



INTÉRÊT DES PRÉLÈVEMENTS SUR BUVARD

5^e réunion viro-clinique inter-COREVIH
« VIH, cultures et thérapeutiques »
Marie Leoz, 23 mars 2013

PRÉLÈVEMENT SUR BUVARD : C'EST QUOI? POURQUOI?

- Mode alternatif de transport et stockage de prélèvements (sang, plasma, sérum)



- Déposer
- Sécher
- Conserver en sachet+dessicant

- Avantages logistiques par rapport au tube!!!
 - Faible encombrement
 - Transport/Conservation possible à T° ambiante
 - Risque infectieux



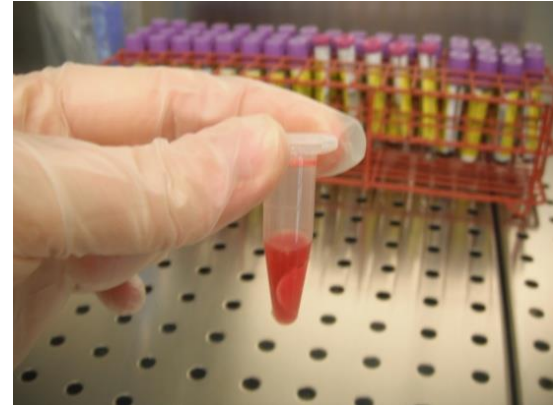
EXEMPLES D'APPLICATIONS DU PRÉLÈVEMENT SUR BUVARD

- Test de Guthrie (depuis les années 60) : dépistage précoce de plusieurs pathologies chez le nouveau-né
- Déclaration obligatoire du VIH : surveillance virologique par le laboratoire CNR (infections récentes, diversité des variants)
- Dans les pays du Sud : faciliter la collecte de prélèvements chez les patients vivant dans des zones rurales ou des villes éloignées des centres de référence

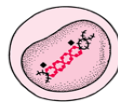


ANALYSES VIH À PARTIR D'UN SPOT DE SANG SÉCHÉ : EN PRATIQUE...

- Élu­tion du spot de sang séché dans un tampon approprié



- L'éluat peut être utilisé directement en sérologie ou après extraction ARN / ADN en biologie moléculaire



BEAUCOUP D'ÉTUDES...

- Suivi de la Charge Virale à partir de buvards
- Séquençage de Résistance à partir de buvards
 - Pour étudier la transmission de mutations de résistance (étude OMS)
 - Pour le suivi du patient
- Revues par **Asgeir et al.** en 2010 (*Bioanalysis*) et 2009 (*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*)
 - Hétérogénéité des méthodes utilisées:
 - volume du spot,
 - conditions de conservation,
 - phase d'éluion,
 - méthode d'extraction des acides nucléiques,
 - traitement par DNase,
 - technique de charge virale / séquençage



PEU D'APPLICATIONS!

- Peu de réelles mises en place de suivi de patients (CV, séquençage de résistance) via buvard
- Et le dépistage???
 - Enfants nés de mère HIV testés par DGV sur buvard en Afrique du Sud
 - Peu d'études sérologiques à partir de buvards, qui pourraient pourtant permettre de limiter le frein au dépistage!



LES BUVARDS AU LABO DE ROUEN

- 1^{ère} description de faisabilité de l'analyse des résistances à partir de spots
- Applications sérologiques sur nouveaux diagnostics
- Limites d'amplification de l'ARN viral
- Application sur le terrain (envoi Sud-Nord)
- Application Esther CHU pédiatrique Ouagadougou depuis 2007

HIV-1 resistance genotyping on dried serum spots

Jean-Christophe Plantier^a, Raoudha Dachraoui^a, Véronique Lemée^a, Marie Gueudin^a, Françoise Borsa-Lebas^b, François Caron^b and François Simon^a

AIDS 2005, 19:391–397

Monitoring the Dynamics of the HIV Epidemic Using Assays for Recent Infection and Serotyping among New HIV Diagnoses: Experience after 2 Years in France

The Journal of Infectious Diseases 2007;196:377–83

Caroline Semaille,^{1a} Francis Barin,^{2a} Françoise Cazein,¹ Josiane Pillonel,¹ Florence Lot,¹ Denys Brand,² Jean-Christophe Plantier,² Pascale Bernillon,¹ Stéphane Le Vu,¹ Roselyne Pinget,¹ and Jean-Claude Desenclos¹

RNA amplification of the HIV-1 *Pol* and *env* regions on dried serum and plasma spots

R Dachraoui,¹ D Brand,² S Brunet,² F Barin² and J-C Plantier¹

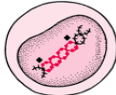

HIV Medicine (2008), 9, 557–561

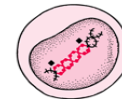
Monitoring of HIV-1 Resistance in Tunisia (North Africa) With a Dried Plasma Spot Strategy

J Acquir Immune Defic Syndr • Volume 47, Number 4, April 1, 2008



LES BUVARDS AU LABO DE ROUEN

- Étude Virologie - SMIT CHU Rouen
 - 98 patients (90 VIH-1, 1 VIH-2 et 7 VIH nég)
 - 6 spots de 75 µL de sang total veineux, conservés 7 jours à +20-25°C
 - Analyses sérologiques :
 - test ELISA générique maison + test rapide Determine (Abbott)
 - Analyses moléculaires :
 - Dépistage Génomique Viral (ADN proviral intégré)
 - Séquençage de résistance protéase + RT (ARN viral)
- Résultats
 - Sérologiques: conform  statut du patient
 - DGV: 98% de positifs
 - Séquençage: amplification pour les CV > 2000cop/mL 
 - Importance d'éliminer l'ADN résiduel (traitement DNase)



PROJET SPOC: SPOT DE SANG CAPILLAIRE

- Spot de sang capillaire prélevé au bout du doigt :

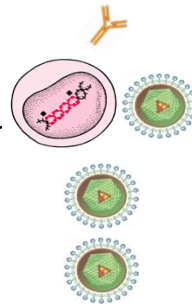


- Prélèvement peu « technique » pouvant être délocalisé : direct, sans matériel spécifique pour la prise de sang ou la décantation par centrifugation



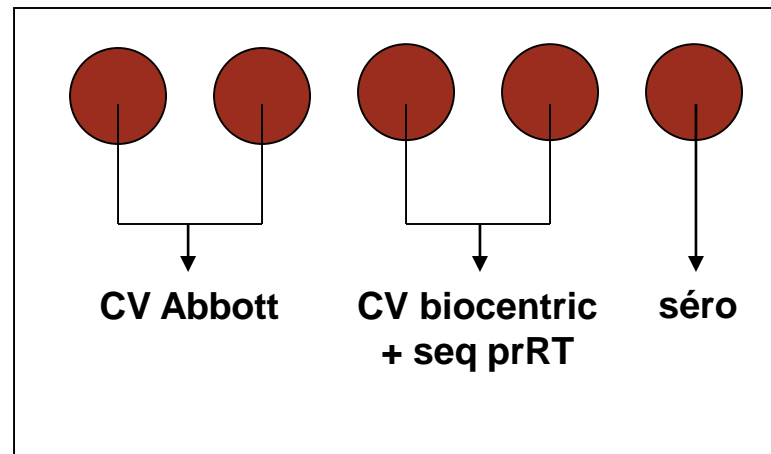
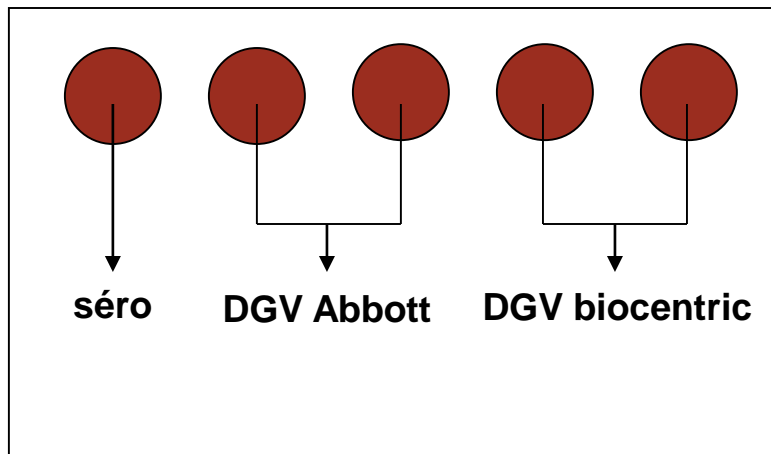
PROJET SPOC: INTÉRÊT DE L'ÉTUDE

- Comparer les résultats obtenus à partir de:
 - Spots de sang capillaire prélevé au bout du doigt
 - Spots de sang veineux prélevé au pli du coude
- Évaluer la possibilité de réaliser toutes les analyses du dépistage au suivi moléculaire: prise en charge complète à partir d'un même buvard!
 - Sérologie
 - Dépistage Génomique Viral
 - Charge Virale
 - Séquençage de résistance



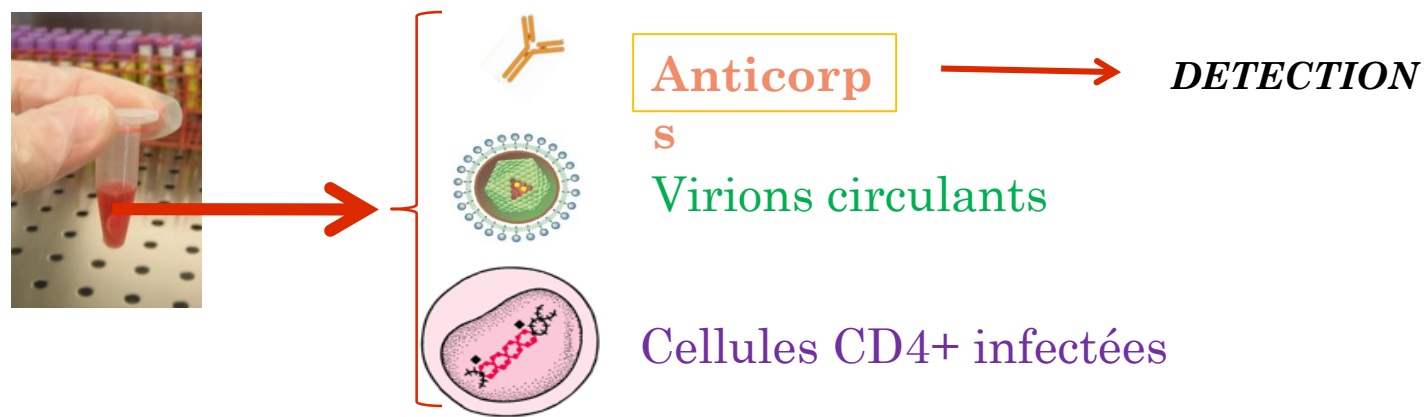
SPOC: DESIGN, MATÉRIEL ET MÉTHODES

- Étude COREVIH H-N / ANRS, multi-centrique
 - Sang capillaire: Rouen et Toulouse (10+12 patients)
 - Sang veineux: Rennes et St Etienne (10+10 patients)
- Dix spots de 50 μ l de sang déposés par patient



DÉPISTAGE SÉROLOGIQUE

- Réalisés directement sur l'éluat

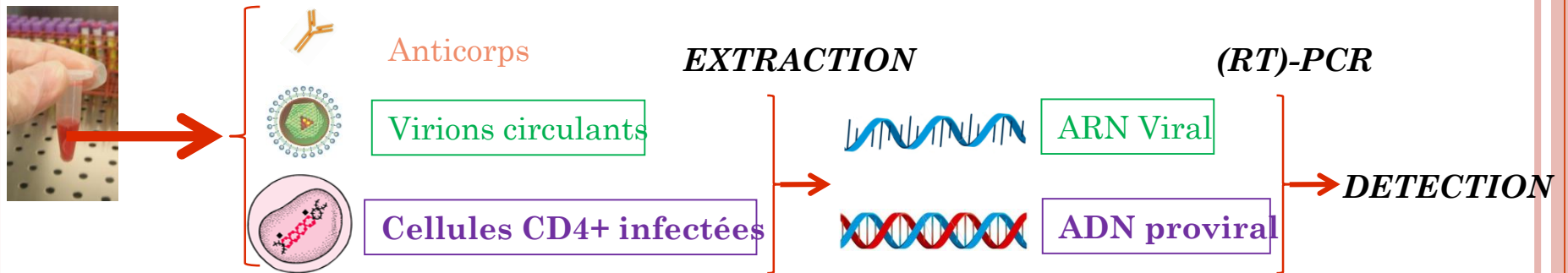


- Test de 4^e génération : Abbott Architect Combo Ag/Ac
- Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD) :
 - Abbott Determine HIV1/2
 - Biomérieux Vikia HIV1/2
 - Biolytical INSTI HIV-1



DÉPISTAGE GÉNOMIQUE VIRAL

- Réalisé sur ADN (+ARN)

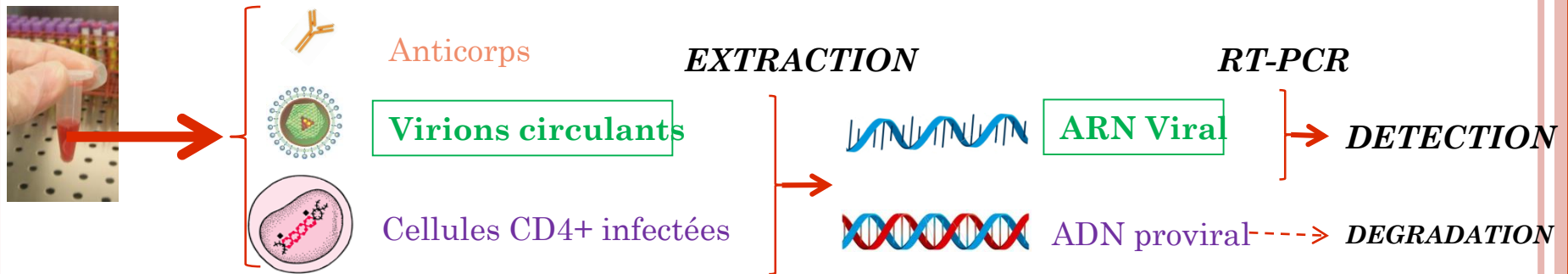


- Technique commerciale Abbott RealTime HIV-1
Qualitative
 - extraction, amplification et détection ARN+ADN sur automate M2000
- Technique ANRS Biocentric HIV DNA cell
 - extraction QIAGEN EZ1ARN+ADN, concentration de l'extrait, amplification et détection de l'ADN



CHARGES VIRALES

○ Réalisées sur ARN

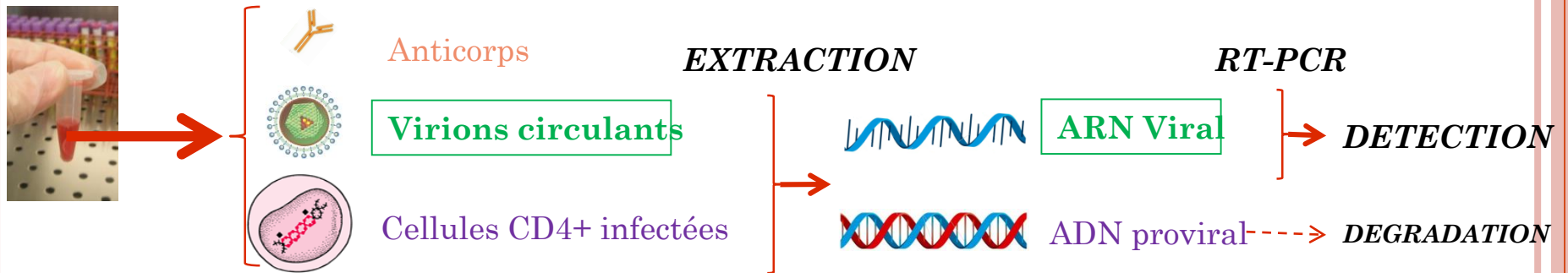


- Technique commerciale Abbott RealTime HIV-1 Quantitative
 - Extraction, amplification et détection ARN sur automate M2000
- Technique ANRS Biocentric HIV Charge Virale
 - Extraction QIAGEN EZ1 ARN+ADN, traitement par DNase Ambion, amplification et détection de l'ARN



SÉQUENÇAGE DE RÉSISTANCE

- Réalisé sur l'ARN



- Technique ANRS

- Utilisation du reste d'extrait ARN utilisé pour CV
Biocentric, soumis à concentration puis RT-PCR nichée



RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

○ Tests Sérologiques:

- positifs, hormis pour le TROD INSTI (nombreux positifs sans bande contrôle)

○ DGV:

- Abbott = 31/42 (73,8%), Biocentric = 19/20 (95,0%)

○ Charge Virale Abbott

- Seuil de quantification à 550copies (2,74log)
- Bonne corrélation CV DBS vs CV plasmatique

○ Charge Virale Biocentric, Séquençage

- Analyses en cours



SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

- Les prélèvements sur buvards, en particulier le sang capillaire prélevé au bout du doigt, présentent **d'importants avantages logistiques** pour la collecte **délocalisée**, le transport et le stockage
- **Prise en charge globale** (dépistage + suivi VIH) à partir d'un même buvard? Les résultats préliminaires de SPOC sont encourageants
- Restent des difficultés pour comparer les **méthodologies hétérogènes**; de nombreux paramètres peuvent sans doute être optimisés





REMERCIEMENTS

COREVIH Haute-Normandie

ANRS

Laboratoires participants:

CHU Rennes, Dr Anne MAILLARD

CHU Rouen, Pr Jean-Christophe PLANTIER

CHU St Etienne, Pr Thomas BOURLET

CHU Toulouse, Dr Karine SAUNE

Patients volontaires et personnels préleveurs