

**Laboratoire de rétrovirologie**  
***CRP-Santé***

**Procédure organisationnelle de la PCR diagnostique HIV-1 en temps  
réel pour l'enfant né de mère séropositive et pour l'adulte**

***Exigences organisationnelles***

### Historique de révision du document

Version	Date de parution	Auteur du document	Motif de la révision	Auteur de la révision	Portée de la révision
1.0	04.08.1999	JCS			
1.1	28.04.2003	JCS	Mise à jour	JCS	
1.2	22.02.2005	JCS	Mise à jour	JCS	
2.0	04.05.2010	CD	Mise à jour	CD	Tout le document
2.1					
2.2					

### Rédaction du document :

Carole Devaux	Responsable adjoint de laboratoire	17/05/2010	
<b>Prénom-Nom</b>	<b>Fonction</b>	<b>Date</b>	<b>Signature</b>

### Vérification du document :

Carole Devaux	Responsable adjoint de laboratoire	17/05/2010	
<b>Prénom-Nom</b>	<b>Fonction</b>	<b>Date</b>	<b>Signature</b>

Chantal Tsobo	Responsable du laboratoire de microbiologie du CHL	17/05/2010	
<b>Prénom-Nom</b>	<b>Fonction</b>	<b>Date</b>	<b>Signature</b>

Terry Baurith	Responsable qualité	17/05/2010	
<b>Prénom-Nom</b>	<b>Fonction</b>	<b>Date</b>	<b>Signature</b>

### Approbation du document :

Carole Devaux	Responsable adjoint de laboratoire	17/05/2010	
<b>Prénom-Nom</b>	<b>Fonction</b>	<b>Date</b>	<b>Signature</b>

Chantal Tsobo	Responsable du laboratoire de microbiologie du CHL	17/05/2010	
<b>Prénom-Nom</b>	<b>Fonction</b>	<b>Date</b>	<b>Signature</b>



## **Procédure organisationnelle de la PCR diagnostique HIV-1 en temps réel pour l'enfant né de mère séropositive et pour l'adulte**

Luxembourg, le 04 mai 2010

Dr Carole Devaux, Laboratoire de Rétrovirologie, CRP-Santé

Dr Chantal Tsobo, Laboratoire de Microbiologie, CHL

Cette procédure s'applique au diagnostic de l'infection HIV-1 chez l'enfant né de mère séropositive ainsi qu'au diagnostic d'infection précoce HIV-1 chez l'adulte à caractère d'urgence. Pour l'adulte, toute demande de diagnostic DNA-PCR doit être transmise au Dr Chantal Tsobo, responsable du laboratoire de microbiologie du CHL, qui prendra seule la décision de la réalisation de l'analyse ou qui transmettra la demande au médecin infectiologue de garde (central téléphonique CHL au 44 11 11 si nécessaire. En absence du Dr Tsobo, le médecin infectiologue de garde du CHL devra être contacté directement et prendra seul la décision d'effectuer le test. Tout prélèvement arrivé au laboratoire sera traité et au minimum 200 µl de plasma (pour sérologie HIV) et 200 µl de sang total (pour PCR diagnostique) seront stockés en attente de la décision de la réalisation de l'analyse.

### **1. Procédure d'envoi et de traitement des prélèvements sanguins**

- 1 tube EDTA (minimum 1 ml) doit être envoyé au Laboratoire de Rétrovirologie via le Centre de Tri ou le Laboratoire de Microbiologie et doit être traité dans un délai de 12 heures.

**Pour les enfants hospitalisés à la clinique pédiatrique ou en maternité**, il faut prendre rendez-vous avec le Laboratoire de Rétrovirologie au 26970-218 ou 26970-215. Pour le premier prélèvement à 48H de vie de l'enfant (ou un prélèvement ultérieur si celui-ci n'a pas été effectué), **un prélèvement sanguin de la mère** (1 tube EDTA, 8 ml) doit être effectué en même temps et acheminé au Laboratoire de Rétrovirologie avec celui de l'enfant.

**Pour les autres structures de santé en dehors du CHL**, avant d'effectuer tout prélèvement, il est nécessaire de téléphoner au laboratoire de Rétrovirologie (26970-218 ou 26970-215) pour s'assurer de la prise en charge du prélèvement dans la journée.

- Après encodage des données de l'enfant et la mise en liaison avec ceux de la mère dans la base de données du Laboratoire de Rétrovirologie, le statut de l'infection par HIV-1 (et non pas HIV-2) est validé par les data-managers.
- Le prélèvement sanguin est traité sous la hotte à flux laminaire réservée aux prélèvements dans la salle de culture virale du P3 du Laboratoire de Rétrovirologie :

Le tube EDTA est inversé manuellement trois fois afin d'homogénéiser le sang. Il est ensuite aliquoté en 4 fois 200 µl dans les tubes stériles Sarstedt de 1.5 ml à vis. Afin d'éviter toute contamination, un seul prélèvement peut être traité à la fois sous la hotte à flux laminaire, ce qui signifie que le prélèvement de la mère et de l'enfant à 48H de vie sont traités séparément en commençant par le prélèvement de l'enfant et en nettoyant la hotte, les portoirs et les pipettes à l'aide de DNA away entre les deux prélèvements.

- Les 4 tubes de 200 µl de sang sont ensuite congelés à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

## 2. Procédure technique de la PCR diagnostique HIV-1

A chaque test DNA-PCR diagnostique en temps réel, les contrôles suivant doivent être inclus :

- **Le contrôle négatif** : il consiste en un échantillon de 200 µl de sang total provenant de poche recueillie lors de saignée thérapeutique, diagnostiquée HIV-1 négatif, par deux techniques DNA-PCR, la PCR nichée sur gel d'agarose et la PCR en temps réel.
- **Le contrôle positif** : il consiste en un échantillon de sang total de 200 µl d'un patient HIV-1 +, enregistré sous le nom anonyme HIV-1 +, non traité par des ARVs et suivi par le Laboratoire de Rétrovirologie. Les données médicales du patient (charge virale, date de séropositivité et sous-type HIV-1) sont indiquées dans une fiche anonyme HIV-1 + avec les résultats de la PCR nichée sur gel d'agarose et de la PCR en temps réel.
- **Le contrôle de l'extraction de l'ADN et d'absence de l'inhibition de la PCR** : il consiste en la détection d'un gène, l'albumine, exprimée ubiquitairement par les cellules. Il est effectué pour tous les contrôles, standards et échantillons de patients à tester.
- **La courbe de standards** : elle consiste en une gamme de dilutions sérielles de cellules ACH 2 ( 100, 1000 et 5000 copies/PCR) resuspendues dans du sang

total de poche recueillie lors de saignée thérapeutique (HIV-1 -) dont le nombre de copies du virus HIV-1 est connue. Cette gamme permet de juger de la linéarité du test (à voir avec Eric Rozet si nécessaire pour l'accréditation 17025 ou 15189).

### Validation de la technique

- Validation de la technique par une courbe de standards ou par le contrôle positif (Ct provenant d'une nouvelle extraction à partir de sang total et Ct obtenue lors d'une réaction de PCR antérieure, Eric Rozet)
- Contrôle de l'extraction et d'absence de l'inhibition de la PCR pour les échantillons testés, les contrôles négatif et positif et la gamme standard : le Ct du gène de l'albumine doit être inférieur à 30 cycles afin de démontrer une quantité suffisante d'ADN cellulaire pour rechercher les copies d'ADN proviral intégré. Si le Ct de l'albumine est  $\geq 30$  cycles, l'extraction de l'ADN doit être réalisée à nouveau sur un autre aliquot de sang de 200  $\mu$ l. L'échantillon de l'enfant ou de l'adulte sera testé non dilué et dilué au 1/10<sup>ième</sup> afin d'exclure une inhibition de la PCR due à une quantité trop importante d'ADN dans la réaction de la PCR.
- Le contrôle négatif doit être indéterminé ou révéler un Ct supérieur à 40 cycles pour les trois gènes HIV-1 et un Ct de l'albumine  $<$  à 30 cycles.
- Le contrôle positif doit révéler un Ct inférieur à 40 cycles pour les trois gènes HIV-1 et un Ct de l'albumine  $<$  à 30 cycles.

### 3. Interprétation des résultats de la PCR diagnostique HIV-1

- Tableau : algorithme d'interprétation des résultats de la PCR diagnostique HIV-1

Résultats transmis au pédiatre	DNA-PCR Gènes LTR POL (INT) et ENV	Contrôle positif	Contrôle négatif	Contrôle absence d'inhibition (albumine)
positif	$\geq 2$ gènes positifs	positif	négatif	positif
négatif	trois gènes négatifs	positif	négatif	positif
Indéterminé, envoyer nouvel échantillon	1 gène positif	positif	négatif	positif

- Si le résultat obtenu pour un échantillon est positif (c'est à dire 2 gènes HIV-1 positifs), une nouvelle extraction est réalisée et la PCR nichée diagnostique sur gel d'agarose (gag, pol et env) est effectuée afin de confirmer ces résultats avant demande d'un nouveau prélèvement au pédiatre ou clinicien.
  
- Si le résultat obtenu pour un échantillon est négatif ou indéterminé, le résultat est rendu au pédiatre ou clinicien sans confirmation par la PCR nichée diagnostique sur gel d'agarose (gag, pol et env).