

# INTÉRÊT DES PRÉLÈVEMENTS SUR BUVARD

5<sup>e</sup> 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

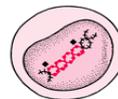


# ANALYSES VIH À PARTIR D'UN SPOT DE SANG SÉCHÉ : EN PRATIQUE...

- Éluetion 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



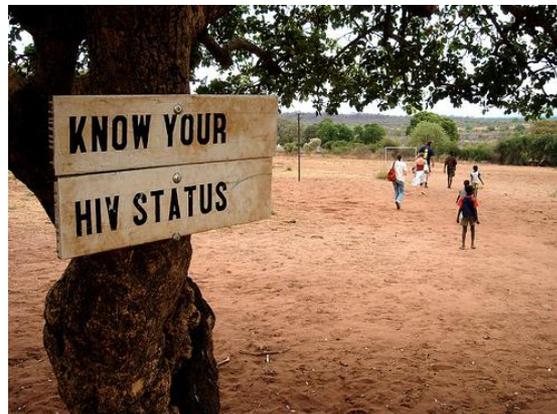
# BEAUCOUP D'ÉTUDES...

- 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<sup>ère</sup> 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<sup>a</sup>, Raoudha Dachraoui<sup>a</sup>, Véronique Lemée<sup>a</sup>, Marie Gueudin<sup>a</sup>, Françoise Borsa-Lebas<sup>b</sup>, François Caron<sup>b</sup> and François Simon<sup>a</sup>

*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,<sup>1a</sup> Francis Barin,<sup>2a</sup> Françoise Cazein,<sup>1</sup> Josiane Pillonel,<sup>1</sup> Florence Lot,<sup>1</sup> Denys Brand,<sup>2</sup> Jean-Christophe Plantier,<sup>2</sup> Pascale Bernillon,<sup>1</sup> Stéphane Le Vu,<sup>1</sup> Roselyne Pinget,<sup>1</sup> and Jean-Claude Desenclos<sup>1</sup>

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

R Dachraoui,<sup>1</sup> D Brand,<sup>2</sup> S Brunet,<sup>2</sup> F Barin<sup>2</sup> and J-C Plantier<sup>1</sup>

*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

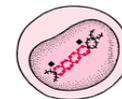
### • Analyses sérologiques :

- test ELISA générique maison + test rapide Determine (Abbott)

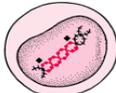


### • Analyses moléculaires :

- 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 :

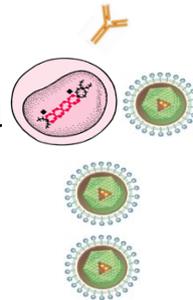


- Prélèvement peu « technique » pouvant être délocalisé : direct, sans matériel spécifique pour la prise de sang ou la décantation par centrifugation



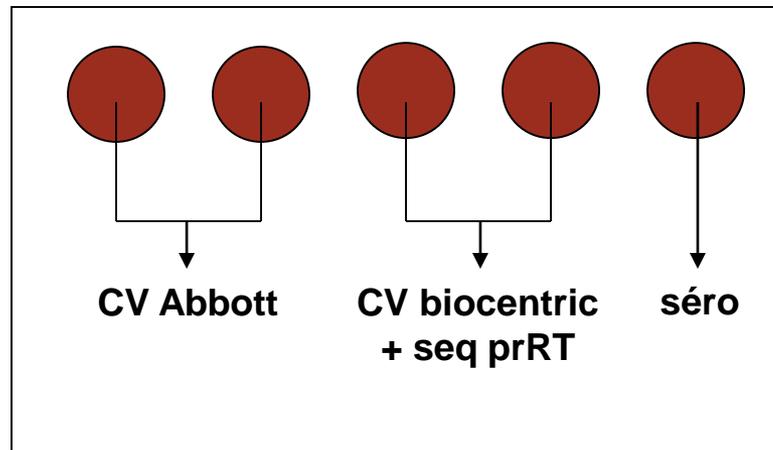
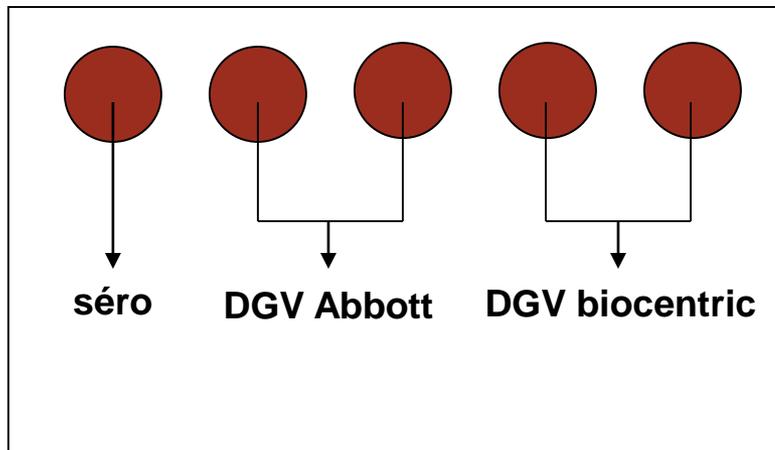
# PROJET SPOC: INTÉRÊT DE L'ÉTUDE

- 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



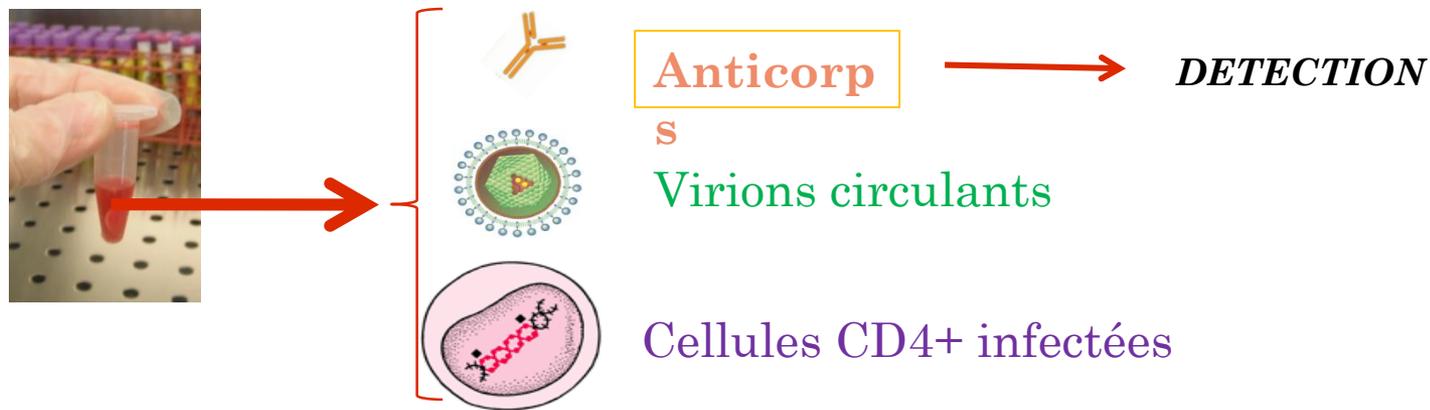
# SPOC: DESIGN, MATÉRIEL ET MÉTHODES

- 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 $\mu$ l de sang déposés par patient



# DÉPISTAGE SÉROLOGIQUE

- Réalisés directement sur l'éluat

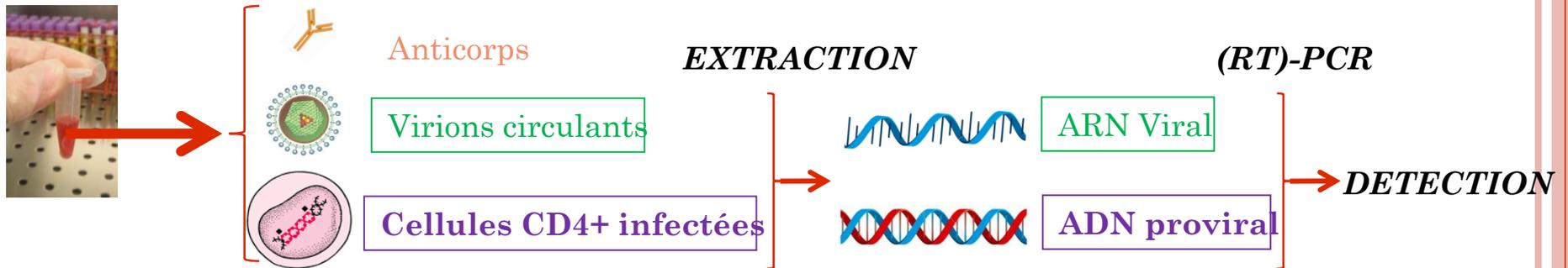


- Test de 4<sup>e</sup> génération : Abbott Architect Combo Ag/Ac
- Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD) :
  - Abbott Determine HIV1/2
  - Biomérieux Vikia HIV1/2
  - Biolytical INSTI HIV-1



# DÉPISTAGE GÉNOMIQUE VIRAL

- Réalisé sur ADN (+ARN)

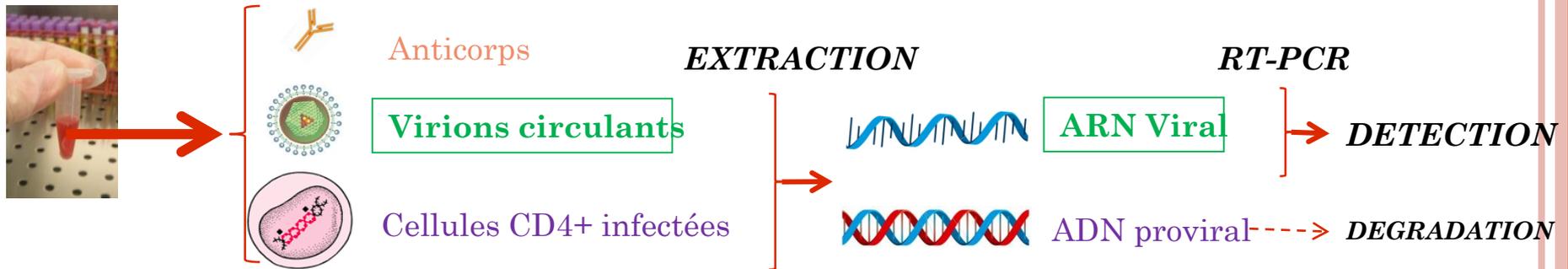


- Technique commerciale Abbott RealTime HIV-1  
Qualitative
  - extraction, amplification et détection ARN+ADN sur automate M2000
- Technique ANRS Biocentric HIV DNA cell
  - extraction QIAGEN EZ1ARN+ADN, concentration de l'extrait, amplification et détection de l'ADN



# CHARGES VIRALES

## ○ Réalisées sur ARN

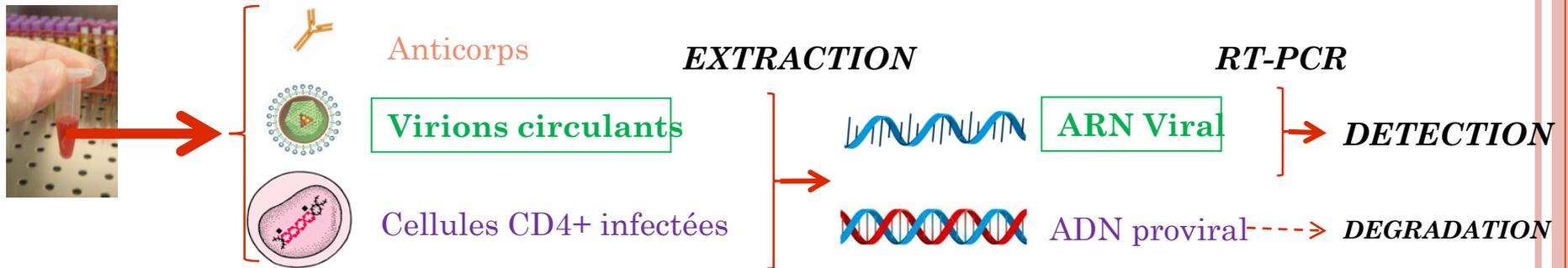


- Technique commerciale Abbott RealTime HIV-1 Quantitative
  - Extraction, amplification et détection ARN sur automate M2000
- Technique ANRS Biocentric HIV Charge Virale
  - Extraction QIAGEN EZ1 ARN+ADN, traitement par DNase Ambion, amplification et détection de l'ARN



# 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

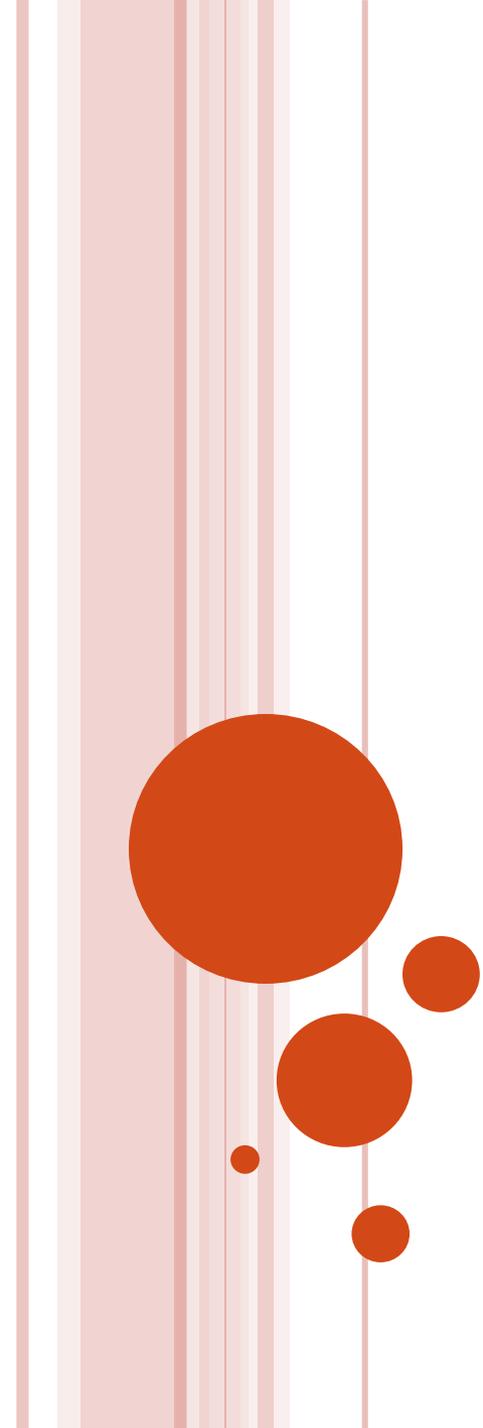
- Analyses en cours



# 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**