

ANRS AC11: Groupe EBV

Responsables: Jean-Marie Seigneurin (Grenoble)
Jean-Claude Nicolas (Paris-Tenon)

❖ Nouveau groupe créé en 2005 pour:

❑ étudier les lymphoproliférations B chez le sujet VIH(+)

(association à l'EBV, marqueurs...)

ë en relation avec le groupe Lymphomes ANRS (Martine Raphaël)

❑ prévoir si possible l'apparition de ces lymphoproliférations

❑ suivre l'efficacité des stratégies thérapeutiques

❑ et apporter ainsi un support virologique (EBV) pour les essais cliniques et les cohortes concernant ces lymphoproliférations

❖ Douze équipes participantes:

- Bordeaux
- Brest
- Grenoble
- Nantes
- Paris-Necker
- Paris-Pitié
- Paris-Tenon
- Paris-HEGP
- Rouen
- Saint-Etienne
- Strasbourg
- Toulouse

❖ 9 réunions de travail entre le 27 juin 2005 et le 11 janvier 2008

2005

- ❖ état des lieux des équipes en matière de « routine » EBV:
 - ❑ environ 23000 PCR EBV quantitatives par an au total
 - ❑ indications : surtout chez les immunodéprimés transplantés
 - ❑ le plus souvent, techniques « maison » de PCR en temps réel

- ❖ objectif n°1: optimiser et standardiser les méthodes
 - ❑ contrôle de qualité: 6 échantillons de sang total envoyés à chaque laboratoire du groupe

1er Contrôle Qualité charge virale EBV, septembre 2005

Echantillons	Charge virale Grenoble (log copies/mL)	Moyenne (log copies/mL)	Médiane (log copies/mL)	Range (log copies/mL)	Delta log (log copies/mL)	Delta log* (log copies/mL)
CQ05 EBV A	5,74	5,59	5,73	5,08 – 6,09	1,01	0,51
CQ05 EBV B	Négatif	0	0	0	0	0
CQ05 EBV C	5,64	5,61	5,76	5,11 – 6,11	1	0,61
CQ05 EBV D	5,47	5,48	5,43	4,83 – 6,14	1,3	1,03
CQ05 EBV F	5,30	5,23	5,3	4,80 – 5,67	0,87	0,58
CQ05 EBV G	3,90	3,63	3,69	3,25 – 4,01	0,76	0,77

* valeurs obtenues par les labos n'utilisant pas le kit TNA MagNAPure

2ème Contrôle Qualité charge virale EBV, mai 2006

- 14 aliquots de sang total

 - techniques propres à chaque laboratoire

- Extraction:

 - ↳ 7 techniques manuelles (5 Qiagen Blood, 1 Qiamp, 1 Roche)

 - ↳ 5 techniques automatiques (MagNAPure DNA isolation kit)

- PCR:

 - 7 techniques maisons

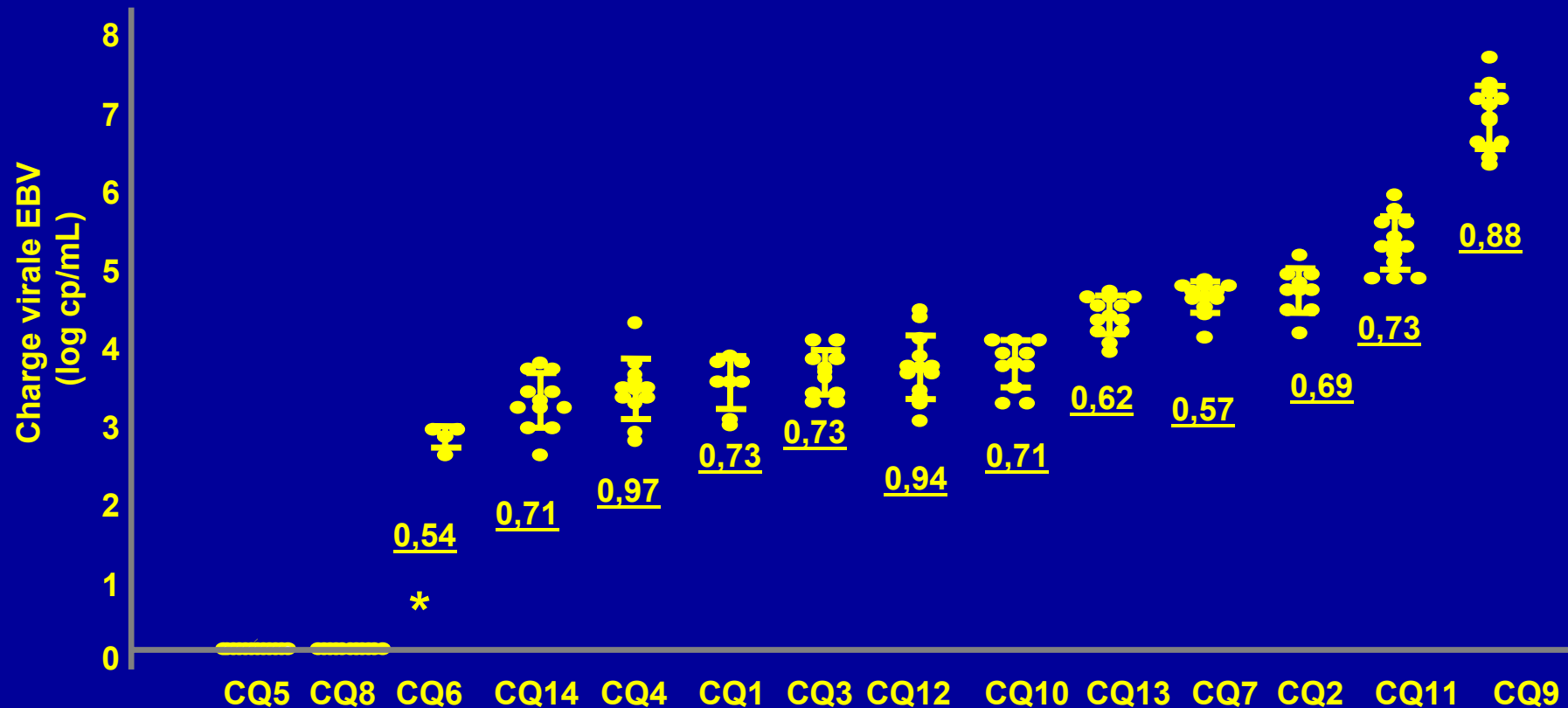
 - ↳ 4 LC

 - ↳ 2 ABI

 - ↳ 1 Rotorgene

 - 5 kits LC Roche

Contrôle Qualité Charge Virale EBV 2006 (Gamme de routine)



- Médiane $\Delta \log$: 0,72

- * Détectée uniquement par les techniques « maison »

Conclusion des CQ EBV

- bonne corrélation entre les laboratoires malgré différences dans les méthodes d'extraction de plate-formes PCR de réactifs
 - Delta-logs autour de 0,70 (semblables entre 2006 et 2007)
- meilleure sensibilité des PCR « maison » par rapport au seul kit commercial utilisé dans le CQ : le kit Roche 2006
- récemment, quelques nouveaux kits, très bons ou bons : Argène, Sangtec/Roche, Artus)

Etude de la charge virale EBV chez le patient HIV

□ Etude pilote prospective:

↳ 12 laboratoires participants (12 CISIH)

↳ Inclusion de ~ 50 patients VIH/ site: moitié avec $CD4 \leq 200$
moitié avec $CD4 > 200$

↳ Information et consentement du patient

□ Objectif final:

↳ Charge virale EBV: facteur de risque pour
lymphoprolifération chez le VIH?

□ Objectifs préliminaires: Quantification EBV ...

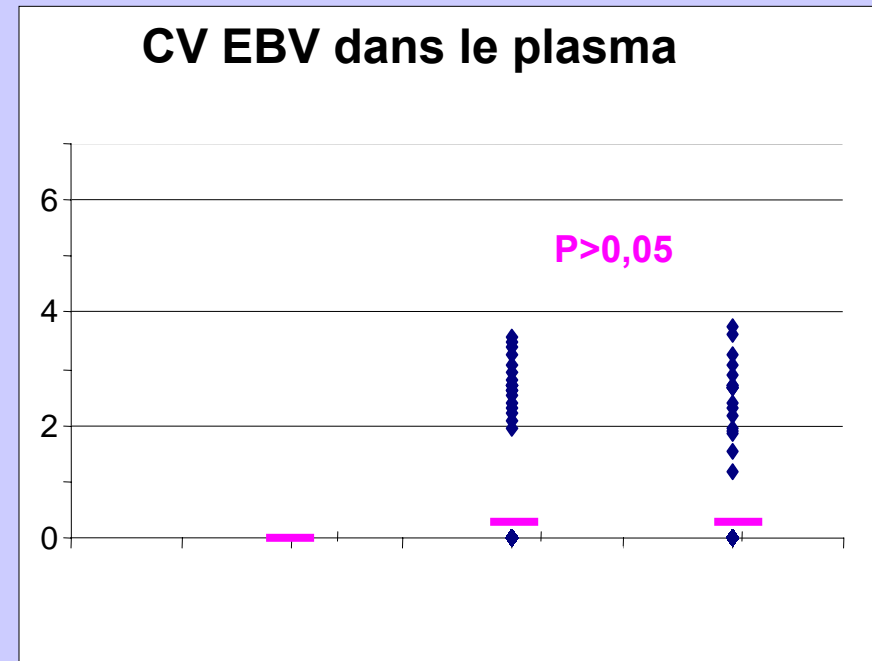
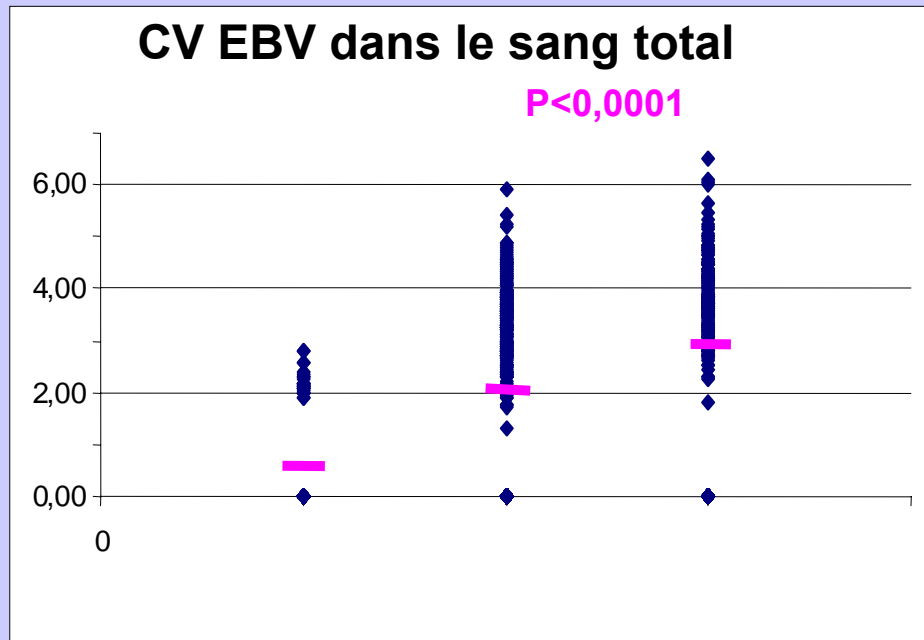
- ❖ Dans quel compartiment: plasma ou sang total ?**
- ❖ à quel niveau moyen chez le patient HIV par rapport au sujet sain ?**
- ❖ Association entre CV EBV élevée et immunodépression?**

CV EBV chez le sujet HIV : premiers résultats (sang total vs plasma)

N= 605

	Range	Moyenne	Médiane
Age (ans)	19 - 83	45	44
CV EBV / sg total (log cp/mL)	0 – 6,48	2,36	2,96
CV EBV / plasma (log cp/mL)	0 – 3,73	0,16	0,00

CV EBV chez HIV (suite) : en fonction de l'immunodépression



HIV+	N	CV EBV sang total (mean log/cpmL)	Range (log cp/mL)	p-value*
CD4 ≤ 200	231	2.81	0 – 6.48	p < 0.0001
CD4 > 200	374	2.09	0 – 6.00	

* Mann-Whitney test

Table : Frequency of detection and levels of EBV DNA (\log_{10} copies/ml) in whole blood and plasma from HIV-1 infected adults, according to the CD4 lymphocyte count.

	Total	CD4 lymphocyte		
		> 200/mm ³	< 200/mm ³	p
Number of patients	582	369	213	
Whole blood				
Number of positive samples (%)	380 (65.5%)	225 (61.2%)	155 (72.8%)	0.03
EBVDNA load in positive samples	3.54	3.41	3.69	<0.001
Range	1.30 - 6.48	1.30 – 6.22	1.79 – 6.48	
Plasma				
Number of positive samples (%)	28 (4.8%)	14 (3.8%)	14 (6.6%)	0.09
EBVDNA load in positive samples	2.57	2.61	2.35	0.215
Range	1.18 – 3.73	1.92 – 3.40	1.18 – 3.73	

EBV DNA loads are the medians for positive samples and are expressed in \log_{10} copies/ml.

Conclusion (CV EBV chez HIV)

- 1. tous les plasmas positifs correspondent à des CV sang total > 2,9 log
(mais certaines CV sang total +++ sont négatives dans le plasma)**
- 2. le sang total est plus informatif que le plasma, surtout pour un suivi quantitatif**
- 3. la CV EBV chez le HIV est plus élevée si CD4 < 200, un peu plus faible si CD4 > 200 (Rq : nettement plus faible chez HIV négatif)**
- 4. lymphomes :
CV EBV dans le sang total : moyenne 4,11 log (vs 2,32 log pour HIV + sans lymphome)

(mais trop peu de cas dans cette étude)**

Publications et communications

Multicenter quality control study of quantification of EBV DNA load in whole blood specimens by the French ANRS working group AC 11

S. Fafi-Kremer et al.

Manuscrit en cours de rédaction

Communications :

**- au 9th Annual ESCV Meeting, Birmingham, United Kingdom
September 2006**

**"Multicenter Quality Control Study for the Quantification of EpsteinBarr
Virus DNA in Whole Blood specimens "**

- à la RICAI à Paris le 6 décembre 2007

**- au 24 th Clinical Virology Symposium, Daytona Beach (Floride) le 27
avril 2008**

EBV load in whole blood correlates with HIV surrogate markers and lymphoma : a French national cross-sectional study

C. Amiel et al.

Soumis à AIDS (Research Letter)

**et communication orale aux Journées Nationales d'Infectiologie, à
Marseille le 4 juin 2008**

**"intérêt de la quantification EBV dans le contexte de l'infection par
le VIH"**

Conclusions générales et perspectives à l'issue de ce groupe de travail

1. Objectifs atteints : optimisation et standardisation de la CV EBV

- bonne corrélation entre les différents laboratoires
delta-log ~ 0.70 : donc différence significative pour un malade
suivi dans plusieurs hôpitaux, seulement si CV EBV ≥ 1 log
si suivi par un même laboratoire avec la même technique :
 $\geq 0,5$ log
- et à poursuivre ... la veille technologique (kits commercialisés plus performants, gammes de quantification standard ...)

2. Travail sur les lymphomes :

utiliser les échantillothèques des cohortes mises en place par l'ANRS :

. études en cours

1) sur les cohortes SEROCO/HEMOCO/PRIMO

2) sur la cohorte LYMPHOVIR : étude du cycle lytique de l'EBV dans les lymphomes

3. Perspectives hors HIV :

. mettre en route une étude nationale prospective de la MNI (PHRC ...)

. affiner l'interprétation des CV EBV chez les transplantés

oOo