

# ÉTUDE DE FAISABILITÉ POUR L'UTILISATION DES TROUSSES HAV, HEV ET B19 SUR L'AUTOMATE LC 480, DANS LE CADRE DU CONTRÔLE DES POOLS DE PLASMA HUMAIN TRAITÉS POUR VIRO-INACTIVATION PAR SOLVANT DÉTERGENT (PL-SD)

MARTINE LAPEYRE<sup>(1)</sup>, FANNY AUVRAY<sup>(1)</sup>, NATHALIE DELESALLE<sup>(1)</sup>, ISABELLE FABRE<sup>(1)</sup>

(1) Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, Saint-Denis, France

## OBJECTIF

Tester les performances de trousse HAV, HEV et B19 dans le cadre du contrôle des pools de PL-SD avec des témoins positifs titrés. Le but est de tester chaque kit indépendamment en réalisant une extraction combinée pour les trois marqueurs viraux avec l'équipement EasyMAG suivi d'une amplification/détection avec l'équipement LightCycler 480.

## MATÉRIEL

- Kits d'amplification ALTONA Realstar HAV PCR, HEV PCR et B19 PCR
- Kit Argène Parvovirus B19 R-gène
- Standard du WHO B19, HAV, HEV
- Panel WHO Génotype B19
- Témoin positif B19 à 10<sup>4</sup> UI/ml, HAV à 1,0x10<sup>2</sup> UI/ml, HEV à 312,5 UI/ml
- Diluant et Témoin négatif = plasma négatif pour les 3 paramètres

EasyMag



LightCycler 480



## MÉTHODE

**Extraction individuelle** avec une prise d'essai d'échantillon de 200 µL et un volume d'élution de 110 µL :

	Dilution	J1	J2	J3
B19 avec kits Argène et Altona	7 points de dilution (UI/ml) 2x 10 <sup>4</sup> / 10 <sup>4</sup> / 5x 10 <sup>3</sup> / 10 <sup>3</sup> / 100 / 50 / 25	2 Te Neg 4 WHO B19 à 10 <sup>4</sup> UI/ml	Gamme WHO B19 de 2x 10 <sup>4</sup> UI/ml à 25 UI/ml	Gamme WHO B19 de 2x 10 <sup>4</sup> UI/ml à 25 UI/ml Panel NIBSC Member 1 à 4
HAV avec Kit Altona	7 points de dilution (UI/ml) 10 <sup>3</sup> / 200 / 100 / 50 / 25 / 12,5 / 6,25	1 Te Neg 1 WHO HAV à 200 UI/ml 3 WHO HAV à 100 UI/ml 2 WHO HAV à 50 UI/ml	Gamme WHO HAV de 10 <sup>3</sup> UI/ml à 6,25 UI/ml 2 Te Neg	Gamme WHO HAV de 10 <sup>3</sup> UI/ml à 6,25 UI/ml 2 Te Neg
HEV avec kit Altona	7 points de dilution (UI/ml) 1 250 / 500 / 400 / 312,5 / 250 / 100 / 20	1 Te Neg 1 WHO HEV à 400 UI/ml 3 WHO HEV à 312,5 UI/ml 2 WHO HEV à 250 UI/ml	2 Te Neg Gamme WHO HEV de 1 250 UI/ml à 20 UI/ml	2 Te Neg Gamme WHO HEV de 1 250 UI/ml à 20 UI/ml

**Extraction combinée** pour les trois marqueurs viraux avec une prise d'essai d'échantillon de 200 µL et un volume d'élution de 110 µL :

J1	J2	J3	J4
Cohabitation des CI trousse Altona B19/HAV/HEV	Cohabitation des CI trousse Argène B19 et Altona HAV/HEV	Cohabitation des CI trousse Altona B19/HAV/HEV	Cohabitation des CI trousse Argène B19 et Altona HAV/HEV
3 points gamme WHO HAV, HEV et B19 4 Te Neg	3 points gamme WHO HAV, HEV et B19 5 Te Neg	Échantillons positifs B19/HAV, B19/HEV et HAV/HEV	Échantillons positifs B19/HAV, B19/HEV et HAV/HEV

## RÉSULTATS

### Extraction individuelle

	HAV Altona	HEV Altona	B19 Altona	B19 Argène
Seuil de détection estimé	Taux 25 UI/ml valeurs homogènes Taux 12,5 UI/ml valeurs hétérogènes ↓ Limite de détection entre 6,25 et 25 UI/ml	Taux 100 UI/ml valeurs homogènes Taux 20 UI/ml 0 % de détection ↓ Limite de détection entre 20 et 100 UI/ml	Taux 5 x 10 <sup>3</sup> UI/µl valeurs homogènes Taux 10 <sup>3</sup> UI/ml valeurs hétérogènes ↓ Limite de détection entre 10 <sup>3</sup> et 5x10 <sup>3</sup> UI/ml	Taux 10 <sup>3</sup> UI/ml valeurs homogènes Taux 100 UI/ml valeurs hétérogènes ↓ Limite de détection entre 50 et 10 <sup>3</sup> UI/ml
Taux servant de Témoin positif ou de seuil d'exclusion	100 UI/ml 100 % de détection (7/7)	312,5 UI/ml (valeur la plus proche possible de 320 UI/ml) 100 % de détection (6/6)	10,0 UI/µl 100 % de détection (8/8)	10,0 UI/µl 100 % de détection (8/8)
Te Neg	0 % de détection (5/5)	0 % de détection (5/5)	0 % de détection (2/2)	0 % de détection (2/2)
Génotypes Panel WHO	/	/	Les génotypes 1, 2 et 3 sont tous détectés	Les génotypes 1, 2 et 3 sont tous détectés

### Extraction combinée

	HAV Altona	HEV Altona	B19 Altona	B19 Argène
Taux servant de Témoin positif ou de seuil d'exclusion	J1+J2 100 UI/ml 100 % de détection (8/8)	J1+J2 312,5 UI/ml (valeur la plus proche possible de 320 UI/ml) 100 % de détection (8/8)	J1 10,0 UI/µl 100 % de détection (3/3)	J2 10,0 UI/µl 100 % de détection (3/3)
Cohabitation CI Altona ARN+ADN/ extraction du seul paramètre (J1)	Taux 100 UI/ml Cp identiques CI: décalage de - 2 Cp (4/4)	Taux 312,5 UI/ml décalage de + 5 Cp CI: décalage de - 5 Cp (4/4)	Taux 10,0 UI/µl Cp identiques CI: Cp identiques (3/3)	/
Cohabitation CI Altona ARN+ Argène ADN/ extraction du seul paramètre (J2)	Taux 100 UI/ml décalage de - 3 Cp CI: Cp identiques (4/4)	Taux 312,5 UI/ml Cp identiques CI: Cp identiques (4/4)	/	Taux 10,0 UI/µl Cp identiques CI: Cp identiques (3/3)
Échantillons multi-contaminés Cohabitation CI Altona ARN+ADN /extraction du seul paramètre (J3)	Taux 100 UI/ml Cp identiques CI: décalage de - 2 Cp (6/6)	Taux 250 UI/ml décalage de > + 6 Cp CI: décalage de - 5 Cp (2/2)	Taux 10,0 UI/µl Cp identiques CI: Cp identiques (6/6)	/
Échantillons multi-contaminés Cohabitation CI Altona ARN+ Argène ADN/ extraction du seul paramètre (J4)	Taux 100 UI/ml décalage de - 1,5 Cp CI: Cp identiques (6/6)	Taux 250 UI/ml Cp identiques CI: Cp identiques (2/2)	/	Taux 10,0 UI/µl Cp identiques CI: Cp identiques (6/6)
Te Neg (J1+J2)	0 % de détection (9/9)	0 % de détection (9/9)	0 % de détection (4/4)	0 % de détection (1/1)

## CONCLUSION

Cette étude a permis :

- de vérifier pour chaque trousse que le taux servant de Témoin positif est correctement détecté ;
- de montrer que la trousse B19 Argène semble avoir une meilleure sensibilité que la trousse B19 Altona ;
- de tester un protocole d'extraction combinée pour les 3 paramètres sur EasyMag ;
- de lancer simultanément les PCR HAV et HEV (kits Altona) ;
- d'établir que le trio « 2 kits Altona (HAV et HEV) et le kit Argène (B19) » semble donner de meilleurs résultats que le trio « 3 kits Altona (HAV, HEV et B19) ».