

VALIDATION DE LA MÉTHODE DE DÉTECTION DES VIRUS HÉPATITE A, HÉPATITE E ET DU PARVOVIRUS B19 PAR PCR EN TEMPS RÉEL DANS LES POOLS DE PLASMA HUMAIN TRAITÉS POUR VIRO-INACTIVATION PAR SOLVANT-DÉTERTGENT (PL-SD)

MARTINE LAPEYRE⁽¹⁾, FANNY AUVRAY⁽¹⁾, HÉLÈNE THEVENIN⁽¹⁾, SÉVERINE PERROLLET⁽¹⁾, NATHALIE DELESALLE⁽¹⁾

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

CONTEXTE

Suite à un changement de réglementation, tous les PL-SD sont soumis au processus de libération de lot selon le guideline européen comprenant la réalisation des tests de détection des virus HAV, HEV, B19 et HCV. Dans ce contexte, une validation de la méthode de détection des virus HAV, HEV et du parvovirus B19 par PCR en temps réel dans les pools de PL-SD a été réalisée dans le but d'être en mesure de libérer les lots de ces produits.

MATÉRIEL

- Kits d'amplification ALTONA Realstar HAV PCR et HEV PCR
- Kit Argène Parvovirus B19 R-gene
- Standard du WHO B19, HAV, HEV
- Panel WHO Génotype B19
- Contrôle de qualité interne B19 à 10⁴ UI/ml, HAV à 1,0x10² UI/ml, HEV à 312,5 UI/ml
- Diluant et Témoin négatif = plasma négatif pour les 3 paramètres
- Easymag
- LightCycler 480



MÉTHODE

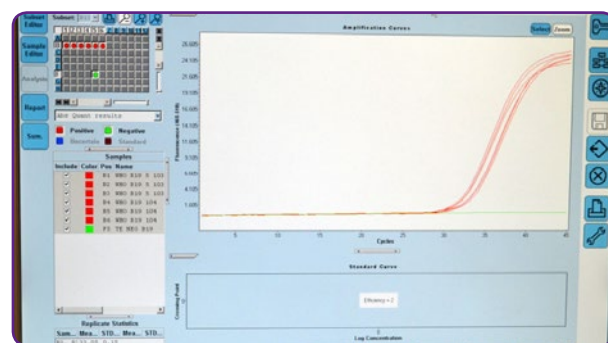
- PCR quantitative en temps réel avec une extraction combinée pour les trois paramètres HAV, HEV, B19 avec l'équipement EasyMAG puis une amplification détection commune pour HAV et HEV (deux virus ARN) et une autre pour B19 (virus ADN) avec l'équipement Light Cycler 480.
- Prise d'essai d'échantillon de 200 µL / Volume d'élution de 110 µL.

- Pour HAV, HEV et B19:
 - Détermination de la robustesse: alternance de 10 échantillons négatifs et positifs sur la plaque;

	1	2	3	4	5	6
A						
B		P1	N3	P6	N8	
C		N1	P4	N6	P9	
D		P2	N4	P7	N9	
E		N2	P5	N7	P10	
F		P3	N5	P8	N10	
G						

- Détermination de la limite de détection: analyse de différents taux de dilution lors de séances indépendantes avec 3 réplicats par taux de dilution.
 - > HAV: 16 taux de dilution lors de 7 séances indépendantes
 - > HEV/B19: 9 taux de dilution lors de 4 séances indépendantes.

- Plus pour le B19, détermination de la linéarité, de la précision sur les résultats de Ct et de l'exactitude à partir des valeurs obtenues précédemment.



RÉSULTATS

Robustesse

	P 1 à P10	N 1 à N10
Théorique	Positif	Négatif
HAV	Positif	Négatif
HEV	Positif	Négatif
B19	Positif	Négatif

Limite de détection HAV

Le seuil de détection de la méthode a été estimé entre 6,25 UI/ml et 25 UI/ml lors des essais préliminaires de faisabilité. Durant les essais de validation, il a été observé que

l'intervalle [6,25 – 25] UI/ml était trop faible pour déterminer la limite de détection (D1=54 UI/ml à D9=1,35 UI/ml). C'est pourquoi, d'autres dilutions ont été testées (D1*=270 UI/ml à D9*=27 UI/ml). L'ensemble des résultats est utilisé pour la détermination de la limite de détection.

Dilutions (UI/ml)	Jour 1 Opérateur: 1			Jour 2 Opérateur: 2			Jour 3 Opérateur: 1			Jour 4 Opérateur: 2		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3
D1*: 270												
D2*: 180												
D3*: 108												
D4*: 90												
D5*: 72												
D6*: 67,5												
D7*: 54												
D8*: 36												
D9*: 27							Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
Lot de réactif	A			A			B			B		

Dilutions (UI/ml)	Jour 1 Opérateur: 2			Jour 2 Opérateur: 1			Jour 3 Opérateur: 1		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3
D1: 54	Pos	Pos	Neg	Positif			Positif		
D2: 27	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Positif		
D3: 18	Pos	Pos	Neg	Négatif			Neg	Pos	Pos
D4: 13,5	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg
D5: 10,8	Pos	Neg	Pos	Négatif			Négatif		
D6: 6,75	Négatif						Pos	Neg	Neg
D7: 4,5	Pos	Neg	Neg	Négatif			Négatif		
D8: 2,7	Négatif						Négatif		
D9: 1,35	Négatif			Négatif			Négatif		
Lot de réactif	C			C			A		

Limite de détection HEV

Dilutions (UI/ml)	Jour 1 Opérateur: 1			Jour 2 Opérateur: 2			Jour 3 Opérateur: 2			Jour 4 Opérateur: 1		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3
D1: 250												
D2: 125												
D3: 62,5				Neg	Pos	Pos	Positif			Pos	Neg	Pos
D4: 31,25	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Négatif			Pos	Neg	Pos
D5: 25	Négatif			Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg
D6: 15,625	Positif			Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg
D7: 12,5	Négatif			Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
D8: 10				Pos	Neg	Neg	Négatif			Pos	Neg	Neg
D9: 5	Négatif			Négatif			Négatif			Négatif		
Lot de réactif	E			E			F			F		

Limite de détection Parvovirus B19

Les résultats sont des Ct.

Dilutions (UI/ml)	Jour 1 Opérateur: 1			Jour 2 Opérateur: 2			Jour 3 Opérateur: 1			Jour 4 Opérateur: 2		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3
D1: 10 ⁵	29,45	29,04	29,33	28,99	29,00	29,05	28,69	29,81	28,94	29,00	28,97	28,92
D2: 2.10 ⁴	31,23	31,26	31,46	31,18	31,17	31,26	31,29	31,48	31,23	31,52	31,77	31,68
D3: 10 ⁴	32,54	32,78	32,30	31,98	32,16	32,17	31,99	32,44	32,33	31,82	32,29	32,46
D4: 5.10 ³	33,29	33,15	32,95	33,19	34,01	34,26	33,48	33,27	33,53	33,30	33,32	33,43
D5: 10 ³	35,56	36,47	35,62	35,49	35,32	35,52	35,57	35,98	35,87	35,32	34,99	36,08
D6: 500	35,70	36,88	36,13	35,79	36,62	36,66	36,38	36,05	36,51	35,80	37,31	36,57
D7: 100	38,24	>40	39,17	0	0	39,05	>40	>40	37,78	38,53	36,63	>40
D8: 50	>40	39,46	>40	>40	0	0	38,71	>40	37,91	0	0	0
D9: 10	0	0	0	>40	0	0	>40	0	0	0	>40	0

CONCLUSION

Les méthodes de détection HAV, HEV et B19 sont validées selon les critères suivants:

Critères	HAV	HEV	B19
Robustesse	Absence de contamination croisée: Méthode ROBUSTE		
Limite de détection	47 UI/ml	103 UI/ml	247 UI/ml
Linéarité	[500 ; 10 ⁵] UI/ml		
Précision	Ct: ± 0,85		
Exactitude	Pas de différence significative avec la valeur attendue		