

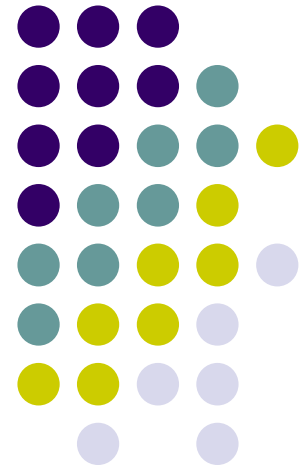


Polymorphisme de la région PreC/C du VHB et sous-quantification de l'ADN par Cobas Taqman, Roche

23^{ème} journée nationale du GEMHEP

Paris - Jeudi 06 Décembre 2018

Laure Boizeau





Observation

CV Roche	Année 2005-2017	
Nb ech CV +	3102	
Nb ech <6UI/mL	293	Non génotypables 119 (41%)
		Génotypables 174 (59%)

- Sensibilité de la PCR « S » ~**30UI/mL**

→ Ces échantillons génotypables sont-ils sous quantifiés par la trousse Roche?



Sélection des échantillons

- Caractéristiques des 106 échantillons sélectionnés

	AgHBs / ADN Ratio ≥ 1000	AgHBs / ADN Ratio <1000
Nombre (n=106)	19	87
Année	2005-2012	2006-2007
AgHBs (ng/ml)	$2,4 \cdot 10^4$ à $3,8 \cdot 10^5$	46 à $1,5 \cdot 10^6$
Génotype	A, C à E	A à F
CV Roche (UI/ml)	<6 à 290	14 à $>1,1 \cdot 10^8$

① Existe t-il une sous quantification par la trousse Roche?



- Comparaison de deux techniques de quantification des charges virales
 - Trousse Cobas TaqMan HBV High pure system, Roche (INTS)
 - Amplification dans la région **PréCore-Core**
plage de quantification de 6 à $1,1 \cdot 10^8$ UI/mL
limite de détection 4,8 UI/mL (95% IC 3,1 – 9,9 UI/mL)
 - Trousse Abbott Real Time HBV, Abbott (La Pitié et CHU Angers)
 - Amplification dans la région **Pré S**
plage de quantification de 10 à $1 \cdot 10^9$ UI/mL
limite de détection 5,6 UI/mL (95% IC 3,52 - 10,94 UI/mL)

106 Résultats de quantification Roche vs Abbott



Echantillons	Comparaison Roche vs Abbott	AgHBs ng/mL	Génotype	CV Roche UI/mL	CV Abbott UI/mL
Ratio AgHBs/ADN <1000	Concordance $ \Delta < 1$ (n=87)	46 à $1,5 \cdot 10^6$	A à F	14 à $>1,1 \cdot 10^8$	29 à $>7,6 \cdot 10^8$
Ratio AgHBs/ADN ≥ 1000 (n=19)	Concordance $ \Delta < 1$ (n=12)	$2,4 \cdot 10^4$ à $3,8 \cdot 10^5$	A, C à E	<6 à 290	1 Neg, <10 à 290
	Discordance $ \Delta > 1$ (n=7)	$4,8 \cdot 10^4$ à $3,8 \cdot 10^5$	A	<6	72 à 5906

② Etude du polymorphisme de la région PréCore-Core



Promoteur PréCore Core



Produit PCR PréCore-Core maison (800pb)

- La PCR/Séquençage PréCore-Core maison
 - Couvre la région promotrice et l'ORF PréCore-Core codant les protéines AgHBe et AgHBc
 - Sensibilité ~150 UI/mL

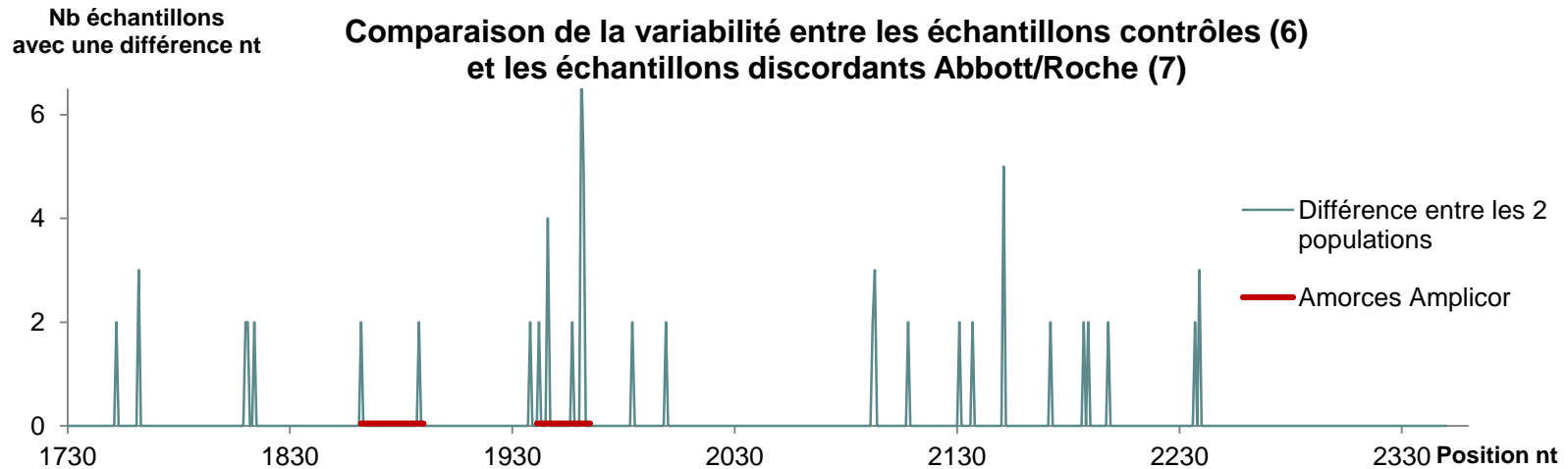
Analyse du polymorphisme PréCore-Core



Promoteur PréCore Core

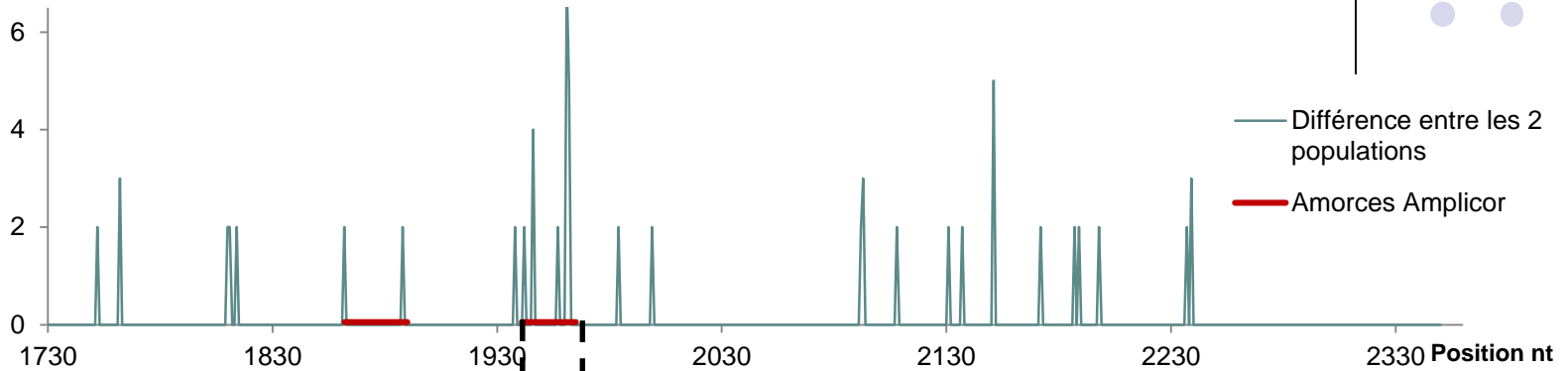
Produit PCR PréCore-Core maison (800pb)

Analyse des séquences PréCore-Core (620nt)

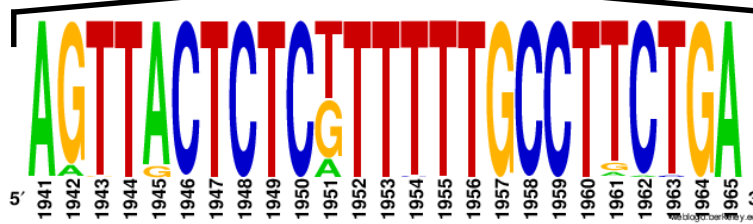


- Présence de variabilité sur l'ensemble de la séquence
- Variabilité accrue sur la région d'hybridation de l'amorce anti-sens du système Amplicor

Analyse du polymorphisme PréCore-Core



Cons A à H
208 Séquences
PubMed



B3161
Roche $6 \cdot 10^5$ UI/mL
Abbott $7 \cdot 10^5$ UI/mL



B5560
Roche <6 UI/mL
Abbott 682 UI/mL



B6145
Roche <6 UI/mL
Abbott 5906 UI/mL



Analyse du polymorphisme PréCore-Core par mutagénèse



Echantillon	Schéma	Rendement Roche	
B3161 Roche $6 \cdot 10^5$ UI/mL Abbott $7 \cdot 10^5$ UI/mL		258%	Quantification normale
B5560 Roche <6 UI/mL Abbott 682 UI/mL		23%	Sous quantification
B6145 Roche <6 UI/mL Abbott 5906 UI/mL		2%	
B3161 → B5560		16%	
B3161 TC → TC		18%	Réduction de la quantification
B3161 → B6145		2%	
B5560 → B3161		172%	Restauration de la quantification
B6145 → B3161		88%	

Analyse du polymorphisme PréCore-Core



<https://hbvdb.ibcp.fr>

Position VHB start EcoRI	nt maj A-H	730 Seq Géno A	2000 Seq Géno B	2000 Seq Géno C	1233 Seq Géno D	375 Seq Géno E	170 Seq Géno F	22 Seq Géno G	32 Seq Géno H
1961	T	11,00%	8,80%	3,50%	14,80%	8,50%	11,20%	0,00%	6,20%
1962	C	5,90%	2,10%	1,10%	4,50%	3,50%	4,70%	0,00%	3,10%
Association 1961-1962	TC	4,79%	1,83%	0,63%	4,22%	3,47%	4,12%	NT	3,13%

- Présence de polymorphisme plus important pour les génotypes A, D et F



Bilan – Perspective

- Clonage des produits d'amplification Cobas Taqman Roche
- 66 échantillons en attente de quantification CV Abbott
 - 25 avec ratio ≥ 1000 et 41 avec ratio < 1000
- 106 échantillons complets (CV Roche / CV Abbott / Seq PreCC)
 - 7 discordants Roche vs Abbott
 - **Identification d'une région responsable de la sous quantification Roche**

Remerciements



- CNR RIT



Laperche Syria

Cappy Pierre

Servant-Delmas Annabelle

Candotti Daniel

Jourdain Catherine

Hamon Clémence

Houdah Ali Kassim

- Collaborateurs

- CHU Angers

Françoise Lunel

Alexandra Ducancelle

- CHU Pontchaillou (Rennes)

Vincent Thibault