soins du VIH. Les coûts importants de traitement et leur complexité restent un obstacle majeur pour l'accès aux soins.

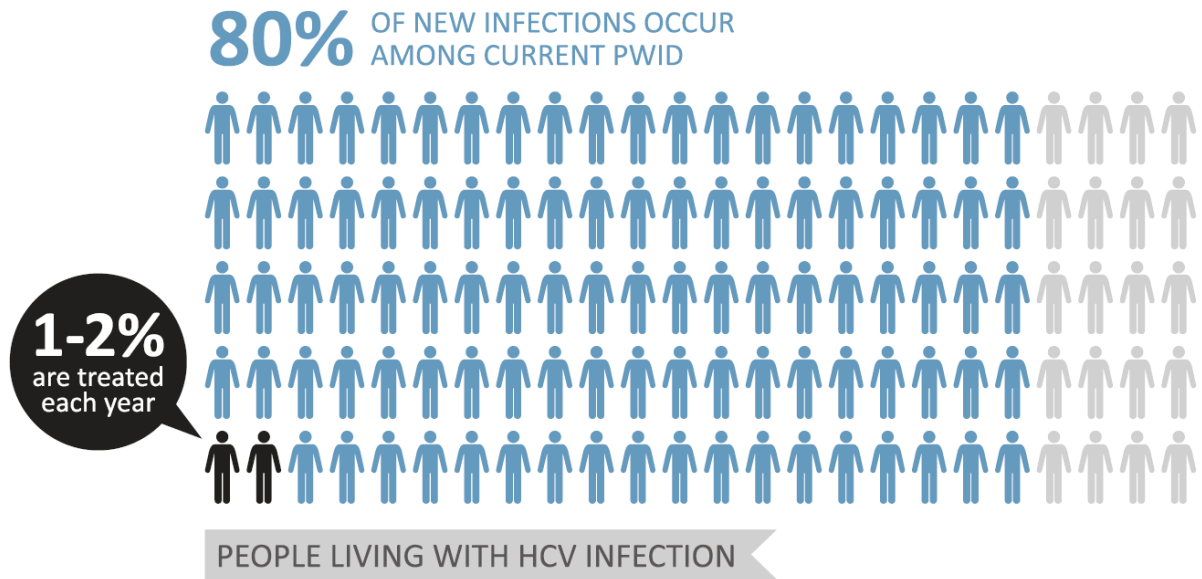


Figure 4 : Proportion de sujets traités : plus de 80% de nouveaux cas VHC chez les UDI, mais seulement 1-2% des patients bénéficiaires du traitement antiVHC par an. *Grebel, J. Antiviral Res, 2014* [60]

J. Grebel, G.J. Dore / Antiviral Research 104 (2014) 62–72

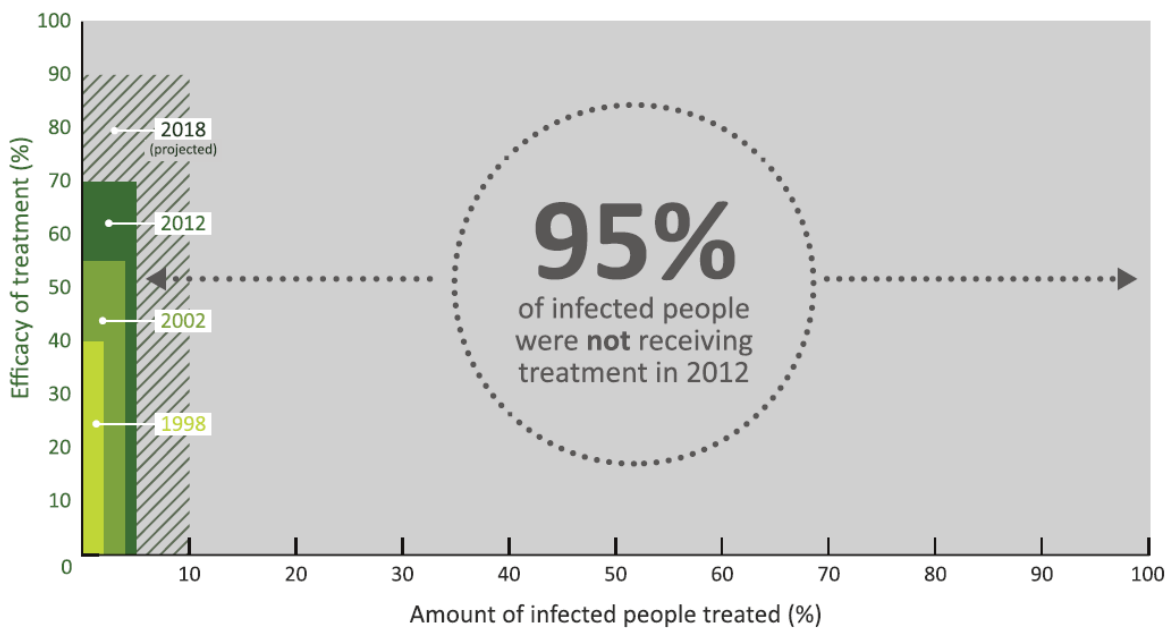


Figure 5 : Proportion d'UDI infectés par le VHC traités en 2012. *Grebel, J. Antiviral Res, 2014* [60]

II. Généralité sur la prise en charge du VIH, du traitement de substitution et de l'hépatite C dans le monde et au Vietnam

II.1 Prise en charge thérapeutique du VIH dans le monde et au Vietnam

Le bénéfice individuel de cette trithérapie est bien démontré en terme réduction de la morbi-mortalité, des infections opportunistes et du risque de transmission du VIH. Le premier traitement ARV fait généralement appel à une trithérapie associant deux inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) et un inhibiteur de protéase boosté par le ritonavir (IP/r) ou un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI) ou un inhibiteur d'intégrase, le choix se faisant parmi un nombre limité d'associations dont l'efficacité, la tolérance et la simplicité d'emploi ont été bien validées. A tout moment du traitement ARV, l'objectif doit être de maintenir la charge virale plasmatique (CV) indétectable (Rapport Morlat 2014)

Les recommandations nationales et internationales actuelles prônent une initiation précoce du traitement ARV. Dans les pays du Nord, le traitement est globalement recommandé chez toutes les personnes vivant avec le VIH quel que soit le niveau du taux de CD4+, en particulier chez les patients à haut risque de contamination (UDI, HSH...) (recommandation américaine et française) [64].

Au Vietnam, la trithérapie est recommandée chez les patients ayant le taux de LT CD4+ inférieurs à 500/mm³ depuis le 29 mai 2015 du VAAC, suivant la recommandation de l'OMS 2014 [65]

II.2 Brève historique de la prise en charge thérapeutique du VIH et situation actuelle au Vietnam.

Depuis 2003, une première série de patients ont été traité par une « vraie » trithérapie associant deux inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptases inverse (INTI) et un inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptases inverse (INNTI) dans le cadre du programme Esther, la collaboration a été établie entre l'équipe médicale pluridisciplinaire de l'Immunologie clinique (Pr Laurence Weiss) et l'équipe médicale du Service des maladies infectieuses de l'hôpital des pathologies tropicales à Ho Chi Minh Ville, Vietnam. Depuis 2005, avec l'arrivée des financements internationaux comme ceux du Fond mondial, du PEPFAR (The President's Emergency Plan For AIDS Relief), Médecin du monde, un grand nombre de patients vietnamiens ont bénéficié d'une trithérapie. Moins de 10 ans plus tard, les résultats de réponse virologique sont encourageants, avec près de 90% de succès virologique 2 ans après initiation de la 1^{ère} ligne de traitement par 2 INRT et 1 INNRT d'après l'étude ANRS 12186 avec [66]. Le coût annuel de la prise en charge globale par patient estimé à 611\$ dont 75% pris en charge par les programmes internationaux pour le traitement ARV de la première ligne. Le coût de la 2^e ligne thérapeutique est 2.7 fois plus élevée [67]. En 2015, parmi les 350000 patients infectés par le VIH, 97864 patients sont sous le traitement ARV (tableau 1), dans 312 cliniques du VIH - OPC (Out Patient Clinic) répartis sur 63 provinces dont

les 3 provinces ayant le plus des patients sont Ho Chi Minh Ville 25271 (29 OPC), Hanoi 10395 (22 OPC) et Hai Phong 4406 (13 OPC) (source VAAC 09/2015).

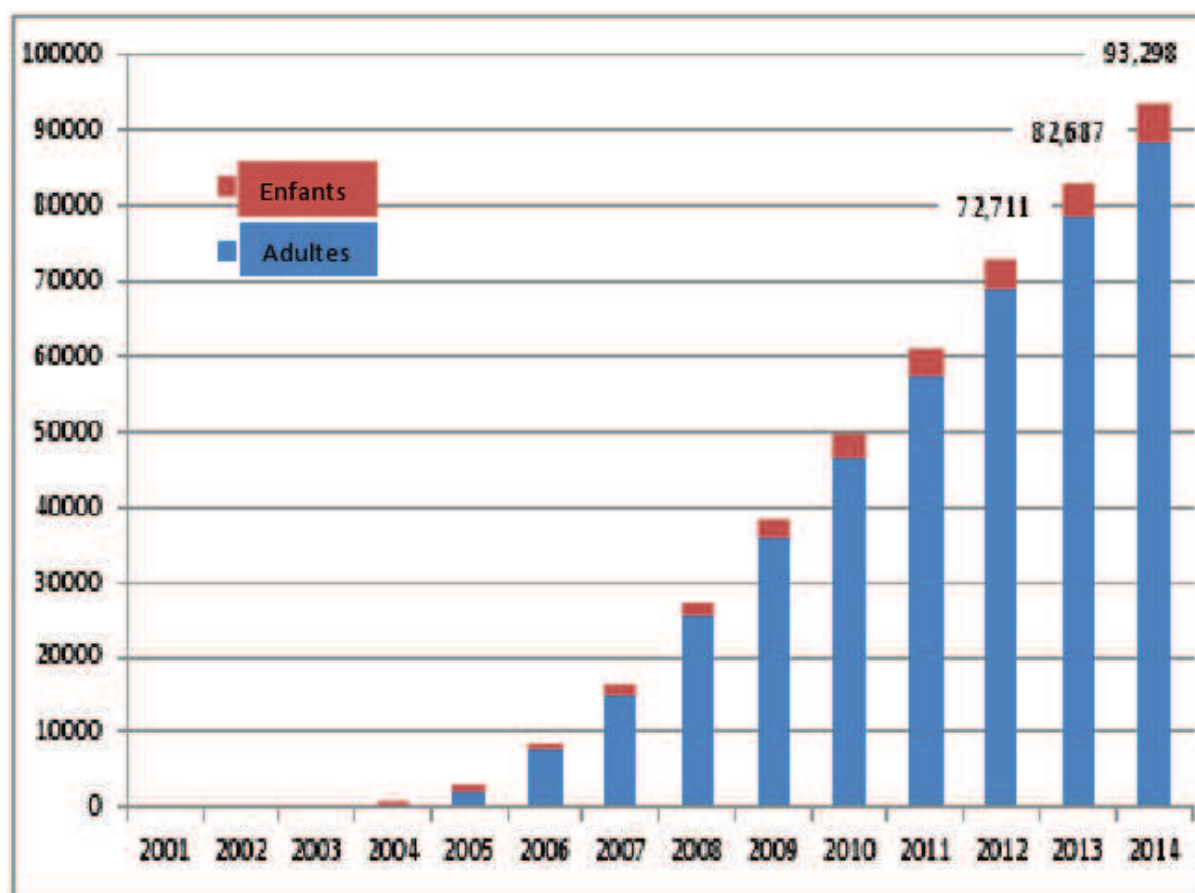


Tableau 1 : Nombre de personnes vivant avec le VIH traitées par ARV au Vietnam (VAAC 2015)

II.3 Prise en charge des UDI et programme Méthadone au Vietnam

En 1986, le Vietnam a commencé une série de changements de politique dénommé Doi Moi [69], avec transition d'une économie socialiste en économie de marché. Ces transitions ont été associées à une augmentation de la consommation de drogues injectables avec une nouvelle épidémie de VIH chez les UDI. La population des UDI a augmenté de 70% entre 2000 et 2004 [70]. Face à cette situation en 2006, le gouvernement vietnamien a approuvé le principe d'interventions de réduction de risque (Figure 6). En 2008, le programme pilote de Méthadone a été mis en service dans deux grandes villes, Hai Phong et Ho Chi Minh-Ville où la prévalence de UDI est la plus importante [54, 71], en même temps que l'existence des centre de « rééducation » obligatoires [72]. En 2012, le Vietnam comptait 171.000 UDI enregistrés.

En septembre 2014, le Vietnam a mis en place 122 cliniques Méthadones dans 38 provinces et villes et fourni un traitement pour 30 850 IDU. En septembre 2015, le

Vietnam a mis en place 187 cliniques Méthadone dans 50 provinces et a fourni le traitement de substitution aux 34961 patients dont les deux centres les plus grands sont celui de Ho Chi Minh Ville avec 2571 patients (13 cliniques) et celui de Hai Phong avec 3603 patients (12 OPC) (VAAC 2015). L'objectif de couverture est de 80000 UDI d'ici fin 2015 [73] (Figures 7, 8) en développant le système de co-paiement (participation des patients au coût du traitement) [74].

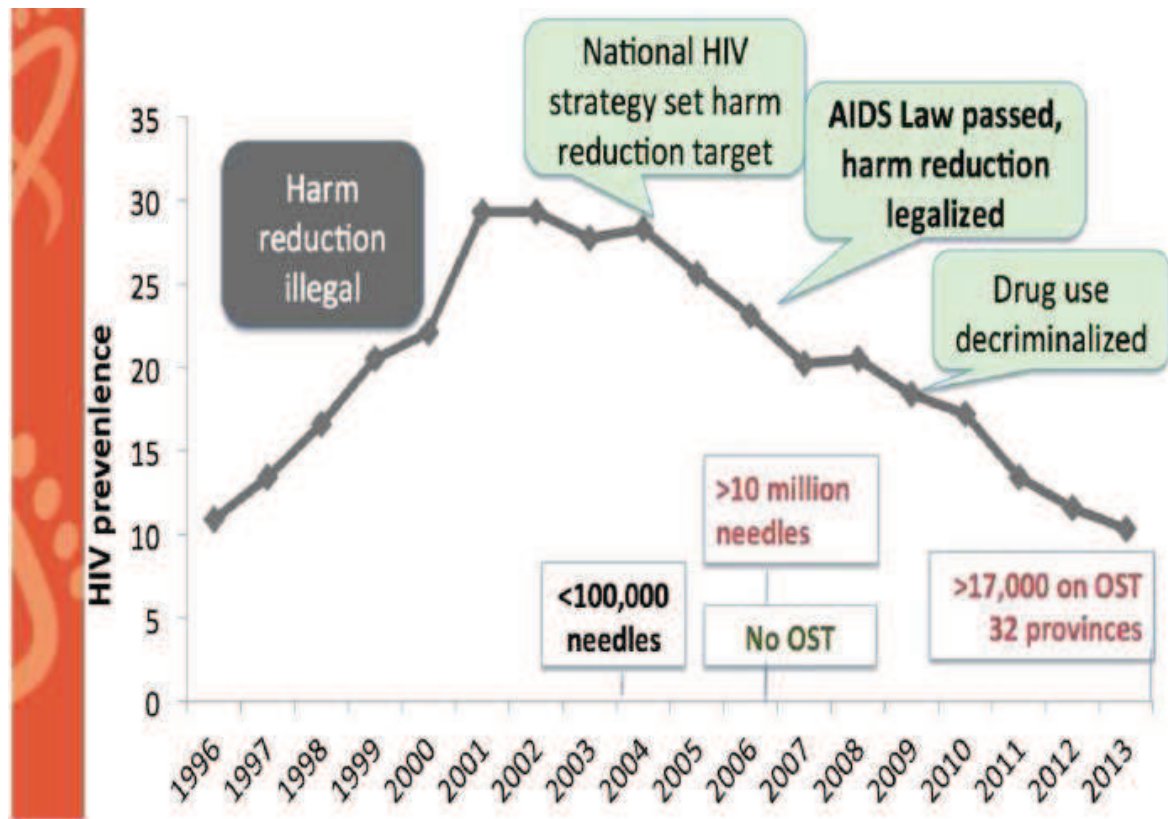


Figure 6: Efficacité des stratégies de réductions des risques sur l'épidémie VIH au Vietnam (Presentation at International Harm Reduction Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, 20/10/2015) "Towards voluntary and community-based treatment for people who have drug problem in Vietnam »

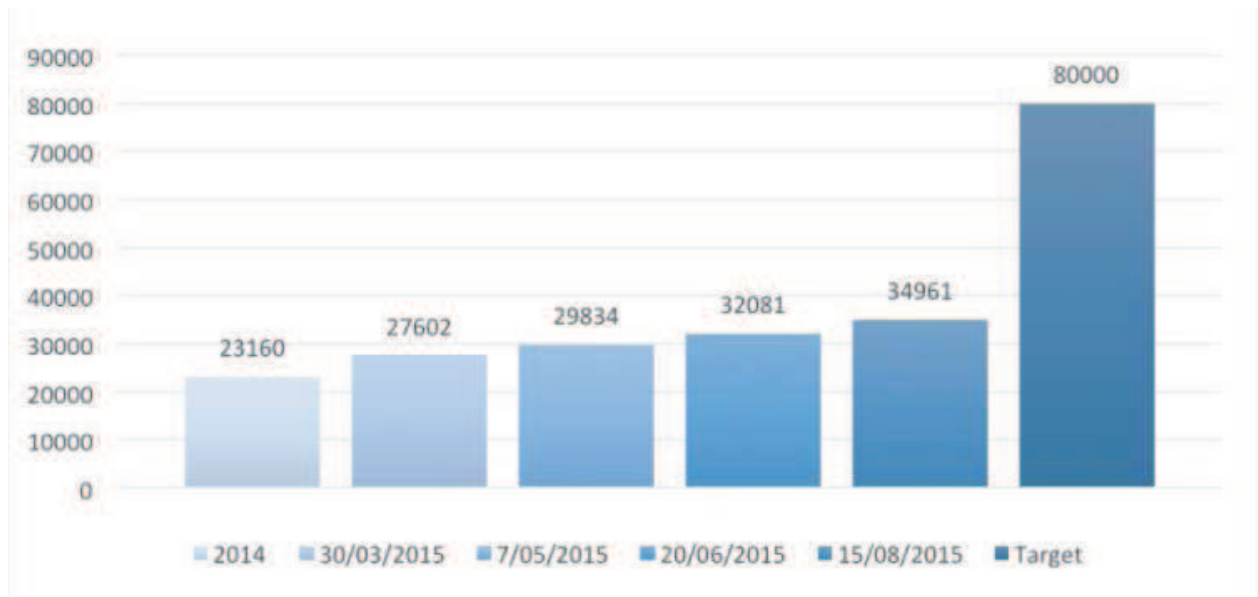


Figure 7 : Nombre des patients inclus dans le programme Méthadone (VAAC 2015)

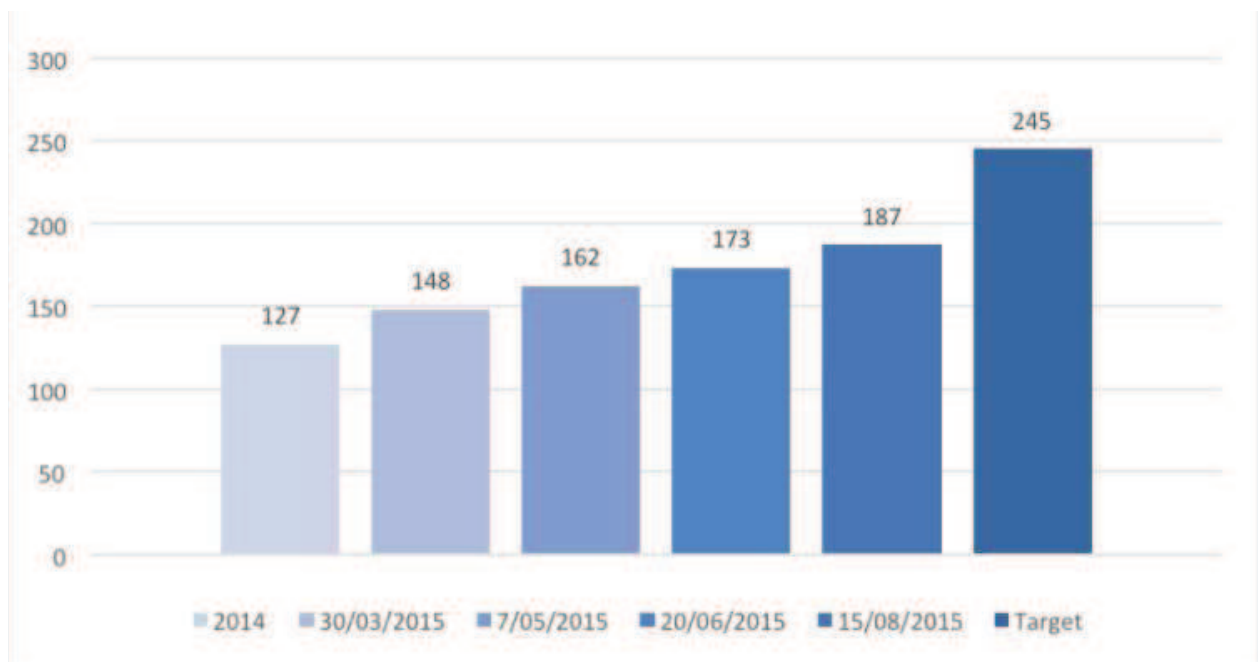


Figure 8 : Nombre des cliniques Méthadone répartis sur toutes les provinces du Vietnam (VAAC 2015)

II.4 Contexte thérapeutique de l'hépatite virale C

Après une primo infection souvent asymptomatique, l'infection à VHC disparaît spontanément dans 15 à 25% des cas. Dans 75 à 85% des cas, l'infection devient chronique (Hépatite C Chronique) pouvant aboutir à une cirrhose (15-30% des patients sur 20 ans) et ses complications : insuffisance hépato-cellulaire et/ou un carcinome hépatocellulaire.

Les progrès thérapeutiques de l'hépatite C ont été considérables, avec un taux de succès passé de 11% au début des années 90 (lorsque l'Interféron était utilisé 3 fois/semaine en monothérapie) à près de 55% en 2010 avec bithérapie (l'interféron pégylé une fois par semaine associé à la ribavirine) tous génotypes confondus. Nous sommes depuis 2 ans, dans une nouvelle ère thérapeutique avec l'arrivée de molécules antivirale d'action directe (DAA) permettant d'obtenir une réponse virologique soutenue dans plus de 90% des cas [68] (Figure 9). Les nouvelles stratégies presque toujours sans interféron et souvent sans ribavirine combinent les DAA comme les Inhibiteurs de protéase - simeprevir, inhibiteurs de NS5A - daclatasvir, inhibiteurs de NS5B - Sofobuvir [69]. Le traitement par DAA représente une simplification thérapeutique majeure en raison d'une durée plus courte et de modalités de surveillance simplifiées. Ces traitements sont également associés à des taux de RVS et donc de guérison très élevés, avoisinant 90%.

Traitement antiviral	Groupe de patients
Traitement indiqué	Tous les patients ayant une hépatite chronique C
Traitement recommandé en fonction de la fibrose hépatique	Patients ayant une fibrose modérée, sévère ou une cirrhose compensée ou décompensée
Traitement recommandé indépendamment du stade de la fibrose hépatique	Patients avec une coïnfection VIH Patients avec une coïnfection VHB Patients infectés par un génotype 3 Patients avec comorbidités : consommation excessive d'alcool, syndrome métabolique Patients avec une indication de transplantation d'organe Patients avec un organe transplanté Patients avec une manifestation extra-hépatique Patients avec une fatigue invalidante
Traitement recommandé en raison du risque de transmission du VHC	Usagers actifs de drogue par voie parentérale ou nasale Hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes Femmes désirant une grossesse Patients hémodialysés Patients détenus Patients vivant en institution Professionnels de santé
Traitement universel recommandé à court terme	Patients non encore traités Patients nouvellement dépistés
Pas d'accès au traitement	Patients dont l'espérance de vie limitée à court terme

Tableau 2 : Indication thérapeutique du VHC, recommandation Association française pour l'étude du foie (EFEF) Juin 2015

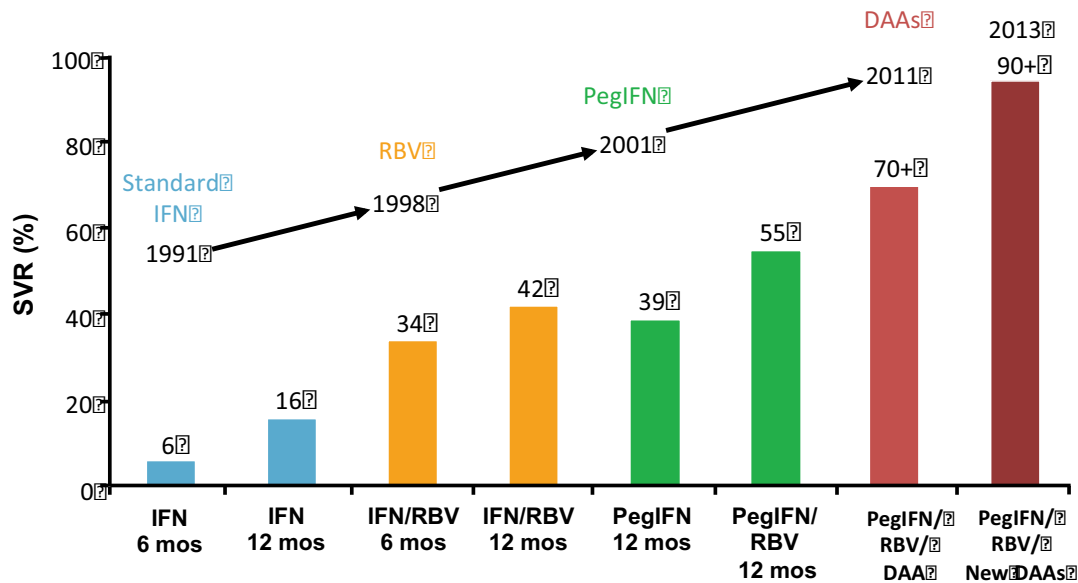


Figure 9 : Evolution des taux de succès thérapeutiques depuis les années 1990. *Grebel, J. Antiviral Res, 2014 [60]*

Les indications thérapeutiques en Europe sont globalement basées sur le niveau de la fibrose au moins modérée (\geq F2 selon le score METAVIR), la présence de facteurs de risque d'aggravation de la maladie hépatique, la présence de manifestations extra-hépatiques, les patients à risque élevé de transmettre le VHC (drogues IV, homosexuels à risque, femme avec désir de grossesse, hémodialysés, détenus, patient vivant en institution), et les patients en attente de transplantation d'organe ou transplantés, recommandations EASL 2015 [69]. L'AASLD (American Association for the Study of Liver) et l'IDSA (Infectious Diseases Society of America) recommandent récemment le traitement de l'hépatite C pour « tous » [70].

Le prix de ces nouvelles molécules est très élevé (environ 1000\$ par comprimé de sofosbuvir par exemple) [71] et reste pour l'instant hors de portée des populations vivant dans les pays à ressources limitées. Afin de résoudre ce problème, les négociations avec les firmes sont en cours pour que les patients éligibles au traitement puissent bénéficier de prix préférentiels.

Les patients co-infectés VIH-VHC ont une prise en charge de l'hépatite C voisine de celles des patients mono-infectés VHC avec une réponse aux DAA qui est comparable aux patients mono-infectés [72-74].

II.5 Evolution de la maladie hépatique chez les patients co-infectés VIH et VHC

L'évolution plus rapide de la fibrose hépatique chez les personnes co-infectées VIH et VHC était, au début de l'épidémie, essentiellement liée à l'infection par le VIH et à l'immunodépression induite par cette infection. Par la suite, les multithérapies antirétrovirales ont eu un impact globalement positif sur le risque de fibrose hépatique, du fait de la restauration immunitaire et du contrôle de la réplication virale VIH qu'elles induisent [75-77], et du fait d'une moindre hépatotoxicité des antirétroviraux récents. Cependant, il persiste toujours un sur-risque d'aggravation hépatique, lié à l'inflammation chronique résiduelle, dont le niveau reste supérieur à celui de patients mono-infectés par le VHC. À cela s'ajoute l'existence fréquente d'autres comorbidités à retentissement hépatique : co-infections VIH-VHC-VHB, syndrome métabolique, consommation d'alcool ou d'autres toxiques.

Les conséquences en termes de morbidité et de mortalité sont importantes. Chez les patients VIH/VHC, les décès d'origine hépatique représentent la première cause de décès. Ce risque de décès de cause hépatique est corrélé au stade initial de fibrose [78] avec une incidence de 3 à 10/1 000 personnes-années chez les patients F0-F1, versus plus de 40/1 000 chez les patients cirrhotiques [79]. La proportion des CHC a progressivement augmenté en quinze ans et représente aujourd'hui 30 à 40% des décès d'origine hépatique.

II.6 Dépistage et prise en charge du VHC dans les pays du Sud et au Vietnam

Les moyens mis en œuvre pour lutter contre les hépatites virales dans les pays du Sud demeurent bien plus modestes que pour les trois infections ciblées comme prioritaires par le fond mondial : le VIH, la tuberculose et le paludisme (Figure 10, 11).

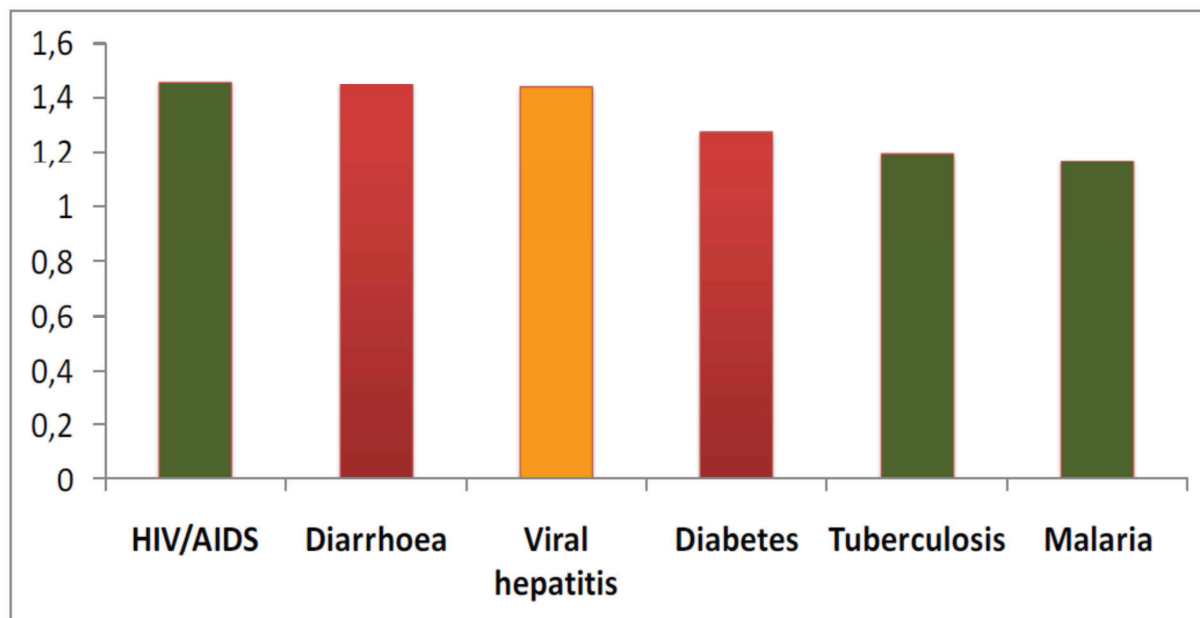


Figure 10 : Nombre de décès/an des principales pandémies (*Adapté de la présentation de Dr Stefan Wiktor - Programme de lutte contre les hépatites virales de l'Organisation l'OMS, lors de la journée nationale contre les hépatites B et C en à Paris, France 2014*)

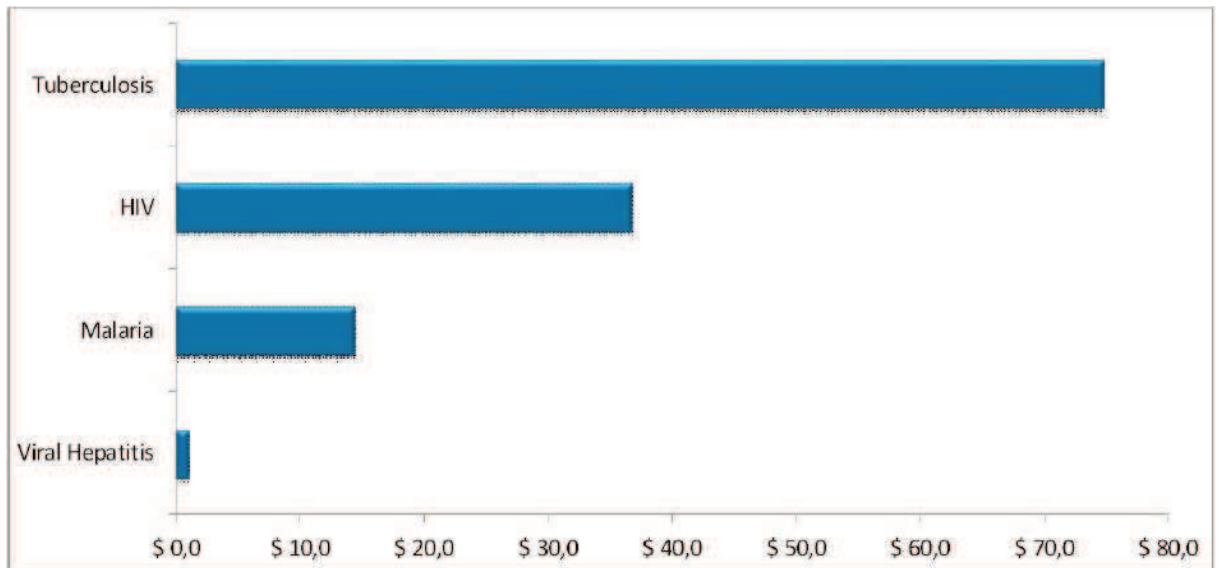


Figure 11 : Budget du fond mondial attribué aux maladies infectieuses. *Lozano, R. Lancet, 2012* [2]

L'enjeu d'aujourd'hui pour les pays du Sud sera de mettre en œuvre des stratégies de dépistage et de prise en charge des hépatites virales adaptées aux moyens et ressources disponible localement.

La prise en charge de l'hépatite C et son dépistage devrait tenir compte désormais de certains points nouveaux : la possibilité à court terme d'accès aux tests rapides, pour effectuer des programmes de dépistage en dehors de l'hôpital (Tests rapides pour le VHC) pourra permettre d'aborder la question de l'épidémie cachée du VHC.

En 2010, le Vietnam a lancé une campagne nationale « santé du foie » sensibilisant le dépistage du VHC, l'élargissement du traitement anti-HCV [80]. Une étude de modélisation estime qu'avec une couverture thérapeutique par bithérapie pégylée du VHC de 25% au Vietnam, on pourrait réduire l'incidence et la prévalence du VHC de façon considérable chez les UDI [59].

Le Ministère de la Santé vietnamien a publié les recommandations dans la prise en charge du VHC en Novembre 2013, et recommande les options thérapeutiques par interféron, ribavirine et soit télaprévir ou bocéprévir; les DAA de seconde génération ne sont pas encore dans la liste recommandée. Pour ceux qui peuvent payer eux même le traitement (les mono-infectés), le traitement du VHC est disponible dans les grands hôpitaux, mais généralement pas dans les hôpitaux provinciaux.

L'efficacité de l'ancienne bithérapie par Interféron Pégylé associé à la ribavirine chez les UDI est légèrement moins bonne que chez les patients non-UDI, environs 55.9% [81]. La prise en charge de l'hépatite C est payante au Vietnam avec un coût annuel estimé entre 8.000 et 20.000\$ [82].

II.7 Les obstacles empêchant l'accès au soin chez les IDU pour le traitement VHC (Figure 12).

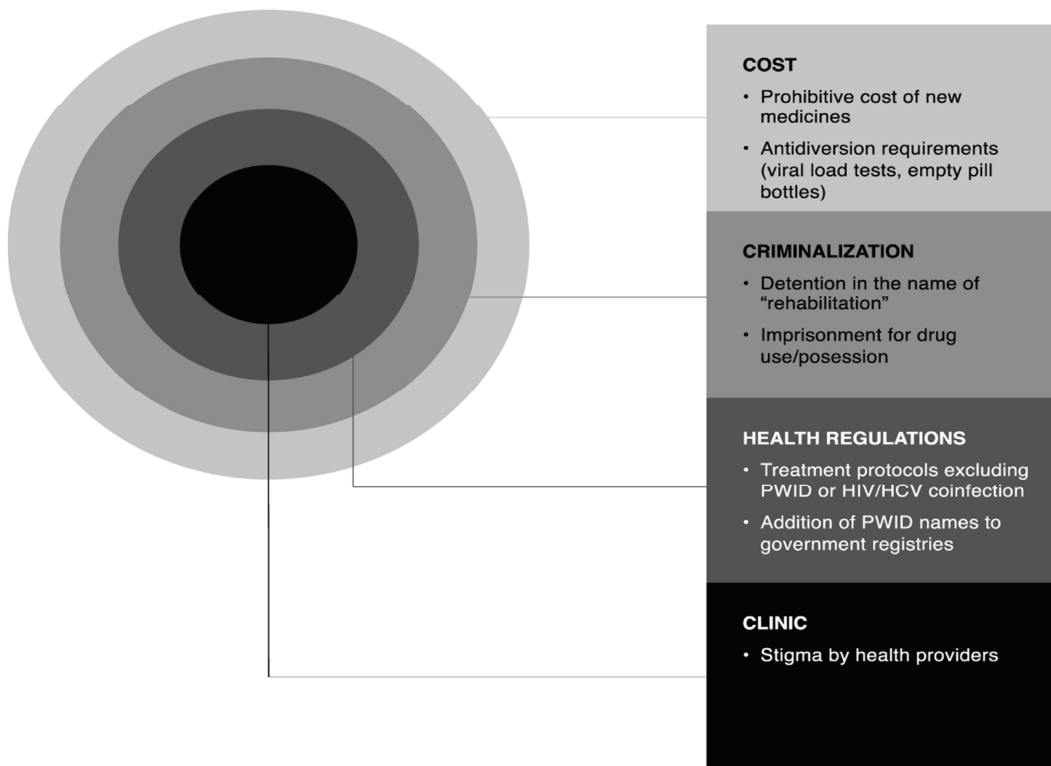


Figure 12 : Barrières de l'accès aux soins du VHC chez les UDI. Wolfe, D. *Int J Drug Policy*, 2015 [82]

Par rapport aux pays voisins en Asie du Sud Est, le Vietnam n'est pas une exception, la prise en charge de l'hépatite virale C est balbutiante, particulièrement chez les patients co-infectés VIH/VHC. Le dépistage et les tests diagnostiques sont peu accessibles pour la population marginalisée (UDI)

Dans cette population vulnérable l'accès au traitement est quasi impossible en raison de l'absence de couverture maladie et de l'importance du coût du traitement.

A côté des difficultés ci-dessus, le gouvernement prend bien conscience des facteurs associés permettant de faciliter la prise en charge des UDI (rôle indiscutable de la prise en charge de substitution par Méthadone, amélioration de la discrimination vis-à-vis de cette population bien vulnérable, l'usage de drogues n'est plus considéré comme une infraction pénale depuis 2009).

En attendant la mise à disposition de nouveau traitement anti-VHC sous forme générique ou à prix préférentiels l'accès thérapeutique se limite encore à l'association pegIFN α /ribavirine. Le coût du traitement est estimé pour 6 mois à 10000\$ (bithérapie PegINF Pegasus-ribavirine) et à 5000\$ pour le bioéquivalent Nanogen, PegNano/ribavirine.

**OUTILS VIROLOGIQUES DE LA PRISE
EN CHARGE DE LA CO-INFECTION
VIH/VHC**

III. Outils et moyens de la cascade de la prise en charge de l'hépatite C chez les co-infectés avec le VIH :

III.1 Tests de diagnostic rapide VHC et VIH

Amélioration de l'accès au dépistage du VHC et du VIH dans les populations à risque, dont UDI représente un enjeu majeur.

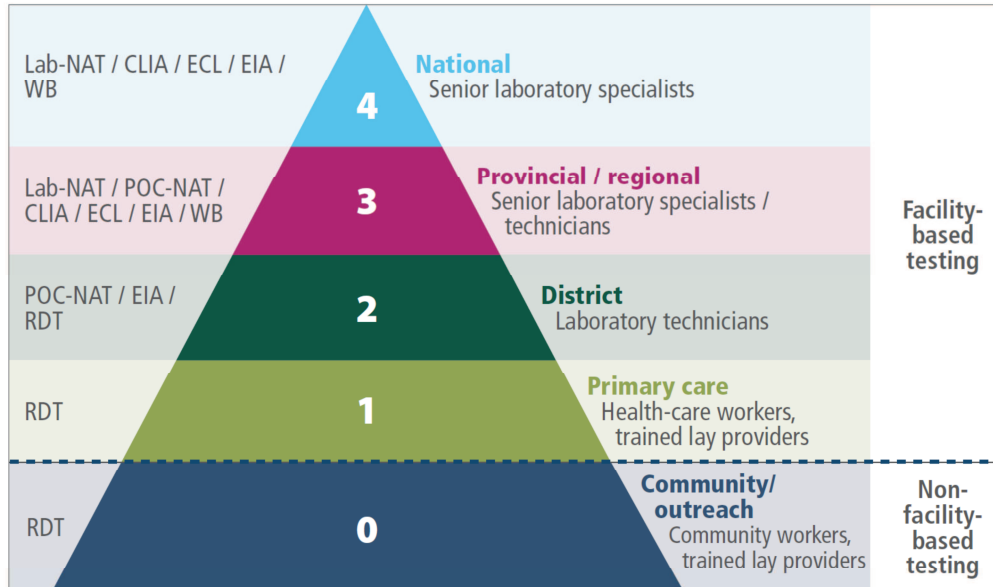
Les tests rapides réalisables sur le sang capillaire sont des alternatives aux techniques Elisa sur sérum ou plasma. Les tests de détection des anticorps anti-VHC ou anti-VIH utilisent un format d'immunoconcentration ou d'immunochromatographie. Ils améliorent considérablement l'accès dans les populations difficiles d'accès et les sujets difficiles à prélever comme chez les UDI avec des performances satisfaisantes [83].

III.1.a Les TRD du VIH :

Les tests rapides se sont imposés dans le domaine du diagnostic VIH. Ils sont aujourd'hui recommandés et largement utilisés pour le dépistage mais aussi la confirmation du diagnostic. Les recommandations OMS de 2015 dans le domaine du VIH soulignent l'intérêt de permettre le dépistage communautaire grâce à l'utilisation des tests rapides afin d'améliorer l'accès au dépistage (Figure 13). Les tests rapides VIH permettent de parvenir à un diagnostic biologique de quasi-certitude en 30 minutes. Les limites des tests rapides demeurent leurs faibles performances dans la phase de primo-infection (sensibilité) et leur capacité moyenne à distinguer les infections VIH-1 versus VIH-2.

L'Ag p24 est d'apparition rapide, détectable dans l'organisme en moyenne 15 jours après le contact infectant avec le virus [84, 85]. Il reste détectable en début d'infection et disparaît chez le sujet immunocompétent qui produit des anticorps anti-VIH du fait de la formation de complexes immuns. Sa détection pendant cette période d'infection chronique requiert une décomplexation préalable par chauffage ou autre procédé.

Ce marqueur d'apparition précoce a été proposé par le passé comme une alternative à la mesure de la charge virale ARN VIH-1 pour le suivi et l'évaluation du traitement chez les patients infectés [86-88]. Quand bien même la méthode semblait nettement moins coûteuse financièrement et plus facile à réaliser techniquement dans le pays à faibles ressources [89]. En pratique clinique, l'Ag p24 est utilisé pour le diagnostic de la primo-infection et aussi pour le diagnostic chez les nouveau-nés exposés au VIH. Dans le diagnostic classique du VIH, la sensibilité des tests combinés immuno-enzymatiques [90] ou immunoluminométriques [91-93] de 4ème génération a également été améliorée grâce à la détection combinée de l'Ag p24 et des anticorps anti-VIH. Le test rapide HIV ne détecte pas la p24 ou la détecte mal pour ce qui concerne le test Duo performance Alere [94].



Lab-NAT: laboratory-based nucleic acid testing; POC-NAT: nucleic acid testing at point-of-care; CLIA: chemiluminescence immunoassay; ECL: electrochemiluminescence immunoassay; EIA: enzyme immunoassay; WB: Western blot; RDT: rapid diagnostic test.

Source: WHO, 2012 (231).

Figure 13 : Place des tests rapide HIV dans le dépistage selon les structures de soins (WHO 2012)

L'OMS recommande deux tests (confirmation spécifique) pour le VIH dans les pays à faibles ressources comme le Vietnam (Figure 14).

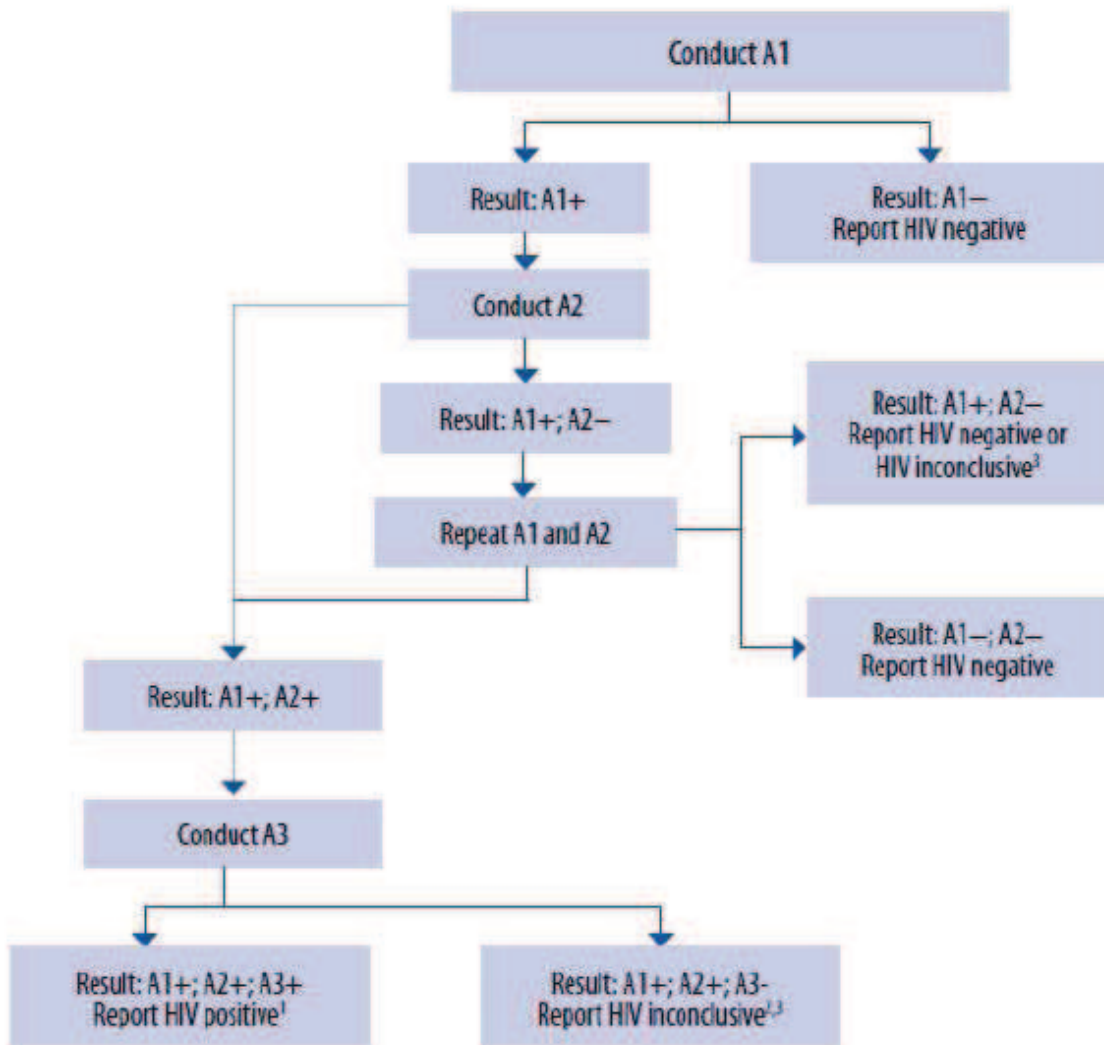


Figure 14 : Algorithme diagnostique du VIH des tests rapides recommandé par l’OMS

III.1.b Les TRD du VHC

Le dépistage de l’hépatite C repose sur la détection des anticorps anti-VHC totaux et la confirmation de la répllication VHC par la détection de l’ARN du virus. Une technique de PCR, sur sérum ou plasma à partir d’un prélèvement veineux constitue une technique de référence. L’utilisation des tests rapides VHC se généralise progressivement même si les tests rapides VHC sont pour l’instant encore moins utilisés que les tests VIH. Au Vietnam les tests rapides VHC sont fréquemment utilisés en première intention même si les recommandations nationales manquent.

Les tests de diagnostic rapides HCV présentent une sensibilité moindre que les tests d’immuno-analyse de laboratoire mais les performances sont acceptables dans le contexte vietnamien qui doit permettre un accès large au dépistage, y compris en situation de faibles équipements. Le dépistage de la co-infection avec le VHC est

recommandé dans le guideline de la prise en charge du VIH (Ministère de la santé) au premier bilan au niveau de l'OPC (Out Patient Clinic), ce dépistage est basé sur les tests rapides. Le suivi sérologique de contrôle n'est pas réalisé au cours de la prise en charge.

III.2 PCR du VHCet antigène (Ag) de capsid

La PCR est un test de confirmation qui demeure couteux et souvent difficile d'accès. Au Vietnam, à ce jour, La PCR VHC n'est demandé que pour un nombre limité des patients mono-infectés, ceux qui ont les moyens financiers pour une prise en charge de son hépatite C dans les centres/hôpitaux spécialisés. Dans le rapport OMS VHC de 2014, il a été estimé que le coût patient du test PCR s'établissait entre 30 et 200 \$ [65]. A l'Institut Pasteur de Ho Chi Minh Ville, le coût du test PCR est d'environ 70 \$.

La détection de l'Ag core VHC apparait comme une solution alternative potentiellement intéressante pour confirmer les infections VHC répliquative [95]. Le test offre une limite inférieure de détection moindre que celle des tests de biologie moléculaire mais qui semble acceptable. Malheureusement ce paramètre biologique n'est aujourd'hui disponible que chez la société Abbott et avec des appareillages complexes (Architect Abbott).

III.3 Tests de diagnostic VIH et VHC sur DBS

III.3.a Avantage du prélèvement de sang sur DBS :

L'un des principaux avantages des tests sur prélèvement capillaire (Test rapides ou DBS) est qu'il permet l'accès au prélèvement sanguin dans des situations où le prélèvement est difficile (éloignement géographique, précarité veineuse ou fragiles comme les utilisateurs de drogues intraveineuses, problème de stockage) [96]. L'utilisation du DBS permet également de minimiser le volume de sang prélevé sur les patients (50µl). Il est intéressant de noter que l'utilisation du DBS permet une réduction importante des coûts en raison principalement de la diminution de la nécessité en personnel formé, de la facilité de transport, de stockage. Par ailleurs, l'utilisation du prélèvement sur DBS est aussi bien adapté pour la détection Elisa (Enzyme-linkedimmunosorbentassay) d'anticorps spécifiques dirigés contre le virus Epstein-Barr [97], le virus de l'hépatite C [96, 98] et le virus HIV [99, 100]

III.3.b Analyses VIH sur DBS :

Dans le domaine du VIH, l'utilisation du DBS, a facilité le diagnostic du VIH chez les enfants de moins de 18 mois et est un outil prometteur pour la gestion thérapeutique du VIH dans les pays aux ressources limitées. De nombreuses études ont démontré que le DBS (ou ses variants DPS, DSS) est des supports adaptés au suivi virologique par la charge virale du VIH [101-103], ce qui fait la révolution thérapeutique dans les pays à ressources limitées [102-110] (Figure 17).

La sensibilité de la PCR VIH qualitative est plus de 98% (avec une CV réelle supérieure à 5000 copies/ml) [101, 103], mais la sensibilité est baissée entre 60 et 80% si la CV est inférieure à 1000 copies/ml en fonction de différentes techniques [101, 103, 111]. Le DBS est une alternative séduisante pour le suivi virologique avec charge virale supérieure à 1000 copies/ml. Le DBS est également étudié en sérologie pour la détection de l'Ag p24 et la numération des lymphocytes T CD4 [112, 113]. Le DBS a été récemment évalué au niveau du test de génotypage, la performance est corrélée avec plus de 80% des cas en comparaison avec technique de séquençage standard [87, 101, 103, 111, 114, 115].

III.3.c Analyses VHC sur DBS

Bien que les tests de diagnostic rapide commerciaux existent pour l'HBsAg et les anticorps anti-VHC, l'utilisation de DBS envoyé aux laboratoires centralisés peut être utile dans certains contextes où les tests rapides ne sont pas disponibles ou pas réalisable. Ainsi le DBS pourrait être utilisé pour le diagnostic VHC d'une manière similaire au VIH afin de faciliter la surveillance et le diagnostic. De même, le DBS peut être utile pour le dépistage combiné de plusieurs maladies, telles que le VIH/VHB/VHC [116], les TDR multiplex à cet effet n'étant pas disponibles ou plus coûteux. La limite principale à l'utilisation des DBS pour la détection des anticorps anti-VHC ou la détection de l'ARN VHC est l'absence de validation de ce support par les fabricants de tests VHC.

L'analyse des études ayant utilisé les DBS pour la détection de l'ARN VHC montre que ces méthodes présentes des performances satisfaisantes.

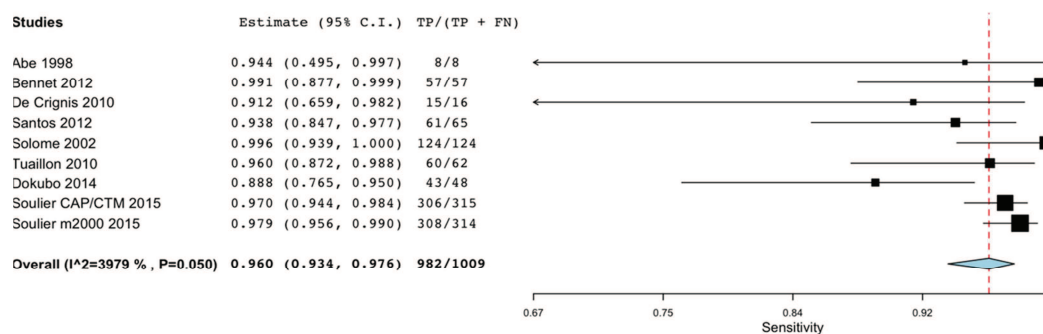


Figure 15 : Sensibilité de la détection de l'ARN VHC sur DBS (WHO, 2016 in press)

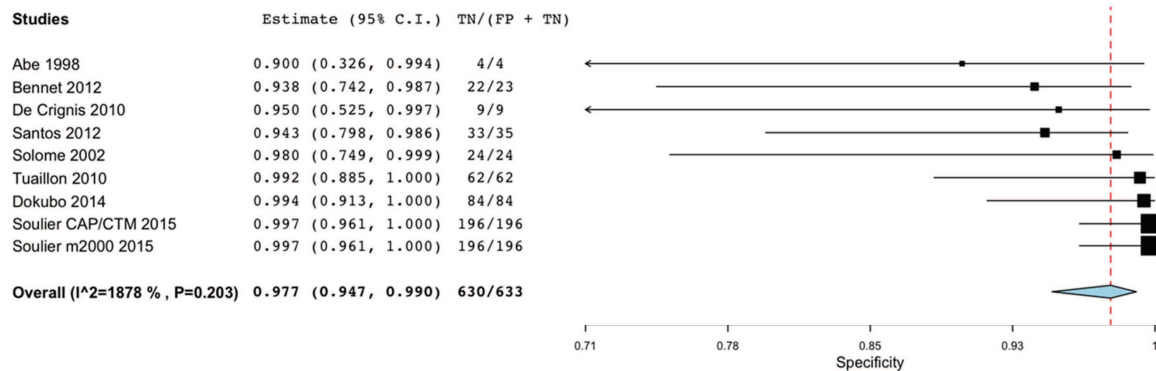


Figure 16 : Spécificité de la détection de l'ARN VHC sur DBS (WHO, 2016 in press)

La publication récente par Soulier et al, 2015 [117] montre la faisabilité de la détection de l'Ag core du VHC sur DBS mais avec des performances suboptimale en termes de limite de détection et de corrélation avec la charge virale ARN VHC (Figure 16).

Deux principaux avantages de l'utilisation de DBS pour le VHC par rapport au VIH sont (1) l'absence d'ADN proviral qui peut surestimer la quantité de virus dans le sang par rapport au plasma et (2) que des tests qualitatifs devrait suffire, à la fois pour le diagnostic et la vérification du succès thérapeutique durable (à 6 mois après arrêt du traitement). Le recours au papier buvard permet la détection des anticorps anti-VHC ainsi que la détection et la quantification de l'ARN du virus. Toutefois, la charge virale VHC est sous-estimée de facteur au moins 100 par rapport à celle déterminée sur un prélèvement sérique ou plasmatique. Le seuil inférieur de détection de l'ARN du VHC sur papier buvard est de l'ordre de 2 500 copies/ml [99]. Ce manque de sensibilité par rapport aux techniques réalisées sur sérum ou plasma pose question pour le suivi thérapeutique, l'objectif du traitement antiviral étant d'obtenir une charge virale indétectable (< 10-15 UI/mL). Cependant, contrairement au suivi des thérapies à base d'IFN, le suivi de la charge virale après initiation du traitement par antiviraux direct à la 4^e, 8^e ou 12^e semaine n'est pas utile et l'échec après traitement s'accompagne le plus souvent d'un rebond important de la charge virale VHC qui sera détectable en technique sur DBS.

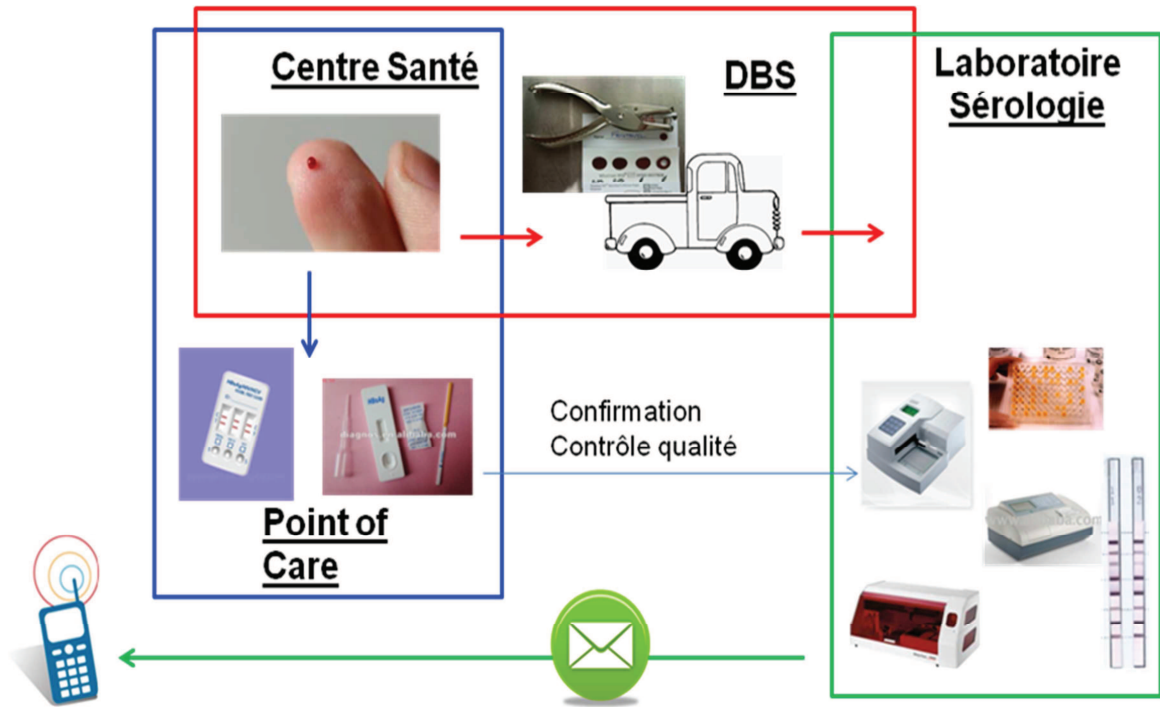


Figure 17 : Stratégie possible de dépistage décentralisé combinant tests POC, DBS, test de laboratoire et rendu de résultats par sms (adaptée de la thèse de KANIA D, UMR 1058, 2014)

**PERSONNALISATION
THERAPEUTIQUE DANS LA PRISE EN
CHARGE DE L'HEPATITE C**

IV. Personnalisation thérapeutique dans la prise en charge de l'hépatite C

L'indication thérapeutique de l'hépatite virale C demeure à ce jour encore basée sur un ensemble d'arguments clinico-biologiques ; le critère clé étant l'évaluation de la fibrose hépatique.

L'évaluation de l'atteinte hépatique (fibrose et activité) doit se faire par des méthodes non invasives [118, 119], et si besoin par ponction biopsie hépatique (PBH) permettant d'aider à la décision d'initiation d'un traitement anti-VHC dans certaines situations (par la mise en évidence ou non d'une fibrose significative ($F > 2$) et d'aider au diagnostic de cirrhose (F4) [120] et à la mise en place des mesures de dépistage et de prévention des complications associées (Figure 18).

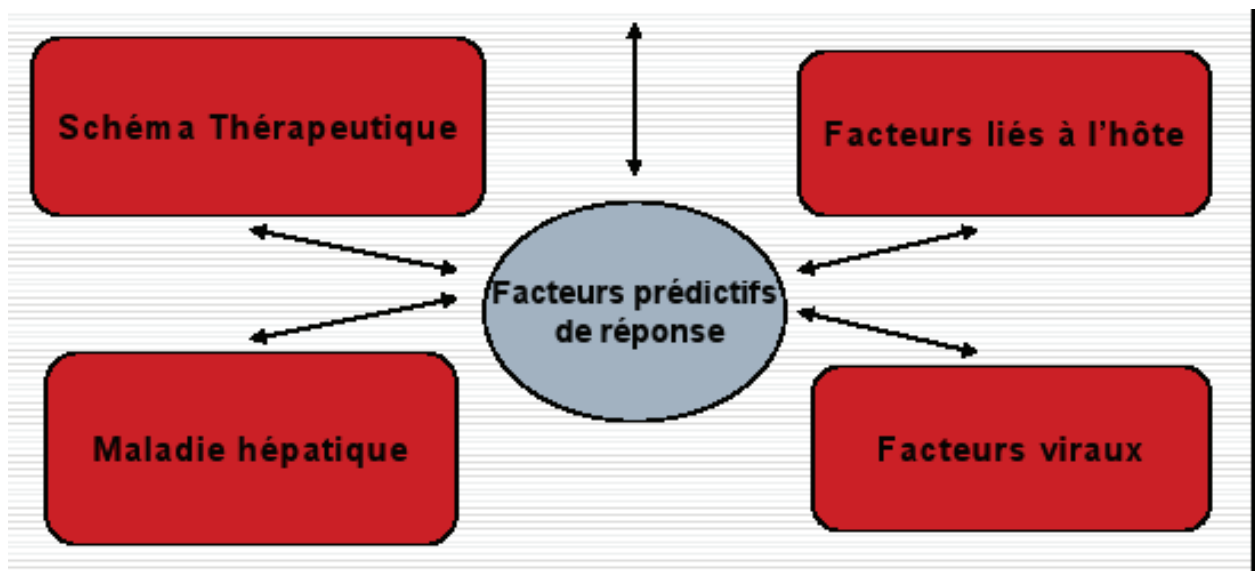


Figure 18 : Facteurs associés à la réponse thérapeutique du traitement anti-VHC

IV.1. Evaluation de l'atteinte hépatique (fibrose hépatique, activité inflammatoire)

IV.1.a Tests biochimiques

Plusieurs scores biochimiques directs ou indirects de fibrose ont été étudiés chez les patients co-infectés. Deux scores (le Fibromètre® et le Fibrotest®) les plus utilisés ont une performance diagnostique intéressante. La combinaison de ces marqueurs le plus souvent à l'aide de la méthode de régression logistique a permis le développement de différents indexes diagnostiques parmi lesquels, le plus connu est le Fibrotest®, mis au point par T. Poynard. Ce score est calculé et breveté à partir de 5 paramètres (haptoglobine, apolipoprotéine A1, bilirubine, Gamma-glutamyltransférase (GGT), alpha 2 macroglobuline) avec ajustement selon l'âge et le sexe a été testé et validé sur une population de 339 patients atteints d'hépatite chronique C [121]. Le Fibrotest® est

commercialisé avec des tables de conversion entre le score Fibrotest-Actitest et les scores METAVIR d'évaluation de la fibrose et de l'activité [122]. En utilisant les valeurs seuils ($\leq 0,31$ et $\geq 0,6$), la valeur prédictive négative et positive est de 85% et 78% respectivement.

Parmi les tests récents, le Fibromètre® semble être l'un des plus prometteurs et son développement a comporté une comparaison aux scores Fibrotest®, ELF, APRI et Forms [123]. L'aire sous la courbe était du Fibromètre® (0,883) était supérieur à celle du Fibrotest® (0,808, $p=0,01$), du Forms (0,820, $p=0,005$), de l'APRI (0,794, $p<10^{-4}$) et du ELF (0,834, $p=0,04$). Le score de Fibromètre® a été calculé et breveté à partir de 5 paramètres (plaquettes, TP, le taux d'ASAT, a2 macroglobuline, acide hyaluronique, l'urée et l'âge). Le score de Fibromètre® fluctue entre 0 et 1 [123]. Cependant ces tests sont onéreux et la possibilité de leur utilisation dans le contexte Sud apparaît donc limitée.

Le test APRI (ASAT to Platelet Ratio Index) a été développé afin de proposer un score de fibrose simple et peu coûteux [124]. Le score APRI (cut-off élevé à 2) a récemment été recommandé par l'OMS pour l'évaluation de la fibrose hépatique, en particulier dans les pays à ressources limitées ne disposant pas de Fibroscan® [65]

.Pour le diagnostic de fibrose cliniquement significative, l'Aire sous la courbe (AUROC) varie de 0,64 à 0,88. Un test $\leq 0,5$ a une valeur prédictive négative de 72 à 86 % et un test $> 1,5$ a une valeur prédictive positive de 88 à 100 % pour le diagnostic de fibrose cliniquement significative (F2) [124-126].

Comme le score APRI, le score FIB-4 est calculé sur l'âge des patients et l'ensemble des paramètres biologiques (transaminases hépatiques et plaquettes). Il devient un biomarqueur de la fibrose hépatique simple, peu coûteux et reproductible, également recommandé par l'OMS dans la prise en charge des hépatites virales. L'étude de Sterling [127] a été réalisée chez les patients co-infectés VIH/VHC, un score inférieur à 1.45 garantit une fibrose minimale à 90 % mais un score supérieur à 3,25 garantit une cirrhose à 97 %. Il permettrait à 71 % des patients d'éviter une ponction-biopsie hépatique.

L'utilisation de ces tests non invasifs est à ce jour validée dans les hépatopathies chroniques virales C et la co-infection VIH-VHC et mais aussi dans l'infection chronique virale B avec néanmoins des valeurs prédictives négatives peu satisfaisantes chez ces malades (recommandations OMS sur la prise en charge de l'hépatite B, Mars 2015)

IV.1.b Méthode non invasive d'évaluation de la fibrose par élastométrie (Fibroscan®)

L'élastométrie ultrasonore impulsionnelle (Fibroscan®) [128] est une technique non invasive qui permet de mesurer de manière objective et quantitative l'élasticité hépatique, corrélée au degré de fibrose hépatique. Plusieurs études montrent une performance diagnostique entre 80 et 97% pour la détermination des différents degrés de fibrose. Cette méthode, validée chez les patients co-infectés, permet aussi de suivre la

progression de la maladie hépatique [14-16]. Le coût est d'environ 100000 \$ pour une machine fixe et 30000 \$ pour une portable, cout d'entretien d'environ 4700 \$ [35]. Ceci représente un obstacle important pour les pays à ressources limitées.

IV.1.c Ponction-biopsie hépatique (PBH)

La ponction biopsie hépatique (PBH) a longtemps été considérée comme le test de référence servant à l'évaluation de la fibrose hépatique au cours de l'hépatite C, mais actuellement elle n'est plus recommandée comme test de première intention pour les sujets infectés par le VHC particulièrement dans les pays a ressources limitées pour des raisons de coût, de technique de réalisation, de complications et de capacité de lecture anatomo-pathologique [35].

La PBH est habituellement interprétée à l'aide d'un score semi-quantitatif d'activité nécrotico-inflammatoire et de fibrose, le plus utilisé étant le score Métavir composé de 4 grades d'activité (A0 à A3) et de 5 stades de fibrose (F0 à F4). Cependant, la biopsie hépatique est un geste invasif dont le risque de complications reste parfois graves (3/1.000 dans un travail multicentrique français) [129] et ceci pose un problème indiscutable pour les pays du Sud ou le nombre d'anatomopathologistes qualifiés fait aussi cruellement défaut.

IV.2. Facteurs de prédiction avec les associations pegIFN/ribavirine

IV.2.a Les facteurs de prédiction virologique :

Les facteurs de prédiction virologique présentaient un intérêt majeur à l'ère des thérapies par Ribavirine plus Interféron. Les études réalisées dans le domaine ont également permis d'améliorer dans une certaine mesure notre compréhension de la guérison d'une maladie virale chronique grâce à une immunothérapie active. Les marqueurs les plus importants de la réponse au traitement pegIFN/ribavirine sont clairement le génotype et la charge virale VHC. Ces éléments sont à prendre en compte pour décision du schéma thérapeutique avec cette bithérapie. La cinétique de charge virale après initiation thérapeutique étant le critère majeur de réponse au traitement.

IV.2.b Facteurs de prédiction métabolique:

Le syndrome métabolique est un facteur de mauvaise réponse au traitement. Les éléments défavorables sont en particulier : le tour de taille – propre au groupe ethnique, taux élevé de triglycérides ($\geq 1,7$ mmol/L ou 150 mg/dL ou traitement spécifique de ce trouble lipidique), faibles taux de cholestérolHDL, comme l'hypertension artérielle, le taux élevé de glycémie. Le syndrome métabolique et l'insulino-résistance sont considérés comme des facteurs majeurs de mauvaise réponse thérapeutique et sont aussi associés avec augmentation de la vitesse de la progression de la maladie hépatique [130, 131].

IV.2.c Facteurs de prédiction génétiques et immunologiques :

Le polymorphisme IL28B est associé à la réponse au traitement antiviral C pour le génotype 1. En effet le phénotype CC détermine une activité lymphocytaire T intra-hépatique importante et de meilleure chance de guérison.

Le dosage élevé de l'IP 10 (CX CL10) (avec cut off à 1080 mg/ml) a une valeur prédictive négative de 75% comme non répondeur au traitement (bithérapie PegINF/Ribavirine) [132-135]. La synthèse de cette chémokine produite par les macrophages et les lymphocytes T est en particulier induite par les cytokines associées à la réponse Th1 comme l'interféron gamma. En l'associant avec la recherche du polymorphisme de l'IL 28B, on augmente significativement la sensibilité de la prédiction de réponse thérapeutique. Néanmoins, ces marqueurs ne représentent plus beaucoup d'utilité avec l'arrivée des DAA de seconde génération.

IV.3. Obstacles à l'amélioration de la prise en charge de l'hépatite C au Vietnam

Le dépistage de l'hépatite C n'est pas systématique chez les patients à risque d'infection par le VHC, comme les UDI. Les recommandations nationales indiquent qu'un dépistage du VHC devrait être réalisé au moment du diagnostic du VIH. Mais en pratique, malgré la disponibilité de tests rapides VHC, le dépistage est peu réalisé. Ainsi seul 1% des patients seraient dépistés pour le VHC au moment du diagnostic VIH, 20% à 6 mois et 40% à 12 mois dans l'étude interventionnelle de Cosimi, réalisée à la province de Son La, Vietnam [136]. Les raisons de ce manque de dépistage tiennent d'un manque de sensibilisation des soignants, de la faible disponibilité des outils para-cliniques de prise en charge, et enfin du coût des traitements pour les patients.

En effet, la quantification de la charge virale du VHC ne se fait que dans deux grandes villes Hanoi et Ho Chi Minh ville. Le même constat peut être fait concernant l'évaluation de la fibrose hépatique avec le Fibroscan® disponible uniquement à Hanoi et Ho Chi Minh ville (environ cinq appareils disponibles appartenant le plus souvent au secteur privé

L'évaluation de l'atteinte hépatique et l'indication thérapeutique se basent dans la plupart des cas que sur l'élévation des transaminases hépatiques et l'échographie hépatique. L'évaluation de la fibrose hépatique est peu réalisée. La charge virale initiale n'est pas réalisée de manière systématique, et presque jamais suivi après initiation du traitement ou à la fin de celui-ci.

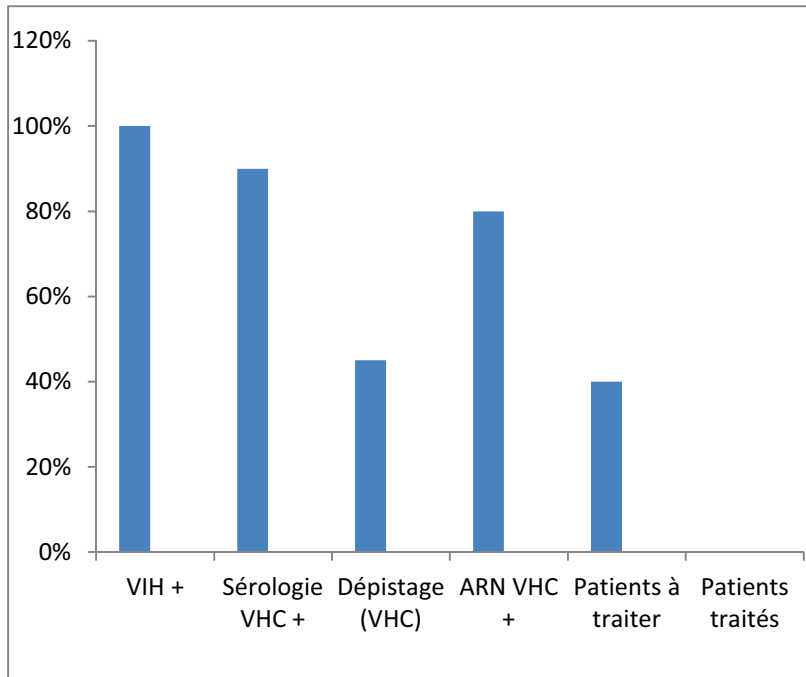


Figure 17 : Estimation de la cascade de soins (VHC) des patients infectés par le VIH au Vietnam, d'après la littérature (VAAC)

RESUMES DES TRAVAUX DE THESE

V. Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse a émergé de la collaboration depuis 2011, entre l'ANRS, son site à Ho Chi Minh Ville, les partenariats vietnamiens à l'Université de médecine Pham Ngoc Thach, Ho Chi Minh Ville, l'Université de Hai Phong, l'Institut Pasteur à Ho Chi Minh Ville, et les équipes de recherches en France à Paris (Saint Antoine, Henri Mondor) et Montpellier (UMR/Inserm U1058). Les objectifs des travaux de thèse sont focalisés sur l'amélioration des moyens biologiques, cliniques et thérapeutiques de prise en charge des usagers de drogue intraveineuse qui sont souvent co-infectés par le VIH et l'hépatite C. Très peu d'études évaluant au Vietnam les caractéristiques globales des patients mono-infectés VHC et aucune étude n'a été menée chez les co-infectés avec le VIH. L'étude ANRS 12262 (FIBRHIViet, contrat d'initiation) avait pour objectif d'évaluer les caractéristiques clinico-virologiques et l'évaluation du degré de la fibrose hépatique avec différentes méthodes chez les patients co-infectés VIH/hépatite virale C. Cette étude pilote s'inscrit également dans une perspective de simplification de la prise en charge de l'hépatite C au Vietnam.

Nous avons également essayé de décrire la réponse immunologique induite par une immunothérapie antivirale IFNpégylé/ribavirine, afin de mieux comprendre les déterminants de la guérison d'une infection virale hépatocytaire chronique. L'interféron pégylé demeurant la seule possibilité curative pour les infections VHB et VHD.

Enfin, nous avons exploré les performances du dépistage des primo-infections VIH sur DBS comparativement au test rapide.

VI. Objectifs spécifiques

Objectif principal du travail: mise en place des outils contribuant à l'amélioration de la prise en charge de l'hépatite C dans le contexte local vietnamien.

Travail 1 : ANRS 12262, Evaluation clinico-virologique et de la fibrose hépatique chez 104 patients co-infectés VIH/hépatite virale C au Vietnam

Travail 2 : Marqueurs immunologiques de clairance du VHC chez les patients co-infectés avec le VIH traités par pegINF et Ribavirine

Travail 3 : Diagnostic de la primo-infection du VIH avec DBS (Dried Blood Spot)

Travail 1 :

Evaluation clinico-virologique et de la fibrose hépatique chez les patients co-infectés VIH/hépatite C au Vietnam.

Etude ANRS 12262. Co-infection VIH-VHC au Vietnam: étude de faisabilité d'un traitement par bithérapie pégylée dans une cohorte de patients co-infectés VIH-VHC suivis à Hai Phong, Vietnam (contrat d'initiation, LEMOINE Maud et DUONG ThiHuong).

Manuscrit soumis.

L'accès aux soins pour les personnes vivant avec le VIH a beaucoup progressé dans les pays à ressources limitées. La co-infection VHC/VIH est fréquente, et la maladie hépatique reste une des causes majeures de morbidité et de mortalité dans ce contexte.

Au Vietnam, les épidémies VIH et le VHC sont concentrés dans des populations vulnérables, en particulier chez les UDI. Les données concernant l'hépatopathie liée au VHC chez les personnes infectées par le VIH sont peu nombreuses dans ce pays. Cette étude visait à évaluer les caractéristiques de l'infection par le VHC, en particulier le niveau de fibrose hépatique et les facteurs de risque associés à la fibrose extensive chez les patients co-infectés VIH-VHC à Haiphong.

Cette étude transversale a été menée à l'OPC VIH (Out Patient Clinic) de Viet-Tiep. Les patients co-infectés bénéficiaient d'un examen clinique et du questionnaire épidémiologique standardisé, d'une évaluation de la fibrose hépatique par l'élastographie hépatique (Fibroscan®, Echosens) et d'un bilan biologique.

Les patients ont été recrutés entre Février et Mars 2014. 104 patients co-infectés VHC-VIH sous traitement antirétroviral ont été inclus: 99 hommes, âge médian de 35,8 ans (32,7 à 39,6), CD4 médian à 504/mm³, 94% avec charge virale ARN VIH indétectable. 93 (89,4%) avaient une charge virale ARN-VHC positive (médiane: 6,2, IC 95%: 5,0 à 6,8 log₁₀ IU / mL). La répartition par génotypes était : 1a / 1b (69%), 6a / 6e (26%) et 3b (5,4%). 43 patients (41,3%) avaient une fibrose significative \geq F2, dont 24 patients (23,1%) avec une fibrose sévère (F3) et la cirrhose (F4). En analyse univariée, la consommation excessive d'alcool, la durée d'infection par le VHC depuis le diagnostic, le nadir des lymphocytes CD4 ont été considérés comme des facteurs associés à la fibrose sévère / cirrhose. L'abus d'alcool était le seul facteur indépendant de fibrose avancée en analyse multivariée.

Dans cette étude menée au Vietnam, près d'un quart patients co-infectés VIH-VHC, sous traitement antirétroviral avec contrôle virologique, présentaient une fibrose avancée ou une cirrhose hépatique, nécessitant donc rapidement l'initiation d'un traitement antiviral VHC.

High proportion of HIV-HCV coinfecting patients with advanced liver fibrosis and cirrhosis requiring hepatitis C treatment in Haiphong, Northern Vietnam

Tam NGUYEN TRUONG^{1,2*}, Didier LAUREILLARD^{2,3*}, Karine LACOMBE⁴, ThiHuong DUONG⁵, Thi Hanh Phuc PHAM⁶, Thi Xuan Lien TRUONG⁷, Thi Nga CHU ⁸, Que Anh LUONG⁹, HaiVinh VU⁶, Nicolas NAGOT^{2,10}, Edouard TUAILLON^{2,11}, Stéphanie DOMINGUEZ¹¹, Maud LEMOINE¹²

* equally contributed

(1) Pham Ngoc Thach University of Medicine, Ho Chi Minh City, Vietnam

(2) INSERM U1058 "Pathogenesis and Control of Chronic Infections", Montpellier, France

(3) Department of Infectious and Tropical Diseases, Caremeau University Hospital, Nîmes, France

(4) Department of Infectious and Tropical Diseases, Saint-Antoine Hospital, AP-HP, Paris, France; Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, Paris, France

(5) Department of Public Health, University of Medicine and Pharmacy, HaiPhong, Vietnam

(6) Department of Infectious and Tropical Diseases, Viet Tiep Hospital, HaiPhong, Vietnam

(7) Pasteur Institute, Ho Chi Minh City, Vietnam

(8) Department of virology, Viet Tep hospital, Haiphong, Vietnam

(9) Department of epidemiology, Unviversity Hospital, Montpellier, France

(10) Department of bacteriology and virology, Unviversity Hospital, Montpellier, France

(11) Department of clinical immunology, Henri Mondor Hospital, AP-HP, Créteil, France

(12) Department of Hepatology, St Mary's Hospital, Imperial College, London, United Kingdom

Corresponding author:

Dr Maud Lemoine

Imperial College London

Department of Hepatology

St Mary's Hospital

Tel: +44 (0) 20 331 25212

Fax: +44 (0) 207 724 9369

Email: m.lemoine@imperial.ac.uk

Word count: 3,148

Tables: 3

Figures: 2

References: 40

Key words: HIV-HCV co-infection, liver fibrosis, cirrhosis, elastography, Fibroscan, APRI, treatment, Vietnam.

Abstract (n=248)

Rational and aims: Screening and treatment for chronic hepatitis C in Vietnam are still very limited. Scarce clinical data are currently available on HCV-related liver disease in people living with HIV/AIDS in Vietnam. This study aimed to assess the severity of liver fibrosis and its risk factors in HIV-HCV coinfecting patients in Haiphong, Northern Vietnam.

Methods: A cross-sectional study was conducted at the HIV clinic of Viet Tiep (Haiphong). Consecutive HIV treated adults with positive HCV serology completed a standardised epidemiological questionnaire and had a comprehensive liver assessment including hepatic elastography (Fibroscan®, Echosens).

Results: From February to March 2014, 104 HIV-HCV coinfecting patients under antiretroviral therapy were enrolled (99 males, median age 35.8 (32.7-39.6) years, 94% with undetectable HIV-RNA, median CD4 count 504 (69,2%)/mm³). Of them, 93 (89.4%) were tested positive for HCV RNA (median 6.19 (4.95-6.83 Log₁₀IU/mL). Patients were mainly infected with genotypes 1a/1b (69%), genotypes 6a/6e (26%) and genotype 3b (5.4%). Forty three patients (41.3%) had fibrosis \geq F2. Among them, 24 patients (23.1%) had severe fibrosis (F3) and/or cirrhosis (F4). In univariate analysis, excessive alcohol consumption, HCV time from diagnosis, nevirapine and lopinavir-based ARV regimen and CD4 nadir were associated factors of advanced fibrosis/cirrhosis. Alcohol abuse was the only independent factor of extensive fibrosis in multivariate analysis. Using Fibroscan® as a gold standard, the high threshold of AST-to-platelet ratio index (APRI) score (2) had very good performances for the diagnosis of extensive fibrosis/cirrhosis (Se: 90%, Sp: 84%, AUROC=0.93, 95%CI: 0.86 - 0.99).

Conclusion

In this study conducted in urban Vietnam, approximately 25% of HIV-HCV coinfecting patients successfully treated with ARV have extensive fibrosis or cirrhosis, and therefore urgently require HCV treatment.

Introduction

Over the last decade, access to HIV/AIDS care and antiretroviral therapy (ART) has been

greatly improved in resource-limited countries and the number of AIDS-related deaths is now steadily decreasing [1]. Hepatitis C virus (HCV) infection, which is a major public health problem globally [2] is frequently observed in HIV-infected individuals and has emerged as a leading cause of morbidity and mortality in this population [3].

In Vietnam, HCV seroprevalence has been reported between 1 to 6 % in the general population [4] and is dramatically higher (up to 90%) in people who inject drug (PWID) [4-10]. The HIV epidemic is concentrated among high risk populations, such as female sex workers (prevalence 2.6 %), men who have sex with men (3.7 %) and PWID (10.3 %) [11]. Despite huge efforts to control the national HIV epidemic among PWID by scaling up ART, needle and syringes exchanges programmes and opioid substitution treatment, PWID still represent the vast majority of people living with HIV/AIDS in Vietnam with a high rate of HCV coinfection.

The Vietnamese Ministry of Health has recently developed national HCV Guidelines upon the release of the first World Health Organization (WHO) Guidelines on HCV care and treatment [2]. However screening and access to care and treatment for chronic hepatitis C in Vietnam are still very limited. To date, very scarce clinical data are available on HCV-related liver disease in people living with HIV/AIDS in Vietnam and the proportion of patients in need of treatment is unknown. Since new highly effective direct antiviral agents have been licensed, access to these drugs in resource-constrained areas has been urged by the medical community and the civil society [12-14]. Therefore, it is critical to identify patients in need of urgent treatment.

This cross sectional study aimed to assess the proportion of clinically significant fibrosis in HIV-HCV-coinfected patients followed in Viet Tep Hospital in Haiphong, Northern Vietnam. Epidemiological, virological and clinical characteristics associated with advanced fibrosis/cirrhosis were explored. Since WHO ranked the aspartate transaminase (AST)-to-platelet ratio index (APRI) as a preferred non-invasive marker of extensive fibrosis and cirrhosis in resource-limited settings, we also evaluated its diagnostic performance using hepatic transient elastography (Fibroscan®) as a gold standard.

Patients and methods

Study population

Among HIV-infected patients treated with ART in the outpatient clinic (OPC) of Viet Tiep hospital in Haiphong, we enrolled consecutive HIV-infected patients with HCV positive serology who visited the clinic for their regular HIV follow-up between February and March 2014. As the ultimate goal of this study was to identify and characterize patients who may benefit from HCV treatment in the near future, eligibility criteria for this cross sectional study were: being over 18 years old, HCV treatment-naïve, under ART for more than 6 months with $CD4 \geq 200/mm^3$ and having no contra-indications to immediate interferon-based HCV treatment i.e: ongoing opportunistic infection, concomitant malignancy, severe anemia defined by $Hb < 8$ g/dL, decompensated cirrhosis, acute heart failure, severe psychiatric disorders, pregnancy, platelet count $< 50.000/mm^3$, neutrophil count $< 750/mL$ measured in the past 6 months. Only participants with a second confirmed positive HCV serology were included in the final analysis. Informed consents were obtained from all the participants before enrolment in the study and ethical approval was granted by the local ethic committee. The study was conducted in agreement with the Haiphong healthcare services and the Helsinki declaration.

Clinical assessment

Each participant was administered a face-to-face standardized socio-demographic questionnaire in Vietnamese, had a clinical examination and a comprehensive liver assessment by a trained medical doctor. Liver fibrosis was assessed using transient elastography (Fibroscan 402, Echosens, France) by two trained experienced operators according to the manufacturer's protocol [15]. The value of liver stiffness measurement (LSM) was expressed in kilopascal (kPa) as the median of 10 successful acquisitions. Unreliable measurement was defined as interquartile range (IQR)/LSM of > 0.30 when LSM is ≥ 7.1 kPa according to Boursier et al. criteria [16]. LSM were all done fasting as recommended [17, 18]. For fibrosis staging, the following cut-offs were applied: fibrosis F0-F1 < 7.1 kPa; F2: 7.1 – 9.4 kPa; F3: 9.5 – 12.4 kPa, F4 > 12.4 kPa [19].

Laboratory investigations

The following blood parameters were determined after overnight fasting in the laboratory of Viet Tiep hospital on the same day than transient elastography in all patients: AST,

alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyltransferase (GGT), bilirubin, platelet count, serum albumin and prothrombin time. All participants had a confirmatory test for HCV serology by Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) technique using Phamatech anti HCV EIA kit (USA). The plasma has been prepared and stored at -20°C in Viet Tiep Hospital then transferred to Pasteur Institute in Ho Chi Minh City. HIV and HCV RNA quantification and HCV genotyping were performed at the Pasteur Institute (Ho Chi Minh City). HIV and HCV RNA were extracted from plasma samples using MagNa Pure 96 system using the kit on the LightCycler® 480 instrument (Roche, USA). HIV viral load was measured by HIV RNA levels (Generic HIV Viral Load®, Biocentric, France) with a detection limit of 300 copies/mL. HCV RNA was quantified by HCV Real-time Quant kit (Sacace Biotechnologies, Italy) with a detection limit of 15 IU/mL.

HCV genotyping was performed for samples with HCV RNA level above 1,000 copies/mL. An in-house assay was applied in which a targeting of 377 bp HCV NS5b region or 464 bp core gene was amplified by ABI 9700 PCR instrument and sequenced by CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter). HCV subtypes were identified using the Los Alamos Hepatitis C sequence (www.hcv.lanl.gov).

Statistical analysis

All data were registered anonymously in a computerized database. The description of socio-demographical, clinical, biochemical, hematological, virological and immunological parameters was performed using standard descriptive methods, i.e. categorical variables were expressed as raw numbers and percentages, continuous variables were described by their means and standard deviation (normal distribution) or their median and IQR 25-75% (non normal distribution assessed by Shapiro-Wilks test). The proportion of F3-F4 fibrosis was assessed as the number of patients with LSM above 9.4kPa and expressed with its 95% confidence interval. Mean (+/- standard derivation (SD) score was also determined and used as a continuous variable. As a value of LSM above 20 and 40 kPa has been proved to be associated with a high risk of portal hypertension and cirrhosis-related complications, respectively [20], we also reported the number of patients with LSM > 20kPa and > 40kPa. Categorical variables were compared using a Pearson χ^2 -test or Fisher's Exact Test as appropriate, and continuous variables were compared using a Student's t test or non

parametric tests as appropriate. A two-sided P value <0.05 was considered statistically significant. The diagnostic performance of APRI in diagnosing advanced fibrosis/cirrhosis was evaluated from the Area Under the ROC curves (AUROCs), considering transient elastography as the gold standard. Two thresholds for fibrosis \geq F3 with APRI were examined: 2 (high threshold) and 1 (low threshold), as per WHO hepatitis C Guidelines [2]. Finally, risk factors for liver fibrosis \geq F3 were assessed by means of two methods: i) outcome expressed as a dichotomous variable (< or \geq F2): univariate and multivariate logistic regression with odds ratios (OR) and 95% confidence intervals; ii) outcome expressed as a continuous variable (LSM): univariate and multivariate linear regression with β parameters and 95% confidence intervals (CI). Statistical analyses were performed using STATA 11 statistical package for Windows.

Results

Study population

From February to March 2014, 111 HIV-infected adults with positive HCV antibodies were screened for enrolment in this study. Seven had a negative HCV confirmatory serological test and were excluded from further assessment. Therefore the study population consisted of 104 patients, whose demographic, clinical and biological characteristics are summarized in Tables 1 and 2.

Study participants were mainly men (95.2%) with a median age at 35.8 (32.7-39.6) years. At enrolment, they were all under ART (most prescribed 3rd agent: efavirenz with a backbone of TDF/3TC or D4T/3TC or AZT/3TC) associated with 94.2 % rate of undetectable plasma HIV-RNA and median (IQR) CD4 T cell count of 504 (361-624) /mm³. Median estimated duration of HIV was 6.3 (3.1-7.8) years.

Of the 104 study participants, 72 (69.2%) reported past injection drug use while 24 (33%) were still intravenous drug users and 21 (20.2%) were receiving opiate substitution treatment. Current or past excessive alcohol consumption was reported in 70 (67.3%) patients. The prevalence of positive HBs antigen (HBsAg) was 12.6% (95% CI: 10.4 – 14.8).

Hepatitis C and liver fibrosis evaluation

Out of the 104 patients with confirmed HCV antibodies, 93 (89.4%) had a positive HCV RNA with a median viral load of median 6.19 (4.95-6.83 Log₁₀IU/mL). Genotype distribution

showed a highest proportion of genotypes 1a/1b (68.8%), followed by genotypes 6a/6e (25.8%), and genotype 3b (5.4%). A valid LSM was obtained for all the subjects median (IQR):6.7 kPa (5.3-9.2). According to the predetermined cut-offs for liver fibrosis, 43 (41.3%) patients were classified as having clinically significant fibrosis (\geq F2) and 24 (23.1%) as having extensive fibrosis (F3) and/or cirrhosis (F4) including 14 (13.5%) classified as cirrhotics. All suspected cirrhotic subjects had compensated liver disease and only 2 were classified Child-Pugh score B. Of the 104 patients, 8 (7.7%) had LSM over 20 kPa suggesting the presence of clinically significant portal hypertension and 2 (2%) had LSM over 40 kPa, a cut-off associated with high risk of cirrhosis-related complications..

Patients with extensive fibrosis/cirrhosis had lower platelet count ($P=0.003$) and prothrombin time ($p<0.0001$), and higher ALT, AST, GGT and total bilirubin levels, ($P<0.0001$) compared to patients with none to moderate fibrosis. A higher rate of alcohol consumption and a trend towards time from HCV diagnosis were also noted in patients with severe fibrosis (83.3% versus 62.5% and 9 years versus 4.6 years, $P=0.04$ and $P=0.08$ respectively). The proportion of patients with severe fibrosis was identical according to HCV genotype (Table 2).

Risk factors for advanced fibrosis/cirrhosis

In univariate analysis with fibrosis as a dichotomous variable (F0-F2 versus F3-F4), the following factors were associated with extensive fibrosis/cirrhosis: current or past excessive alcohol consumption, HCV time from diagnosis, nevirapine of lopinavir-based ART regimen and CD4 nadir. After adjustment, the only factor remaining associated with F3-F4 score was current or past excessive alcohol consumption (OR: 4.2, 95% CI: 1.1-15.4). In multivariate analysis with transient elastography as a continuous variable, heavy alcohol consumption remained strongly associated with high LSM values ($\beta=36.04$ (3.95 – 68.13), $p<0.03$)

Performance of APRI score for the diagnosis of advanced fibrosis/cirrhosis

Median of APRI score was higher in patients with F3-F4 score compared to patients with F0-F2 fibrosis (2.2 versus 0.7, $P<0.0001$). For the diagnosis of advanced fibrosis/cirrhosis, the performance of APRI (high threshold at 2) was very good (Figure 1 and Table 3) with

an AUROC at 0.93 (95% IC, 0.86 – 0.99) and 87 (84%) of the patients were correctly classified. Using the low APRI threshold at 1, AUROC was only 0.75 (95% IC, 0.64 – 0.86) and less patients (78, 75%) were correctly classified. Using the high cut-off APRI score allowed maximising the sensitivity of the score (90%) while keeping the same level of specificity (84%) (Table 3).

Discussion

Our study suggests that 1) among HIV-HCV coinfecting subjects under ART who are attending the outpatient clinic of Tip Vet Hospital, Haiphong in Northern Vietnam, almost half of them have clinically significant fibrosis ($\geq F2$) and one fourth an extensive liver fibrosis or cirrhosis despite optimal HIV viro-immunological control; 2) genotypes 1 and 6 are the predominant HCV genotypes circulating in this region.

Few studies on HCV infection have been conducted in Vietnam. These studies were mainly sero-epidemiological surveys without clinical focus on the liver [9, 21,22]. One study only assessed the degree of liver fibrosis in HIV-HCV co-infected individuals in Southeast Asia [23]. This study was performed in Thailand and reported 41.7% of HIV-HCV coinfecting patients with extensive fibrosis (F4) using Fibroscan®. Out of them 24% were classified as cirrhotics. Cross sectional studies conducted in Western countries also reported high proportions of extensive fibrosis and cirrhosis [24-27] in cohorts of naïve of treatment HIV-HCV coinfecting subjects. The higher rates of extensive fibrosis observed in the Thai and Western studies compared to our results may be explained by the differences in age (our patients were much younger) and duration of HCV infection. The median duration of HCV exposure was over 17 years in the Thai study and Western studies compared to an estimated median HCV contamination below seven years in our study. . Interestingly, the short period from HCV diagnosis (4.8 (2.7-6.5) years) suggests that HCV infection was long neglected in Vietnam, as systematic HCV screening has been implemented only in 2005 in HIV clinics.

Haiphong city experiences important rates of injection drug use in young individuals [28]. Indeed, it is a well-established area within the “Golden Triangle” for heroin supply at low price and has become an attractive area for PWID [28]. In our study, as expected the use of injecting drugs was frequently associated with HCV infection among HIV positive patients

and HCV transmission was attributable to the use of intravenous drug in almost two third of the cases. This is in line with other studies from Vietnam, Asia and South East Asia that reported a high prevalence of HCV infection, up to 96% in IDUs [9, 10, 29]. In Hanoi, among HIV-infected individuals, 35.4% were tested positive for HCV and HIV-HCV co-infection was mainly observed in young males and use of injecting drug was reported as a transmission factor in 44% of HCV positive cases [21].

As suggested by previous studies, we confirm that genotypes 1 and 6 are frequent circulating genotypes in Vietnam with almost one third of patients being infected with a genotype 6 [30, 31]. However, genotype 6 was not the predominant circulating genotype in Vietnam although previous studies reported a high HCV genotype 6 prevalence [30, 31]. Interestingly, we found a few Vietnamese patients infected with a genotype 3b. . While Avihingsanon *et al.* observed a lower rate of severe fibrosis in HCV genotype 6 infected subjects in Thailand, we did not find any difference in fibrosis stage according to HCV genotype.

We assessed the severity of liver fibrosis using Fibroscan® as its excellent performances have been demonstrated in HCV-infected as well as HIV-HCV co-infected individuals [19, 32, 33]. In addition, liver biopsy is not feasible in routine clinical practice in resource-limited countries. However, the Fibroscan® device is rarely available in these countries mainly because of its high cost (€34,000 for the portable machine and €5,000 for the annual maintenance cost). In Vietnam only a few machines are available in the country and are mainly accessible in the private sector. As a result WHO recommends the use of APRI (high cut-off) as a simple and inexpensive alternative method to identify patients with extensive fibrosis and cirrhosis in resource-constrained countries [2]. Using Fibroscan® as a gold standard, we found that APRI performed very well in diagnosing extensive fibrosis/cirrhosis (AUROC>0.90) when using the high threshold of 2. performance

Since international guidelines recommend to prioritize treatment in patients with extensive fibrosis or cirrhosis [34], we focused our analysis on F3-F4 patients., a recent model-based analysis performed in resource-limited countries (Egypt, Thailand, Côte d'Ivoire) suggested that focusing HCV treatment on patients with severe fibrosis (F3–F4) using standard of care therapy (Peg-interferon and ribavirin) or interferon-free therapy (sofosbuvir and ribavirin), is the best strategy for developing countries as it induces the

highest number of life per year saved [35]. Several studies have also shown that HCV antiviral therapy in IDUs, especially in those on opioid substitution treatment, is associated to identical sustained virological response compared to non-or former IDUs [36, 37]. In addition, there is an increase evidence to propose HCV therapy as a cost-effective intervention to reduce the burden of HCV infection and transmission in this specific population [38, 39].

Our study clearly suggests that a high proportion of IDUs in Vietnam urgently requires HCV antiviral therapy. Based on our analysis and considering that there is 200,000 IDUs in Vietnam, about 150,000 of them (70%) () have been infected with HCV, 80% of them (120,000) have a chronic HCV hepatitis and 30,000 could be pre-cirrhotic or cirrhotics with a risk of decompensated cirrhosis or HCC over the next years if they do not benefit of antiviral treatment soon.

Interestingly, almost all our study participants (95%) had a very good HIV viro-immunological control . This reflects the great efforts that have been deployed over the last decades in Vietnam to fight against HIV/AIDS and expand ART also to the most stigmatized populations. Thus, if access to HCV treatment is not improved, the success of ART in resource-limited countries will be clearly undermined.

In our study, heavy alcohol consumption was the only statistical difference between patients with extensive fibrosis or cirrhosis and those with none to moderate fibrosis. It was also a strong independent factor of severe fibrosis. By contrast with other studies, age, duration of HIV or HCV infection and ARV regimen were not statistically associated with extensive liver fibrosis/cirrhosis although a trend was noted for the HCV duration. This underlines that excessive alcohol consumption is an important contributor of liver fibrosis progression in this population. Heavy alcohol consumption has been previously reported as a major public health problem in Vietnam in particular in men [4, 40]. Unfortunately, alcohol is another neglected problem in many resource-limited countries and must be clearly integrated in harm reduction programs [2].

Our study has some limitations. First, it is a cross-sectional study including a small number of patients, which may not strictly reflect the burden of HCV-related burden disease in Vietnam. Secondly, since the most severe cases have been seen mainly in inpatient clinic,

our study may have underestimated the proportion of patients with end-stage liver disease. Finally, we could not properly assess the proportion of patients with liver complications (in particular portal hypertension) due to resource-limited constraints.

Our findings underlined the urgent need of HCV screening and treatment programs in Vietnam. Indeed, in HIV-HCV coinfecting subjects successfully treated with ARV, our study suggests that about 25% of patients urgently require HCV antiviral therapy. HCV treatments must be adapted to the local epidemiology (genotypes 1 & 6). This will comply with the recent WHO recommendations [2] and its recent call to deploy strategies to reduce the burden of viral hepatitis especially in endemic resource-constrained areas [41].

Acknowledgements

We would like to thank all the participants, Prof. Hoang Van Mich (director of Viet Tiep Hospital), and the entire team of the HIV out-patient clinic. We are grateful to Echosens France, in particular Jean-Marc David and Céline Fournier, for offering the Fibroscan® machine. We also thank the French national research agency on HIV and viral hepatitis (ANRS) and its director Prof. Jean-François Delfraissy. Finally we want to acknowledge Prof. Françoise Barre-Sinoussi, the French coordinator of the ANRS Vietnam site, for her strong support.

Competing interests

The authors declare no competing interests directly related to this study.

Financial support

This study was funded by the French Research Agency on HIV/AIDS and Viral hepatitis (ANRS 12262)

Table 1: Description of the study population according to the liver fibrosis status

	General population n=104	Patients with F0 – F2 liver fibrosis n= 80	Patients with F3 – F4 liver fibrosis n= 24	P valu e
Socio-demographic characteristics				
Male gender (n, %)	99 (95.2)	75 (93.8)	24 (100)	0.6
Age, years (median, IQR)	35.8 (32.7 – 39.6)	37.1 (6.2)	36.6 (5.5)	0.9
BMI, kg/m ² (median IQR)	19.6 (18.4 – 21.6)	20.1 (2.0)	20.1 (2.3)	0.8
IV drug use as way of HCV transmission (n, %)	72 (69.2)	56 (70)	16 (66.7)	0.8
Current or past excessive alcohol consumption (n, %)	70 (67.3)	50 (62.5)	20 (83.3)	0.04
Current tobacco use (n, %)	82 (78.9)	65 (81.3)	17 (70.8)	0.3
Current cannabis use (n, %)	16 (15.4)	11 (13.8)	5 (20.8)	0.5
Current use of any drugs (including injecting) (n, %)	8 (10.8)	6 (10.3)	2 (12.5)	0.9
Current use of injecting drugs (n, %)	9 (12.7)	7 (12.5)	2 (13.3)	0.9
Current oral opioid substitution (n, %)	21 (20.2)	18 (22.5)	3 (12.5)	0.4
HIV characteristics				
Estimated duration of HIV infection from first screening, years (median, IQR)	6.3 (3.1 – 7.8)	6.6 (4,0)	5.7 (3,8)	0.4
CD4 nadir, per mm ³ (median, IQR)	84 (38 – 175)	113 (113.4)	133 (110.2)	0.2
Current CD4 count, per mm ³ (median, IQR)	504 (361 – 624)	521 (210.2)	471 (159.6)	0.4
Undetectable HIV-RNA (n, %)*	98 (94.2)	75 (93.8)	23 (95.8)	0.9
Duration of cART, years (median, IQD)	4.3 (4.1 – 6.0)	4.2 (1.9)	3.8 (1.9)	0.3
Type of cART				
- Nevirapine-based	7 (6.7)	4 (5)	3 (12.5)	
- Efavirenz-based	91 (87.5)	73 (91.3)	18 (75.0)	
- Lopinavir-based	6 (5.8)	3 (3,5)	3 (12.5)	0.07
HBsAg positivity (n, %), n=103	13 (12.6)	9 (11.3)	4 (12.6)	0.5

*: limit of detection: 250 copies/mL

Table 2: Hepatitis C characteristics of the study population according to the liver fibrosis status

	General population n=104*	Patients with F0 – F2 liver fibrosis n=80*	Patients with F3 – F4 liver fibrosis n=24*	P Value
Time from HCV diagnosis, years	4.8 (2.7 – 6.5)	4.6 (2.1)	9.0 (22.4)	0.08
Detectable HCV-RNA, n (%)	93 (89.4)	70 (87.5)	23 (95.8)	0.5
HCV-RNA, IU/mL	6.19 (4.95-6.83)	5.93 (1.26)	5.91 (0.99)	0.7
HCV genotypes, n (%)				
- 1 (1a/1b)	64 (68.8)	49 (70.0)	15 (65.2)	
- 3b	42(45.2)/22(23.7)			
- 6	5 (5.4)	4 (5.7)	1 (4.4)	0.8
(6a/6e)	24 (25.8) 19 (20.4)/5(5.4)	17 (24.3)	7 (30.4)	
Platelets, 10 ⁹ /L	214 (177 – 267)	235 (71)	189 (86)	0.003
ALT, IU/mL	62 (40 – 95)	62 (34)	128 (92)	0.0001
AST, IU/mL	48 (38 – 68)	47 (20)	105 (58)	0.0001
GGT, IU/mL	143 (93 - 378)	23.5 (210.5)	67.9 (332.5)	
Total Bilirubin mg/dL	10 (7 – 13.5)	9.9 (4.3)	16.3 (9.2)	
Albumin, g/L	43 (41 – 45)	41.8 (7,0)	41.0 (8.7)	0.9
Prothrombin time, %	91 (79 – 99)	93 (22)	79 (17)	0.002
LSM, kPa	6.7 (5.3 – 9.2)	6.1 (1.5)	18.4 (11.6)	0.0001
F0-F1/F2/F3/F4, n (%)	61 (68.7)/19(18.3)/10 (9.6)/14 (13.5)	na	na	
APRI score	0.7 (0.4 – 1.4)	0.7 (0.5)	2.2 (1.9)	0.0001

*Continuous variables are expressed with their median and interquartile range (IQR) for the general population and mean and standard deviation when categorized by liver fibrosis group. Continuous variables are expressed with their mean and Standard Deviation (SD)

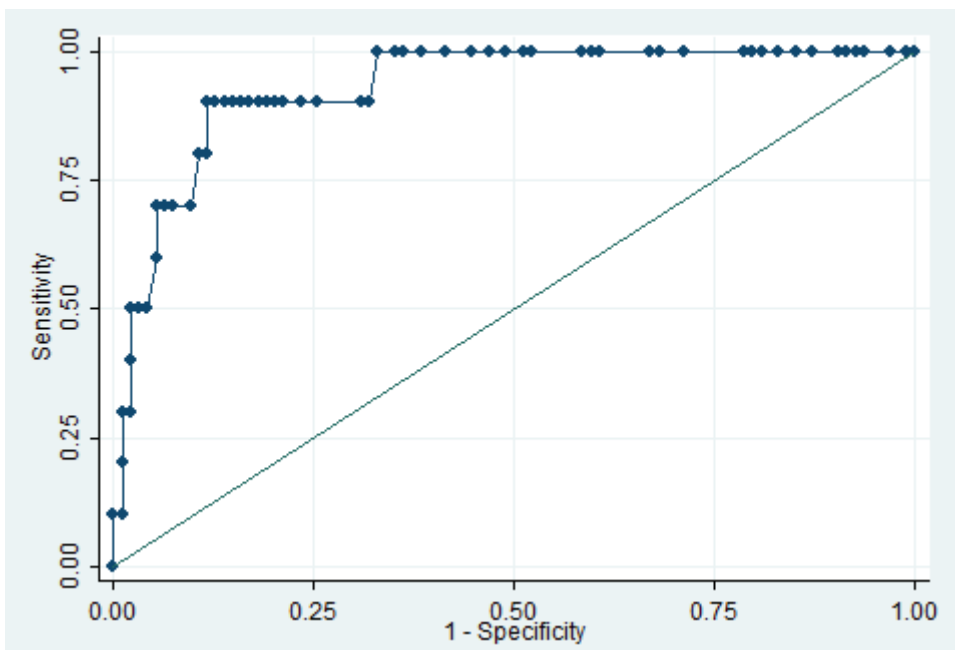
Table 3: Performance of APRI in predicting advanced fibrosis /cirrhosis (F3/F4) using transient elastography as a gold standard

	AUROC (95%CI)	Se (%)	Sp (%)	Correctly classified, (%)	LR-	LR+
High APRI threshold (2)	0.93 (0.86 – 0.99)	90	84	84.6	0.11	7.69
Low APRI threshold (1)	0.75 (0.64 – 0.86)	47	90	75	0.59	4.59

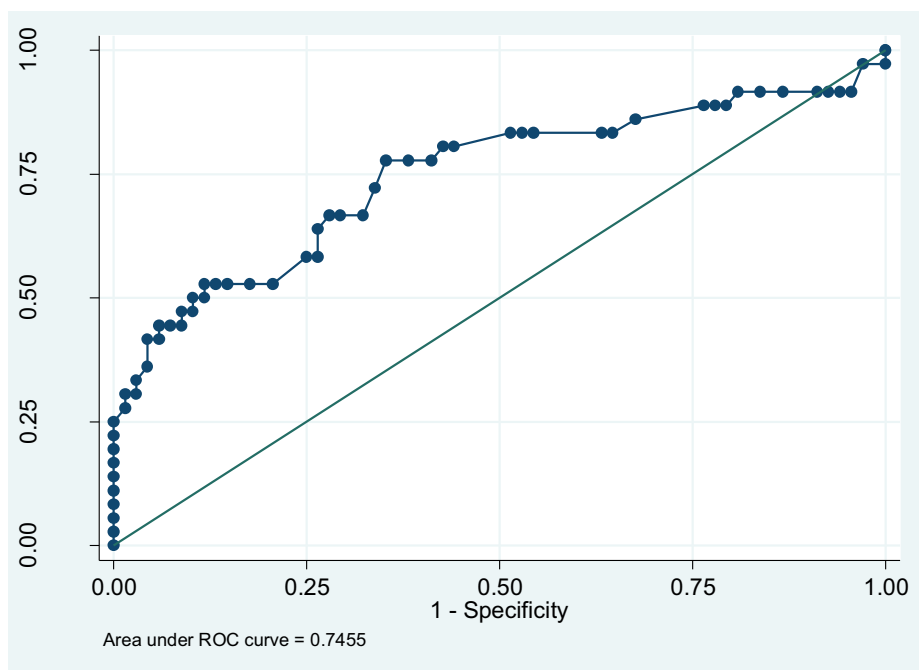
Abbreviations: AUROC: area under the receiving operator curve; Se: sensitivity; p: specificity; LR-: negative likelihood ratio; LR+: positive likelihood ratio.

Figure 1: Performance of APRI in diagnosing extensive fibrosis (F3) and cirrhosis using a threshold (APRI > 2) (Figure 1B) and a low cutoff (APRI>1) (Figure 1B)

1A. AUROC: 0.93 (95% CI: 0.86 – 0.99)



1B. AUROC: 0.75 (95%, IC 0.64 – 0.86)



References

1. UNAIDS.
http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf Last accessed 3rd of June 2014. 2013.
2. WHO; Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection <http://who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-c-guidelines/en/> Accessed 18t March 2015 2014.
3. Joshi D, O'Grady J, Dieterich D, Gazzard B, Agarwal K. Increasing burden of liver disease in patients with HIV infection. *Lancet* 2011,**377**:1198-1209.
4. Gish RG, Bui TD, Nguyen CT, Nguyen DT, Tran HV, Tran DM, *et al.* Liver disease in Viet Nam: screening, surveillance, management and education: a 5-year plan and call to action. *J Gastroenterol Hepatol* 2012,**27**:238-247.
5. Viet nam HIV/AIDS ESTIMATES AND PROJECTIONS 2007 – 2012. . *MINISTRY OF HEALTH – VIET NAM ADMINISTRATION OF HIV/AIDS CONTROL.*
6. Kallman JB, Tran S, Arsalla A, Haddad D, Stepanova M, Fang Y, *et al.* Vietnamese community screening for hepatitis B virus and hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 2011,**18**:70-76.
7. Sereno L, Mesquita F, Kato M, Jacka D, Nguyen TT, Nguyen TN. Epidemiology, responses, and way forward: the silent epidemic of viral hepatitis and HIV coinfection in Vietnam. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)* 2012,**11**:311-320.

8. Clatts; MC, Colón-López; V, Giang; LM, Goldsamt. LA. Prevalence and Incidence of HCV Infection among Vietnam Heroin Users with Recent Onset of Injection. *Journal of Urban Health: Bulletin of the New York Academy of Medicine* 2009,**87**.
9. Quan VM, Go VF, Nam le V, Bergenstrom A, Thuoc NP, Zenilman J, *et al.* Risks for HIV, HBV, and HCV infections among male injection drug users in northern Vietnam: a case-control study. *AIDS Care* 2009,**21**:7-16.
10. Zhang L, Celentano DD, Le Minh N, Latkin CA, Mehta SH, Frangakis C, *et al.* Prevalence and correlates of HCV monoinfection and HIV and HCV coinfection among persons who inject drugs in Vietnam. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015,**27**:550-556.
11. Vietnam AIDS response progress report 2014. National committee for AIDS, drugs and prostitution prevention and control. Hanoi.
12. Ford N, Singh K, Cooke GS, Mills EJ, von Schoen-Angerer T, Kamarulzaman A, *et al.* Expanding access to treatment for hepatitis C in resource-limited settings: lessons from HIV/AIDS. *Clin Infect Dis* 2012,**54**:1465-1472.
13. Lemoine M, Thursz M. Hepatitis C, a global issue: access to care and new therapeutic and preventive approaches in resource-constrained areas. *Semin Liver Dis* 2014,**34**:89-97.
14. Jayasekera CR, Barry M, Roberts LR, Nguyen MH. Treating hepatitis C in lower-income countries. *N Engl J Med* 2014,**370**:1869-1871.
15. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, *et al.* Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003,**29**:1705-1713.
16. Boursier J, Zarski JP, de Ledinghen V, Rousselet MC, Sturm N, Lebaill B, *et al.* Determination of reliability criteria for liver stiffness evaluation by transient elastography. *Hepatology* 2013,**57**:1182-1191.
17. Arena U, Lupsor Platon M, Stasi C, Moscarella S, Assarat A, Bedogni G, *et al.* Liver stiffness is influenced by a standardized meal in patients with chronic hepatitis C virus at different stages of fibrotic evolution. *Hepatology* 2013,**58**:65-72.
18. Lemoine M, Shimakawa Y, Njie R, Njai HF, Nayagam S, Khalil M, *et al.* Food intake increases liver stiffness measurements and hampers reliable values in patients with chronic hepatitis B and healthy controls: the PROLIFICA experience in The Gambia. *Aliment Pharmacol Ther* 2014,**39**:188-196.
19. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, *et al.* Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005,**128**:343-350.
20. European Association for the Study of the Liver. Electronic address eee, Asociacion Latinoamericana para el Estudio del H. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol* 2015.

21. Huy BV, Vernavong K, Kinh NV. HBV and HCV Coinfection among HIV/AIDS Patients in the National Hospital of Tropical Diseases, Vietnam. *AIDS Res Treat* 2014,**2014**:581021.
22. Ye S, Pang L, Wang X, Liu Z. Epidemiological implications of HIV-hepatitis C co-infection in South and Southeast Asia. *Curr HIV/AIDS Rep* 2014,**11**:128-133.
23. Avihingsanon A, Jitmitraparp S, Tangkijvanich P, Ramautarsing RA, Apornpong T, Jirajariyavej S, *et al.* Advanced liver fibrosis by transient elastography, fibrosis 4, and alanine aminotransferase/platelet ratio index among Asian hepatitis C with and without human immunodeficiency virus infection: role of vitamin D levels. *J Gastroenterol Hepatol* 2014,**29**:1706-1714.
24. Carton JA, Collazos J, de la Fuente B, Garcia-Alcalde ML, Suarez-Zarracina T, Rodriguez-Guardado A, *et al.* Factors associated with liver fibrosis in intravenous drug users coinfecting with HIV and HCV. *Antivir Ther* 2011,**16**:27-35.
25. Kirk GD, Astemborski J, Mehta SH, Spoler C, Fisher C, Allen D, *et al.* Assessment of liver fibrosis by transient elastography in persons with hepatitis C virus infection or HIV-hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis* 2009,**48**:963-972.
26. Macias J, Recio E, Vispo E, Rivero A, Lopez-Cortes LF, Rios MJ, *et al.* Application of transient elastometry to differentiate mild from moderate to severe liver fibrosis in HIV/HCV co-infected patients. *J Hepatol* 2008,**49**:916-922.
27. Cacoub P, Carrat F, Bedossa P, Lambert J, Penaranda G, Perronne C, *et al.* Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers in HIV/HCV co-infected patients: the fibrovic study--ANRS HC02. *J Hepatol* 2008,**48**:765-773.
28. Ahmed T, Long TN, Huong PT, Stewart DE. Drug injecting and HIV risk among injecting drug users in Hai Phong, Vietnam: a qualitative analysis. *BMC Public Health* 2015,**15**:32.
29. Solomon SS, Mehta SH, Srikrishnan AK, Solomon S, McFall AM, Laeyendecker O, *et al.* Burden of hepatitis C virus disease and access to hepatitis C virus services in people who inject drugs in India: a cross-sectional study. *Lancet Infect Dis* 2015,**15**:36-45.
30. Pham DA, Leuangwutiwong P, Jittmittraphap A, Luplertlop N, Bach HK, Akkarathamrongsin S, *et al.* High prevalence of Hepatitis C virus genotype 6 in Vietnam. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2009,**27**:153-160.
31. Tanimoto T, Nguyen HC, Ishizaki A, Chung PT, Hoang TT, Nguyen VT, *et al.* Multiple routes of hepatitis C virus transmission among injection drug users in Hai Phong, Northern Vietnam. *J Med Virol* 2010,**82**:1355-1363.
32. Tsochatzis EA, Gurusamy KS, Ntaoula S, Cholongitas E, Davidson BR, Burroughs AK. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: a meta-analysis of diagnostic accuracy. *J Hepatol* 2011,**54**:650-659.
33. de Ledinghen V, Douvin C, Kettaneh A, Zioli M, Roulot D, Marcellin P, *et al.* Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006,**41**:175-179.
34. European Association for Study of L. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014,**60**:392-420.
35. Obach D, Yazdanpanah Y, Esmat G, Avihingsanon A, Dewedar S, Durier N, *et al.* How to optimize HCV treatment impact on life years saved in resource-constrained countries. *Hepatology* 2015.

36. Bruggmann P, Falcato L, Dober S, Helbling B, Keiser O, Negro F, *et al.* Active intravenous drug use during chronic hepatitis C therapy does not reduce sustained virological response rates in adherent patients. *J Viral Hepat* 2008,**15**:747-752.
37. Schulte B, Schutt S, Brack J, Isernhagen K, Deibler P, Dilg C, *et al.* Successful treatment of chronic hepatitis C virus infection in severely opioid-dependent patients under heroin maintenance. *Drug Alcohol Depend* 2010,**109**:248-251.
38. Martin NK, Foster GR, Vilar J, Ryder S, Cramp ME, Gordon F, *et al.* HCV treatment rates and sustained viral response among people who inject drugs in seven UK sites: real world results and modelling of treatment impact. *J Viral Hepat* 2015,**22**:399-408.
39. Hellard ME, Jenkinson R, Higgs P, Stoope MA, Sacks-Davis R, Gold J, *et al.* Modelling antiviral treatment to prevent hepatitis C infection among people who inject drugs in Victoria, Australia. *Med J Aust* 2012,**196**:638-641.
40. Huu Bich T, Thi Quynh Nga P, Ngoc Quang L, Van Minh H, Ng N, Juvekar S, *et al.* Patterns of alcohol consumption in diverse rural populations in the Asian region. *Glob Health Action* 2009,**2**.
41. World Health Organization, Global Hepatitis Programme, Global partners. http://www.who.int/hiv/mediacentre/news/hep_calltoaction_new.pdf

Travail 2 :

Marqueurs immunologiques de clairance du VHC chez les patients co-infectés avec le VIH traité par pegIFN α + Ribavirine

Manuscrit accepté

Le traitement contre le VHC basé sur la bithérapie pegIFN α et ribavirine, est un traitement antiviral et immuno-modulateur dont le mode d'action n'est que partiellement compris. Ce traitement induit des changements de la sécrétion des cytokines par les lymphocytes T et les macrophages. Dans cette étude nous avons exploré la réponse immune induite par la bithérapie pegIFN α -ribavirine chez les patients co-infectés par le VHC et le VIH.

Nous avons étudié la concentration circulante de 25 cytokines et l'activation des cellules T CD8 chez 30 patients co-infectés par VIH / VHC suivis en consultation dans le service des Maladies Infectieuses et Tropicales du CHRU de Montpellier. Les résultats ont été comparés entre les patients classés « RVS » (réponse virologique soutenue) (RVS, n = 19) et les non-répondeurs (NR, n = 11).

L'étude a montré que la concentration pré-thérapeutique d'IP-10 (CXCL10) et de MCP-1 (CCL-2) était associée à une mauvaise réponse anti-VHC. L'initiation du traitement par pegIFN α -ribavirine augmente l'activation des lymphocytes T CD8 + et induit des changements significatifs sur des cytokines liées à la fois à la réponse Th1 et Th2. Chez les patients du groupe RVS, les taux circulants de 11 cytokines étaient augmentés suite à la prise de la bithérapie (IL1beta, IL1RA, IL4, IL5, IL6, IL7, IL12p40.70, IL13, IP10, eotaxine, MCP-1), contre seulement six cytokines chez les patients du groupe NR (IL1beta, IL-2, IL-5, IL12p40.70, IL13, eotaxine). Une augmentation plus importante de la concentration de MCP-1 et MIP-1 β a été observée quatre semaines après l'initiation du traitement anti-VHC, dans le groupe RVS en comparaison du groupe NR (p = 0,002 et p = 0,03, respectivement), alors qu'une diminution de la concentration d'IL-8 était associée avec l'échec du traitement (p = 0,052). Le changement de l'expression de CD38 sur les cellules T CD8 n'était pas associé au succès thérapeutique. Cette étude d'immunomonitoring au cours d'une bithérapie comprenant de l'interféron alpha objective les changements importants du climat cytokinique plasmatique et de l'activation des cellules T. Les profils des sujets répondeurs et non-répondeurs sont différents. Dès lors que l'utilisation de l'interféron demeure une option thérapeutique il demeure nécessaire de mieux définir la signature immune prédisant une réponse efficace.



Original Article (Advance Online Publication not corrected by the authors)

Cytokine response associated with Hepatitis C virus clearance in HIV coinfecting patients initiating peg interferon- α based therapy

Truong Tam Nguyen^{1,2}, Reihani Niloofar¹, Pierre-Alain Rubbo¹, Kuster Nils¹, Karine Bollore¹, Jacques Ducos⁵, Georges-Philippe Pageaux^{1,3}, Jacques Reynes^{1,4}, Philippe Van de Perre^{1,5} and Edouard Tuaillon^{1,5}

¹ Université Montpellier 1, INSERM U 1058, , 34394 Montpellier, France.

² Pham Ngoc Thach University of Medicine, Thanh Thai, Ho Chi Minh City, Vietnam.

³ CHU Montpellier, Département d'Hépatogastro-entérologie, 34295 Montpellier, France.

⁴ CHU Montpellier, Département des Maladies Infectieuses et Tropicales, 34295, France.

⁵ CHU Montpellier, Département de Bactériologie - Virologie, 34295 Montpellier, France.

Abstract. Background: Treatment of hepatitis C virus (HCV) infection based on peginterferon- α (pegIFN α) and ribavirin induces important changes in cytokine release and T cell activation.

Objective: Immune response to pegIFN α -ribavirin therapy was explored in patients coinfecting by HCV and HIV.

Methods: Concentrations of 25 cytokines and CD8⁺ T cell activation were monitored in HCV/HIV coinfecting patients classified as sustained virological responders (SVR, n=19) and non-responders (NR, n=11).

Results: High pretreatment concentrations of IP-10 (CXCL-10) and MCP-1 (CCL-2) were associated with a poor anti-HCV response. PegIFN α -ribavirin therapy increased CD8⁺ T cell activation and induced significant changes in levels of eleven cytokines related to both Th1 and Th2 responses in SVR (IL-1 β , IL-1RA, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12p40/70, IL-13, IP-10, eotaxin, MCP-1) but of only six cytokines in NR (IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-12p40/70, IL-13, eotaxin). The highest rise in MIP-1 β and MCP-1 levels was observed four weeks after anti-HCV treatment initiation in SVR compared to NR (p=0.002 and p=0.03, respectively), whereas a decrease in IL-8 concentration was associated with treatment failure (p= 0.052).

Conclusions: Higher and broader cytokine responses to pegIFN α -ribavirin therapy were observed in SVR patients compared to NR. Changes in IL-8, MIP-1 β , and MCP-1 serum concentrations may be associated with efficacy of pegIFN α - and ribavirin-based therapies in patients coinfecting by HCV and HIV.

Citation: Tam Nguyen T., Niloofar R., Rubbo P.A., Nils K., Bollore K., Ducos J., Pageaux G.P., Reynes J., Van de Perre P., Tuaillon E. Cytokine response associated with Hepatitis C virus clearance in HIV coinfecting patients initiating peg interferon- α based therapy. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2016, 8(1): e2016003, DOI: <http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2016.003>

Published: January 1, 2016

Received: May 19, 2015

Accepted: November 9, 2015

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Correspondence to: Edouard Tuaillon, MD, PhD. Département de Bactériologie - Virologie/INSERM U1058, CHRU de Montpellier, France. Tel: +33 (0) 467 338 469 (340), Fax: +33 (0) 467 338 334. E-mail: e-tuaillon@chu-montpellier.fr

Introduction. Infection by hepatitis C virus (HCV) and HIV shared common routes of transmission and thus coinfections with the two viruses are frequent. HCV infection is seen in 15–30% of HIV-infected patients in Western Europe, with almost 20 000 HIV-infected individuals chronically infected with HCV in France.^{1,2} Since the introduction of antiretroviral

therapy (ART), HCV-related liver diseases have become leading causes of morbidity and mortality in HIV-infected individuals.^{3,4}

Faster progression to cirrhosis has been observed in patients coinfecting with HCV and HIV by comparison with subjects infected with HCV alone.⁵ HIV/HCV coinfection is also associated with higher HCV viral



levels in serum.⁶ Finally, ART-related adverse events are more frequent in HCV/HIV coinfecting individuals, with increased difficulties in optimally treating HIV infection.^{7,8}

Until recently, a combination of pegIFN and ribavirin has been the standard-of-care for treatment of chronic HCV patients. In coinfecting individuals pegIFN-ribavirin therapy is less efficacious than in single HCV infection.^{9,10} Approximately 30% of patients receiving a combination of ribavirin with pegIFN have a sustained virological response when infected with HCV genotype 1 and 4.⁹ This rate increases to 60% when genotype 2 and 3 are involved.¹⁰ Most of the current anti-HCV therapeutic options remained based on pegIFN and/or ribavirin in addition to protease inhibitors or NS5A or NS5B inhibitors.¹¹

PegIFN constitutes an active immunotherapy triggering innate immune response and T cell activation. The cytokine response to pegIFN- α -based regimens plays probably an important role in treatment outcome. IFN α stimulates Th1 cells and limits secretion of Th2 related cytokines such as IL-4 or IL-10.¹² IFN α signals through Janus kinase signal transducer, an activator of transcription pathway, and induction of IFN-stimulated genes.¹³ Ribavirin synergies this effect by reducing IL-10 production, enhancing autocrine IFN- β and IL-8 secretion.¹⁴⁻¹⁶ Several immune factors are predictive of virological response on pegIFN- α -ribavirin-based therapy: pretreatment concentration of IFN α -inducible protein 10 (IP-10, also called CXCL-10), polymorphisms near the interleukin-28B gene coding for the IFN α -3, and CD4⁺ T cell count in HIV/HCV coinfecting individuals.^{18,19} Progressive impairment of immune functions and T cell exhaustion induced by prolonged exposure to virus antigens are fundamental features of HIV infection. Inhibitory networks, such as the programmed cell death protein-1 (PD-1) and IL-10 play a key role in this process.^{20,21} PD-1 is upregulated on CD8⁺ and CD4⁺ T cells and mediates a dysfunction partially reversible on ART.²²⁻²⁴ PD-1 signalling impacts the expression of both Th1 and Th2 cytokines but limits particularly the capacity of Th1 and IFN γ secretion by CD4⁺ and CD8⁺ T cells.²¹

Although HCV clearance depends on immune response induced by pegIFN- α -ribavirin therapy, the dynamics of cytokine response and T cell activation in individuals coinfecting with HIV and HCV remain poorly characterized.²⁵ In this study, we monitor serum concentration of 25 cytokines alongside with the level of CD8⁺ T cell activation in HIV/HCV coinfecting patients initiating anti-HCV therapy.

Methods.

Patient samples: Patients coinfecting by HIV/HCV followed at Montpellier University Hospital and initiating anti-HCV therapy were included consecutively between January 2007 and January 2010 after providing written informed consent. The study was approved by the local institution ethical committee (DC-2011-1405). Chronic hepatitis was proved by the presence of serum HCV antibodies and detectable viral RNA. HCV genotype, HCV and HIV-1 viral loads, CD4⁺ T cell count, and liver enzyme levels were all determined using standard procedures. All patients received pegIFN α 2a 180 microg/week plus ribavirin 800 to 1,200 mg daily; patients infected with HCV genotype 2 and 3 received 800 mg daily and genotype 1 and 4 received a weight based dose: 1,000 mg/day for persons less than 75 kg and 1200 mg/day over 75 kg.

Subjects were ranged into two distinct groups based on HCV response to therapy:

- i) Sustained virological responders (SVR) when serum HCV RNA was undetectable 24 weeks after completing therapy, and
- ii) non responders (NR) when HCV RNA decrease was < 2 log copies/mL at week 12 or when HCV RNA was detectable at the end of treatment.
- iii) Patient relapsing in the 24 weeks period after therapeutic cessation were excluded from the study.

Routine laboratory testing: Serum HCV RNA was quantified using COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV assay (Roche Diagnostic Systems). HCV genotypes were determined using INNO-LiPA HCV II test (Innogenetics). Alanine aminotransferase (ALT) dosages were executed using standard methods.

Quantitation of serum cytokine concentrations: Cytokines were quantified in serum samples obtained before initiation of treatment, and four weeks after the start of PegIFN- α -based therapy. A multiplexed microbead assay was used according to manufacturer's instructions (cytokine twenty-five-plex kit, Life Technologies Ltd, Paisley, UK) and an FIDISTM apparatus (BMD). Twenty five cytokines were quantified in duplicate: IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40/70, IL-13, IL-15, IL-17, eotaxin, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, and TNF- α . Data were analyzed using the MLX-Booster program (BMD). Mean concentrations (pg/ml) of cytokines were all superior to the detection limits, defined as the mean background value plus 2 SD.

Analysis of CD8⁺/CD38^{bright} T cells: Activation of CD8⁺ T cells was assessed by flow cytometry analysis on EDTA-treated fresh whole blood using FC 500 apparatus (Beckman Coulter, Miami, Florida). T cell activation was explored at day 0, week 4 and week 12 after initiation of pegIFN- α -ribavirin therapy. The

expression of CD38^{bright} on CD8⁺ T cells was analyzed as previously described using a two-colour staining with anti-CD8 and anti-CD38 conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) and phycoerythrin (PE), respectively (Beckman Coulter).²⁶ The positive threshold for CD38^{bright} analysis was established using the CellQuant CD38/CD8 kit for quantitation of CD38 cell surface expression (BioCytex, Marseille, France) and was defined as 8,500 CD38 binding sites/cells. The CD8⁺/CD38^{bright} values were expressed as the percentage of CD38^{bright} cells from the CD8⁺ T cell populations.

Statistical Analysis: The Mann–Whitney U test and Kruskal–Wallis test were used to analyze continuous variables where appropriate. The Friedman test was used to evaluate changes in serum cytokine levels over time. A mixed model was used to analyze the association between T cell activation during anti-HCV therapy and therapeutic response. Statistical analyses were done using SPSS software version 18.0J.

Results.

Clinical characteristics at baseline: Thirty HCV/HIV coinfecting patients receiving pegIFN α -ribavirin therapy were included in the study. Nineteen (63%) were classified as SVR and eleven (37%) as NR. Patient characteristics are shown in **Table 1**.

Pretreatment levels of soluble and cellular inflammatory markers: IP-10 levels were higher in the NR group than in the SVR group, $P = 0.021$ (**Table 2**). Individuals from the NR group also had higher pretreatment concentrations of MCP-1, $P = 0.0009$. A trend for a higher serum concentration of IL-8 was also observed in patients of the NR group compared to the SVR group, $P = 0.106$.

Cytokines change after therapeutic initiation of HCV treatment: Initiation of anti-HCV treatment elicited IFN α rise in both SVR and NR patients (**Figure 1 and Supplemental Table 1**). This enhancement of IFN α in

serum was similar in the two groups. Besides IFN α , the anti-HCV therapy induced a significant increase in the serum levels of eleven cytokines in SVR patients, including cytokines related to Th1-dominant immune responses (IL-12p40/70, IP-10), Th2-type cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13), and pro-inflammatory

Table 2. Pre-treatment Cytokine concentrations in serum from SVR and NR patients

Cytokines	SVR pg/ml mean [CV]	NR pg/ml mean [CV]	p-value (Wilcoxon)
IL-1 β	12.9 [34.2]	10.84 [4.9]	0.093
IL-1RA	1556.0 [198.0]	1506.0 [123.0]	0.779
IL-2	6.2 [2.4]	5.8 [2.6]	0.425
IL-2R	837.0 [812.2]	884.1 [155]	0.101
IL-4	8.0 [177.9]	8.0 [173.5]	0.338
IL-5	2.3 [0.5]	2.3 [0]	0.616
IL-6	4.6 [2.2]	5.0 [23.0]	0.353
IL-7	18.9 [2.3]	20.8 [4.3]	0.142
IL-8	22.5 [73.8]	128.1 [707.7]	0.106
IL-10	3.6 [1.1]	3.1 [2.0]	0.777
IL-12p40/70	321.5 [55.8]	318.3 [56.5]	0.948
IL-13	11.0 [4.1]	11.0 [2.7]	0.702
IL-15	33.2 [9.4]	33.2 [3.1]	0.863
IL-17	24.8 [9.3]	24.0 [8]	0.73
TNF α	8.8 [2.6]	8.8 [1.1]	0.762
IFN γ	5.2 [1.3]	6.1 [0.8]	0.621
GM.CSF	18.4 [9.2]	15.3 [13.8]	0.482
MIP-1 α	119.4 [1.8]	120.6 [6.8]	0.262
MIP-1 β	150.4 [24.3]	150.4 [23.6]	0.88
IP-10	64.3 [32.9]	132.0 [58.8]	0.021
MIG	458.6 [5.9]	458.6 [4.0]	0.497
Eotaxin	75.5 [30.7]	72.9 [29.4]	0.813
RANTES	10540.0 [6413.0]	9350.0 [10922.0]	0.683
MCP-1	347.9 [91.2]	442.6 [145.7]	0.009
IFN α	143.0 [21.3]	143.0 [1.4]	0.477

Table 1. Patient characteristics

	All (n=30)	SVR (n=19)	NR (n=11)*
Age	45	44	47
CD4 ⁺ T cells (μ l)	350 (50-1076)	378(128-1076)	328 (50-715)
Nadir CD4 T cells (μ l)	122.5 (32-598)	124 (33-598)	119.5 (32-324)
ALAT (IU/L)	48.5 (13-172)	40.5 (13-172)	56.5 (24-133)
VL HCV S0 (Log ₁₀ IU/ml)	5.96 (5.43-6.68)	5.49 (4.12-5.81)	6.68 (5.98-6.84)
VL HIV S0 (IU/l)	0 (0-290)	0 (0-290)	0 (0-118)
HCV Genotypes 1 / 2 / 3 / 4	21 / 2 / 7 / 1	10 / 1 / 8 / 0	10 / 0 / 0 / 1
Liver fibrosis (F \geq 2)	22	13	9

*Seven subjects had a reduction of less than 2 log₁₀ in HCV RNA after 12 weeks of therapy (null responders) and four subjects had a reduction of more than 2 log₁₀ (partial responders).

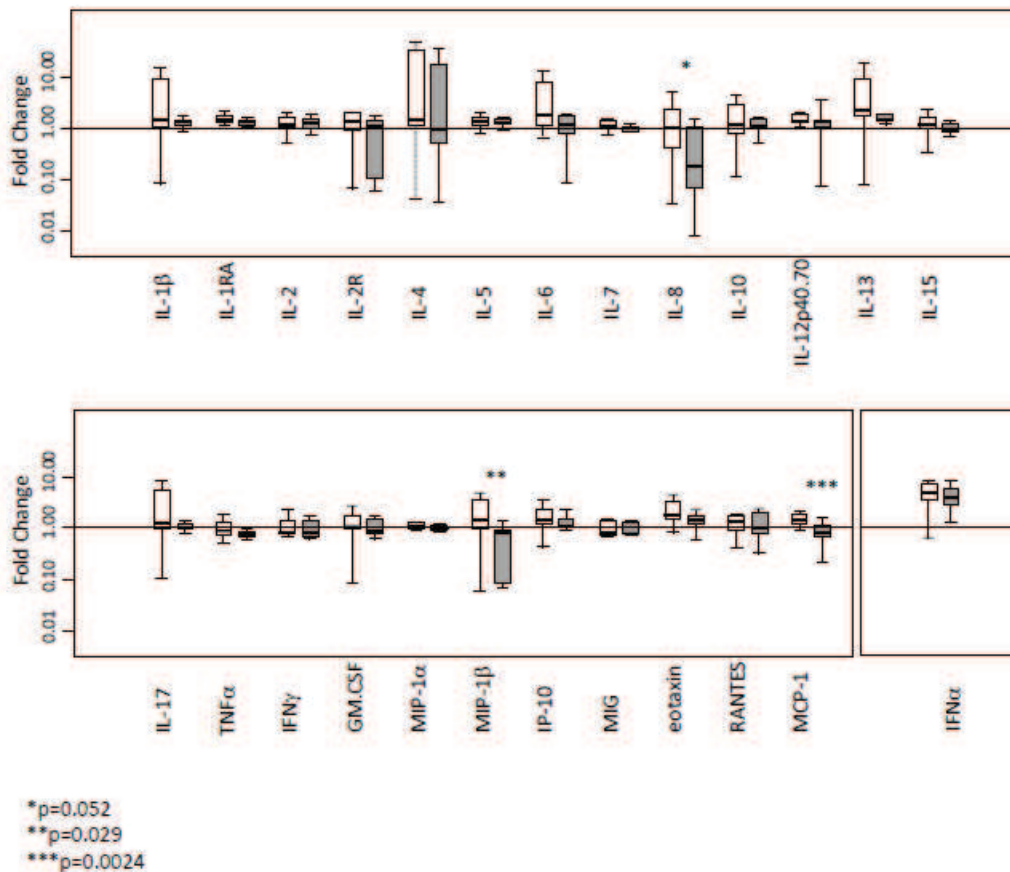


Figure 1. Impact of anti-HCV therapy on cytokine concentrations in serum of NR and SVR. Fold-changes in cytokine levels following pegIFN α -ribavirin therapy initiation in SVR (white bars) and NR (gray bars). Results are expressed as fold changes in cytokine concentrations between week 0 (pretreatment) and week 4 (four weeks of pegIFN α -ribavirin therapy). *p=0.052, **p=0.029, ***p=0.0024.

cytokines (IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-7). By comparison, levels of only six cytokines rose in the NR group (**Supplemental Table 1**). Finally, when results were analyzed without consideration of the HCV therapeutic response (combining SVR and NR patients), we also

observed an increase of IL-2, IL-10, and RANTES concentrations four weeks after initiation of anti-HCV treatment (**Additional file 1**).

Comparison of the cytokine level changes induced by pegIFN α -ribavirin between SVR and NR group: Changes in cytokines were compared among SVR and NR using the ratio between baseline and four weeks of treatment (**Figure 1**). A sharp increase of MCP-1 and MIP-1 β concentration was observed after initiation of anti-HCV therapy in the SVR group whereas the value decreased or remained stable in the NR group (p=0.0024 and p=0.029, respectively). Furthermore, the IL-8 concentration remains stable after a one-month period of pegIFN α -ribavirin therapy in most of the patients responding to anti-HCV treatment, whereas this concentration declined in NR patients (p=0.052).

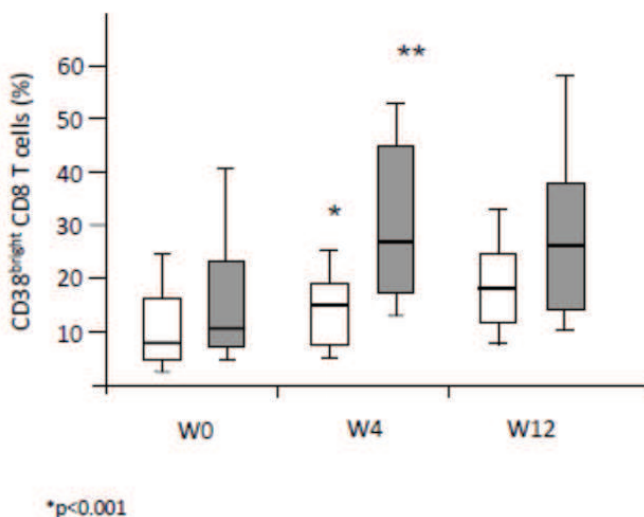


Figure 2. Changes in T cell activation over a 3-month period of pegIFN α -ribavirin therapy. Fold-changes in CD38^{bright} expression on CD8 T cells following pegIFN α -ribavirin therapy initiation in SVR (white bars) and NR (gray bars). Significant increase of CD38^{bright} expression between two consecutive time periods is indicated: *p<0.001.

Changes in T cell activation over the three-months period of therapy initiation: The impact of pegIFN α -ribavirin on T cell activation was explored at day 0, week 4 and week 12 (**Figure 2**). CD8⁺ T cell activation before the treatment tends to be higher in NR patients compared to the SVR patients, (p=0.066, **Figure 2**). Anti-HCV therapy induced a major increase in

CD38^{bright} expression on CD8⁺ T⁺ cells in the two groups of patients ($p < 0.001$). No significant differences were observed between the two groups in the slope of CD38 cell surface expression of CD8⁺ T cells suggesting that the over time changes of this activation marker not be associated with a better immune response to therapy.

Discussion. Although the virological response to pegIFN α /ribavirin-based therapy is intimately associated with the host immunity, the monitoring of HCV treatment is based on the serum HCV RNA level decay regardless of the immune response. In this study, CD8⁺ T cell activation and levels of 25 cytokines were analyzed in HIV/HCV coinfecting patients with favourable versus unfavourable therapeutic outcome.

PegIFN α /ribavirin administration induced a dramatic change in serum cytokine concentrations and CD8⁺ T-cell activation level. We observed that the HCV clearance under pegIFN α /ribavirin therapy was associated with broader and higher cytokine responses in SVR than in NR.

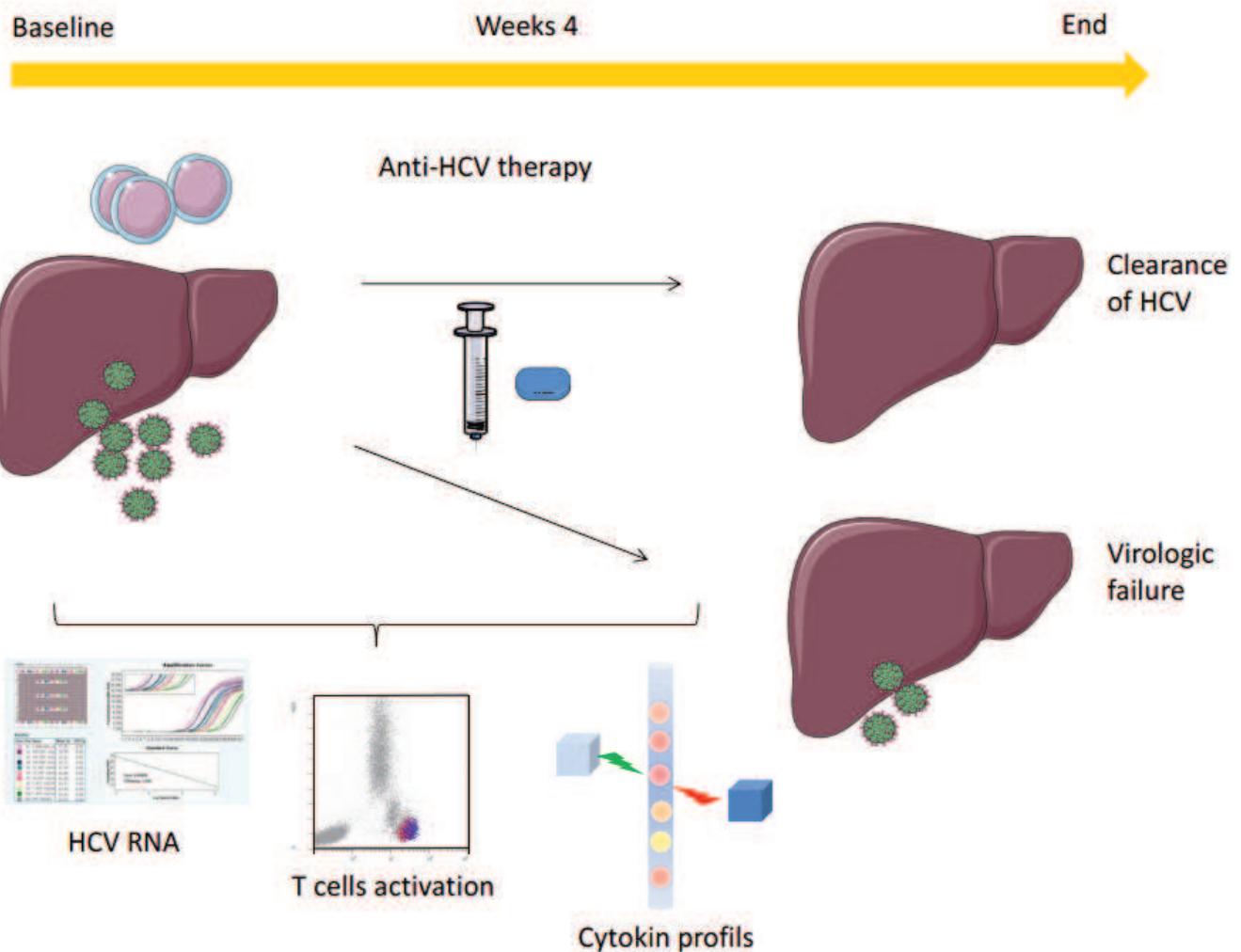
Multianalyte assays make possible to analyze a wide an array of cytokines using a small sample volume rapidly. In the present study, the level of 25 cytokines and CD8⁺ T-cell activation were analyzed at baseline and week four after the initiation of pegIFN α /ribavirin therapy. Comparison between different multiplex bead assays has shown variable agreement among kits evidencing that absolute cytokine concentrations differ across commercial assays.^{27,28} As a consequence, multisite comparisons between cytokine concentrations obtained with different methods are difficult to interpret because of the lack of standardization. However, these methods are useful for longitudinal studies, and a similar rank order of cytokine concentrations between samples is preserved between the different commercial kits. Hence, we considered comparisons based on fold change under pegIFN α -ribavirin therapy as a valuable method for identifying a predictor of therapeutic success or failure. Even if interferon-free regimen progressively substitute pegIFN α -containing regimen for treatment of hepatitis C it remains of particular importance to describe immune response after initiation of pegIFN α . Indeed, IFN α remains the only drug approved for treatment of chronic hepatitis D and the only treatment used for a limited period for hepatitis B.

Baseline serum concentration of IP-10 and MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) were higher in NR than in SVR. A significant increase was observed after treatment initiation in 15 out of 25 soluble biomarkers tested. The strongest increased was observed for IFN α as an expectable consequence of the anti-HCV therapy,

with more than 4-fold rise between week 0 and week 4. Increase in cytokine concentrations after pegIFN α -ribavirin administration was observed for pro-inflammatory- and Th1-related cytokines such as IL-12 or IP-10, but also for Th2-related cytokines such as IL-4 or IL-13. Activation of T cells accompanied this phenomenon as shown by the increased cell surface expression of CD38 on CD8⁺ T cells.

Based on therapeutic outcome distinct cytokine patterns were identified. Differences in cytokine concentrations were observed at baseline and following anti-HCV initiation. In agreement with previous studies in individuals coinfecting we observed the pretreatment serum level of IP-10 was higher in the NR group than in the SVR group.¹⁹ Circulating IP-10 concentration is well correlated with intrahepatic IP-10 messenger RNA expression during chronic HCV infection.²⁹ The high baseline hepatic IFN-stimulated genes expression is associated with a lower chance to be SVR to IFN-based therapy when HIV-uninfected.³⁰⁻³³ Interestingly, the pre-treatment MCP-1 concentration was also found at a higher concentration in the NR group. This pro-inflammatory chemokine is involved in the migration and infiltration of monocytes and CD4⁺ memory T lymphocytes. Intra-hepatic and serum MCP-1 levels are associated with liver inflammation and fibrosis during chronic HCV infection.^{34,35} MCP-1 plays a significant role in the recruitment of monocytes by interacting with their cell-surface adhesion-molecules that are over expressed during chronic HCV infection.³⁶ Association between MCP-1 baseline level and response to pegIFN α -ribavirin therapy has been recently reported in HIV-uninfected patients.³⁷ Both chronic HCV and HIV infections induce expression and release of MCP-1 in humans.^{38,39} HIV proteins like gp120⁴⁰ and transactivator protein Tat^{41,42} have shown strong immunomodulatory capacity through MCP-1 stimulation. MCP-1 has also been shown to promote Th2 responses by polarizing Th0 cells towards a Th2 phenotype⁴³ and is thought to be one of the key factors involved in HIV pathogenesis.⁴⁴ Hence, MCP-1 pretreatment level may be associated with the promotion of the Th1 dominant response and HCV clearance under pegIFN α -ribavirin therapy in HIV/HCV coinfecting patients.

Cytokine response to pegIFN α /ribavirin therapy differed qualitatively between SVR and NR. The cytokine response appeared more restricted in NR than in SVR since only 6 versus 11 cytokines rise significantly following the commencement of anti-HCV therapy. As a possible consequence of high IP-10 and MCP-1 baseline level, the boost of circulating IP-10 and MCP-1 levels was not observed in the NR after four weeks of pegIFN α -ribavirin treatment. Circulating IP-10 is considered as a marker of the pre-therapeutic activation level of IFN-stimulated genes. The defect in IP-10 response observed four weeks after starting



pegIFN α -ribavirin treatment can be viewed as a marker of the overexpression of IFN-stimulated genes leading to a poor capacity response to exogenous IFN injections.

Four weeks after initiation of pegIFN α -ribavirin, a higher MIP-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β) and MCP-1 secretions were observed in SVR when compared to NR. Of interest, a trend for a paradoxical decrease of MIP-1 β was also observed at the same time in the NR group. The concentration of MIP-1 β was halved in the NR group at week four compared to baseline whereas MCP-1 β level tends to increase in the SVR group. This observation is consistent with a previous study showing that HCV clearance is more frequent in patients experiencing strong MIP-1 α and MIP-1 β response to pegIFN α -based therapy.^{45,46} MIP-1 β (also named CCL4) is a chemokine linked to the Th1 response. MIP-1 β is involved in T cell recruitment mediated by CCR5 and CCR1 in the liver of HCV infected patients.³⁸ The amplitude of MCP-1 variation in response to pegIFN α /RBV is probably dependent on baseline MCP-1 level as for IP-10. IL-8 dynamic response to pegIFN α -ribavirin therapy also appears different in the two groups. IL-8 serum levels tend to be elevated at baseline in NR and to diminish following

pegIFN α -ribavirin initiation. High IL-8 mRNA is involved in liver inflammation⁴⁷⁻⁴⁹ and inhibition of the IFN α antiviral response *in vitro*.⁵⁰ Pretreatment level of IL-8 has also been found associated with poor virological response to pegIFN α -ribavirin therapy.⁵¹ Evolution of IL-8 concentration may reflect the combined effect of pegIFN plus ribavirin since ribavirin induces its secretion through the activation of activator protein 1.¹⁴

In this study, relapse patients were not included in the group of patients that did not recover from HCV under pegIFN α -ribavirin. Subjects who experience relapse had patterns of virological response different from NR with a rapid decline in HCV RNA during the first week of treatment.^{52,53} Hence, relapse patients should be explored a part from NR and SNR groups.

Our study had limitations related to its retrospective nature and the small number of subjects included. HCV genotypes and fibrosis stage were not taken into account in the analysis and IL-28 polymorphism, which is also known to predict the hepatic responsiveness to IFN-based therapy, was not assessed. The study was not designed to establish clinical performances of immunological markers useful for HCV therapeutic prediction and/or monitoring but showed that different ongoing trends of cytokine

response to pegIFN α /ribavirin can be observed in SVR and NR patients infected with HIV.

Conclusions. HIV/HCV coinfecting patients, showing a high IP-10 and MCP-1 baseline level alongside with a reduced capacity to produce or to maintain broader secretion of cytokines, including MIP-1 β , IL-4, IL-6 or IL-8, may have a poor response to regimens based on Peg-IFN and ribavirin. Anti-HCV treatment based on

drugs having immunomodulating activities may benefit from immunomonitoring using multiplex techniques.

Acknowledgements. This work has been supported by grants from Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS), UMR Inserm U1058, and the Ministère Français de la Coopération for Ph.D. grants of Tam Truong Nguyen.

References:

1. Loko MA, Salmon D, Carrieri P, et al. The French national prospective cohort of patients co-infected with HIV and HCV (ANRS CO13 HEPAVIH): early findings, 2006-2010. *BMC Infect Dis* 2010; 10:303. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-303> PMID:20969743 PMCid:PMC2988047
2. Larsen C, Chaix ML, Le Strat Y, et al. Gaining greater insight into HCV emergence in HIV-infected men who have sex with men: the HEPAIG Study. *PLoS One* 2011; 6:e29322. Davies A, Singh KP, Shubber Z, et al. Treatment outcomes of treatment-naïve Hepatitis C patients co-infected with HIV: a systematic review and meta-analysis of observational cohorts. *PLoS One* 2013; 8:e55373. Heim MH. Interferons and hepatitis C virus. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: w13586.
3. Luz PM, Bruyand M, Ribeiro S, et al. AIDS and non-AIDS severe morbidity associated with hospitalizations among HIV-infected patients in two regions with universal access to care and antiretroviral therapy, France and Brazil, 2000-2008: hospital-based cohort studies. *BMC Infect Dis* 2014; 21:278. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-278> PMID:24885790 PMCid:PMC4032588
4. Ingle SM, May MT, Gill MJ, et al. Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Impact of risk factors for specific causes of death in the first and subsequent years of antiretroviral therapy among HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 2014; 59:287-297. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu261> PMID:24771333 PMCid:PMC4073781
5. Thein HH1, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Natural history of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals and the impact of HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. *AIDS* 2008; 22:1979-1991. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e32830e6d51> PMID:18784461
6. Danta M, Semmo N, Fabris P, et al. Impact of HIV on host-virus interactions during early hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2008; 197:1558-1566. <http://dx.doi.org/10.1086/587843> PMID:18419344
7. Loko MA, Bani-Sadr F, Wincock M, et al. Impact of HAART exposure and associated lipodystrophy on advanced liver fibrosis in HIV/HCV-coinfecting patients. *J Viral Hepat* 2011; 18:307-314. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01417.x> PMID:21692942
8. D'Arminio Monforte A, Cozzi-Lepri A, Castagna A, et al. Risk of developing specific AIDS-defining illnesses in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus with or without liver cirrhosis. *Clin Infect Dis* 2009; 49:612-622. <http://dx.doi.org/10.1086/603557> PMID:19591597
9. Ford N, Kirby C, Singh K, et al. Chronic hepatitis C treatment outcomes in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Bulletin of the World Health Organization* 2012; 90:540-550. <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.11.097147> PMID:22807600 PMCid:PMC3397704
10. European Association for Study of Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014; 60:392-420. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.003> PMID:24331294
11. Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, et al. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa. *Hepatology* 1996; 24: 6-9. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510240102> PMID:8707283
12. Tokumoto Y, Hiasa Y, Uesugi K, et al. Ribavirin regulates hepatitis C virus replication through enhancing interferon-stimulated genes and interleukin 8. *J Infect Dis* 2012; 205: 1121-1130. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis025> PMID:22357660
13. Rigopoulou EI, Abbott WG, Williams R, Naoumov NV. Direct evidence for immunomodulatory properties of ribavirin on T-cell reactivity to hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2007; 75:36-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.11.008> PMID:17210188
14. Brenndörfer ED, Brass A, Karthe J, et al. Cleavage of the T cell protein tyrosine phosphatase by the hepatitis C virus nonstructural 3/4A protease induces a Th1 to Th2 shift reversible by ribavirin therapy. *J Immunol* 2014; 192: 1671-1680. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1301077> PMID:24442435
15. Falconer K, Askarieh G, Weis N, et al. IP-10 predicts the first phase decline of HCV RNA and overall viral response to therapy in patients co-infected with chronic hepatitis C virus infection and HIV. *Scand J Infect Dis* 2010; 42:896-901. <http://dx.doi.org/10.3109/00365548.2010.498019> PMID:20608766
16. Zeremski M, Markatou M, Brown QB, et al. Interferon gamma-inducible protein 10: a predictive marker of successful treatment response in hepatitis C virus/HIV-coinfecting patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 45:262-268. PMID:17414926
17. Thomson EC, Fleming VM, Main J, et al. Predicting spontaneous clearance of acute hepatitis C virus in a large cohort of HIV-1-infected men. *Gut* 2011; 60: 837-845. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2010.217166> PMID:21139063 PMCid:PMC3095479
18. Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, et al. IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 2009; 114:346-356. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-12-191296> PMID:19365081 PMCid:PMC2714209
19. Porichis F, Hart MG, Zupkosky J, et al. Differential impact of PD-1 and/or interleukin-10 blockade on HIV-1-specific CD4 T cell and antigen-presenting cell functions. *J Virol* 2014; 88:2508-2518. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02034-13> PMID:24352453 PMCid:PMC3958087
20. Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P, Rieger A, et al. Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; 56:118-124. <http://dx.doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181fbab9f> PMID:20980914
21. Spitsin S, Tustin NB, Riedel E, et al. Programmed death 1 receptor changes ex vivo in HIV-infected adults following initiation of highly active antiretroviral therapy. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19: 752-756. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00093-12> PMID:22441393 PMCid:PMC3346323
22. Cockerham LR1, Jain V, Sinclair E, et al. Programmed death-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells in treated and untreated HIV disease. *AIDS* 2014; 28:1749-1758. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0000000000000314> PMID:24871455 PMCid:PMC4206412
23. Rubbo PA, Van de Perre P, Tuaille E. The long way toward understanding host and viral determinants of therapeutic success in HCV infection. *Hepatol Int* 2012; 6:436-440. <http://dx.doi.org/10.1007/s12072-011-9339-y> PMID:26201406
24. Tuaille E, Al Tabaa Y, Baillat V, et al. Close association of CD8+/CD38 bright with HIV-1 replication and complex relationship with CD4+ T-cell count. *Cytometry B Clin Cytom* 2009; 76: 249-260. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.20467> PMID:19072838
25. Djoba Siawaya JF, Roberts T, Babb C, et al. An evaluation of

- commercial fluorescent bead-based luminex cytokine assays. *PLoS ONE* 2008; 3: e2535. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002535> PMID:18596971 PMCid:PMC2432042
26. Dupuy AM, Kuster N, Lizard G, et al. Performance evaluation of human cytokines profiles obtained by various multiplexed-based technologies underlines a need for standardization. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 1385-1393. <http://dx.doi.org/10.1515/ccm-2012-0648> PMID:23314551
 27. Askarieh G, Alsio A, Pugnale P, et al. Systemic and intrahepatic interferon-gamma-inducible protein 10kDa predicts the first-phase decline in hepatitis C virus RNA and overall viral response to therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010; 51:1523-1530. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.23509> PMID:20186843
 28. Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:7034-7039. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0707882105> PMID:18467494 PMCid:PMC2383932
 29. Feld JJ, Nanda S, Huang Y, et al. Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology* 2007; 46: 1548-1563. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21853> PMID:17929300 PMCid:PMC2808168
 30. Dill MT, Duong FH, Vogt JE, et al. Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140: 1021-1031. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.039> PMID:21111740
 31. Chen L, Borozan I, Feld J, et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 2005; 128:1437-1444. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.01.059> PMID:15887125
 32. Micheloud D, Salcedo M, Banares R, et al. Serum levels of fibrosis biomarkers measured early after liver transplantation are associated with severe hepatitis C virus recurrence. *Transpl Infect Dis* 2009; 11:183-188. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3062.2009.00370.x> PMID:19254326
 33. Mühlbauer M, Bosserhoff AK, Hartmann A, et al. A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. *Gastroenterology* 2003; 125: 1085-1093. [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01213-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01213-7)
 34. El-Bassiouni NE, Mahmoud OM, El Ahwani EG, Ibrahim RA, El Bassiouny AE. Monocyte adhesion molecules expression in patients with chronic hepatitis C liver disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013; 5(1): e2013054. <http://dx.doi.org/10.4084/mjihid.2013.054> PMID:24106604 PMCid:PMC3787663
 35. Gu B, Ye B, Mao WL, Ye JL. Monocyte chemotactic protein-1 as possible prognostic markers of the efficacy of antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2014; 61: 55-58. PMID:24895793
 36. Heydtmann M, Adams DH. Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection. *Hepatology* 2009; 49:676-688. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22763> PMID:19177577 PMCid:PMC2919201
 37. Tuyama AC, Hong F, Saiman Y, et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1 expression: implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus-induced liver fibrosis. *Hepatology* 2010; 52:612-22. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.23679> PMID:20683959 PMCid:PMC2917256
 38. Hong F, Bansal MB. HIV gp120(X4) promotes hepatic stellate cell activation, fibrogenesis, and proliferation: a potential mechanism for rapid fibrosis progression in HIV/HCV coinfecting patients. *Hepatology* 2009; 51:676-688.
 39. Weiss JM, Nath A, Major EO, Berman JW. HIV-1 Tat induces monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte transmigration across a model of the human blood-brain barrier and up-regulates CCR5 expression on human monocytes. *J Immunol* 1999; 163:2953-2959. PMID:10453044
 40. Kim BO, Liu Y, Zhou BY, He JJ. Induction of C chemokine XCL1 (lymphotactin/single C motif-1 alpha/activation-induced, T cell-derived and chemokine-related cytokine) expression by HIV-1 Tat protein. *J Immunol* 2004; 172:1888-1895. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1888> PMID:14734774
 41. Gu L, Tseng S, Horner RM, et al. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 2000; 404:407-411. <http://dx.doi.org/10.1038/35006097> PMID:10746730
 42. Ansari AW, Heiken H, Meyer-Olson D, Schmidt RE. CCL2: a potential prognostic marker and target of anti-inflammatory strategy in HIV/AIDS pathogenesis. *Eur J Immunol* 2011; 41:3412-3418. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201141676> PMID:22076814
 43. Zhang Y, Guo D, Zhao Y, et al. The effect of cytokine profiles on the viral response to re-treatment in antiviral-experienced patients with chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral Res* 2011; 92: 247-254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.08.009> PMID:21889543
 44. Florholmen J, Kristiansen MG, Steigen SE, et al. A rapid chemokine response of macrophage inflammatory protein (MIP)-1a, MIP-1b and the regulated on activation, normal T expressed and secreted chemokine is associated with a sustained virological response in the treatment of chronic hepatitis C. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 204-209. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03206.x> PMID:20219081
 45. Shimoda K, Begum NA, Shibuta K, et al. Interleukin-8 and IIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28:108-115. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510280116> PMID:9657103
 46. Mahmood S, Sho M, Yasuhara Y, et al. Clinical significance of intrahepatic interleukin-8 in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2002; 24:413-419. [http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6346\(02\)00136-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6346(02)00136-5)
 47. Asselah T, Bièche I, Laurendeau I, et al. Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 129:2064-2075. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.09.010> PMID:16344072
 48. Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001; 75:6095-6106. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.13.6095-6106.2001> PMID:11390611 PMCid:PMC114325
 49. Akbar H, Idrees M, Butt S, et al. High baseline interleukine-8 level is an independent risk factor for the achievement of sustained virological response in chronic HCV patients. *Infect. Genet Evol* 2011; 11:1301-1305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.021> PMID:21554996
 50. Feng B, Yang RF, Zhang HY, et al. Early predictive efficacy of core antigen on antiviral outcomes in genotype 1 hepatitis C virus infected patients. *Braz J Infect Dis*. 2015;19: 390-398 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.04.007> PMID:26100438
 51. Dieterich DT, Rizzetto M, Manns MP. Management of chronic hepatitis C patients who have relapsed or not responded to pegylated interferon alfa plus ribavirin. *J Viral Hepat*. 2009; 16: 833-843. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01218.x> PMID:19889142

Travail 3:

J Clin Virol. 2015 Jan;62:92-7. doi: 10.1016/j.jcv.2014.11.005. Epub 2014 Nov 13.

Performances of fourth generation HIV antigen/antibody assays on filter paper for detection of early HIV infections. Journal of Clinical Virology, 2014

Les tests diagnostic rapide (TDR) de l'infection par le VIH jouent un rôle important dans la prévention de la transmission car ils permettent un accès au dépistage dans les populations à risques. Cependant ces tests sont presque toujours basés exclusivement sur la détection des anticorps du virus et présentent de ce fait des performances insuffisantes dans les phases précoces de l'infection VIH (primo-infection). La durée de la fenêtre sérologique (absence d'anticorps détectables) varie entre 20 et 30 jours après la contamination. Cette phase peut être réduite de plusieurs jours par les tests qui permettent de détecter l'antigène p24. De nombreuses études ont montré que le sang prélevé et séché sur papier filtre est utile dans le diagnostic et la surveillance du VIH avec d'excellentes performances analytiques. Toutefois, aucune évaluation n'était disponible en phase de primo-infection VIH. Notre travail a donc consisté à évaluer la performance de deux tests immunoluminométriques (ou immunochemiluminescents) de 4ème génération (Elecsys® HIV Combi PT assay, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany et Liaison® XL Murex HIV Ab/Ag test, DiaSorin S.p.A., Saluggia, Italy) sur des échantillons séchés sur papier filtre issus de patients en phase d'infection VIH aiguë en comparaison au test de diagnostic rapide sur sérum.

Sur 39 échantillons en primo-infection, chacun des deux tests de 4ème génération sur papier filtre, a correctement identifié 34 échantillons (soit un pourcentage de 87,2%), tandis que le test rapide n'en a détecté que 24 (soit une proportion de 61,5%) avec une différence statistiquement significative ($p = 0,009$).

Ce travail démontre que les tests de 4ème génération utilisant du sang séché sur papier filtre offrent de bonnes performances dans le diagnostic de la primo-infection par rapport aux tests de diagnostic rapide sur sérum. Cette méthode alternative peut être utilisée pour détecter précocement le VIH en cas de suspicion d'infection récente avant que les tests rapides deviennent positifs.



Performances of fourth generation HIV antigen/antibody assays on filter paper for detection of early HIV infections



Dramane Kania^{a,b,*}, Tam Nguyen Truong^{a,1}, Ana Montoya^a, Nicolas Nagot^{a,c}, Philippe Van de Perre^{a,d}, Edouard Tuaillon^{a,d}

^a Université Montpellier 1, INSERM U 1058, 34394 Montpellier, France

^b Laboratoire de Virologie, Unité VIH et Maladies Associées, Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

^c CHU Montpellier, Département d'Information Médicale, 34295 Montpellier, France

^d CHU Montpellier, Département de Bactériologie-Virologie, 34295 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 September 2014

Received in revised form 31 October 2014

Accepted 3 November 2014

Keywords:

HIV-1

Acute infection

Point-of-care

Dried blood spot

4th generation immunoassay

p24 antigen

ABSTRACT

Background: Point-of-care testing and diagnosis of HIV acute infections play important roles in preventing transmission, but HIV rapid diagnosis tests have poor capacity to detect early infections. Filter paper can be used for capillary blood collection and HIV testing using 4th generation immunoassays.

Objectives: Antigen/antibody combined immunoassays were evaluated for their capacity to identify early HIV infections using filter paper in comparison with rapid test.

Study design: Thirty nine serum samples collected from HIV seroconverters were spotted onto filter paper and tested by the Roche Elecsys[®] HIV Combi PT test and the DiaSorin Liaison XL Murex HIV Ab/Ag assay.

Results: Fourth generation immunoassays identified 34 out of 39 HIV early infections using dried serum spot, whereas the Determine[™] HIV-1/2 rapid test detected 24 out of 39 HIV positive serum (87.2% vs 61.5% respectively, $p = 0.009$). p24 antigen was detected by the Liaison XL in 19 dried serum samples (48.7%). In the group characterized by a negative western blot, 7 out of 8 (87.5%) and 6 out of 8 (75.0%) samples were found positive for HIV using the Elecsys and the Liaison XL, respectively. None of these eight samples classified in this group of early acute infections were found positive by the rapid test.

Conclusion: Fourth generation Ag/Ab immunoassays performed on dried serum spot had good performance for HIV testing during the early phases of HIV infection. This method may be useful to detect HIV early infections in hard-to-reach populations and individuals living in remote areas before rapid tests become positive.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

Acute infection plays a significant role in transmission of human immunodeficiency virus (HIV) because of high viral loads encountered during this phase of infection [1]. It is of particular importance to identify persons with acute infections to prevent transmission and to begin treatment, but this diagnosis remains a challenge. Anti-HIV-1 antibodies can be detected in blood about 3–4 weeks after infection in most individuals. The window period for HIV diagnosis can be shortened by several days by testing plasma HIV-1 RNA and p24 antigen.

* Corresponding author at: Laboratoire de Virologie, Unité VIH et Maladies Associées, Centre Muraz, BP390 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso. Tel.: +226 20 97 01 02; Fax: +226 20 97 04 57.

E-mail address: kaniadramane@yahoo.fr (D. Kania).

¹ These authors contributed equally to this work.

The HIV RNA detection is superior to p24 antigen assays in detecting viral particles. It has been estimated that RT-PCR methods detect HIV-1 infection three to five days earlier than the p24 antigen test and one to three weeks earlier than standard serologic tests [1]. However, the screening for HIV infection remains based on serological testing alone because of the cost and complex technology of molecular assays [2].

Fourth generation immunoassays (IAs) have been developed in the last 10 years to improve HIV diagnosis especially during early phases of the infection by coupling HIV-1/HIV-2 antigen sandwich assays that detect both IgG and IgM class antibodies (3rd generation test) with the detection of p24 antigen [3–8]. However, these tests required venipuncture and laboratory equipments which limit their use.

Point-of-care testing based on HIV rapid diagnostic tests (RDTs) have been recommended due to their reliability, simplicity to use and accessibility for people living in remote areas [9]. Blood collection on filter paper represents also an interesting device to

Table 1
Patient characteristics.

	WB negative (Group 1, n = 8)	WB indeterminate (Group 2, n = 23)	WB positive (Group 3, n = 8)	Total N = 39
Age (year) ± SD	43.5 ± 15.3	38.9 ± 10.7	37.6 ± 8.7	39.6 ± 11.3
Male, n (%)	7 (87.5%)	21 (91.3%)	7 (87.5%)	35 (89.7%)
Risk factor, n (%)				
MSM	5 (62.5%)	9 (39.1%)	3 (37.5%)	17 (43.6%)
Heterosexuality	2 (25.0%)	3 (13.0%)	2 (25.0%)	7 (17.9%)
IDU	0 (0.0)	1 (4.4%)	0 (0.0)	1 (2.6%)
Unknown	1 (12.5%)	10 (43.5%)	3 (37.5%)	14 (35.9%)
CD4 mean count ± SD	317.3 ± 165.7	430.6 ± 221.2	436.9 ± 190.5	409.8 ± 206.0
CD4 median count (IQR 25–75)	273.0 (248.5–368.0)	375.5 (283.0–588.5)	473.0 (345.0–570.0)	355.0 (269.5–556.0)
CD8 mean count ± SD	354.6 ± 203.3	917.0 ± 591.8	940.7 ± 430.3	812.3 ± 548.7
CD8 median count (IQR 25–75)	286.0 (185.0–548.5)	865.0 (471.8–1,191.0)	902.0 (683.5–1,024.5)	683.5 (425.8–1,022.0)
HIV RNA mean concentration (Log ₁₀ copies/mL) ± SD	6.6 ± 0.7	6.0 ± 0.9	5.5 ± 1.1	6.6 ± 6.6
HIV RNA median concentration (IQR 25–75) (Log ₁₀ copies/mL)	7.0 (6.5–7.0)	6.0 (5.5–6.8)	5.9 (5.0–6.1)	6.1 (5.5–6.8)
HIV genotype	B (2); CRF02_AG (5); CRF31_BC (1)	B (19); CRF02_AG (1); NA (3)	B (5); F1 (1); NA (2)	B (26); CRF02_AG (6); CRF31_BC (1); F1 (1); NA (5)
HIV p24 reactive, n (%)	8 (100.0%)	23 (100.0%)	7 (87.5%)	38 (97.4%)
HIV p24 mean concentration (pg/mL) ± SD	11,878.6 ± 19,218.7	3,263.3 ± 10,619.0	276.7 ± 599.8	4,843.4 ± 12,691.9
HIV p24 median concentration (IQR 25–75) (pg/mL)	421.0 (359.5–500.0)	145.5 (29.4–383.0)	36.2 (12.5–122.3)	169.0 (36.6–410.5)

WB, western blot; n, number; MSM, men who have sex with men; IDU, injection drug user; HIV, human immunodeficiency virus; RNA, ribonucleic acid; SD, standard deviation; IQR, inter-quartile range; mL, milliliter; pg, picogram; log₁₀, logarithm of 10; CD4, cluster of differentiation 4; CD8, cluster of differentiation 8; NA, not available; CRF, circulating recombinant form.

improved diagnosis of infectious diseases in hard-to-reach populations. Blood samples collected on filter paper at the site of patient care can be tested in laboratory by means of 4th generation ELISA as a reliable alternative or a complementary approach for HIV diagnosis in resource-limited settings [10]. Many studies have demonstrated that dried blood spot (DBS) and dried serum spot (DSS) are useful for HIV diagnosis and monitoring with an excellent analytical performance [11]. However no data are available for these sample collection devices, and their transportation and storage for the diagnosis of acute HIV infections.

2. Objectives

This study was conducted to evaluate the performance of HIV 4th generation immunoassays to detect acute HIV infections using DSS in comparison to serum specimen and rapid diagnostic test.

3. Study design

3.1. Population, specimens and data collection

A total of 39 serum samples from newly diagnosed HIV infected persons collected at early phases of infection and archived in the Virology Laboratory of Montpellier University Hospital were selected. HIV early infections were established based on p24 antigen/anti-HIV antibodies fourth generation EIA, plasma HIV RNA quantification and immunoblotting assay (WB), and clinical manifestations. Patient characteristics are presented in Table 1.

A positive WB result is defined as the presence of at least two clearly visible *Env* glycoprotein bands and at least one clear line of *Gag* or *Pol* protein. An indeterminate WB result is the presence of any other band or bands that fail to meet the criteria for positivity. A negative WB result is the absence of all bands.

The p24-antigen has been performed by the Vidas® HIV p24 II assay (BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France). RNA viral load has been performed using Roche Cobas system (dynamic range of 20–10,000,000 copies/mL) with the Cobas AmpliPrep/Cobas

Amplicor HIV-1 Monitor Test, v1.5 or the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test, v2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

3.2. HIV rapid testing in the study

Serum samples were assessed by means of an immunochromatographic rapid diagnostic tests (RDTs) using Alere Determine™ HIV-1/2 assay (Alere Medical Co. Ltd., Chiba, Japan). Fifty microliters (50 µL) of serum of each patient were directly performed as recommended by the manufacturer instructions and results obtained after 15 min.

3.3. HIV acute infection screening using p24 antigen/antibody combination assays on filter paper

From each selected serum sample, about 50 µL of serum were spotted onto Whatman 903™ Protein Saver Card (Whatman GmbH, Dassel, Germany) and dried at ambient temperature for at least 3 h. Filter paper cards were then stocked at –20 °C before use. Samples spotted on filter paper card were tested using two 4th generation immunoassays (IAs): (i) Elecsys® HIV Combi PT assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) on an automated system (Cobas 6000/Cobas e601, Roche Diagnostics GmbH); and (ii) Liaison® XL Murex HIV Ab/Ag test (DiaSorin S.p.A., Saluggia, Italy) on a fully automated chemiluminescence analyzer (Liaison® XL, DiaSorin S.p.A.). This test distinguishes between signals from antibody and antigen reactivities [3]. Assays were performed and results interpreted in accordance with the manufacturer's instructions.

3.4. Filter paper performing by means of Elecsys® HIV Combi PT assay

Six mm diameter of disk punched from each dried serum spot (DSS) was eluted during 1 h into 200 µL of phosphate buffered saline (PBS) buffer with shaking. The final solution obtained from

each sample was analyzed using the Elecsys HIV Combi PT kit on the Roche Cobas® 6000/Cobas e601 instrument which use 40 µL of sample as input volume. This assay which detects overall reactivity of antigen (Ag) and antibodies (Abs) simultaneously was performed at least 1 week of storage of DSS samples. Its p24-antigen detection limit is ≤ 2 IU/mL using the WHO First International Reference Reagent (NIBSC code 90/636).

3.5. Filter paper performing by means of Liaison® XL Murex HIV Ab/Ag assay

Two punch disks of 6 mm diameter of DSS were eluted during 1 h in 400 µL of PBS buffer with shaking. Then, eluted solution of each sample was tested using the Liaison® XL Murex HIV Ab/Ag kit on the DiaSorin Liaison® XL apparatus which use an input volume of 200 µL. It was performed after 12 months of storage of DSS samples. This assay allows the differentiation of Ag (HIV-1 p24) from Ab reactivity. The sensitivity of the test set at 1.26 IU/mL for HIV p24 Ag using the WHO Reference Reagent and 27.4 pg/mL by testing the HIV-1 Panel of the French Agency for Health Safety (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, AFS-SAPS).

3.6. Statistical analysis

Results of the three evaluated assays were compared to the results of confirmed acute HIV infection status established by the combination of RNA, p24 antigen, enzyme immunoassay (EIA) and immunoblotting tests in serum as gold standard to calculate tests' sensitivity in acute HIV infection detection as simple proportion with its 95% confidence intervals (CIs). Continuous variables were described as mean with standard deviation (SD) or median with inter-quartile range (IQR).

4. Results

4.1. Characteristics of study population

Of the 39 subjects included, 31 subjects (79.5%) were classified as early phases of acute HIV infection corresponding to Fiebig's stages (I–III) since HIV RNA test was positive while immunoblotting assay was negative (group 1, $n = 8$) or indeterminate (group 2, $n = 23$). The other 8 samples (20.5%) were considered to be collected from patients with late phases of acute HIV infection or established HIV infections (Fiebig's stages IV–V) since immunoblotting test was positive (group 3). HIV RNA was detected in all samples with 34 of them (87.2%) exhibited a plasma viral load (VL) ≥ 5.0 Log₁₀ copies/mL. Thirty-eight out of the 39 samples were

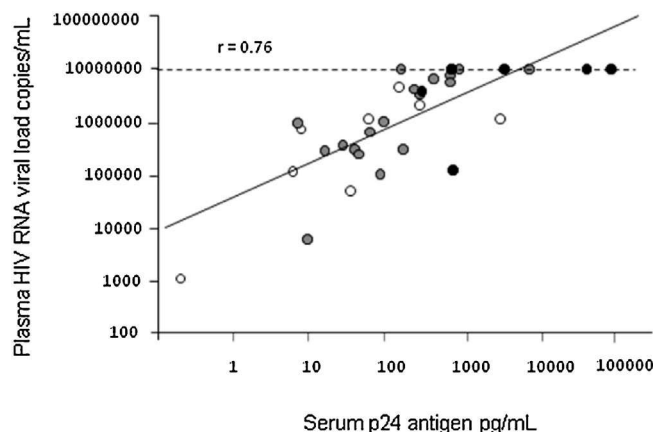


Fig. 1. Correlation between HIV RNA viral load (y-axis, copies/mL) and p24-antigen concentration. The fitted regressions are represented with solid line. Black circles represent western blot negative samples (group 1, $n = 6$), gray circles western blot indeterminate samples (group 2, $n = 19$) and white circles western blot positive samples (group 3, $n = 8$). An arbitrary value of 1×10^7 copies/mL has been affected to HIV RNA levels above the upper limit of RNA quantification (dotted line). mL, milliliter; pg, picogram

p24-antigen reactive with varied concentrations ranged from 4 to $>40,000$ pg/mL and a median value of 169.0 pg/mL. As indicated in Fig. 1, RNA concentration was correlated with p24-antigen values in serum of seroconverter subjects ($r = 0.76$; $p < 0.001$). A sample non-reactive by p24-antigen testing had a lowest RNA concentration of 3.1 Log₁₀ copies/mL.

4.2. Analytical performance of rapid diagnostic test (RDT) in acute HIV infection screening

As shown in Table 2 and Fig. 2, no sample of the 8 WB negative samples (group 1) was reactive by the Determine™ HIV-1/2 rapid test. Out of 39 seroconverter serum samples, only 24 were reactive using the Determine™ HIV-1/2 rapid test, indicating a global sensitivity of 61.5% (95% CI, 44.7–76.2). In the group 2 (WB indeterminate samples), 17 out of 23 samples were RDT reactive, indicating 73.9% (95% CI, 51.3–88.9) of sensitivity. Except one sample exhibiting a low clear visible gp41 band in this group, the four other discordant RDT results were presented a trace of one to three bands of gp120, gp41, p24 or p31. In the group 3 (WB positive), seven of eight were RDT positive corresponding to 87.5% (95% CI, 46.7–99.3) of sensitivity. The discrepant result here had two clear visible bands of Env glycoprotein (gp120 and gp41) and a trace of p24 and p31 bands.

Table 2
Performance of RDT and 4th generation HIV assays on DSS for diagnosis of acute HIV infections.

	WB negative (Group 1, $n = 8$)			WB indeterminate (Group 2, $n = 23$)			WB positive (Group 3, $n = 8$)			Total ($N = 39$)		
	<i>n</i>	%	95% CI	<i>n</i>	%	95% CI	<i>n</i>	%	95% CI	<i>n</i>	%	95% CI
RDT reactive	0	0.0	–	17	73.9	51.3–88.9	7	87.5	46.7–99.3	24	61.5	44.7–76.2
Elecsys Combi PT test reactive	7	87.5	46.7–99.3	20	87.0	65.3–96.6	7	87.5	46.7–99.3	34	87.2	71.8–95.2
Liaison XL test reactive	6	75.0	35.6–95.5	21	91.3	70.5–98.5	7	87.5	46.7–99.3	34	87.2	71.8–95.2
Differentiation of Liaison XL test Results												
Ag+/Ab–	6	75.0	–	4	17.4	–	0	0.0	–	10	25.6	–
Ag–/Ab+	0	0.0	–	11	47.8	–	4	50.0	–	15	38.5	–
Ag+/Ab+	0	0.0	–	6	26.1	–	3	37.5	–	9	23.1	–
Ag–/Ab–	2	25.0	–	2	8.7	–	1	12.5	–	5	12.8	–

DSS, dried serum spot; WB, western blot; *n*, number; RDT, rapid diagnosis test; CI, confidence interval, Ag, antigen; Ab, antibody; + positive; –, negative.

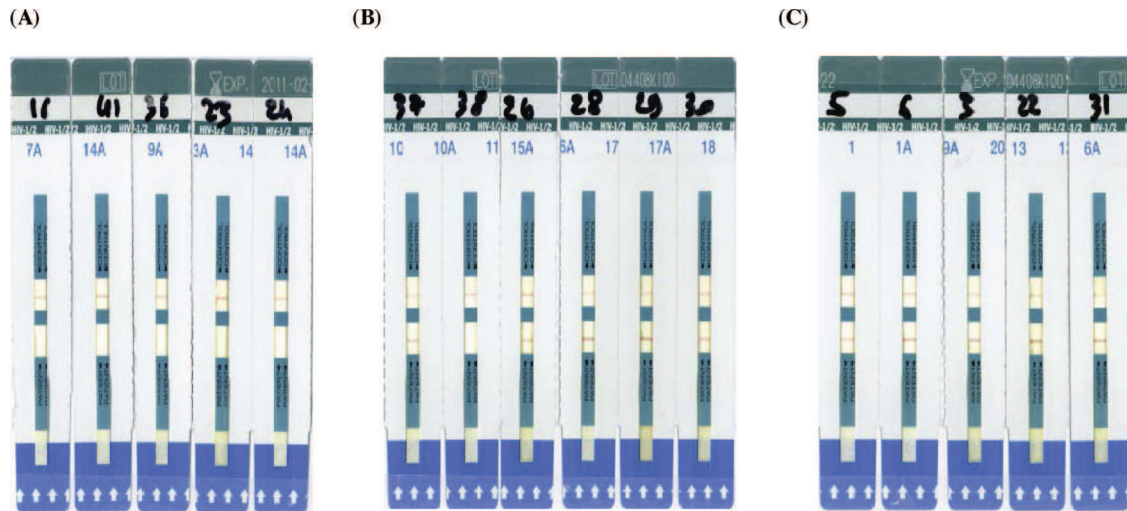


Fig. 2. Results of Determine™ HIV-1/2 assay (3rd generation IA rapid test) during HIV acute infections (representative cases): (A) strips of determine test in samples with negative WB test (group 1); (B) strips of determine test in samples with indeterminate WB test (group 2); and (C) strips of determine test in sample with positive WB test (group 3). IA, immunoassay; WB, Western Blot.

4.3. Performance of combined antigen and antibody 4th generation immunoassays on filter paper for diagnosis of HIV infection

In total, 34 of 39 seroconverter serum samples spotted onto filter paper were reactive with the two 4th generation IAs conferring a global sensitivity of 87.2% for each (Table 2).

The two 4th generation IAs were concordant for 7 out of 8 DSS samples in the WB negative group (group 1) with 6 samples reactive and one sample non-reactive. One sample was positive by the Roche Elecsys® test but negative by the DiaSorin Liaison XL assay. This sample classified HIV-1 CRF31_BC was also negative for the Determine rapid test, but had a detectable HIV viral load of 6.6 Log₁₀ copies/mL and a p24-antigen concentration of 169 pg/mL.

In the second group (WB indeterminate group), the two 4th generation IAs were concordant for 22 samples, with 20 samples reactive and two samples non-reactive for both two tests. The two IA-negative samples in this group had a trace of gp120 and gp41 bands with or without a trace of p31 band. The p24 antigen level was ≤76 pg/mL in these samples exhibiting a high RNA VL (≥5.82 Log₁₀ copies/mL). A sample with discrepant result between the two evaluated IAs was negative by the Roche Elecsys® test but positive by the Liaison XL. This sample classified HIV-1 subtype B was positive by antibody component only of Liaison XL test and had

a detectable HIV viral load of 5.6 Log₁₀ copies/mL and a p24-antigen concentration of 17 pg/mL. It was also positive for the Determine rapid test and indeterminate on the WB.

In the last group (group 3) defined as late acute/established infections (WB positive group), the two assays performed on DSS samples were concordantly reactive for seven sample and non-reactive for one sample. The false negative sample with the two evaluated IAs had a detectable HIV viral load of 4.8 Log₁₀ copies/mL and a p24-antigen concentration of 21 pg/mL. This sample exhibiting gp120, gp41 bands and a trace of p24 and p31 bands by WB test. It was also non-reactive by means of the Determine rapid test.

4.4. Discrimination between antigen and antibody detection on filter paper

p24 antigen versus anti-HIV antibodies results obtained with the Liaison® XL assay on DSS samples were compared. From 38 subjects positive for p24 in serum with the Vidas HIV p24 II assay, the p24 was detected in 19 cases on DSS, indicating a sensitivity of 50.0% (95% CI, 33.7–66.3). DSS negative for p24 using the Liaison XL assay had a median p24 serum concentration of 36.6 pg/mL (IQR: 23.3–160.0) compared to 383.0 pg/mL (IQR: 197.5–2820.5) in p24 positive DSS.

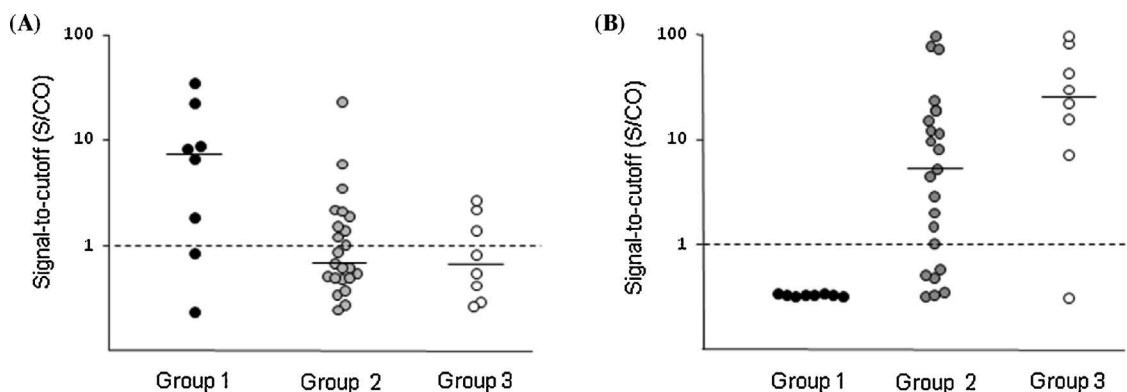


Fig. 3. Simultaneous but separate detection of p24 Ag and anti-HIV on DSS with Liaison XL Murex HIV Ab/Ag immunoassay during HIV acute infections (group 1: WB negative samples; group 2: WB indeterminate samples; and group 3: WB positive samples). (A) Liaison XL p24 Ag component results; and (B) Liaison XL anti-HIV Ab component results. The dotted line is the threshold value of the signal-to-cutoff ratio (S/CO) for interpretation of the Liaison XL results and the solid lines represent the median in each group. DSS, dried serum spot; WB, Western Blot; Ab, antibody; Ag, antigen.

As shown in Fig. 3A, the Liaison XL assay performed on DSS detect p24-antigen in most of the samples where tests based on antibody detection (WB and RDTs) were negative. These samples had exhibited a high level of p24-antigen concentration with 592.9 ± 562.2 pg/mL of p24-antigen as a mean value. Anti-HIV Abs were not detected using filter paper in WB negative samples, but detected in most of WB indeterminate or positive sample groups (Fig. 3B).

5. Discussion

In this study, results obtained with two 4th generation automated HIV Ab/Ag immunoassays demonstrated that HIV testing using serum spotted onto filter paper offers good performances to detect acute infections.

The early identification of HIV during the acute phases of infection via p24 antigen detection affords the opportunity of allowing potential reductions in disease transmission. In comparison with third generation enzyme immunoassays designed for antibody detection, 4th generation tests reduce the window period by approximately 5 days, due to their antigen component [3,7,8]. Hence, antigen-antibody tests are recommended for HIV screening by the French regulation authority since 2008 [12]. However these tests are laboratory-based and are therefore difficult to use in the environment of resource-constrained countries.

Blood spotted on filter paper makes it possible to collect blood for HIV testing in difficult-to-reach communities and outside of a formal clinic setting. By contrast with point-of-care methods that are based on diagnosis test performed near the site of patient care, filter paper testing decentralized the blood collection but performed the assay within the laboratory setting. Archived serum spotted on filter paper was used in this study but in clinical practice capillary blood sampling and DBS that do not require venipuncture and centrifugation would be more useful than DSS.

Overall, the two 4th generation IAs evaluated in this study on filter paper samples presented similar analytical performance by identifying 87.2% of seroconverters. DSS samples tested on the Liaisons XL apparatus were stored during 12 months before testing. We cannot exclude that the difference in storage time had affected the results and the analytical sensitivity of the assay. However, results obtained were similar to the Elecsys® Combi PT assay performed after a short time period of storage. This observation suggests a good stability of DSS at minus 20 °C.

Recent evaluations of 4th generation IAs report their ability to detect HIV infection in serum specimen from about 19 to 26 days before the first positive WB, whereas 3rd generation EIAs based on antibody testing detect infection 12–14 days for ELISA tests or 1–7 days for RDTs before the first positive WB [13]. Alonso et al. using the Liaison XL Murex HIV Ab/Ag performed in serum yielded accurate results in 87.5% of suspected acute infections [3].

Unlike the others 4th generation tests, the Liaison XL test allows differentiation of HIV-1 p24 Ag reactivity from antibody reactivity. Results of p24 antigen versus anti-HIV antibody levels in the subjects grouped according to the WB patterns confirmed the lack of detectable antibodies to HIV in the group negative for WB testing, and the low levels in the WB indeterminate group. A good correlation was observed between RNA concentration and p24-antigen. During HIV primary infections, the p24-specific antibody titers were not high enough to complex the antigen by contrast with the chronic phase of infection [14].

Point-of-care methods based on HIV rapid testing minimize the risk of loss to follow-up before diagnosis but have some technical limitations regarding their poor performances in the acute phases of infection due to the detection of HIV antibodies only. In this study, results obtained with two 4th generation automated HIV

Ab/Ag IAs demonstrated that HIV testing using serum samples spotted onto filter paper are more sensitive to detect acute infection when compare to RDT. Combined detection of p24 and antibodies may improve performances of RDT during the early phases of infection. However, a study by Chetty et al. (2012) in South Africa using the Combo RT, a first licensed Ag/Ab HIV RDT, report sensitivity of 59% for HIV detection in seroconverters [15]. These suboptimal sensitivity during the acute phases of infection have been confirmed by other studies based on the Combo RT [15–20].

In conclusion, HIV testing on serum spotted onto filter paper using 4th generation automated Ag/Ab immunoassays is a sensitive method to diagnose HIV infection during primary infections. This approach may be used in combination with HIV rapid tests when an early HIV infection is suspected since these assays do not offer appropriate performance in this case.

Funding

This work has been supported by France Recherche Nord & sud Sida-hiv Hépatites (ANRS), UMR Inserm U1058, and the Ministère Français de la Coopération for Ph.D. grants of Dramane Kania and Tam Nguyen Truong.

Competing interests

The authors declare that they have no competing of interests.

Ethical approval

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and patients gave their written consent for the study. The local research ethic committee approved the study (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée IV, Q2011.12.01).

Author contributions

DK and TNT performed biological assays, statistical analysis, and interpretation of the data and wrote the manuscript. AM, participated in patient selection, collection of samples and acquisition of data. NN and PVP participated in the study concept and contributed with critical revision of the manuscript. ET supervised the study and wrote the manuscript. All authors revised and approved the manuscript.

References

- [1] Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1998;339:33–9.
- [2] Maylin S, Fouere S, Simon F, Delaugerre C. Failure of fourth-generation enzyme immunoassay in HIV screening and plasma HIV-1 RNA detection in recent high-risk behavior. *Intervirology* 2014;57(1):49–51.
- [3] Alonso R, Lopez Roa P, Suarez M, Bouza E. New automated chemiluminescence immunoassay for simultaneous but separate detection of human immunodeficiency virus antigens and antibodies. *J Clin Microbiol* 2014;52(5):1467–70.
- [4] Chavez P, Wesolowski L, Patel P, Delaney K, Owen SM. Evaluation of the performance of the Abbott ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo Assay. *J Clin Virol* 2011;52(Suppl. 1):S51–5.
- [5] Mitchell EO, Stewart G, Bajzik O, Ferret M, Bentsen C, Shriver MK. Performance comparison of the 4th generation Bio-Rad Laboratories GS HIV Combo Ag/Ab EIA on the EVOLIS automated system versus Abbott ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo Ortho Anti-HIV 1+2 EIA on Vitros ECi and Siemens HIV-1/O/2 enhanced on Advia Centaur. *J Clin Virol* 2013;58(Suppl. 1):e79–84.
- [6] Muhlbacher A, Schennach H, van Helden J, Hebell T, Pantaleo G, Burgisser P, et al. Performance evaluation of a new fourth-generation HIV combination antigen-antibody assay. *Med Microbiol Immunol* 2013;202(1):77–86.
- [7] Song EY, Hur M, Roh EY, Park MH, Moon HW, Yun YM. Performances of four fourth-generation human immunodeficiency virus-1 screening assays. *J Med Virol* 2012;84(12):1884–8.
- [8] Tao CM, Cho Y, Ng KP, Han X, Oh EJ, Zainah S, et al. Validation of the Elecsys(R) HIV combi PT assay for screening and reliable early detection of HIV-1 infection in Asia. *J Clin Virol* 2014;58(1):221–6.

- [9] WHO/UNAIDS/UNICEF. Guidance on provider-initiated HIV testing and counseling in health facilities; 2007. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Available from: http://www.unicef.org/aids/files/PITCGuidance2007_Eng.pdf [accessed 10.05.14].
- [10] Kania D, Bekale AM, Nagot N, Mondain AM, Ottomani L, Meda N, et al. Combining rapid diagnostic tests and dried blood spot assays for point-of-care testing of human immunodeficiency virus, hepatitis B and hepatitis C infections in Burkina Faso, West Africa. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(12):E533–41.
- [11] Smit PW, Sollis KA, Fiscus S, Ford N, Vitoria M, Essajee S, et al. Systematic review of the use of dried blood spots for monitoring HIV viral load and for early infant diagnosis. *PLOS ONE* 2014;9(3):e86461.
- [12] Haute Autorité de Santé (HAS). Dépistage de l'infection par le VIH en France: stratégies et dispositif de dépistage; 2008. Available from: <http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c.866949> [accessed October 2008].
- [13] Masciotra S, Luo W, Youngpairaj AS, Kennedy MS, Wells S, Ambrose K, et al. Performance of the Alere Determine HIV-1/2 Ag/Ab Combo Rapid Test with specimens from HIV-1 seroconverters from the US and HIV-2 infected individuals from Ivory Coast. *J Clin Virol* 2013;58(Suppl. 1):e54–8.
- [14] Nadal D, Böni J, Kind C, Varnier OE, Steiner F, Tomasik Z, et al. Prospective evaluation of amplification-boosted ELISA for heat-denatured p24 antigen for diagnosis and monitoring of pediatric human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1999;180:1089–95.
- [15] Chetty V, Moodley D, Chuturgoon A. Evaluation of a 4th generation rapid HIV test for earlier and reliable detection of HIV infection in pregnancy. *J Clin Virol* 2012;54(2):180–4.
- [16] Brauer M, De Villiers JC, Mayaphi SH. Evaluation of the determine fourth generation HIV rapid assay. *J Virol Methods* 2013;189(1):180–3.
- [17] Faraoni S, Rocchetti A, Gotta F, Ruggiero T, Orofino G, Bonora S, et al. Evaluation of a rapid antigen and antibody combination test in acute HIV infection. *J Clin Virol* 2013;57(1):84–7.
- [18] Kilembe W, Keeling M, Karita E, Lakhi S, Chetty P, Price MA, et al. Failure of a novel, rapid antigen and antibody combination test to detect antigen-positive HIV infection in African adults with early HIV infection. *PLOS ONE* 2012;7(6):e37154.
- [19] Pavie J, Rachline A, Loze B, Niedbalski L, Delaugerre C, Laforgerie E, et al. Sensitivity of five rapid HIV tests on oral fluid or finger-stick whole blood: a real-time comparison in a healthcare setting. *PLOS ONE* 2010;5(7):e11581.
- [20] Rosenberg NE, Kamanga G, Phiri S, Nsona D, Pettifor A, Rutstein SE, et al. Detection of acute HIV infection: a field evaluation of the determine(R) HIV-1/2 Ag/Ab combo test. *J Infect Dis* 2011;205(4):528–34.

**DISCUSSIONS, CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

I. Discussions

Les 3 études présentées dans ce travail de thèse s'inscrivent dans une dynamique visant à l'amélioration de la prise en charge de la co-infection VIH/VHC en particulier dans les pays du Sud et au Vietnam.

La première étude est une étude de terrain, pilote, interventionnelle. Elle a également une dimension de plaidoyer en faveur de l'accès thérapeutique pour les personnes vivant avec le VHC dans les pays du Sud. L'étude a mis en évidence un pourcentage important des patients nécessitant rapidement un traitement spécifique antiviral C. En effet, presque 50% des sujets avaient une fibrose significative \geq F2 et 25% \geq F3. Ces patients devraient être traités en urgence compte tenu de la sévérité de la fibrose hépatique selon les recommandations actuelles de l'OMS. La plupart de ces patients avaient par ailleurs une réponse virologique VIH satisfaisante ; 95% des patients ayant une charge virale VIH indétectable. Cela prouve l'adhérence thérapeutique de ces patients vulnérables. Il existe, une seule étude en Asie du Sud Est du même type [137]. Cette étude réalisée en Thaïlande chez 331 patients mono-infectés et 130 patients co-infectés observait que 56.3% des sujets présentaient une fibrose significative ($>$ F2 dont 18.4% F3 et 12.4% F4) et chez les patients co-infectés 69.5% avaient une fibrose significative ($>$ F2) dont 41.7% avec fibrose sévère ou étaient cirrhotiques. Cette différence entre deux études pourrait s'expliquer par un biais du recrutement dans notre étude, car les patients ont été sélectionnés en consultation externe, pouvant se déplacer à l'OPC, l'étude a certainement sous-estimé une partie des patients graves en hospitalisation ou restant à domicile avec une altération importante de l'état générale en raison de l'hépatopathie chronique.

Depuis l'avènement des marqueurs non invasifs de fibrose incluant le Fibroscan et les marqueurs sériques, l'évaluation de la fibrose hépatique a été largement simplifiée, moins coûteuse et surtout non-invasive par rapport à l'indication classique par PBH présentant un certain risque de complications lié au geste. Dans notre étude, nous avons pu montrer la faisabilité de cette méthode pour la première fois au Vietnam. Nous avons observé une concordance entre les deux méthodes d'évaluation non-invasives Fibroscan et score simplifié (APRI). Le score APRI (ASAT to Platelet Ratio Index) est le test le plus utilisé aujourd'hui. Son intérêt réside dans sa grande simplicité d'utilisation puisqu'il utilise deux paramètres sanguins courants avec un rapport simple se basant sur le niveau d'ASAT et le taux de plaquettes [124]. Cette méthode a été recommandée par l'OMS en vue d'évaluation de la fibrose en utilisant le cut-off supérieur à 1.5 et 2 pour classer la fibrose sévère et la cirrhose. Cette association a été bien démontrée dans différentes études, par exemple pour le diagnostic de fibrose significative, l'AUROC varie de 0,64 à 0,88 dans les études. Un test \leq 0,5 a une valeur prédictive négative de 72 à 86 % et un test $>$ 1,5 a une valeur prédictive positive de 88 à 100 % [125, 126]. Le Fibroscan pourrait être réservé à l'évaluation en 2^e intention du fait de sa faible disponibilité au Vietnam, se présentant comme une alternative de recours en cas de doute avec les tests simplifiés type APRI.

Comme les autres études précédentes réalisées chez les mono-infectés, l'étude ANRS 12262 a mis en évidence, pour la première fois chez les patients co-infectés VIH/VHC, les deux génotypes prédominants : le GT 1(69%) et le GT 6 (26%) à Hai Phong, une province du Nord du Vietnam. La plupart des études génotypiques au Vietnam sont réalisées chez les patients mono-infectés. Nous avons observé une grande différence dans différentes provinces : une étude génotypique de Pham, 2009, réalisée sur 103 prélèvements de don sanguin à Hanoi, Nord du Vietnam a montré la répartition, le génotype 1 (47,1%), le génotype 6 (37.1%). Une autre étude du même auteur réalisée à Ho Chi Minh Ville en 2011 a montré un résultat différent chez 842 prélèvements du don sanguin, la prédominance du génotype 6 (54.4%), puis le génotype 1 (30.4%) et le 2 (15.2%). L'étude de Tanimoto [23] chez 468 UDI à Hai Phong dont 323 (66.5%) ayant une sérologie VHC positive, 137 prélèvements ont été analysés pour étude génotypique : GT6 (46.9%) et GT1 (38.5%). Malgré le pourcentage du génotype 6 dans cette étude est moins important (26%) que dans la population générale au Vietnam, il faudrait prendre en compte de cette particularité dans la prise en charge globale. Ce qui nous emmène à penser à développer des essais thérapeutiques en particulier pour le génotype 6 au Vietnam.

La deuxième étude présentée dans cette thèse présente à la fois un caractère historique du fait de l'abandon progressif de la bithérapie traditionnelle et un caractère de modèle d'immuno-monitoring basé sur les approches multiplexes.

Notre étude peut apparaître quelque peu en « décalage » avec l'évolution thérapeutique de l'hépatite C sans PegINF. Pourtant la place du PegINF demeure importante pour les pays à ressources limitées n'ayant pas accès aux DAA. De même, l'interféron garde une place importante vis-à-vis des autres infections hépatique virales chroniques B et Delta. Le traitement « curatif » d'une durée définie, chez les patients ayant une 'hépatite B chronique active implique l'utilisation du PegINF. Ce traitement permet une séroconversion HBe observée chez 36 % des malades atteints d'hépatite chronique avec AgHBe positif [138] et une réponse virologique chez 43 % des malades atteints d'hépatite chronique B avec AgHBe négatif [139] après 48 semaines de PegINF. Si les options thérapeutiques des hépatites B et surtout C sont nombreuses, le seul traitement du VHD recommandé jusqu'à ce jour est l'interféron (classique ou pégylé). La réponse virologique varie entre 20 et 45% [140-148]. Puisque son action thérapeutique est antivirale et immunomodulatrice, le suivi immunologique paraît nécessaire, comme le résultat de notre étude sur le modèle de l'hépatite virale C. Une concentration sanguine élevée d'IP 10 est prédictive de mauvaise réponse au traitement de l'hépatite C mais aussi semble t-il pour l'hépatite B [149]. Les essais cliniques avec intensification thérapeutique PegINF et analogues nucléotidiques ou nucléosidiques sont en cours. Pour autant la question des immunothérapies et de leur monitoring dans le traitement des infections chroniques reste posée. L'expérience avec le VHC après plus de 20 ans d'INF-thérapie peut aider à la recherche sur les traitements anti-VHB et VHD. D'où la nécessité d'explorer les marqueurs immunologiques sous le traitement immunomodulateur, PegINF par exemple, qui induit une bonne amplitude de réponse, et une réponse

polyfonctionnelle avec augmentation des concentrations de cytokines variées (Th1/Th2). Suggérons que ce modèle de l'hépatite C puisse être adapté aux autres infections virales, notamment pour l'hépatite B et D.

Au Vietnam, l'hépatite virale B (AgHBs positif) reste un problème dans la population générale avec une prévalence estimées entre 10-20% [15, 150-153]. En Asie la transmission est souvent périnatale. Certaines études réalisées chez les UDI ont montré la même prévalence que dans la population générale [43]. Peu de données sérologiques de la co-infection VHB/VHD existe au Vietnam. Une étude récente réalisée chez 1999 UDI sur 5 provinces du Vietnam, montre une prévalence de l'hépatite B de 15% avec une co-infection VHD de 15.3% parmi les porteurs de l'AgHBs, la PCR VHD étant positive dans 61% des cas de séropositivité IgG anti-Delta [154].

La dernière étude porte sur une question très important dans l'amélioration de la prise en charge et du dépistage précoce des infections virales, VIH et VHC. Les tests de diagnostic rapides améliorent considérablement l'accès au dépistage. Mais il faut souligner que leur principe est basé sur la détection des anticorps contre le virus en cause (même principe pour le VIH et aussi le VHC) sans détection de l'antigène le plus souvent. La détection des anticorps elle-même est moins sensible qu'avec les techniques de laboratoire. La conséquence de ces caractéristiques est que la phase précoce de l'infection VIH et VHC est plus tardivement détecté par les tests rapides. Le sang séché sur papier filtre communément appelé « dried blood spot » ou DBS, se positionne comme une alternative intéressante et séduisante en termes de prélèvement capillaire délocalisé du laboratoire ou du centre de soins, de transport et de stockage pour le diagnostic des infections virales.

Notre troisième étude montrait clairement que les deux tests de 4ème génération réalisés sur papier filtre offrent de bonnes performances dans le diagnostic de la primo-infection par rapport aux tests de diagnostic rapide sur sérum. Cette méthode peut être utilisée en complément des tests rapides en particulier chez les personnes vulnérables, les personnes difficiles à atteindre comme les toxicomanes et les populations vivant dans des zones périphériques des pays à ressources limitées.

II. Conclusion et perspectives pour la prise en charge de l'hépatite C au Vietnam

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'envisager certaines des perspectives de la prise en charge des hépatites chroniques virales et du VIH dans les au Vietnam.

Pour la première fois, une étude descriptive épidémiologique et virologique est réalisée au Vietnam chez des patients co-infectés VIH/VHC. Nos résultats suggèrent que près de la moitié des patients, par ailleurs jeunes et bien contrôlés pour leur infection VIH, ont une fibrose significative justifiant un traitement antiviral C et 25% ont une fibrose extensive et sont en attente d'un traitement urgent

Dans le cadre de ce travail, le Fibroscan a été légué à l'hôpital de Viet Tiep et pourra bénéficier à d'autres patients et d'autres projets de recherche, par exemple les projets Esther (CHU Toulouse, Nîmes et Hai Phong) et l'étude DRIVE-IN en cours au Vietnam et financée par l'ANRS.

En l'absence de Fibroscan, comme l'indique la revue systématique de l'OMS, le score APRI (seuil à 2) est un marqueur simple et performant pour éliminer le diagnostic de cirrhose. C'est ce que nous confirmons dans notre étude. En cas de discordance avec le tableau clinique ou de score inférieur à 2, le fibroscan pourrait être utilisé pour repérer les patients ayant une fibrose significative.

Nous pourrions imaginer une simplification de la prise en charge de l'hépatite virale C dans le contexte vietnamien, en particulier chez la population à fort risque présentant des difficultés importantes d'accès aux soins. Le dépistage basé sur les tests rapides actuels avec le complément du support DBS par exemple pour la confirmation des positifs, les tests moléculaires, la surveillance épidémiologique, offre des possibilités encore largement sous exploitées. Nos résultats montrent que le dépistage de l'infection précoce à VIH sur papier buvard est un complément ou une alternative possible aux tests rapides qui sont insuffisamment sensibles dans cette situation. L'échantillon sanguin testé sur papier buvard peut être prélevé « hors les murs » sur sang capillaire en même temps que le test rapide. L'échantillon sur papier buvard est facilement transportable par courrier conventionnel et peut permettre de confirmer ou de redresser un diagnostic de primo-infection avec test rapide négatif

La question de l'immunothérapie et de leur monitoring dans le traitement des infections chroniques virales reste posée. Comment admettre que l'on administre une immunothérapie active sans suivre les effets de celle-ci sur le système immunitaire afin d'optimiser et de personnaliser les schémas thérapeutiques ? Avec l'expérience avec le VHC après plus de 20 ans de INF thérapie peut servir à progresser dans le domaine des traitements anti-VHB et VHD

Références

1. Alter, M.J., *Epidemiology of hepatitis C virus infection*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2436-41.
2. Lozano, R., et al., *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2095-128.
3. Szpakowski, J. and L. Tucker, *Causes of death in patients with hepatitis B: A natural history cohort study in the United States*. Hepatology, 2013. **58**(1): p. 21-30.
4. Alter, H. and L. Seeff. *Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome*. in *Seminars in Liver Diseases*. 2000. GEORG THIEME VERLAG.
5. Thomas, D.L., et al., *The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors*. Jama, 2000. **284**(4): p. 450-456.
6. Guerra, J., et al., *HCV burden of infection in Egypt: results from a nationwide survey*. J Viral Hepat, 2012. **19**(8): p. 560-7.
7. Perz, J.F., et al., *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide*. J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 529-38.
8. Shepard, C.W., L. Finelli, and M.J. Alter, *Global epidemiology of hepatitis C virus infection*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(9): p. 558-67.
9. Sievert, W., et al., *A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt*. Liver Int, 2011. **31 Suppl 2**: p. 61-80.
10. Jahan, S., et al., *Hepatitis C virus to hepatocellular carcinoma*. Infect Agent Cancer, 2012. **7**(1): p. 2.
11. Parikh, N., et al., *Substance abuse, HIV-1 and hepatitis*. Curr HIV Res, 2012. **10**(7): p. 557-71.
12. Thein, H.H., et al., *Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression*. Hepatology, 2008. **48**(2): p. 418-31.
13. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
14. Graham, C.S. and M.J. Koziel, *Why should hepatitis C affect immune reconstitution in HIV-1-infected patients?* Lancet, 2000. **356**(9245): p. 1865-6.
15. Do, S.H., et al., *High prevalences of hepatitis B and C virus infections among adults living in Binh Thuan province, Vietnam*. Hepatol Res, 2015. **45**(3): p. 259-68.
16. Sereno, L., et al., *Epidemiology, responses, and way forward: the silent epidemic of viral hepatitis and HIV coinfection in Vietnam*. J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic), 2012. **11**(5): p. 311-20.
17. Lwin, A.A., et al., *Hepatitis C virus genotype distribution in Myanmar: Predominance of genotype 6 and existence of new genotype 6 subtype*. Hepatol Res, 2007. **37**(5): p. 337-45.
18. Hubschen, J.M., et al., *High genetic diversity including potential new subtypes of hepatitis C virus genotype 6 in Lao People's Democratic Republic*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(12): p. E30-4.
19. Yamada, H., et al., *Seroprevalence, genotypic distribution and potential risk factors of hepatitis B and C virus infections among adults in Siem Reap, Cambodia*. Hepatol Res, 2015. **45**(4): p. 480-7.
20. Wasitthanasem, R., et al., *Genotypic distribution of hepatitis C virus in Thailand and Southeast Asia*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126764.
21. Rong, X., et al., *Increased prevalence of hepatitis C virus subtype 6a in China: a comparison between 2004-2007 and 2008-2011*. Arch Virol, 2014. **159**(12): p. 3231-7.
22. Pham, V.H., et al., *Very high prevalence of hepatitis C virus genotype 6 variants in southern Vietnam: large-scale survey based on sequence determination*. Jpn J Infect Dis, 2011. **64**(6): p. 537-9.
23. Tanimoto, T., et al., *Multiple routes of hepatitis C virus transmission among injection drug users in Hai Phong, Northern Vietnam*. J Med Virol, 2010. **82**(8): p. 1355-63.
24. Greene, W.K., et al., *Prevalence of hepatitis C virus sequence variants in South-East Asia*. J Gen Virol, 1995. **76 (Pt 1)**: p. 211-5.
25. Utama, A., et al., *Genotype diversity of hepatitis C virus (HCV) in HCV-associated liver disease patients in Indonesia*. Liver Int, 2010. **30**(8): p. 1152-60.
26. Kageyama, S., et al., *Tracking the entry routes of hepatitis C virus as a surrogate of HIV in an HIV-low prevalence country, the Philippines*. J Med Virol, 2009. **81**(7): p. 1157-62.
27. Pham, D.A., et al., *High prevalence of Hepatitis C virus genotype 6 in Vietnam*. Asian Pac J Allergy Immunol, 2009. **27**(2-3): p. 153-60.

28. Thu Thuy, P.T., et al., *A randomized trial of 48 versus 24 weeks of combination pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 6 chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2012. **56**(5): p. 1012-8.
 29. *Vietnam AIDS response progress report 2014*. National committee for AIDS, drugs and prostitution prevention and control. Hanoi.
 30. Nguyen, T.H., et al., *HIV monitoring in Vietnam: system, methodology, and results of sentinel surveillance*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1999. **21**(4): p. 338-46.
 31. Le, T.T., et al., *Correlates of HIV infection among street-based and venue-based sex workers in Vietnam*. Int J STD AIDS, 2015.
 32. Nelson, P.K., et al., *Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews*. The Lancet, 2011. **378**(9791): p. 571-583.
 33. Mathers, B.M., et al., *Global epidemiology of injecting drug use and HIV among people who inject drugs: a systematic review*. The Lancet, 2008. **372**(9651): p. 1733-1745.
 34. UNAIDS, http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf Last accessed 3rd of June 2014. 2013.
 35. Organization, W.H., *Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection*, 2014.
 36. Joshi, D., et al., *Increasing burden of liver disease in patients with HIV infection*. Lancet, 2011. **377**(9772): p. 1198-209.
 37. Mathers, B.M., et al., *Global epidemiology of injecting drug use and HIV among people who inject drugs: a systematic review*. Lancet, 2008. **372**(9651): p. 1733-45.
 38. *Viet nam HIV/AIDS ESTIMATES AND PROJECTIONS 2007 – 2012*. . MINISTRY OF HEALTH – VIET NAM ADMINISTRATION OF HIV/AIDS CONTROL.
 39. Nguyen, T.T., et al., *Methadone maintenance therapy in Vietnam: an overview and scaling-up plan*. Adv Prev Med, 2012. **2012**: p. 732484.
 40. Degenhardt, L., et al., *What has been achieved in HIV prevention, treatment and care for people who inject drugs, 2010-2012? A review of the six highest burden countries*. Int J Drug Policy, 2014. **25**(1): p. 53-60.
 41. Tran, B.X., et al., *Cost-effectiveness of methadone maintenance treatment for HIV-positive drug users in Vietnam*. AIDS Care, 2012. **24**(3): p. 283-90.
 42. Huong, N.T., et al., *Social marketing of low dead space syringes in Vietnam: findings from a 1-year pilot program in Hanoi, Thai Nguyen, and Ho Chi Minh City*. Harm Reduct J, 2015. **12**: p. 15.
 43. Nadol, P., et al., *Findings from integrated behavioral and biologic survey among males who inject drugs (MWID) - Vietnam, 2009-2010: evidence of the need for an integrated response to HIV, hepatitis B virus, and hepatitis C virus*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0118304.
 44. Giang, L.M., et al., *Substance use disorders and HIV in Vietnam since (Renovation): an overview*. J Food Drug Anal, 2013. **21**(4): p. S42-S45.
 45. Quan, V.M., et al., *Risks for HIV, HBV, and HCV infections among male injection drug users in northern Vietnam: a case-control study*. AIDS Care, 2009. **21**(1): p. 7-16.
 46. Nguyen, T.H., T.L. Nguyen, and Q.H. Trinh, *HIV/AIDS epidemics in Vietnam: evolution and responses*. AIDS Educ Prev, 2004. **16**(3 Suppl A): p. 137-54.
 47. Zhang, L., et al., *Prevalence and correlates of HCV mono-infection and HIV and HCV coinfection among persons who inject drugs in Vietnam*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2015. **27**(5): p. 550-6.
 48. Wiessing, L., et al., *Hepatitis C Virus Infection Epidemiology among People Who Inject Drugs in Europe: A Systematic Review of Data for Scaling Up Treatment and Prevention*. PloS one, 2014. **9**(7): p. e103345.
 49. WHO, *Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection* <http://who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-c-guidelines/en/>
- Accessed 18t March 2015, 2014.
50. Hoàng Đình Cảnh, N.T.L., *Một số đặc điểm của người nghiện ma túy (các chất dạng thuốc phiện) trước khi tham gia điều trị Methadone tại thành phố Hồ Chí Minh và Hải Phòng*. 2013. **Tập XXIII, số 6(142)**.
 51. Clatts, M.C., et al., *Prevalence and Incidence of HCV Infection among Vietnam Heroin Users with Recent Onset of Injection*. Journal of Urban Health, 2010. **87**(2): p. 278-91.
 52. Perlman, D.C., et al., *An international perspective on using opioid substitution treatment to improve hepatitis C prevention and care for people who inject drugs: Structural barriers and public health potential*. Int J Drug Policy, 2015. **26**(11): p. 1056-63.

53. Turner, K.M., et al., *The impact of needle and syringe provision and opiate substitution therapy on the incidence of hepatitis C virus in injecting drug users: pooling of UK evidence*. *Addiction*, 2011. **106**(11): p. 1978-88.
54. Vickerman, P., et al., *Can needle and syringe programmes and opiate substitution therapy achieve substantial reductions in hepatitis C virus prevalence? Model projections for different epidemic settings*. *Addiction*, 2012. **107**(11): p. 1984-95.
55. Degenhardt, L., et al., *Prevention of HIV infection for people who inject drugs: why individual, structural, and combination approaches are needed*. *Lancet*, 2010. **376**(9737): p. 285-301.
56. Palmateer, N., et al., *Exploring associations between perceived HCV status and injecting risk behaviors among recent initiates to injecting drug use in Glasgow*. *Subst Use Misuse*, 2008. **43**(3-4): p. 375-88.
57. Hagan, H., E.R. Pouget, and D.C. Des Jarlais, *A systematic review and meta-analysis of interventions to prevent hepatitis C virus infection in people who inject drugs*. *J Infect Dis*, 2011. **204**(1): p. 74-83.
58. Linas, B.P., et al., *The hepatitis C cascade of care: identifying priorities to improve clinical outcomes*. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e97317.
59. Durier, N., C. Nguyen, and L.J. White, *Treatment of hepatitis C as prevention: a modeling case study in Vietnam*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e34548.
60. Grebely, J. and G.J. Dore, *Can hepatitis C virus infection be eradicated in people who inject drugs?* *Antiviral Res*, 2014. **104**: p. 62-72.
61. Grebely, J., et al., *Low uptake of treatment for hepatitis C virus infection in a large community-based study of inner city residents*. *J Viral Hepat*, 2009. **16**(5): p. 352-8.
62. Mehta, S.H., et al., *Limited uptake of hepatitis C treatment among injection drug users*. *J Community Health*, 2008. **33**(3): p. 126-33.
63. Iversen, J., et al., *Uptake of hepatitis C treatment among people who inject drugs attending Needle and Syringe Programs in Australia, 1999-2011*. *J Viral Hepat*, 2014. **21**(3): p. 198-207.
64. Gunthard, H.F., et al., *Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel*. *Jama*, 2014. **312**(4): p. 410-25.
65. World Health Organization, *Global Hepatitis Programme, Global partners*. http://www.who.int/hiv/mediacentre/news/hep_calltoaction_new.pdf

Last accessed 10 July 2015. 2014.

66. Aghokeng, A.F., et al., *Extraordinary heterogeneity of virological outcomes in patients receiving highly antiretroviral therapy and monitored with the World Health Organization public health approach in sub-saharan Africa and southeast Asia*. *Clin Infect Dis*, 2014. **58**(1): p. 99-109.
67. Nguyen, L.T., et al., *The cost of antiretroviral treatment service for patients with HIV/AIDS in a central outpatient clinic in Vietnam*. *Clinicoecon Outcomes Res*, 2014. **6**: p. 101-8.
68. Degasperis, E. and A. Aghemo, *Sofosbuvir for the treatment of chronic hepatitis C: between current evidence and future perspectives*. *Hepat Med*, 2014. **6**: p. 25-33.
69. *EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015*. *J Hepatol*, 2015. **63**(1): p. 199-236.
70. *Hepatitis C guidance: AASLD-IDS recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus*. *Hepatology*, 2015. **62**(3): p. 932-54.
71. Kuehn, B.M., *Guideline: New HCV drugs should go to sickest patients*. *Jama*, 2014. **312**(11): p. 1084-5.
72. Davies, A., et al., *Treatment outcomes of treatment-naive Hepatitis C patients co-infected with HIV: a systematic review and meta-analysis of observational cohorts*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e55373.
73. Ford, N., et al., *Chronic hepatitis C treatment outcomes in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis*. *Bull World Health Organ*, 2012. **90**(7): p. 540-50.
74. Naggie, S., et al., *Ledipasvir and Sofosbuvir for HCV in Patients Coinfected with HIV-1*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(8): p. 705-13.
75. Lopez-Dieguez, M., et al., *The natural history of liver cirrhosis in HIV-hepatitis C virus-coinfected patients*. *AIDS*, 2011. **25**(7): p. 899-904.
76. Macias, J., et al., *Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfected with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus*. *Hepatology*, 2009. **50**(4): p. 1056-63.
77. Lo Re, V., 3rd, J.R. Kostman, and V.K. Amorosa, *Management complexities of HIV/hepatitis C virus coinfection in the twenty-first century*. *Clin Liver Dis*, 2008. **12**(3): p. 587-609, ix.
78. Lewden, C., et al., *Changes in causes of death among adults infected by HIV between 2000 and 2005: The "Mortalite 2000 and 2005" surveys (ANRS EN19 and Mortavic)*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2008. **48**(5): p. 590-8.

79. Limketkai, B.N., et al., *Relationship of liver disease stage and antiviral therapy with liver-related events and death in adults coinfecting with HIV/HCV*. *Jama*, 2012. **308**(4): p. 370-8.
80. Gish, R.G., et al., *Liver disease in Viet Nam: screening, surveillance, management and education: a 5-year plan and call to action*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012. **27**(2): p. 238-47.
81. Aspinall, E.J., et al., *Treatment of hepatitis C virus infection among people who are actively injecting drugs: a systematic review and meta-analysis*. *Clin Infect Dis*, 2013. **57 Suppl 2**: p. S80-9.
82. Wolfe, D., et al., *Human rights and access to hepatitis C treatment for people who inject drugs*. *Int J Drug Policy*, 2015. **26**(11): p. 1072-80.
83. Kosack, C.S., S. Nick, and L. Shanks, *Diagnostic accuracy evaluation of the ImmunoFlow HCV rapid immunochromatographic test for the detection of hepatitis C antibodies*. *J Virol Methods*, 2014. **204**: p. 6-10.
84. Fiebig, E.W., et al., *Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection*. *AIDS*, 2003. **17**(13): p. 1871-9.
85. McMichael, A.J., et al., *The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(1): p. 11-23.
86. Brinkhof, M.W., et al., *Evaluation of p24-based antiretroviral treatment monitoring in pediatric HIV-1 infection: prediction of the CD4+ T-cell changes between consecutive visits*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2006. **41**(5): p. 557-62.
87. Knuchel, M.C., et al., *Ultrasensitive quantitative HIV-1 p24 antigen assay adapted to dried plasma spots to improve treatment monitoring in low-resource settings*. *J Clin Virol*, 2006. **36**(1): p. 64-7.
88. Tehe, A., et al., *Quantification of HIV-1 p24 by a highly improved ELISA: an alternative to HIV-1 RNA based treatment monitoring in patients from Abidjan, Cote d'Ivoire*. *J Clin Virol*, 2006. **37**(3): p. 199-205.
89. Rouet, F. and C. Rouzioux, *HIV-1 viral load testing cost in developing countries: what's new?* *Expert Rev Mol Diagn*, 2007. **7**(6): p. 703-7.
90. Mitchell, E.O., et al., *Performance comparison of the 4th generation Bio-Rad Laboratories GS HIV Combo Ag/Ab EIA on the EVOLIS automated system versus Abbott ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo, Ortho Anti-HIV 1+2 EIA on Vitros ECI and Siemens HIV-1/O/2 enhanced on Advia Centaur*. *J Clin Virol*, 2013. **58 Suppl 1**: p. e79-84.
91. Alonso, R., et al., *New automated chemiluminescence immunoassay for simultaneous but separate detection of human immunodeficiency virus antigens and antibodies*. *J Clin Microbiol*, 2014. **52**(5): p. 1467-70.
92. Muhlbacher, A., et al., *Performance evaluation of a new fourth-generation HIV combination antigen-antibody assay*. *Med Microbiol Immunol*, 2013. **202**(1): p. 77-86.
93. Song, E.Y., et al., *Performances of four fourth-generation human immunodeficiency virus-1 screening assays*. *J Med Virol*, 2012. **84**(12): p. 1884-8.
94. Masciotra, S., et al., *Performance of the Alere Determine HIV-1/2 Ag/Ab Combo Rapid Test with specimens from HIV-1 seroconverters from the US and HIV-2 infected individuals from Ivory Coast*. *J Clin Virol*, 2013. **58 Suppl 1**: p. e54-8.
95. Chevaliez, S., et al., *Clinical utility of hepatitis C virus core antigen quantification in patients with chronic hepatitis C*. *J Clin Virol*, 2014. **61**(1): p. 145-8.
96. Judd, A., et al., *Evaluation of a modified commercial assay in detecting antibody to hepatitis C virus in oral fluids and dried blood spots*. *J Med Virol*, 2003. **71**(1): p. 49-55.
97. Fachiroh, J., et al., *Dried-blood sampling for epstein-barr virus immunoglobulin G (IgG) and IgA serology in nasopharyngeal carcinoma screening*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(4): p. 1374-80.
98. Tuailon, E., et al., *Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing*. *Hepatology*, 2010. **51**(3): p. 752-8.
99. De Crignis, E., et al., *HIV-1 and HCV detection in dried blood spots by SYBR Green multiplex real-time RT-PCR*. *J Virol Methods*, 2010. **165**(1): p. 51-6.
100. Parker, S.P., H.I. Khan, and W.D. Cubitt, *Detection of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spot samples from mothers and their offspring in Lahore, Pakistan*. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(6): p. 2061-3.
101. Dachraoui, R., et al., *RNA amplification of the HIV-1 Pol and env regions on dried serum and plasma spots*. *HIV Med*, 2008. **9**(7): p. 557-61.
102. Dachraoui, R., et al., *Monitoring of HIV-1 resistance in Tunisia (North Africa) with a dried plasma spot strategy*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2008. **47**(4): p. 522-5.
103. Beck, I.A., et al., *Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 subtype B DNA in dried blood samples for diagnosis in infants in the field*. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(1): p. 29-33.

104. Johannessen, A., et al., *Dried blood spots perform well in viral load monitoring of patients who receive antiretroviral treatment in rural Tanzania*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(6): p. 976-81.
105. Hamers, R.L., et al., *Dried fluid spots for HIV type-1 viral load and resistance genotyping: a systematic review*. Antivir Ther, 2009. **14**(5): p. 619-29.
106. Bertagnolio, S., et al., *HIV-1 drug resistance surveillance using dried whole blood spots*. Antivir Ther, 2007. **12**(1): p. 107-13.
107. Hearps, A.C., et al., *Stability of dried blood spots for HIV-1 drug resistance analysis*. Curr HIV Res, 2010. **8**(2): p. 134-40.
108. Mwaba, P., et al., *Whole blood versus plasma spots for measurement of HIV-1 viral load in HIV-infected African patients*. Lancet, 2003. **362**(9401): p. 2067-8.
109. Stevens, W.S., L.E. Scott, and S.M. Crowe, *Quantifying HIV for monitoring antiretroviral therapy in resource-poor settings*. J Infect Dis, 2010. **201** Suppl 1: p. S16-26.
110. Mbida, A.D., et al., *Measure of viral load by using the Abbott Real-Time HIV-1 assay on dried blood and plasma spot specimens collected in 2 rural dispensaries in Cameroon*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2009. **52**(1): p. 9-16.
111. Reigadas, S., et al., *Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood and plasma spots*. J Virol Methods, 2009. **161**(1): p. 177-80.
112. Childs, E.A., et al., *Plasma viral load and CD4 lymphocytes predict HIV-associated dementia and sensory neuropathy*. Neurology, 1999. **52**(3): p. 607-13.
113. Amellal, B., C. Katlama, and V. Calvez, *Evaluation of the use of dried spots and of different storage conditions of plasma for HIV-1 RNA quantification*. HIV Med, 2007. **8**(6): p. 396-400.
114. Garrido, C., et al., *Subtype variability, virological response and drug resistance assessed on dried blood spots collected from HIV patients on antiretroviral therapy in Angola*. J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(3): p. 694-8.
115. Johannessen, A., et al., *HIV-1 drug resistance testing from dried blood spots collected in rural Tanzania using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(2): p. 260-4.
116. Kania, D., et al., *Combining rapid diagnostic tests and dried blood spot assays for point-of-care testing of human immunodeficiency virus, hepatitis B and hepatitis C infections in Burkina Faso, West Africa*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(12): p. E533-41.
117. Soulier, A., et al., *Dried Blood Spots: A Tool to Ensure Broad Access to Hepatitis C Screening, Diagnosis, and Treatment Monitoring*. J Infect Dis, 2015.
118. Castera, L. and M. Pinzani, *Non-invasive assessment of liver fibrosis: are we ready?* Lancet, 2010. **375**(9724): p. 1419-20.
119. Castera, L., *Invasive and non-invasive methods for the assessment of fibrosis and disease progression in chronic liver disease*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(2): p. 291-303.
120. Bedossa, P. and T. Poynard, *An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group*. Hepatology, 1996. **24**(2): p. 289-93.
121. Imbert-Bismut, F., et al., *Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study*. Lancet, 2001. **357**(9262): p. 1069-75.
122. Poynard, T., et al., *Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C*. Comp Hepatol, 2004. **3**(1): p. 8.
123. Cales, P., et al., *A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis*. Hepatology, 2005. **42**(6): p. 1373-81.
124. Wai, C.T., et al., *A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C*. Hepatology, 2003. **38**(2): p. 518-26.
125. Park, G., D.B. Jones, and P. Katelaris, *Value of AST/ALT ratio as fibrotic predictor in chronic hepatitis C*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(7): p. 1623-4; author reply 1624.
126. Sebastiani, G., et al., *Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2006. **44**(4): p. 686-93.
127. Sterling, R.K., et al., *Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection*. Hepatology, 2006. **43**(6): p. 1317-25.
128. Castera, L. and P. Bedossa, *How to assess liver fibrosis in chronic hepatitis C: serum markers or transient elastography vs. liver biopsy?* Liver Int, 2011. **31** Suppl 1: p. 13-7.
129. Cadranet, J.F., P. Rufat, and F. Degos, *Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF)*. Hepatology, 2000. **32**(3): p. 477-81.

130. Sanyal, A.J., *Role of insulin resistance and hepatic steatosis in the progression of fibrosis and response to treatment in hepatitis C*. *Liver Int*, 2011. **31 Suppl 1**: p. 23-8.
131. Kurosaki, M., et al., *A predictive model of response to peginterferon ribavirin in chronic hepatitis C using classification and regression tree analysis*. *Hepatology*, 2010. **40**(4): p. 251-60.
132. Romero, A.I., et al., *Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection*. *J Infect Dis*, 2006. **194**(7): p. 895-903.
133. Zeremski, M., et al., *Interferon gamma-inducible protein 10: a predictive marker of successful treatment response in hepatitis C virus/HIV-coinfected patients*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2007. **45**(3): p. 262-8.
134. Falconer, K., et al., *IP-10 predicts the first phase decline of HCV RNA and overall viral response to therapy in patients co-infected with chronic hepatitis C virus infection and HIV*. *Scand J Infect Dis*, 2010. **42**(11-12): p. 896-901.
135. Casrouge, A., et al., *Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(1): p. 308-17.
136. Cosimi, L.A., et al., *Integrated clinical and quality improvement coaching in Son La Province, Vietnam: a model of building public sector capacity for sustainable HIV care delivery*. *BMC Health Serv Res*, 2015. **15**: p. 269.
137. Avihingsanon, A., et al., *Advanced liver fibrosis by transient elastography, fibrosis 4, and alanine aminotransferase/platelet ratio index among Asian hepatitis C with and without human immunodeficiency virus infection: role of vitamin D levels*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014. **29**(9): p. 1706-14.
138. Lau, G.K., et al., *Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(26): p. 2682-95.
139. Marcellin, P., et al., *Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(12): p. 1206-17.
140. Hadziyannis, S.J., *Use of alpha-interferon in the treatment of chronic delta hepatitis*. *J Hepatol*, 1991. **13 Suppl 1**: p. S21-6.
141. Farci, P., et al., *Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(7): p. 1740-9.
142. Lau, D.T., et al., *Resolution of chronic delta hepatitis after 12 years of interferon alfa therapy*. *Gastroenterology*, 1999. **117**(5): p. 1229-33.
143. Yurdaydin, C., et al., *A pilot study of 2 years of interferon treatment in patients with chronic delta hepatitis*. *J Viral Hepat*, 2007. **14**(11): p. 812-6.
144. Castelnau, C., et al., *Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up*. *Hepatology*, 2006. **44**(3): p. 728-35.
145. Farci, P., *Treatment of chronic hepatitis D: New advances, old challenges*. *Hepatology*, 2006. **44**(3): p. 536-9.
146. Farci, P., et al., *Treatment of chronic hepatitis D*. *J Viral Hepat*, 2007. **14 Suppl 1**: p. 58-63.
147. Yurdaydin, C., et al., *Natural history and treatment of chronic delta hepatitis*. *J Viral Hepat*, 2010. **17**(11): p. 749-56.
148. Janssen, H.L., et al., *Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial*. *Lancet*, 2005. **365**(9454): p. 123-9.
149. Sonneveld, M.J., et al., *Serum levels of interferon-gamma-inducible protein 10 and response to peginterferon therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B*. *J Hepatol*, 2013. **58**(5): p. 898-903.
150. Lan, P.T., et al., *Reproductive tract infections including sexually transmitted infections: a population-based study of women of reproductive age in a rural district of Vietnam*. *Sex Transm Infect*, 2008. **84**(2): p. 126-32.
151. Duong, T.H., et al., *Risk factors for hepatitis B infection in rural Vietnam*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2009. **10**(1): p. 97-102.
152. Nguyen, V.T., M.L. McLaws, and G.J. Dore, *Prevalence and risk factors for hepatitis C infection in rural north Vietnam*. *Hepatology*, 2007. **1**(3): p. 387-93.
153. Dunford, L., et al., *A multicentre molecular analysis of hepatitis B and blood-borne virus coinfections in Viet Nam*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e39027.
154. Hall, N., et al., *High prevalence of hepatitis delta virus among persons who inject drugs, Vietnam*. *Emerg Infect Dis*, 2015. **21**(3): p. 540-3.