

Expertises de la trousse ABBOTT CMV real time pour la mesure de la charge virale dans le sang total

1) Evaluation de la technique de quantification de la charge virale CMV à l'aide de la trousse Abbott RealTime CMV et des automates m2000 sp pour l'extraction et m2000 rt pour l'amplification. (Laboratoire Lariboisière)

L'ensemble proposé par Abbott est entièrement automatisé, de l'extraction à la lecture des résultats qui sont transmis au logiciel de gestion du laboratoire. Deux cibles très conservées au sein des génomes de CMV sont amplifiées simultanément : une région du gène UL34 et une région du gène 80.5. Ce système de mesure des charges virales CMV est applicable à partir d'échantillons de plasma ou à partir d'échantillons de sang total.

L'évaluation a été faite en utilisant comme matrice le sang total. L'extraction est réalisée à partir de 0,5 ml de sang total pour une prise d'essai de 300µl. Les résultats sont exprimés de la façon suivante :

- Non détectable si aucun signal d'amplification n'est perçu
- Détectable non quantifiable si le signal perçu est au dessous du seuil de quantification (<1,6 log copies par ml)
- Détectable avec indication du nombre de copies de génomes par ml de sang total.
- Détectable avec indication d'une charge virale supérieure à la limite de quantification (>8 log copies de génomes par ml).

Les caractéristiques de la technique en termes de linéarité, sensibilité et reproductibilité ont été évaluées à l'aide de panels du commerce, d'échantillons de sang total connus et du standard OMS de quantification.

Pour déterminer l'intérêt clinique de la technique une étude rétrospective portant sur 302 échantillons analysés à l'aide de la technique de routine du laboratoire (trousse de PCR CMV Qiagen utilisée avec l'extracteur m2000 sp et l'amplificateur m2000rt) a été effectuée. Les échantillons provenaient de 208 patients. Ces échantillons de sang total conservés à -80°C au laboratoire ont été décongelés pour le test.

Les informations concernant le contexte clinique ont été collectées.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Les tests de reproductibilité intra et inter essai ont été effectués à l'aide d'échantillons de sang fortement positifs en CMV dilués dans du sang négatif pour le CMV afin d'obtenir des échantillons titrant 5 log 10 copies de génome /ml et 3 log10 copies de génome/ml.

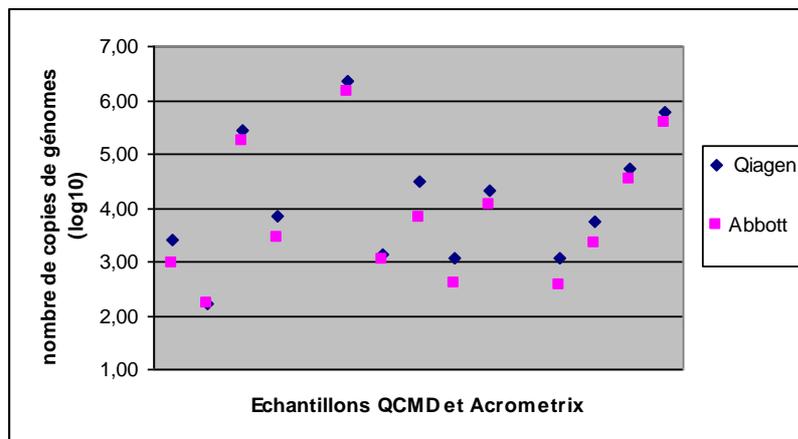
Répétabilité :

Echantillons	Nombre	Moyenne log copies/mL	Ecart type	CV %
Sang CMV 5 log10	30	5,09	0,07	1,37
Sang CMV 3 Log10	30	3,04	0,07	2,41

Reproductibilité

Echantillons	Nombre	Moyenne log copies/mL	Ecart type	CV %
Sang CMV 5 log ₁₀	11	5,01	0,10	2,09
Sang CMV 3 log ₁₀	11	2,95	0,11	3,80

Détection des contrôles QCMD et Acrometrix par les deux techniques (Abbott et Qiagen)

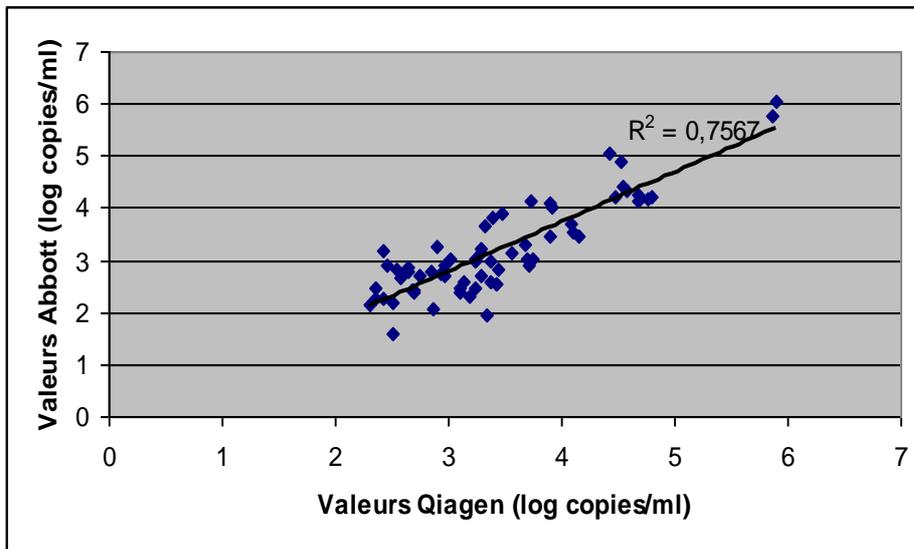


Les résultats de mesure de charge virale CMV peuvent être exprimés en UI/ml de sang total depuis la mise à disposition d'un standard OMS. Abbott propose un facteur de conversion de 1,56 pour passer du nombre de copies/ml au nombre d'UI/ml. Pour vérifier ce facteur de conversion, le standard OMS a été reconstitué selon les indications, puis dilué dans du sang total CMV négatif pour obtenir des parties aliquotes titrant 5 log₁₀, 4log₁₀ et 3 log₁₀ respectivement. Les échantillons ont été passés 6 fois en PCR extraction. Les facteurs de conversion obtenus pour ces trois valeurs de charge virale sont les suivants :

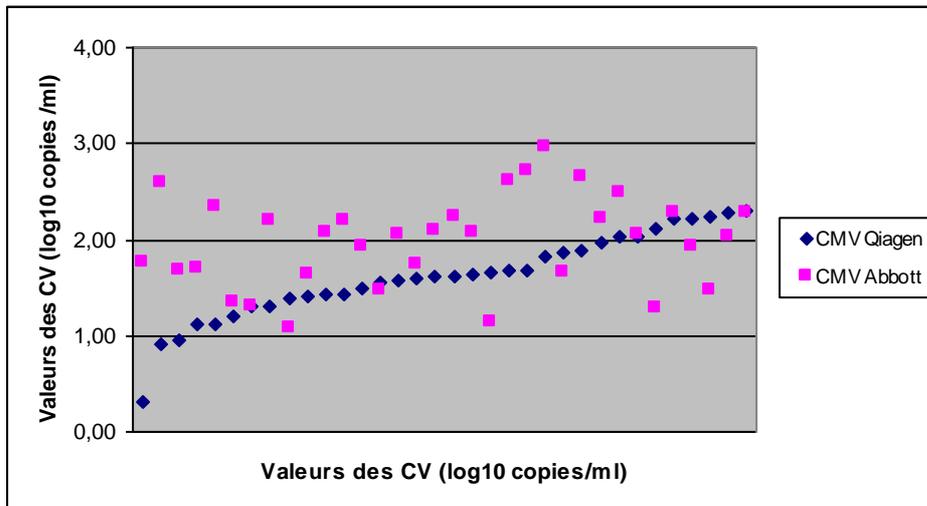
5log₁₀, 2,96, **4log₁₀** 3,09 **et 3 log₁₀** 2,89. Le facteur de conversion à adopter pour la technique avec la matrice sang total est donc très clairement différent de celui préconisé par le fournisseur. Le facteur déterminé par Abbott l'a été sur plasma. Il ne peut donc pas s'appliquer à une autre matrice, en particulier le sang total.

Analyse des résultats obtenus avec les deux techniques chez les patients :

Les résultats obtenus pour les prélèvements à charge virale détectable sont présentés ci-dessous.



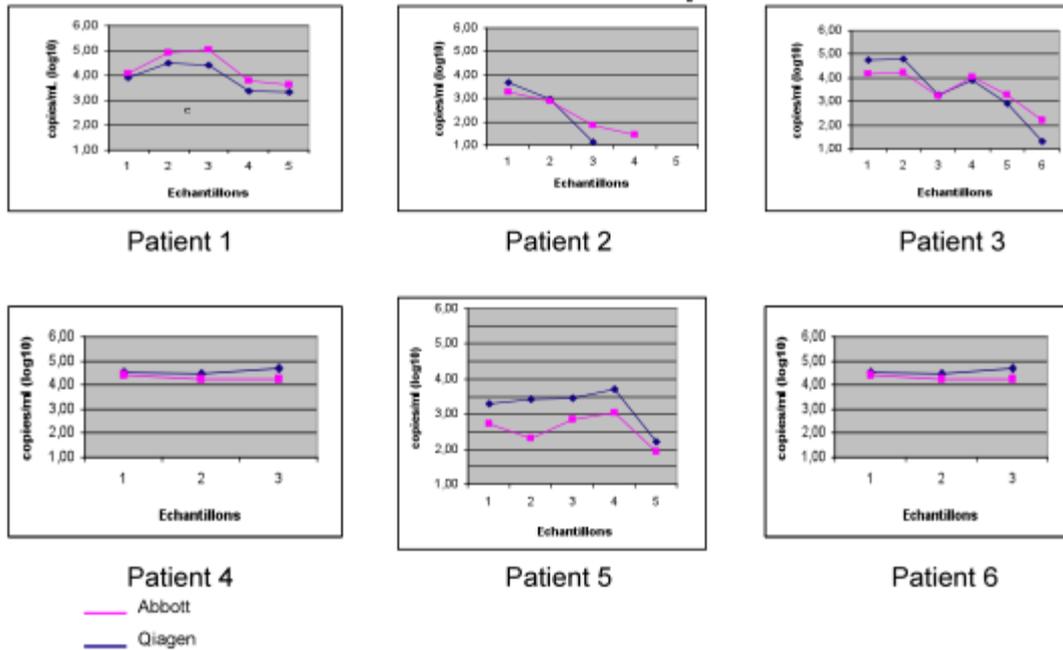
Quarante échantillons avaient une charge virale détectable inférieure à 200 copies /ml : 34 ont une charge virale détectable en technique Abbott et 6 une charge virale indétectable. La comparaison des résultats est présentée sur la figure ci-dessous.



195 échantillons avaient une charge virale indétectable en technique Qiagen : dans 165 échantillons, la charge virale est indétectable en technique Abbott, dans 7 échantillons elle est supérieure à 40copies/ml (47 à 152 copies /ml), et dans 23 échantillons, elle est détectable à moins de 40 copies/ml.

Pour quelques patients, des prélèvements séquentiels ont été analysés par les deux techniques.

Prélèvements séquentiels



En conclusion, la technique RealTime CMV Abbott en raison de son automatisation complète (extraction, distribution des réactifs de PCR, amplification, lecture et interprétation des résultats) permet la réalisation de grandes séries et assure la traçabilité des échantillons. La technique est reproductible, ce qui permet d'établir la cinétique des charges virales, indispensable pour le suivi des patients immunodéprimés en particulier les receveurs d'allogreffe. La sensibilité de cette technique assure le dépistage très précoce de l'infection, et donc de mesurer au mieux la progression de la charge virale en tout début de répllication. L'expression des résultats en UI/ml est un pas vers l'harmonisation des résultats. Cependant, le facteur de conversion doit être revu en ce qui concerne la matrice sang total.

Suite à l'étude des performances de la trousse **Abbott RealTime CMV** pratiquée dans l'année 2011 (rapport 2011), la méthode Abbott a été implantée au laboratoire et utilisée en routine. Elle a confirmé ses bonnes performances en termes de reproductibilité et de sensibilité. La qualité de l'extraction est démontrée par la constance de la valeur du Ct du contrôle interne. Sur les 4560 échantillons analysés du 21 mai 2012 au 30 septembre 2012, seuls 16 échantillons (0,35%) ont un contrôle interne décalé, témoignant d'une inhibition partielle de l'amplification.

Résultats publiés en 2013 (Schnepf et al., J. clin. Microbiol., 2013).

Schnepf N, Scieux C, Resche-Riggon M, Feghoul L, Xhaard A, Gallien S, Molina JM, Socié G, Viglietti D, Simon F, Mazon MC, Legoff J. Fully automated quantification of cytomegalovirus (CMV) in whole blood with the new sensitive Abbott realtime CMV assay in the era of the CMV international standard. J Clin Microbiol. 2013 Jul;51(7):2096-102. Doi: 10.1128/JCM.00067-13.

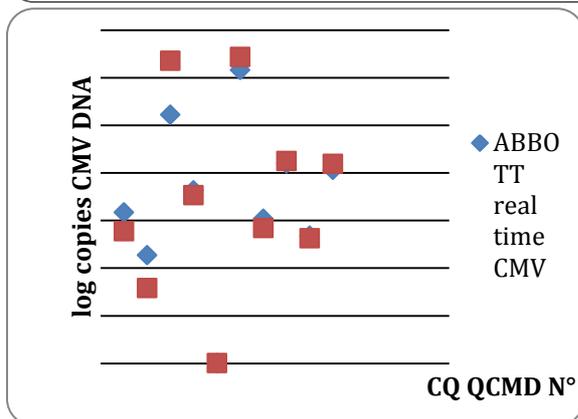
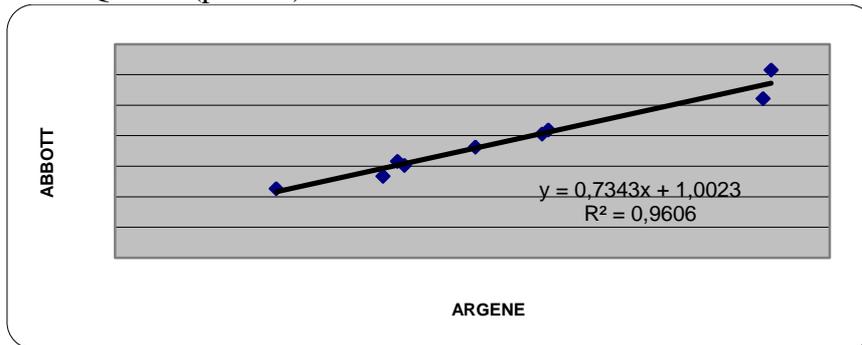
2) Evaluation de la trousse ABBOTT Real Time CMV par rapport à la trousse CMV-R gene (Argene/BioMérieux) (Laboratoire CNR)

La trousse CMV-R gene est la technique utilisée en routine par le laboratoire CNR. Les extraits d'Acides nucléiques sont obtenus avec l'automate Easy Mag protocole spécifique B pour sang total. Le seuil de détection de la trousse CMV R gene est de 75 copies/mL. Un contrôle interne est incorporé à l'extraction.

Pour cette évaluation 110 échantillons ont été testés en parallèle à partir d'aliquotes conservés à -80°C par la technique Rgene en routine, et par la méthode ABBOTT Real Time, selon les recommandations du fabricant. Auparavant, un panel de contrôle de qualité QCMD et le panel de contrôle de qualité externe Accrometrix ont été testés.

Panel de contrôles de qualité : Bonne corrélation des deux méthodes

Panel QCMD (plasma)



Panel Accrométrix (virus dilué dans du plasma) bonne corrélation globale mais pentes différentes avec un écart sur les valeurs hautes

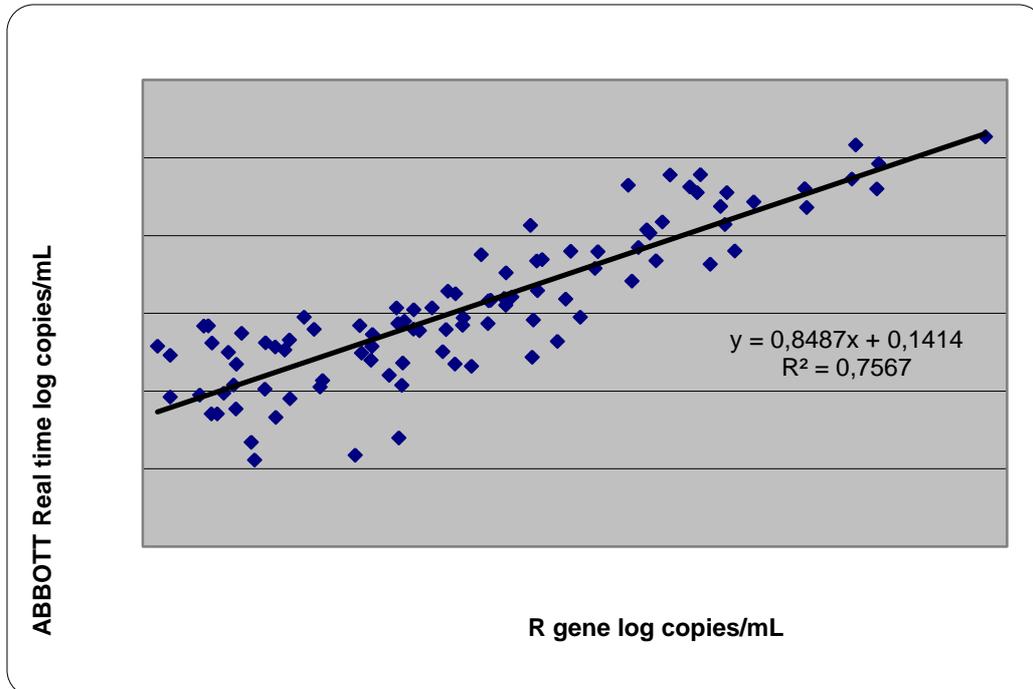


Echantillons de patients (sang total)

2/110 échantillons positifs en Rgene (141 et 222 copies/mL respectivement) ont été trouvés négatifs en ABBOTT.

La corrélation globale entre les deux méthodes est bonne $R^2 = 0,75$.

Confirmée par un test de Spearman (coefficient à 0,8986, $p < 0,001$)



Conclusion générale : la trousse CMV ABBOTT sur sang total montre une bonne corrélation avec la trousse Rgene (Argene) et avec la trousse Qiagen.

Le passage en UI doit être contrôlé sur la matrice sang total en utilisant la méthode préconisée par le CNR

Résultats non publiés