

VALIDITE D'UN TEST ELISA POUR LA NUMERATION DES LYMPHOCYTES T CD4⁺ ET VALIDITE DE LA NUMERATION DES LYMPHOCYTES TOTAUX DANS L'EVALUATION DES ETATS D'IMMUNODEFICIENCE PAR VIH

par

A. LOUA¹, L. KESTENS², G. VANHAM², L. BOEL²,
R. COLEBUNDERS³ & P. GIGASE²

¹ Département de Biologie Clinique, CHU Ignace DEEN, BP 585, Conakry, Guinée

² Laboratoire de Pathologie et d'Immunologie, ³ Service Médical, Institut de médecine Tropicale,
Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen 1, Belgique

Résumé — Un test ELISA commercial (TRAx CD4, T Cell Diagnostics USA) pour la numération de lymphocytes T CD4⁺ est évalué par rapport à la Cytométrie en Flux, technique de référence, chez 105 patients VIH positifs et 6 patients VIH négatifs.

La sensibilité et la spécificité de l'ELISA dans l'identification des sujets VIH positifs avec moins de 200 lymphocytes T CD4/μl ont été déterminées en utilisant la courbe ROC. La reproductibilité du test ELISA a été analysée sur 40 échantillons. Le coefficient de corrélation entre l'ELISA et la Cytométrie en Flux était de 0.79 (p<0.001). Le test ELISA surestime systématiquement les lymphocytes T CD4⁺ chez les séropositifs et tend à les sous-estimer chez les séronégatifs. L'apport des CD4 monocytaires n'est pas suffisant pour expliquer cette surestimation, peut-être due au CD4 circulant. Les seuils obtenus par la courbe ROC pour identifier les sujets VIH positifs avec effectivement moins de 200 lymphocytes T CD4/μl et qui maximalisent la spécificité et la sensibilité, sont de 400 équivalents cellules pour l'ELISA (sensibilité et spécificité égales à 80%), et de 1450 lymphocytes/μl pour les lymphocytes totaux absolus (sensibilité et spécificité égales à 75%). La courbe ROC indique que les seuils de 300 équivalents cellules pour l'ELISA et de 1100 pour les lymphocytes totaux permettent de maximaliser la spécificité sans perte significative de la sensibilité.

KEYWORDS: TRAx CD4; ELISA; Flow Cytometry; HIV; CD4⁺ T Lymphocytes

Introduction

Le Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) est la manifestation clinique la plus sévère de la perturbation majeure du système immunitaire due à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (11). La maladie touche une grande proportion des populations des pays en voie de développement (7).

La pathogenèse du SIDA est, du moins en partie, attribuable à la diminution des lymphocytes T porteurs d'un marqueur spécifique, la molécule CD4. La présence de cette molécule fait des lymphocytes T CD4⁺ la cible privilégiée du VIH. La détermination quantitative des lymphocytes T CD4⁺ est un élément important dans le suivi du statut immunitaire des sujets infectés par le VIH (2).

Jusqu'à présent, la numération des lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique s'effectue essentiellement par la Cytométrie en Flux après marquage des cellules par des anticorps monoclonaux couplés à des fluoro-

chromes (2). Cette méthode est sensible et précise mais nécessite un équipement coûteux et un personnel spécialement entraîné. Ces inconvénients limitent son utilisation dans les pays en voie de développement, pourtant les plus touchés. La numération des lymphocytes totaux est simple mais sa validité dans le dépistage des états d'immunodéficience reste à déterminer.

L'objectif de ce travail est de déterminer les performances d'une méthode commerciale d'ELISA simplifiée pour la numération des lymphocytes T CD4⁺ d'une part et celles de la numération des lymphocytes totaux d'autre part par rapport à la Cytométrie en Flux, méthode de référence, d'évaluer les sensibilités et les spécificités de l'ELISA et de la numération des lymphocytes totaux au seuil de 200 lymphocytes T CD4⁺/μl, critère de la définition du SIDA (3), enfin d'examiner la stabilité des échantillons pendant la conservation du sang. Le but était de trouver une alternative concordante, fiable et applicable dans les pays en voie de développement.

Matériel et méthodes

Les sangs testés

Les échantillons de sang proviennent de 105 patients infectés par le VIH1 et de 6 patients séronégatifs de la clinique de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers. Le sang a été prélevé dans des tubes plastiques contenant le sel tripotassique d'éthylène diamine tétracétique (K³EDTA) comme anticoagulant. Sur les 111 échantillons de sang recueillis, 71 ont été analysés en simple et 40 en double pour l'étude de la reproductibilité du test ELISA commercial. Quatre échantillons ont servi à l'étude de la stabilité des lymphocytes T CD4⁺ au cours de la conservation du sang à la température du laboratoire (22°C-26°C) de 0 à 7 jours après le prélèvement.

Méthodes analytiques

Numération des lymphocytes T CD4

Les échantillons de sang ont été analysés en aveugle à la fois à l'aide du test commercial et de la Cytométrie en Flux.

Le test commercial dose les protéines CD4 totales grâce au principe ELISA en sandwich sur du sang complet à l'aide de TRAx CD4 (T Cell Diagnostics, MA, USA) (10). La quantité de CD4 qui correspond à la quantité de CD4 présent sur une cellule est considérée comme 1 équivalent cellule. Le sang est additionné d'un réactif de lyse totale de toutes les cellules puis congelé à -80°C. Le lysat est ensuite analysé selon la procédure donnée par le fabricant. Le coffret de réactif se conserve entre 2°C et 8°C.

La Cytométrie en Flux: Des anticorps monoclonaux marqués par un fluorochrome (la fluorescéine ou la phycoérythrine) sont incubés avec du sang complet. Ils se lient spécifiquement aux antigènes de surface des leucocytes. Le sang ainsi marqué est ensuite traité par une solution de lyse spécifique pour les érythrocytes. Les globules blancs recueillis par centrifugation sont lavés, fixés et analysés par un Cytomètre en Flux (FACSCAN Becton Dickinson) (6).

Un panel composé de 2 combinaisons d'anticorps monoclonaux (Becton Dickinson) est utilisé: IgG1/IgG2a (contrôle négatif), CD3/CD4 (pour différencier les cellules T CD4 qui sont CD3⁺CD4⁺ des monocytes qui sont CD3⁻CD4⁺).

Analyse de l'influence des CD4 d'origine monocyttaire

En vue de corriger l'apport des CD4 monocytaires dans les résultats de l'ELISA, le nombre absolu des monocytes/ μ l de sang de nos échantillons est déterminé par un analyseur hématologique TECHNICON H*1. La densité des molécules CD4 sur la membrane des monocytes et des lymphocytes T CD4⁺ est évaluée sur dix échantillons de sang VIH positifs par la Cytométrie en Flux et exprimée en Unités Arbitraires de Fluorescence (UAF) sur une échelle logarithmique de 1 à 10⁴. Un facteur de correction est calculé en divisant le nombre absolu de monocytes par le rapport moyen par cellule.

Numération des lymphocytes totaux

Les lymphocytes totaux sont déterminés dans les mêmes échantillons de sang sur l'analyseur hématologique TECHNICON H*1.

Méthodes d'analyses statistiques

L'évaluation statistique de nos résultats est effectuée sur le logiciel informatique Epiinfo version 5.0.

La concordance entre l'ELISA CD4 et la Cytométrie en Flux est évaluée par l'analyse de la moyenne de la différence entre les nombres absolus de lymphocytes T CD4⁺ fournis par les 2 méthodes, par le test de Wilcoxon pour échantillons appariés (5) et par une régression linéaire (4).

La sensibilité et la spécificité du test ELISA et des lymphocytes totaux par rapport à la Cytométrie en Flux sont déterminées sur la base du critère de définition du SIDA du CDC (3), qui prend en compte le seuil de 200 lymphocytes T CD4⁺/ μ l.

La courbe ROC (Receiver Operating Characteristic curve) est utilisée pour déterminer les "cut-off" optimaux du test ELISA et de la numération des lymphocytes absolus en fonction du critère du seuil de 200 lymphocytes T CD4⁺ mesurés par la Cytométrie en Flux (1).

La reproductibilité de l'ELISA est évaluée par le coefficient de variation entre 2 numérations successives. Une variation de 10% est considérée comme acceptable.

La stabilité des lymphocytes T CD4 évalués par l'ELISA est indiquée par le coefficient de variation des numérations effectuées sur les échantillons de sang conservés à la température du laboratoire.

Résultats

L'analyse des 111 échantillons montre que la technique ELISA donne des chiffres absolus de lymphocytes T CD4⁺ plus élevés que ceux de la Cytométrie en Flux. La médiane est de 431 cellules/ μ l pour l'ELISA (IC₉₅ = 383 - 479) et de 306 cellules/ μ l pour la Cytométrie en Flux (IC₉₅ = 256 - 356).

Concordance entre ELISA et Cytométrie en Flux

La moyenne de la différence observée entre les 2 méthodes pour les 111 échantillons est égale à 122 cellules ($IC_{95} = 90 - 154$). Elle est significativement différente de zéro ($p < 0.05$). Elle est de 141 cellules ($IC_{95} = 127 - 155$) pour les 105 patients VIH positifs, et de -96 cellules ($IC_{95} = -187$ à -5) pour les 6 patients VIH négatifs.

La régression linéaire de l'ELISA sur la Cytométrie en Flux pour les 105 données des patients VIH positifs donne une droite qui a pour équation $Y = 0,88X - 80$ et un coefficient de corrélation " r " = 0,79 ($p < 0.001$) (figure 1).

Indicateurs de validité de L'ELISA

Les indicateurs de validité du test ELISA et de la numération des lymphocytes totaux sont déterminés par rapport à la Cytométrie en Flux vis-à-vis du critère du seuil de 200 lymphocytes T CD4⁺/ μ l. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

TABLEAU 1
Sensibilité et spécificité de l'ELISA par rapport au seuil de 200 CD4/ μ l mesuré par la Cytométrie en Flux.

| CYTOMETRIE EN FLUX (CD4/ μ l) . | | | |
|-------------------------------------|-------|------|-------|
| ELISA (CD4/ μ l) | < 200 | >200 | Total |
| < 200 | 14 | 0 | 14 |
| > 200 | 16 | 71 | 97 |
| Total | 40 | 71 | 111 |

Sensibilité 35%; Spécificité 100%

TABLEAU 2
Sensibilité et spécificité de la numération des lymphocytes totaux par rapport au seuil de 200 CD4/ μ l mesuré par la Cytométrie en Flux.

| CYTOMETRIE EN FLUX (CD4/ μ l) . | | | |
|-------------------------------------|-------|------|-------|
| LYMPHOCYTES / μ l) | < 200 | >200 | Total |
| < 1.000 | 19 | 2 | 21 |
| > 1.000 | 20 | 69 | 89 |
| Total | 39 | 71 | 110 |

Sensibilité 49%; Spécificité 97%

Ces résultats montrent qu'avec un seuil de 200 équivalents cellules, l'ELISA est très spécifique mais peu sensible. Néanmoins, une augmentation du seuil de 200 à 300 donne une sensibilité supérieure (de 49% à 68%) sans une perte importante de spécificité (95%).

En prenant un seuil de 1000 lymphocytes/ μ l le chiffre des lymphocytes totaux est plus sensible que l'ELISA et garde la même spécificité.

La courbe ROC de l'ELISA et des lymphocytes totaux (Figure 2) montre que leurs seuils qui maximalisent conjointement la sensibilité et la spécificité

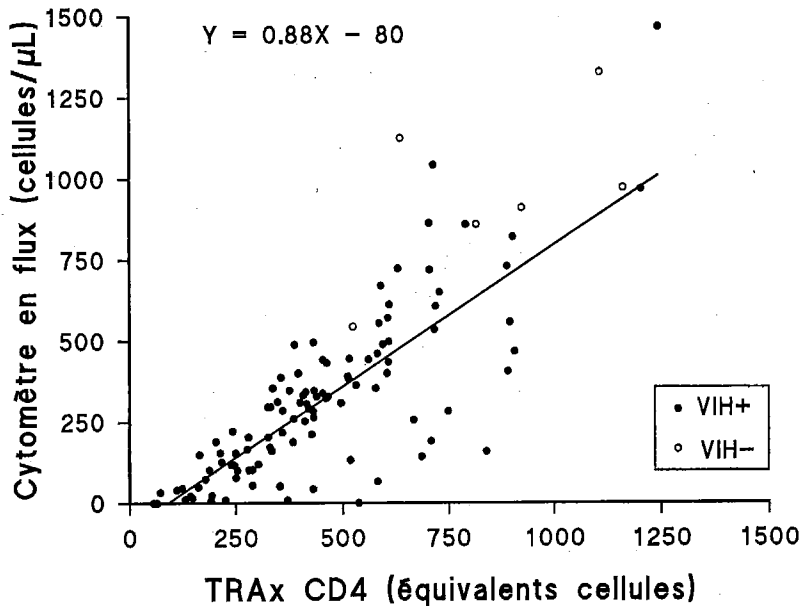


Figure 1

Régression entre le test ELISA CD4 et la Cytométrie en Flux ($r = 0.79$, $p < 0.001$, $n = 105$ VIH positifs).

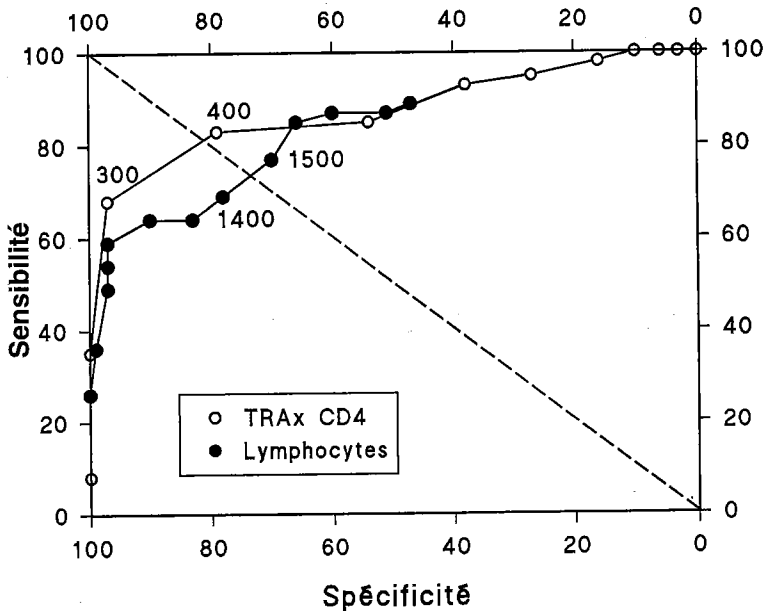


Figure 2

Courbe ROC indiquant les seuils optimaux de l'ELISA CD4 et des lymphocytes totaux chez 111 patients.

sont respectivement de 400 équivalents cellules ELISA (sensibilité et spécificité égales à 80%) et de 1.450 lymphocytes/ μ l (sensibilité et spécificité égales à 75%).

Analyse de la reproductibilité

La reproductibilité de l'ELISA est analysée par 2 numérations successives de lymphocytes T CD4⁺ sur 40 échantillons de sang. Il n'y a pas de différence significative. Le coefficient de variation entre les 2 numérations successives est de 10,2%.

Stabilité des CD4 au cours de la conservation du sang

L'étude de la stabilité des cellules CD4 avec la méthode au TRAx CD4 au cours de la conservation du sang à la température du laboratoire (22°C-26°C) montre, pour les 4 échantillons analysés, une augmentation des CD4 les 2 premiers jours puis une diminution les jours suivants (Figure 3). Les coefficients de variation pour les 4 échantillons sont respectivement de 28%, 19%, 20% et 20%.

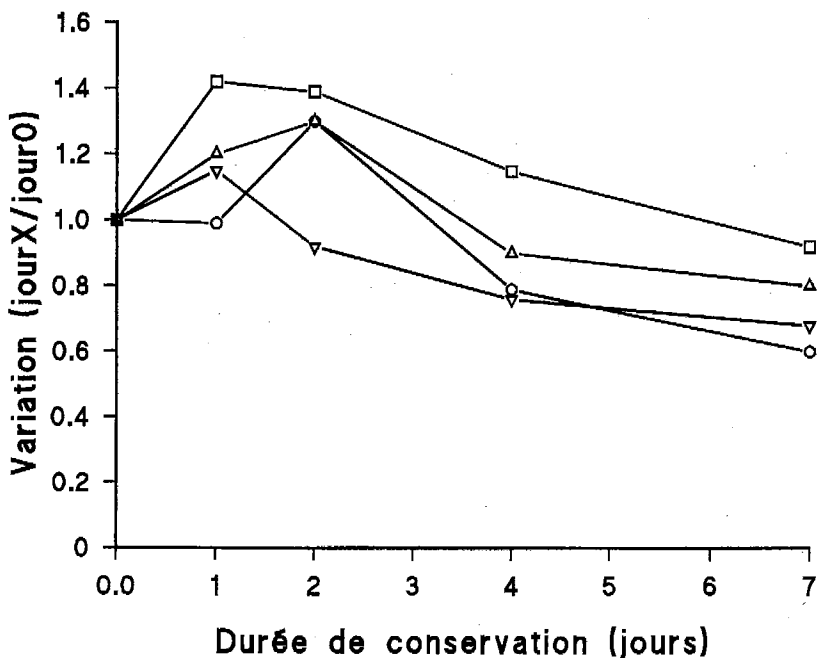


Figure 3

Variation des lymphocytes T CD4 mesurés par l'ELISA dans 4 échantillons de sang conservés à la température du laboratoire.

Discussion

L'intérêt des études portant sur les numérations des lymphocytes T CD4⁺ au cours de l'infection VIH est considérable. Ce paramètre est un critère important de maladie dans la définition la plus récente (1993) du SIDA par le CDC (3). Les techniques actuelles de numérations de ces lymphocytes sont cependant compliquées et très chères, ce qui limite leur utilisation dans les pays en voie de développement (7). Le chiffre absolu des lymphocytes est facile à obtenir mais sa valeur en tant que marqueur de pronostic doit être évaluée.

Dans le présent travail, les résultats d'une méthode simplifiée ELISA commerciale pour la numération de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique ont été comparés à ceux de la Cytométrie en Flux (méthode de référence).

Pour les échantillons VIH positifs, la technique ELISA donne des valeurs supérieures à la Cytométrie en Flux. La correction de l'influence du facteur CD4 monocytaire ne modifie pas les résultats observés. Cela suggère que la surestimation des lymphocytes T CD4 par l'ELISA pourrait être due à des CD4 solubles. En effet, des taux élevés de CD4 soluble ont été détectés chez des patients infectés par le VIH (8, 9). L'effet des CD4 solubles pourrait être réduit en améliorant la technique ELISA par un lavage préalable du sang en eau physiologique mais ceci compliquerait la technique.

Pour les 6 échantillons VIH négatifs, la moyenne de la différence négative indique que l'ELISA a tendance à sous-estimer le nombre des lymphocytes T CD4⁺ chez les patients VIH négatifs. Cette observation doit être nuancée parce qu'elle est basée sur un trop petit nombre d'échantillons.

La courbe ROC indique que, pour le même échantillon, la numération des lymphocytes totaux a des sensibilités et spécificités proches de celles de l'ELISA. Cependant, la validité de cette numération par rapport aux cellules T CD4 mesurées par la Cytométrie en Flux, reste à évaluer dans les pays en voie de développement.

Le test ELISA est malheureusement cher. Le coffret pour 96 déterminations coûte environ 1,000 US\$ soit 10.5 US\$ par test. Un tel coût rend le test inaccessible à la plupart des pays en voie de développement. La réalisation en double multiplie évidemment le coût par deux. Dans cette étude, l'analyse en simple a cependant donné des résultats fiables.

Malgré le coût et les quelques résultats discordants observés, la technique ELISA a le grand avantage de la flexibilité par la possibilité de congeler le sang lysé ce qui permet de réaliser des analyses en série, mais exige en revanche un congélateur ou un réfrigérateur. Le jugement sur l'utilité de l'ELISA en vue d'un traitement sélectif dépendra évidemment du seuil utilisé, de la prévalence de l'immunodéficience avancée chez les patients VIH positifs, et de la nature et des caractéristiques du traitement envisagé.

La numération des lymphocytes totaux est une alternative très accessible à condition que comptage et formule sanguine soient réalisés convenablement.

Validity of an ELISA test for CD4⁺ T lymphocytes enumeration and validity of total lymphocyte counts in assessing immune deficiency in HIV infection

Summary — A newly available commercial ELISA (TRAx CD4, T Cell Diagnostics USA) for enumerating CD4⁺ T lymphocytes has been evaluated with blood samples of 105 HIV seropositive and 6 seronegative subjects. Results from the flow cytometric analysis were used as reference. The sensitivity and specificity of the ELISA to identify HIV seropositive subjects having less than 200 CD4⁺ T lymphocytes/ μ l were assessed and studied using the ROC curve. The reproducibility of the ELISA test was analyzed on 40 samples.

The results of the ELISA correlated well with these of the flow cytometric analysis ($r = 0.79, p < 0.001$). However, the ELISA test tends to overestimate the true CD4 count in HIV seropositives. This overestimation could not be explained by the aspecific contribution of monocytic CD4. The threshold for identifying HIV seropositive subjects with less than 200 CD4⁺ T lymphocytes with a maximum sensitivity and specificity was determined with ROC curve and equalled 400 cell equivalents with the ELISA (sensitivity and specificity were equal to 80%) and 1,450 lymphocytes/ μ l with the total absolute lymphocyte count (sensitivity and specificity were equal to 75%). Using this curve, a threshold of 300 cell equivalents for the ELISA test and of 1,100 lymphocytes/ μ l for the absolute lymphocyte count was shown to maximize the specificity (>95%) without a significant loss of sensitivity.

Validiteit van een ELISA test voor het tellen van CD4⁺ T lymphocyten en validiteit van het totaal aantal lymphocyten voor de evaluatie van immuundeficiëntie bij HIV infectie

Samenvatting — Een nieuwe commerciële ELISA test (TRAx CD4, T Cell Diagnostics USA) voor het bepalen van het absoluut aantal CD4⁺ T lymphocyten werd geëvalueerd op bloedmonsters afkomstig van 105 HIV seropositive en 6 seronegatieve personen. De flow cytometrische bepaling werd als referentie gebruikt.

De gevoeligheid en de specificiteit van de ELISA om HIV seropositive personen met minder dan 200 CD4⁺ T lymphocyten/ μ l bloed te herkennen, werd bepaald en bestudeerd met de ROC curve. De reproduceerbaarheid van deze ELISA werd geanalyseerd aan de hand van 40 bloedmonsters.

De resultaten van de ELISA correleerden goed met deze van de flow cytometrische bepaling ($r = 0.79, p < 0.001$). De ELISA test vertoonde de eigenschap de werkelijke waarde te overschatten bij HIV seropositive personen. Deze overschatting kon niet verklaard worden door de aspecifieke bijdrage van CD4 moleculen afkomstig van monocyten. De drempel waarbij men met een maximale gevoeligheid en specificiteit HIV seropositive personen kon aanduiden met minder dan 200 CD4⁺ T lymphocyten werd bepaald met de ROC curve en resulteerde in een waarde van 400 celevaivalenten voor de ELISA (sensitiviteit en specificiteit waren beiden gelijk aan 80%) en in een waarde van 1450 lymphocyten voor de bepaling van het totaal absoluut aantal lymphocyten (sensitiviteit en specificiteit waren beiden gelijk aan 75%). Aan de hand van de ROC curve kon bepaald worden dat drempels van 300 celevaivalenten voor de ELISA en een drempel van 1100 lymphocyten voor de telling van het totaal aantal lymphocyten de specificiteit van de bepaling kunnen opdrijven tot meer dan 95% zonder significant verlies aan gevoeligheid.

Reçu pour publication le 20 décembre 1993.

REFERENCES

1. Altman, DG: Practical statistics for medical research. Chapman and Hall, 1991, pp. 417-418.
2. Centers for Disease Control: Guidelines for the performance of CD4⁺ T-Cell determinations in persons with Human Immunodeficiency Virus infections. MMWR 1992, 1, 1-17.
3. Centers for Disease Control: 1993 Revised Classification System for HIV infection and Expanded Surveillance Case definition for AIDS among Adolescents and Adults. MMWR 1992, 41, 1-19.
4. Grenier B: Les courbes ROC. *in* La décision médicale. Analyse et stratégie de la décision dans la pratique médicale. Paris: Masson édition, 1990, 46-55.
5. Kamoun P: Méthodes statistiques. *in* Appareils et méthodes en biochimie. Flammarion Médecine Sciences 3^e édition, 1987.
6. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV: Application of Flow cytometry to the study of HIV infections. AIDS 1990, 4, 479-497.
7. Organisation Mondiale de la Santé. La pandémie mondiale du VIH/SIDA: situation actuelle. Relev. Epidémiol. Hebdom. 1993, 68, 11.
8. Peakman M, Senaldi G, Foote N, McManus TJ, Vergani D: Naturally occurring soluble CD4 in patients with human immunodeficiency virus infection. J. Infect. Dis. 1992, 165, 799-804.
9. Reddy MM, Vodian M, Grieco MH: Elevated levels of CD4 antigen in sera of human immunodeficiency virus-infected populations. J. Clin. Microbiol. 1990, 28, 1744-1746.
10. T-CELL DIAGNOSTIC. TRAx (Total Receptor Assay) CD4. Clinical Laboratory International 1993, 17 (1/2).
11. Teillaud JL: Le déficit immunitaire lié au Virus d'Immunodéficience Humaine. Rétrovirus 1988, 2, 73-84.