

# Étude des performances et de la stabilité des principaux milieux de conservation et/ou de transport de cellules du col de l'utérus utilisés en France par le test Cobas® 4800 HPV (Roche Diagnostics)

*Cytological and virological medium performance and stability assessment using the Cobas® 4800 HPV test (Roche Diagnostics) used in France*

Hacène Khiri<sup>1</sup>  
Claire Camus<sup>1</sup>  
Mireille Portugal<sup>1</sup>  
Guillaume Péñaranda<sup>1</sup>  
Stéphane Boyer<sup>1</sup>  
Philippe Halfon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Alphabio, Marseille, France  
<h.khiri@alphabio.fr>

<sup>2</sup> Hôpital Européen, Marseille, France

**Résumé.** Les performances analytiques et de stabilité de dix milieux ont été comparées au milieu PreservCyt en utilisant la méthode Cobas 4800® HPV : Easyfix (Labonord SAS, France), Qualicyt (Qualicyt, France), NovaPrep HQ+ (NovaCyt, France), CMDH (SARL Alphapath France), Cyt-All (Cytomega, France), Digene Cervical Sampler (Qiagen, USA), Aptima (Gen-Probe, USA), Multi-Collect (Abbott, Allemagne), M4RT Micro Test (Remel, USA), et PCR-Media (Roche, Suisse). La plupart des milieux présentent une bonne corrélation sur l'ensemble des paramètres étudiés. Les milieux Cyt-All et NovaPrep HQ+ présentent une parfaite conformité de tous les paramètres avec ceux du milieu de référence PreservCyt, cela pour tous les génotypes détectables. Notons que deux milieux, le CMDH et le M4RT, présentent une durée de stabilité à +25 °C relativement réduite de 3 et 2 jours respectivement, incompatible avec les pratiques courantes de transport. La plupart des milieux testés présentent des performances analytiques et de stabilité sensiblement équivalentes à celles du milieu de référence. Les résultats de cette étude ouvrent des perspectives importantes non seulement pour les fabricants de milieux polyvalents adaptés à la problématique des frottis cervico-utérin, mais également à celle de la conservation, du transport de virus ou de bactéries pour la recherche simultanée des HPV, de *Chlamydia trachomatis*, ou de *Neisseria gonorrhoea*.

**Mots clés :** HPV, Cobas® 4800, milieu cytologique, milieu de conservation/transport microbiologique

**Abstract.** Analytical and stability performances of ten media were compared to PreservCyt medium using the Cobas® 4800 HPV test: Easyfix (Labonord SAS, France), Qualicyt (Qualicyt, France), NovaPrep HQ+ (NovaCyt, France), CMDH (SARL Alphapath France), Cyt-All (Cytomega, France), Digene Cervical Sampler (Qiagen, USA), Aptima (Gen-Probe, USA), Multi-Collect (Abbott, Allemagne), M4RT Micro Test (Remel, USA), et PCR-Media (Roche, Suisse). Most of media show a good correlation for all the performance characteristics studied. Cyt-All and NovaPrep HQ+ media are perfectly concordant with PreservCyt all parameters and genotypes considered. CMDH and M4RT have a reduced stability at +25°C (3 and 2 days respectively) and would not be conformed to current shipping practices. Most of media tested show analytical and stability performances equivalent with the reference medium. The prospects of such study are interesting because in the near future, providers would make available media adapted to the problem of cervical smear but also to the conservation, transport of virus or bacteria for performing simultaneous searches of HPV, *Chlamydia trachomatis* or *Neisseria gonorrhoea*.

**Key words:** HPV, Cobas® 4800, cytological medium, microbiological medium

Article reçu le 06 septembre 2013,  
accepté le 24 septembre 2013

Tirés à part : H. Khiri

Les papillomavirus humains (human papillomavirus, HPV) sont les agents infectieux les plus fréquemment incriminés dans les infections sexuellement transmissibles. Soixante-quinze pour cent des femmes auront été en contact avec le virus au cours de leur vie sexuelle [1, 2]. Deux grands groupes d'HPV sont classiquement différenciés selon leur potentiel oncogénique : les types à haut (HR) et bas risque (BR). Alors que les HPV à BR provoquent généralement de simples verrues génitales ou modifications cellulaires du col, les HPV à HR sont qualifiés d'oncogènes car ils conduisent au développement de néoplasie cervicale intra-épithéliale (CIN) pouvant évoluer jusqu'au cancer invasif du col de l'utérus (ICC) [3-5]. Plusieurs méta-analyses de données ont démontré l'implication prédominante de 14 types d'HPV HR dans les cancers invasifs (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) [6-8]. Récemment, une étude rétrospective à l'échelle internationale incluant plus de 10 000 cas histologiques confirmés de ICC a permis de valider la contribution dans plus de 90 % des ICC des huit types d'HPV les plus communs, parmi les 14 cités précédemment : 16, 18, 45, 33, 31, 52, 58 et 35, par ordre décroissant de prévalence. Les HPV16, 18 et 45 sont les génotypes les plus fréquemment retrouvés parmi toutes les catégories histologiques de cancer rencontrées (carcinome épidermoïde, adénocarcinome, carcinome adénoquameux) [9].

Plusieurs études rétrospectives ont également mis en évidence l'existence d'un risque accru de développer des lésions cervicales de haut grade au cours d'un suivi de courte durée réalisé chez des patientes infectées par HPV16 ou 18, contrairement aux autres génotypes [10-12]. L'OMS (Organisation mondiale de la santé) et l'IARC (*International agency for research on cancer*) ont officiellement désigné les HPV16 et 18 comme agents carcinogènes [13]. Le cancer invasif du col de l'utérus occupe le deuxième rang en fréquence des cancers de la femme dans le monde avec près de 500 000 nouveaux cas en 2005, ayant provoqué près de 260 000 décès [14]. L'ICC constitue la première cause de mortalité par cancer dans les pays en voie de développement. Au sein de l'Union européenne, 30 400 femmes sont touchées et la mortalité est estimée à 4,7 %. En France, les recommandations en vigueur concernant la conduite à tenir après un frottis cervico-utérin (FCU) anormal (Anaes de 2002 [15]) et concernant l'indication du test HPV (actualisation de l'HAS 2010 [16]) n'indiquent le test HPV qu'en seconde intention, et ce dans deux situations précises : la prise en charge d'un FCU de type Ascus (*Atypical squamous cell of undetermined significance*) chez la femme de plus de 30 ans et dans le cadre de la surveillance post-thérapeutique des CIN2-3 [17, 18]. L'utilisation du test HPV en première intention, en tant que nouveau procédé de dépistage primaire du cancer du col, est à l'étude depuis plusieurs années et fait l'objet d'expérimentations

dans plusieurs pays européens. Le test de dépistage des HPV à HR couplé à l'analyse cytologique a nettement permis d'accroître la sensibilité de détection des lésions de type CIN2+ chez les femmes de 30 ans et plus [19].

La majorité des techniques de recherche des HPV sont réalisées à partir d'un frottis cervico-utérin. Les FCU sont aujourd'hui majoritairement conditionnés en phase liquide. Bien que les milieux de conservation des cellules prélevées aient initialement été conçus pour les analyses cytologiques, ils peuvent également être utilisés à des fins virologiques visant à la recherche du génome viral, à condition qu'ils aient été préalablement validés dans ce contexte. En effet, chaque fabricant valide un ou plusieurs milieux pour chaque trousse et ne certifie l'efficacité de la technique que dans certaines conditions de réalisation et de conservation des échantillons avant la réalisation des tests. Dans le cas d'un frottis conventionnel, un second prélèvement doit être effectué à l'aide d'une cytobrosse qui sera déchargée dans un milieu de transport et de conservation virologique permettant de pratiquer le test HPV. Si la nature des milieux de transport des échantillons varie selon les préférences de l'anatomopathologiste ou du gynécologue, les performances intrinsèques, la durée et la température de conservation de ces milieux peuvent également avoir une influence sur la sensibilité de la détection qu'il convient de déterminer pour une technique donnée.

D'après une étude réalisée par le Centre national de référence (CNR) et publiée en 2012, près de la moitié des laboratoires de biologie médicale pratique des examens de détection et/ou de génotypage des HR dans des conditions qui ne sont pas conformes au Guide de bonne exécution des analyses (GBEA). Ces non-conformités concernent principalement la phase pré-analytique, notamment en raison de l'absence de marquage CE des milieux de transport ou parce qu'en dépit du marquage CE, ils n'ont pas été validés par les trousse de détection et/ou de génotypage utilisées [20].

Parmi les trousse commerciales disponibles sur le marché, le Cobas® 4800 HPV (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA, USA) est un test *in vitro* qualitatif par PCR en temps réel, destiné à la détection des HPV sur des échantillons de patients. Il présente l'avantage d'être complètement automatisé et de permettre le génotypage spécifique des HPV16 et/ou 18 tout en détectant simultanément les 12 autres types d'HPV à HR (OHR soit les HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68) à des niveaux d'infection cliniquement pertinents. La qualité du prélèvement est évaluée par la recherche simultanée d'un gène ubiquitaire ( $\beta$  globine) qui permet d'estimer la présence de cellules dans le milieu et d'un éventuel agent inhibiteur. Le test Cobas® 4800 HPV a été validé pour être utilisé uniquement à partir d'échantillons de cellules de col de l'utérus prélevées sur milieu de prélèvement :

Cobas® PCR Cell Collection Media (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA, USA), ou solution PreservCyt (ThinPrep, Hologic Incorporated, MA, USA) ou liquide de préservation SurePath (BD Diagnostics-TriPath).

L'objet de notre étude est d'évaluer les principaux milieux de conservation et/ou de transport de cellules du col de l'utérus dont l'utilisation n'est pas décrite dans la fiche technique du test Cobas® 4800 HPV. Les caractéristiques obtenues à partir de dix milieux parmi les plus fréquemment employés par les gynécologues et anatomopathologistes, seront comparées au milieu de référence PreservCyt dans le cas de cellules infectées par un HPV16, 18 et 68, ce dernier ayant été choisi arbitrairement pour représenter les HPV OHR. Sur la base des critères de performances mesurés pour chacun de ces milieux en comparaison avec ceux obtenus pour le milieu PreservCyt, leur utilisation pour la recherche d'HPV avec la technique Cobas® 4800 HPV ainsi que les conditions optimales de stabilité seront prospectivement évaluées.

## Matériels et méthodes

### Milieux

Les dix milieux testés (figure 1) se divisent en deux groupes : 1) les milieux cytologiques destinés à la réalisation d'un frottis monocouche, et 2) les milieux virologiques/bactériens destinés à un test spécifique HPV ou à la conservation/transport d'autres tests microbiologiques. Les milieux testés appartenant à la première catégorie sont Easyfix (Labonord SAS, Templemars, France), Qualicyt (Qualicyt, Vincenne, France), NovaPrep HQ+ (NovaCyt,

Velizy Villacoublay, France), CMDH (SARL Alphapath Manguio France), Cyt-All (Cytomega, Manguio, France). Les milieux testés dédiés à la deuxième catégorie sont : Digene, Cervical Sampler (Qiagen, Gaithersburg, USA), Aptima (Gen-Probe, San Diego, CA, USA), Multi-Collect (Abbott, Wiesbaden, Allemagne), M4RT Micro Test (Remel, Santa Fe Lenexa, USA) et PCR-Media (Roche, Rotkreuz, Suisse).

### Matériaux de référence

#### Milieu

Le milieu de référence utilisé est le milieu de conservation cytologique PreservCyt (ThinPrep, Hologic Incorporated, MA, USA) dont l'utilisation est validée et les paramètres de performances connus sont indiqués dans la notice du fournisseur pour le test Cobas® 4800 HPV (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA, USA).

#### Contrôles standards cellulaires infectés par des HPV de génotype 16 ou 18 ou 68

Afin d'évaluer les performances analytiques en fonction des milieux étudiés, un panel contrôle de lignées cellulaires infectées par HPV répondant au critère de la norme ISO NF EN 17511 a été utilisé (AcroMetrix® HPV Genotype Control, Life technologies). Ce panel comprend des cellules infectées par HPV16, AcroMetrix HPV-16 Genotype Control ref 950075 ; par HPV18, AcroMetrix HPV-18 Genotype Control ref 950076 ; et par HPV68, AcroMetrix HPV-68 Genotype Control ref 950077). Ces suspensions cellulaires, préparées à partir de lignées cellulaires HPV positives diluées en milieu PreservCyt sont conçues pour mimer les échantillons biologiques naturellement infectés

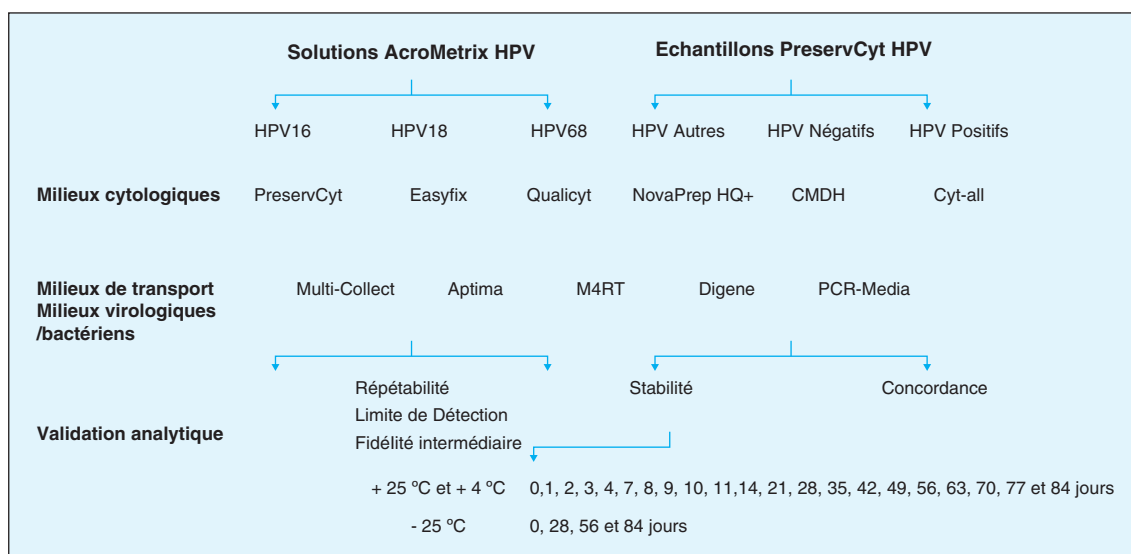


Figure 1. Schéma de l'étude.

contenant de l'ADN HPV sous forme intégrée au génome cellulaire. Les concentrations des suspensions cellulaires sont de l'ordre de 50 000 cellules/mL, de 250 000 cellules/mL et de 10 000 cellules/mL pour les solutions d'HPV16, 18 et 68, respectivement.

Les solutions mères servant à la préparation des solutions de travail sont établies à une concentration de 10 000 cellules/mL. Le volume de solution mère préparée est prévu en quantité suffisante pour la réalisation des tests de répétabilité, reproductibilité, et limite de détection.

### **Test Cobas® 4800 HPV**

Le test Cobas® 4800 HPV (Roche) est un test qualitatif par PCR temps réel utilisant le principe des sondes d'hydrolyse afin de déterminer simultanément lors d'un même test la présence spécifique de HPV 16 et/ou HPV18 et/ou la présence d'au moins un des 12 HPV hauts risques (HPV OHR dits autres) et de la  $\beta$  globine, au moyen d'un cocktail de sondes. Cette détermination simultanée est possible car l'appareil de PCR temps réel (z480, Roche) possède 4 canaux de lecture. Le logiciel qui pilote le système est donc capable pour chaque échantillon de tester la présence ou l'absence des 4 cibles recherchées.

Pour déterminer la positivité d'une PCR et/ou quantifier par PCR en temps réel un échantillon, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit de PCR est détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou « Ct » (*cycle threshold*) sera utilisé comme mesure du signal obtenu.

Le test Cobas® 4800 HPV n'est pas un test quantitatif en raison : 1) de l'absence de courbe standard, 2) du multiplexage pouvant induire des phénomènes de compétition sondes/amplicons difficilement mesurables, 3) de la difficulté d'évaluer la cellularité de l'échantillon primaire.

Le test Cobas® 4800 HPV fournit une donnée mesurable : le Ct. Lorsque les conditions d'utilisation sont strictement identiques : échantillon identique, de même cellularité, de même concentration virale, conservé et manipulé dans les mêmes conditions, nous pouvons exploiter la valeur du Ct comme facteur de comparaison.

### *Évaluation des performances de chaque milieu*

#### **Détermination de la limite de détection**

La limite de détection est définie par le vocabulaire international de métrologie (VIM) comme la valeur mesurée par une procédure opératoire donnée, pour laquelle la probabilité de déclarer faussement l'absence du pathogène dans un échantillon est  $\beta$ , et  $\alpha$  la probabilité de déclarer faussement sa présence. De manière classique, la limite de détection est déterminée pour une probabilité  $\beta$  de 5 %.

La détermination de la limite de détection est réalisée par dosage de 10 réplicats préparés extemporanément pour

chaque concentration testée. Cette détermination est effectuée pour les différents types viraux détectés dans chacun des canaux de lecture de l'instrument soit pour les génotypes HPV16, HPV18 et HPV68 pour le canal de détection des HPV OHR.

La limite de détection (LOD) est définie comme étant la plus faible concentration mesurable dans 95 % des échantillons. Lorsque la variable de réponse est binaire (0 ou 1, présence ou absence), les méthodes classiques de régression ne sont pas utilisables. Une alternative est d'utiliser une méthode élaborant une équation de prévision dont les valeurs appartiennent à [0;1] telle que la régression logistique ou l'analyse Probit. Dans notre analyse, la limite de détection a été déterminée selon la méthode de régression Probit [21].

#### **Répétabilité**

La répétabilité est définie comme l'étroitesse de l'accord entre les résultats de mesurage successifs d'un même mesurande effectués dans la totalité des mêmes conditions de mesure, appelées conditions de répétabilité. Les conditions de répétabilité imposent donc l'emploi d'un système analytique unique, l'intervention d'un opérateur unique, le recours à un seul lot de réactif, la réalisation des différents mesurages sur une période de temps la plus courte possible (norme ISO NF 5725). La répétabilité a été réalisée par dosage de 22 réplicats préparés extemporanément pour une concentration d'environ 1 500 copies/mL. Cette détermination est effectuée pour les différents types viraux détectés HPV16, HPV18 et HPV68.

#### **Fidélité intermédiaire FI (reproductibilité)**

La reproductibilité est définie comme l'étroitesse de l'accord entre les résultats de mesurage successifs effectués en faisant varier les conditions de mesure. L'expression de la variabilité doit spécifier les paramètres ayant fait l'objet de variation tels que le système analytique, l'opérateur, le lot de réactif, le temps de réalisation (norme NF ISO 5725). La reproductibilité a été réalisée par dosage de 22 réplicats préparés extemporanément pour une concentration de 1 500 copies/mL. Cette détermination est effectuée pour les différents types viraux détectés HPV16, HPV18 et HPV68. Les variables sont la date de réalisation du test et/ou l'opérateur.

#### **Comparaison de méthodes**

La comparaison de méthodes consiste à s'assurer de l'accord entre les résultats produits par une méthode définie comme référence, méthode consensuellement reconnue ou méthode initialement appliquée dans le laboratoire, et une méthode candidate. Dans le cas présent, l'objet de la concordance est de comparer les résultats obtenus au moyen d'un milieu de conservation à évaluer à ceux obtenus avec le milieu de référence PreservCyt validé pour emploi avec le test Cobas® 4800 HPV.

L'échantillon pris pour référence pour la réalisation du test de comparaison est un échantillon prélevé sur milieu PreservCyt. De manière à réduire le biais méthodologique lors de la comparaison, l'échantillon collecté est homogénéisé et réparti en volume égal dans deux tubes à centrifuger. Les cellules sont concentrées par centrifugation à 260 g durant 10 min à température ambiante, puis le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est lavé au moyen du milieu à tester pour un tube essai et au moyen de PreservCyt pour le tube de référence, avant de subir une nouvelle centrifugation à 260 g durant 10 min à température ambiante. Le culot est finalement repris dans un volume identique de milieu à tester pour un tube et de milieu de référence pour le second. Les échantillons ainsi générés sont testés en parallèle au sein d'une même série. Les résultats obtenus pour chacun des échantillons dans le milieu à évaluer sont comparés à ceux produits au moyen de l'échantillon en PreservCyt.

Le panel analysé est de 100 échantillons comprenant 50 % de négatifs et 50 % de positifs. Les échantillons positifs ont été sélectionnés de manière à représenter les génotypes HPV détectables, que ce soit des mono- ou des multi-infections. On définira pour chaque génotype la concordance positive par le pourcentage d'échantillons retrouvés positifs conformément au milieu de référence et inversement, la concordance négative par le pourcentage d'échantillons retrouvés négatifs. En cas de faux positifs ou de faux négatifs, les pourcentages de concordances totales positives ou négatives respectivement seront supérieurs à 100 % et inversement en cas de sous-estimation du nombre de positifs ou de négatifs.

### Stabilité

L'objet de l'étude de la stabilité est de déterminer quelle est la durée maximale de conservation de l'échantillon dans le milieu employé pour sa collecte en fonction du temps et de la température de stockage. La nature du génotype de papillomavirus n'étant pas réputée avoir une incidence notable sur la stabilité de l'échantillon, seul le paramètre HPV OHR a été évalué.

À cette fin, un pool d'échantillons PreservCyt HPV OHR positif a été préparé de façon à tester trois températures de conservation classiquement utilisées : température ambiante (25 °C +/- 5 °C), condition réfrigérée (5 °C +/- 3 °C) et condition congelée (-25 °C +/- 5 °C).

Les cellules sont concentrées par centrifugation à 260 g durant 10 min à température ambiante, puis le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est lavé au moyen du milieu à tester avant de subir une nouvelle centrifugation à 260 g durant 10 min à température ambiante. Le culot est finalement repris dans le volume approprié de milieu à évaluer.

Une suspension cellulaire stock suffisante est réalisée pour la totalité des temps et températures testés, chaque condition a été testée en triplicats. À partir de celle-ci, 63 pots de prélèvements sont préparés pour tester la température + 25 °C, 63 pots sont préparés pour tester la température + 5 °C et 12 pots sont préparés pour tester la température - 25 °C.

Les temps testés pour les températures de + 25 °C et + 4 °C sont 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 et 84 jours (J). Les temps testés pour la température - 25 °C sont 0, 28, 56 et 84 J.

La stabilité a été évaluée pour chaque milieu en prenant comme valeur de référence le Ct HPV OHR moyen, calculé sur l'ensemble des valeurs obtenues à J0 aux 3 températures testées (soit une moyenne de 9 résultats). Pour le type d'HPV étudié, la variation acceptable entre J0 et JN et ce, quelles que soient les températures, doit être inférieure à 2,8 fois l'écart type de reproductibilité. Des différences supérieures en comparaison de cette valeur moyenne impliquent que la stabilité du milieu affecte la qualité du résultat obtenu.

## Résultats

L'analyse des résultats porte sur l'étude des données relatives à 1) la LOD de chaque HPV, 2) la répétabilité, 3) la fidélité intermédiaire établie pour chacun des trois canaux de mesure employés pour le test Cobas® 4800 HPV, ainsi que 4) la concordance des résultats et 5) la stabilité du milieu dans le temps et à différentes températures (*figure 1*). Le milieu PreservCyt a été évalué selon la même méthodologie que les autres milieux de l'étude. Les résultats ainsi obtenus pour le milieu PreservCyt ont été considérés comme résultats de référence afin de comparer les performances des autres milieux. L'analyse comparative des LOD a été effectuée en utilisant les intervalles de confiance de la moyenne à 95 % (IC95) ; en l'absence de chevauchement des IC95, les distributions peuvent être considérées comme significativement différentes au seuil  $\alpha = 0,05$ .

### Limite de détection (LOD)

Afin d'évaluer l'influence des milieux testés sur la sensibilité du test, dix réplicats ont été mesurés pour chaque concentration de la gamme de dilution testée. Après détermination des LOD, les résultats obtenus pour les milieux à tester ont été comparés à ceux obtenus pour le milieu PreservCyt de référence. Le *tableau 1* présente les LOD déterminées pour les différents milieux et pour chaque génotype : HPV16, HPV18, et HPV OHR.

La *figure 2A* représente les LOD déterminées dans chaque milieu pour le génotype HPV16. Alors que le fournisseur



**Tableau 1.** Tableau comparatif des limites de détection (LOD) des milieux étudiés.

Milieux	LOD Probit [95%CI] copies/mL			LOD 100 % copies/mL		
	HPV16	HPV18	HPV OHR	HPV16	HPV18	HPV OHR
<b>PreservCyt - fournisseur*</b>	<b>600</b>	<b>600</b>	<b>450</b>			
PreservCyt - expérimental	105 [97 ; 122]	1 219 [989 ; 1 761]	113 [104 ; 128]	200	2 000	200
Multi-Collect	386 [328 ; 511]	736 [698 ; 808]	130 [123 ; 143]	800	1 000	200
Aptima	596 [506 ; 794]	1 012 [931 ; 1 174]	105 [97 ; 122]	600	2 000	200
CMDH	63 [55 ; 82]	386 [359 ; 439]	44 [43 ; 47]	60	600	60
Cyt-All	54 [50 ; 62]	361 [329 ; 425]	82 [80 ; 86]	80	600	100
Easyfix	< 100	1 211 [1 144 ; 1 339]	110 [103 ; 125]	100	2 000	200
M4RT	45 [40 ; 55]	378 [354 ; 426]	< 60	80	600	60
NovaPrep HQ+	110 [103 ; 125]	1 759 [1 476 ; 2 397]	104 [94 ; 125]	200	2 000	200
Qualicyt	70 [65 ; 79]	629 [537 ; 829]	323 [278 ; 420]	100	1 000	600
Digene	232 [211 ; 274]	979 [892 ; 1 153]	323 [290 ; 392]	400	2 000	600
PCR Media	339 [305 ; 410]	1 320 [1 261 ; 1 431]	243 [218 ; 295]	600	1 600	400

\*Selon les informations de la notice technique, la limite de détection (LOD) des génotypes de HPV à haut risque HPV16, HPV18 et HPV31 a été déterminée pour le test Cobas® 4800 HPV. Les limites de détection ont été évaluées à l'aide de plasmides de HPV16, HPV18 et HPV31, dans l'arrière-plan d'échantillons patients négatifs au HPV en pools prélevés en solution PreservCyt. Nous ne prendrons comme référence uniquement les valeurs issues de notre expérimentation.

Roche indique une LOD de 600 copies/mL pour HPV16, expérimentalement nous obtenons une LOD de 105 copies/mL. Les milieux Multi-Collect, Aptima, Digene, et PCR Media ont des LOD significativement supérieures à celle du milieu PreservCyt ( $p \leq 0,05$ ). Les milieux CMDH, Cyt-All, M4RT et Qualicyt ont des LOD significativement inférieures à celle du milieu PreservCyt ( $p \leq 0,05$ ). Les milieux Easyfix et NovaPrep HQ+ ont une LOD non significativement différente à celle du PreservCyt.

La *figure 2B* représente les LOD déterminées dans chaque milieu pour le génotype HPV18. D'après le fournisseur Roche la LOD pour HPV18 en milieu PreservCyt de référence est de 600 copies/mL, alors qu'expérimentalement nous obtenons une LOD de 1 219 copies/mL. Les milieux Multi-Collect, CMDH, Cyt-All, M4RT, et Qualicyt ont des LOD significativement inférieures à celle du milieu de référence PreservCyt ( $p \leq 0,05$ ). Quant aux milieux Aptima, Easyfix, NovaPrep HQ+, Digene, et PCR Media, ils ont des LOD non significativement différentes de celle du milieu PreservCyt.

La *figure 2C* représente les LOD déterminées dans chaque milieu pour les HPV OHR. Le fournisseur Roche indique une LOD de 450 copies/mL pour les HPV OHR, alors qu'expérimentalement nous déterminons une LOD de 113 copies/mL. Les milieux Qualicyt, Digene, et PCR Media ont des LOD significativement supérieures à celle du milieu PreservCyt ( $p \leq 0,05$ ). Les milieux CMDH, Cyt-All, et M4RT ont, quant à eux, des LOD significativement inférieures à celle du milieu PreservCyt ( $p \leq 0,05$ ). Les milieux Easyfix, Aptima, Multi-Collect et NovaPrep HQ+ ont des LOD non significativement différentes de celle du milieu de référence.

### Répétabilité et fidélité intermédiaire

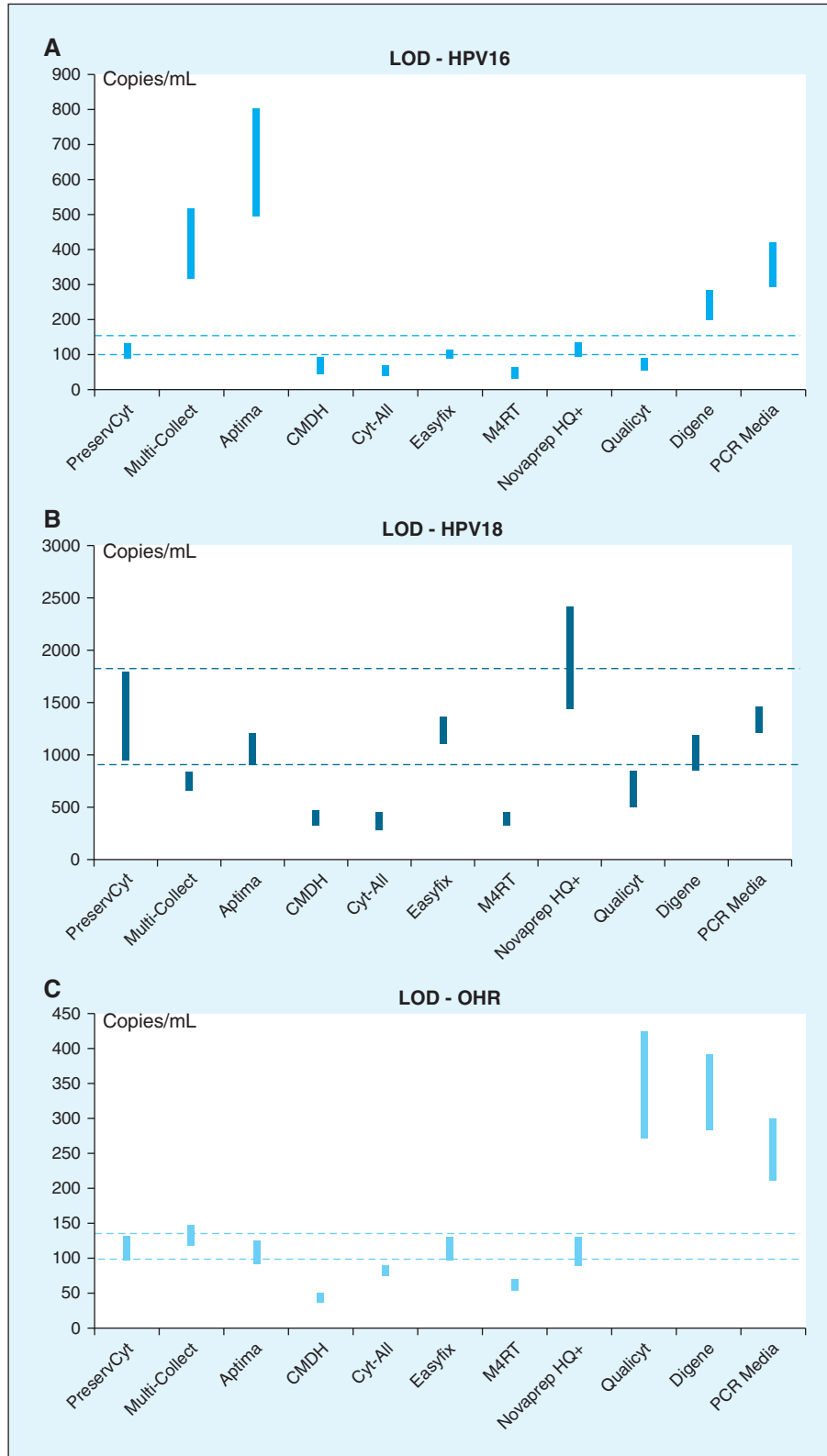
Les valeurs des coefficients de variation de répétabilité (CVr) des différents milieux varient entre 0,41 % et 2,13 % selon les types HPV. Pour HPV16, l'analyse des CVr montre qu'aucun des milieux ne présente un CVr supérieur à celui du milieu de référence PreservCyt (CVr = 1,39 % ; rapport des CVr < 1). Pour HPV18, les milieux Multi-Collect, Qualicyt, Digene, et PCR Media, présentent un CVr inférieur à celui du milieu de référence (0,98 %, 0,98 %, 0,84 %, et 1 %, respectivement, comparé à 1,12 % pour PreservCyt). Pour les HPV OHR, seul le milieu Digene présente un CVr inférieur à celui de référence (0,5 % vs. 0,54 %, respectivement). Notons que le rapport de CVr maximum de 3,88 a été trouvé pour le milieu PCR Media dans le cas des HPV OHR (*figure 3*).

Les valeurs des coefficients de variation de fidélité intermédiaire (CVR) varient entre 0,52 % et 5,20 %. Le rapport CVR (milieu à tester)/ CVR (milieu de référence) indique que les milieux CMDH, Cyt-All, et NovaPrep HQ+ présentent des CVR supérieurs à ceux du milieu de référence (*figure 4*) : le CMDH pour les trois HPV, le Cyt-All pour le HPV18, le NovaPrep HQ+ pour le HPV OHR.

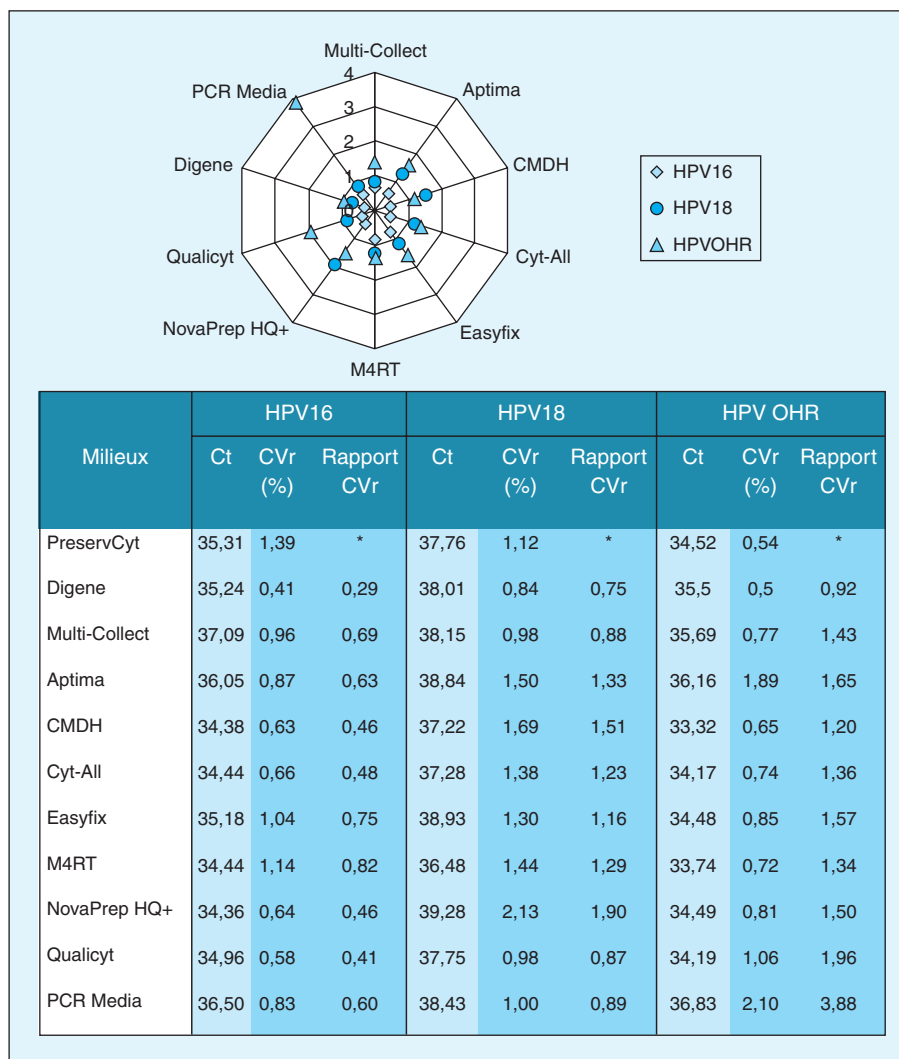
### Concordance

L'ensemble des milieux présente une bonne concordance (*tableau 2*).

Seuls les milieux Cyt-All et NovaPrep HQ+ ont montré une concordance parfaite avec le milieu de référence PreservCyt et ce pour tous les génotypes HPV. L'obtention d'un résultat positif ou négatif sans tenir compte de la capacité à détecter ou non plusieurs génotypes a montré



**Figure 2. A :** LOD des milieux pour le génotype HPV16. **B :** LOD des milieux pour le génotype HPV18. **C :** LOD des milieux pour le génotype HPV68.



**Figure 3.** Rapport des coefficients de variation de répétabilité de chaque milieu en fonction du milieu de référence. Ct : cycle Threshold ; CVr : coefficients de variation de répétabilité ; Rapport CVr = CVr (milieu à tester)/CVr (du milieu de référence PreservCyt).

que six milieux ont produit des résultats faussement négatifs : Multi-Collect, Aptima, PCR Media, Digene, CMDH et Qualicyt. D'autre part, cinq milieux ont produit des résultats faussement positifs : Easyfix, CMDH, M4RT, Qualicyt et PCR Media.

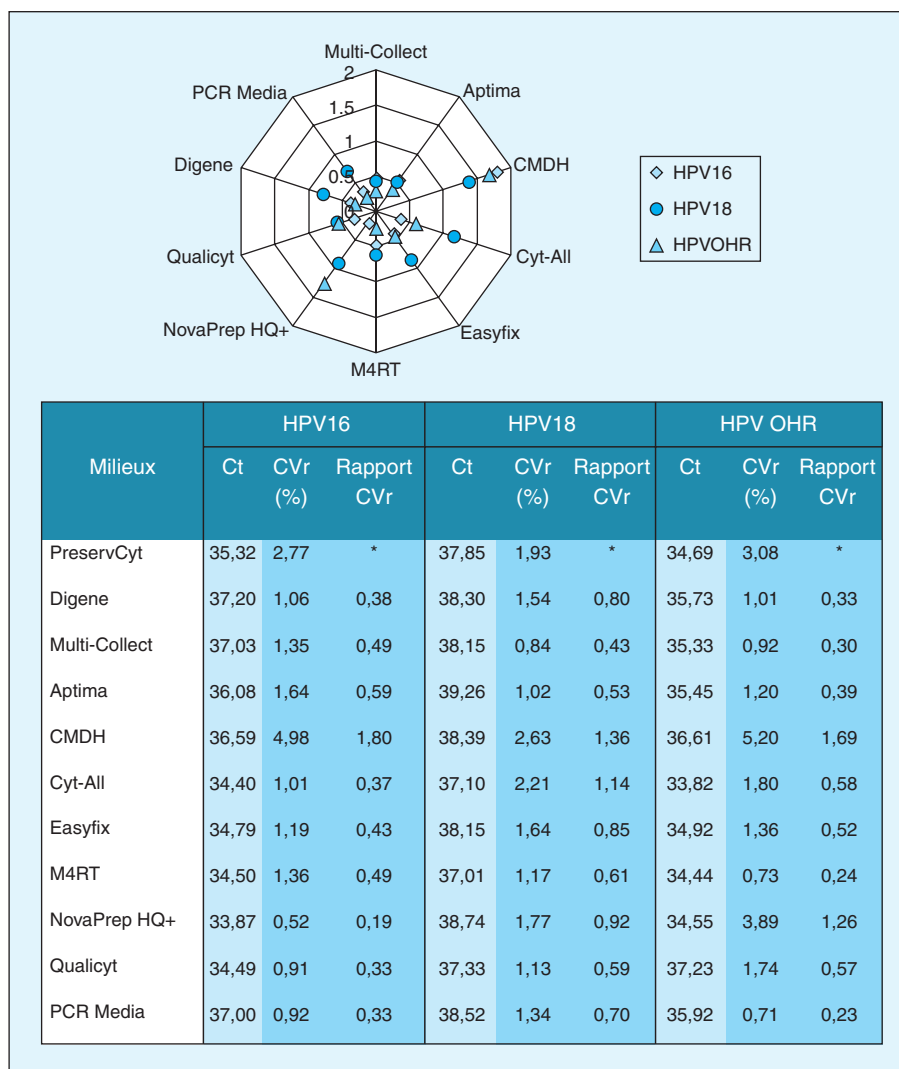
### Stabilité

La majorité des milieux évalués a montré une stabilité satisfaisante aux trois températures testées (- 25 °C, + 5 °C, et + 25 °C) pour une valeur modale de 84 jours. Toutefois deux milieux, le CMDH et le M4RT, présentent une durée de stabilité à + 25 °C relativement réduite de 3 et 2 jours respectivement, à + 5 °C. La conservation optimale est assurée jusqu'à 42 et 77 jours, respectivement (figure 5).

### Discussion

Le test Cobas® 4800 HPV (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA, USA) est un test *in vitro* qualitatif de PCR en temps réel permettant de rendre un résultat de génotypage partiel en concluant sur la présence ou l'absence concomitante d'HPV 16 et/ou HPV18 et/ou HPV OHR. Bien que près d'une vingtaine de milieux de conservation et/ou de transport disponibles sur le marché soient fréquemment utilisés en routine par le corps médical, l'utilisation de seulement 3 milieux est validée par le fournisseur. Afin de mieux maîtriser la phase préanalytique liée à la diversité de la nature des prélèvements HPV, notre laboratoire accrédité selon la norme ISO NF EN 15189, a procédé à l'évaluation de différents milieux. Nous avons entrepris





**Figure 4.** Rapport des coefficients de variation de la fidélité intermédiaire ou reproductibilité (CVR) de chaque milieu en fonction du milieu de référence. Ct : cycle Threshold ; CVr : coefficients de variation de fidélité intermédiaire ; Rapport CVr = CVr (milieu à tester)/CVr (du milieu de référence PreservCyt).

une étude visant à caractériser les critères de performances de notre test de routine Cobas® 4800 HPV pour les 3 types d'HPV détectables HPV 16, HPV 18 et les HPV OHR sur dix milieux de conservation et/ou de transport d'échantillons de cellules du col de l'utérus, en comparaison avec ceux obtenus pour le milieu de référence PreservCyt.

L'ensemble des résultats de la présente étude démontre une excellente corrélation de tous les paramètres mesurés et ce pour tous les génotypes détectables, sur les milieux Cyt-All et NovaPrep HQ+ avec ceux du milieu de référence PreservCyt. Par conséquent, les mêmes critères de performances que ceux déterminés par le fournisseur pour le PreservCyt sont applicables pour l'interprétation de résultats obtenus avec le test Cobas® 4800 HPV pour ces deux

milieux. Compte tenu des limites d'acceptabilité concernant la valeur limite de CVr (CVr limite < 0,75 x CVr de la référence) l'utilisation des milieux Digene, Qualicyt et Aptima peut également être validée avec le test Cobas® 4800 HPV sous réserve de la considération des LOD respectives.

Bien que le milieu CMDH présente des performances intéressantes pour les LOD, et ce quel que soit le type d'HPV, il montre non seulement des CVr supérieures au milieu de référence, mais surtout une instabilité à température ambiante justifiant une recommandation de conservation et de transport en conditions réfrigérées.

Le milieu Easyfix présente quant à lui d'excellentes performances au niveau de la LOD, de la répétabilité, de la fidélité

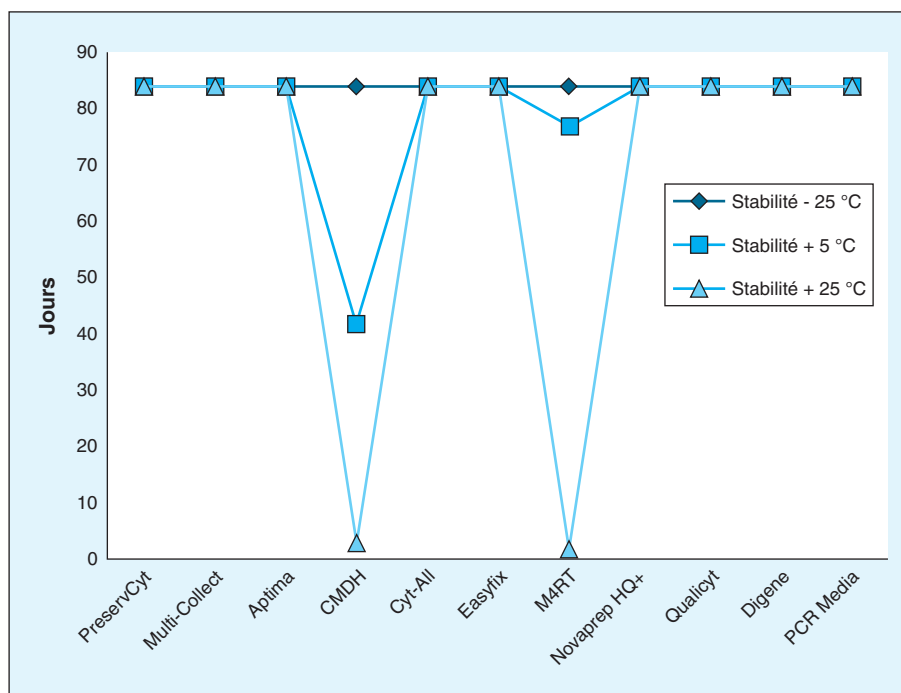
**Tableau 2.** Tableau comparatif des concordances de résultats HPV obtenus pour chaque milieu sur la base d'un panel de 100 échantillons.

Milieux	Effectif	Corrélation positive* (%)			Corrélation totale (%)		Kappa**
		HPV16	HPV18	HPV OHR	Positive	Négative	
Cytall	100	100	100	100	100	100	1
NovaPrep HQ+	100	100	100	100	100	100	1
Digene	100	94,44	100	100	98,41	102	0,99
Qualicyt	100	104	100	97,14	98,57	98,04	0,97
Aptima	100	100	100	97,96	98,33	102	0,98
M4RT	100	100	100	100	102,86	96,15	0,98
PCR Media	100	100	80	100	98,39	98,04	0,97
CMDH	100	100	90	100	101,41	98,08	0,96
Easyfix	100	100	100	100	107,94	90,57	0,94
Multi-Collect	100	100	100	89,8	91,67	110	0,92

\*La corrélation positive est définie par le pourcentage d'échantillons retrouvés positifs et inversement, la corrélation négative par le pourcentage d'échantillons retrouvés négatifs. En cas de faux positifs ou de faux négatifs, les pourcentages de corrélations totales positives ou négatives respectivement, seront supérieurs à 100 % et inversement en cas de sous-estimation du nombre de positifs ou de négatifs. \*\*Le coefficient kappa mesure le degré d'accord entre le résultat obtenu pour le milieu de référence et celui du milieu testé. Les valeurs comprises entre 0,81 et 1,00 démontrent un accord presque parfait (le kappa ne pouvant excéder la valeur 1,00).

intermédiaire et de la stabilité, cependant notre expérimentation montre qu'il détecte des échantillons faussement positifs. Une étude complémentaire serait nécessaire pour expliquer ce phénomène. Le milieu M4RT montre des performances comparables à celles du milieu de référence : pour les LOD et ce quel que soit le type d'HPV, le CVr et le CVR. Cependant nous observons une instabilité à température ambiante justifiant

une recommandation de conservation et de transport en conditions réfrigérées des échantillons. Les milieux Multi-Collect et PCR Media présentent des performances conformes à la référence : les LOD du HPV18, les CVr des HPV16 et HPV18, les CVR et ce quel que soit le type HPV, ainsi que la stabilité. Toutefois, on observe pour ces deux milieux une LOD pour HPV16 significativement supérieure, des CVr supérieurs pour HPV OHR, ainsi



**Figure 5.** Stabilité des différents milieux.

qu'une sous-évaluation de la positivité de certains échantillons. Une étude complémentaire serait nécessaire pour expliquer ce dernier point.

Le milieu SurePath (BD Diagnostics-TriPath) n'a pas été évalué dans cette étude, toutefois nous pensons qu'il serait utile de déterminer ses performances selon le même protocole afin d'obtenir un point de comparaison supplémentaire, et ce bien que ce milieu ait déjà été validé dans la notice fournisseur Roche.

Globalement, l'étude semble montrer que pour la recherche d'HPV avec le test Cobas® 4800 HPV, il est possible d'utiliser la plupart des milieux testés avec des performances sensiblement équivalentes à celles du milieu de référence. Les perspectives d'une telle étude sont d'autant plus intéressantes qu'il est fort probable que dans un avenir proche, les fournisseurs mettent à disposition des utilisateurs des milieux polyvalents tout aussi bien adaptés à la problématique des FCU mais également à celle de la conservation/transport de virus/bactéries permettant de réaliser la recherche des HPV, de *Chlamydia trachomatis* (CT), de *Neisseria gonorrhoea* (NG), etc. Il est à noter que le milieu PreservCyt est également déjà validé sur l'automate Cobas 4800 pour la recherche de CT/NG.

**Remerciements.** Nous tenons à remercier Monsieur Sylvain Kuzio (Roche, Meylan, France) pour sa participation dans la mise en place des outils d'exploitation des données ainsi que pour ses remarques avisées.

**Liens d'intérêts :** Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 518-27.
- Boulangier JC, Sevestre H, Bauville E, Ghigli C, Harlicot JP, Gondry J. Epidemiology of HPV infection. *Gynecol Obstet Fertil* 2004 ; 32 : 218-23.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, *et al.* A review of human carcinogens—Part B : biological agents. *Lancet Oncol* 2009 ; 10 : 321-2.
- De Villiers E, Fauquet C, Broker T, Bernard H, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004 ; 324 : 17-27.
- NIH. Cervical cancer. *NIH Consens Statement* 1996 ; 14 : 1-38 ; quiz 4p.
- Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer : a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003 ; 89 : 101-5.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide : a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003 ; 88 : 63-73.
- Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions : comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 ; 14 : 1157-64.
- De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, *et al.* Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer : a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010 ; 11 : 1048-56.
- Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, *et al.* The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005 ; 97 : 1072-9.
- Kjaer S, Hogdall E, Frederiksen K, Munk C, van den Brule A, Svare E, *et al.* The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 10630-6.
- Bulk S, Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L, Boeke AJ, Verheijen RH, *et al.* Risk of high-grade cervical intra-epithelial neoplasia based on cytology and high-risk HPV testing at baseline and at 6-months. *Int J Cancer* 2007 ; 121 : 361-7.
- IARC. *IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans Group IW.* IARC, 1995.
- Inca. *Le cancer du col de l'utérus en France. Etat des lieux.* Boulogne-Billancourt : Inca, 2010.
- Anaes. *Conduite à tenir devant une patiente ayant un frottis cervico-utérin anormal. Actualisation. Recommandations.* Anaes : Saint-Denis La Plaine, 2002.
- HAS. *État des lieux et recommandations pour le dépistage du cancer du col de l'utérus en France. Synthèse et Recommandations.* Paris : HAS, 2010.
- Carcopino X, Bolger N, Henry M, Mancini J, Boubli L, Olive D, *et al.* Evaluation of type-specific HPV persistence and high-risk HPV viral load quantitation in HPV positive women under 30 with normal cervical cytology. *J Med Virol* 2011 ; 83 : 637-43.
- Carcopino X, Muszynski C, Mergui JL, Gondry J, Boubli L. Should CIN 2 and 3 be treated the same way ? *Gynecol Obstet Fertil* 2011 ; 39 : 94-9.
- Wright Jr. TC, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening tests. 2006 ASCCP Sponsored Consensus Conference. *J Low Genit Tract Dis* 2007 ; 11 : 201-22.
- HAS. *Conditions de réalisation de la détection des papillomavirus humains (HPV). Note de cadrage.* Paris : HAS, 2012.
- Hewett P, Ganser GH. A comparison of several methods for analyzing censored data. *Ann Occup Hyg* 2007 ; 51 : 611-32.