



Direction de l'Evaluation des Dispositifs Médicaux
Département Surveillance du Marché
Unité Evaluation et Contrôle du Marché - DIV

**ETAT DES LIEUX DES DISPOSITIFS MEDICAUX
DE DIAGNOSTIC IN VITRO DE DEPISTAGE DE
L'ANTIGENE HBs DU VIRUS DE L'HEPATITE B
- PROBLEMATIQUE DES MUTANTS DE L'AgHBs -
(Version du 20/04/09)**

PLAN

- I- Introduction-Problématique**
- II- Méthodologie – Actions menées par l’Afssaps**
- III- Liste des réactifs de dépistage de l’antigène HBs**
- IV- Résultats de l’étude**
 - IV–1 Conception des tests**
 - IV–2 Etudes réalisées par les fabricants**
 - IV–3 Etude des notices**
- V- Réponses des industriels**
 - V–1 Procédure suivie**
 - V–2 Actions entreprises par les industriels sur les dispositifs**
- VI- Discussion –Conclusions -Recommandations**

Annexes :

Annexe I : Bibliographie

I- Introduction – Problématique

L'hépatite B est une maladie infectieuse, de transmission essentiellement sexuelle, sanguine (majoritairement chez les toxicomanes intra-veineux) ou mère-enfant.

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est souvent asymptomatique (60% des cas). La forme aigüe de la maladie (40% des cas) peut évoluer dans 0,1% à 1% des cas vers une hépatite fulminante. Cinq à 10% des formes asymptomatiques et aigües peuvent également évoluer vers la chronicité ; cette forme de la maladie pouvant conduire à une cirrhose ou un cancer du foie.

Le VHB est détectable dans le sang. La protéine de surface du VHB, antigène HBs (AgHBs) est un marqueur sérologique important de l'hépatite B. Actuellement, en France, le diagnostic de l'infection par le VHB repose essentiellement sur la mise en évidence de la présence de l'AgHBs et éventuellement des anticorps dirigés contre la capsid du virus (anticorps anti-HBc).

Depuis une dizaine d'années, on assiste à une augmentation de la fréquence de virus dont les déterminants antigéniques de l'AgHBs ont subi une ou plusieurs mutations qui s'observent pour les virus soumis à une pression immunitaire naturelle ou induite par la vaccination ou la thérapie.

Les zones comprises entre les acides aminés 120 à 123 et 140 à 145 du déterminant « a » de l'antigène HBs sont également connues pour être fortement immunogènes, mais également sujettes à de nombreuses variations (Tian Y. 2007, Weber B. 2006). Une des mutations la plus fréquemment retrouvée chez les personnes infectées par le virus de l'hépatite B correspond à la substitution d'un acide aminé glycine par une arginine en position 145 de la protéine « s » (mutant G145R) (Pawlotsky JM 2005).

Ces mutations modifient la structure de l'épitope avec comme conséquence possible la non-reconnaissance de l'antigène muté par les anticorps des réactifs de dépistage de l'AgHBs.

Selon les études récentes, la prévalence des mutants de l'AgHBs pourrait atteindre près de 30% (Roque-Afonso A. 2007).

La directive européenne 98/79/CE impose aux fabricants pour la mise sur le marché européen de réactifs de dépistage de l'AgHBs d'évaluer la sensibilité et la spécificité de leur réactif selon les Spécifications Techniques Communes (STC, 2009/108/CE). Celles-ci précisent que la spécificité doit être d'au moins 99% pour les tests rapides et 99,5% pour les autres réactifs. Concernant la sensibilité diagnostique du réactif, « *les performances globales du nouveau dispositif doivent être au moins équivalentes à celle du dispositif reconnu* » (STC 2009/108/CE, 3.1.8.2). Cependant, les STC pour les tests de dépistage de l'antigène HBs n'imposent pas spécifiquement aux fabricants d'évaluer les performances de leur réactif sur des souches mutées du VHB.

En 2006, le Paul Ehrlich Institut a mené une étude de performance sur 17 réactifs marqués CE. Cette étude montre que plusieurs réactifs n'ont pas détecté certains mutants des panels utilisés, même ceux couramment rencontrés entre les positions 143 et 145 (Scheiblauer H. 2006).

Dans ce contexte, l'Afssaps a réalisé un état des lieux concernant les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro de dépistage de l'AgHBs distribués en France au regard de la problématique des mutants de cet antigène.

II- Méthodologie- Actions menées par l’Afssaps

L'état des lieux concernant les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro de dépistage de l'AgHBs a consisté en :

- questionner les fabricants sur les éventuelles études ou données bibliographiques concernant la reconnaissance de virus mutants disponibles pour leur(s) réactif(s).
- vérifier si les notices d'utilisation des réactifs de dépistage de l'AgHBs mentionnent les performances du produit vis-à-vis des souches mutées du virus.

L'état des lieux a été réalisé en collaboration avec le Professeur Patrice ANDRE du laboratoire de virologie de l'hôpital de la Croix-Rousse à Lyon.

III- Liste des réactifs de dépistage de l’AgHBs

Au début de l'étude, vingt-trois réactifs marqués CE ont été déclarés à l'Afssaps ; parmi eux, 6 produits ne sont plus commercialisés et le réactif fabriqué par Murex (UK) ne semble pas distribué en France.

Le tableau suivant présente les réactifs marqués CE distribués en France.

Fabricant	Réactif
ABBOTT DIAGNOSTIC	PRISM HBsAg
ABBOTT DIAGNOSTIC	ARCHITECT HBsAg
ABBOTT DIAGNOSTIC	AxSYM HBsAg V2
ADALTIS	EIAgen HBsAg
BECKMAN COULTER	ACCESS HBs Ag
BIO-RAD SA	MONOLISA Ag HBs ULTRA
BIOMERIEUX	VIDAS HBs Ag Ultra
BIOMERIEUX BV	Hepanostika HBsAg Ultra
DIASORIN	ETI-MAK-4
DIASORIN	Liaison HBsAg
INVERNESS Médical France	ImmunoComb II HBs Ag
ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS	Vitros AgHBs Vitros AgHBs ES (commercialisé à partir de février 2009)
ROCHE DIAGNOSTICS GmbH	ELECSYS HBsAg II
SIEMENS HEALTHCARE DIAGN.	Immulite 2000, 2500 HBsAg
SIEMENS HEALTHCARE DIAGN.	Enzygnost HBsAg 5.0 Enzygnost HBsAg 6.0 (marqué CE en décembre 2008)
SIEMENS HEALTHCARE DIAGN.	ADVIA CENTAUR HBsAg

Sur les 16 réactifs présents sur le marché français au moment de l'état des lieux et pour lesquels les fabricants ont répondu : 10 sont des techniques automatisées, 5 sont des réactifs ELISA au format microplaque 96 puits et 1 réactif est un test rapide.

En décembre 2008, Siemens Healthcare Diagnostics a marqué CE une nouvelle version du test Enzygnost : Enzygnost HBsAg 6.0.

En février 2009, le test Vitros AgHBs (Ortho Clinical Diagnostics) a été remplacé par le test Vitros AgHBs ES.

IV- Résultats de l'étude

IV-1 Conception des tests

Les tests actuellement sur le marché sont des tests EIA « sandwich » basés sur le principe de la capture directe de l'AgHBs par des anticorps.

La phase de capture utilise essentiellement des anticorps monoclonaux humains ou murins, de 1 à 4 anticorps différents suivant les réactifs, fixés sur un support solide (par exemple microplaque ou microparticule).

La révélation de la réaction est réalisée par l'intermédiaire d'anticorps marqués, soit polyclonaux, soit monoclonaux.

Les problèmes de détection peuvent survenir dans le cas où le(s) anticorps utilisé(s) par les industriels sont dirigés vers une zone de la protéine « s » susceptible de contenir une mutation.

IV-2 Etudes réalisées par les fabricants

Trois réactifs ne disposent ni d'études scientifiques, ni de bibliographie relative à l'étude des performances du produit vis-à-vis de souches mutées et les fabricants de 4 réactifs nous ont transmis des références bibliographiques uniquement.

Les études qui nous ont été transmises pour 8 réactifs montrent une grande hétérogénéité en termes de nombre d'échantillons et de souches testées :

- le nombre de souches mutées testées va de 2 à plus de 100 suivant les réactifs,
- les souches testées sont essentiellement des mutants recombinants possédant une ou plusieurs mutations,
- une souche contenant la mutation la plus répandue (G145R) est retrouvée dans chacune des études.

L'hétérogénéité des études en termes de nombre d'échantillons testés peut cependant être expliquée par l'absence de panels commerciaux contenant des virus recombinants mutés.

Cependant, les résultats des études montrent généralement une bonne reconnaissance des souches mono ou poly-mutées qui ont été testées. Un réactif ne détecte cependant pas les souches contenant une mutation G145R.

Le tableau suivant synthétise les éléments disponibles au regard de la problématique des mutants AgHBs.

Réactif	Etudes	Bibliographie	Information dans la notice
PRISM HBsAg (ABBOTT DIAGNOSTIC)		X	
ARCHITECT HBsAg (ABBOTT DIAGNOSTIC)		X	X
AxSYM HBsAg V2 (ABBOTT DIAGNOSTIC)		X	
EIAgen HBsAg (ADALTIS)			
ACCESS HBs Ag (BECKMAN COULTER)	X		X
MONOLISA Ag HBs ULTRA (BIO-RAD)	X	X	X
VIDAS HBs Ag Ultra (BIOMERIEUX)	X		
Hepanostika HBsAg Ultra (BIOMERIEUX BV)		X	
Enzygnost HBsAg 5.0 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGN.)	X		
ETI-MAK-4 (DIASORIN)	X		
Liaison HBsAg (DIASORIN)	X		
Immunité 2000, 2500 HBsAg (SIEMENS HEALTHCARE DIAGN.)	X		
ImmunoComb II HBs Ag (INVERNESS Médical France)			
ELECSYS HBsAg II (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH)	X		X
ADVIA CENTAUR HBsAg (SIEMENS HEALTHCARE DIAGN.)			
VITROS AgHBs (ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS)	X		

IV–3 Etude des notices

Seules 4 notices font références aux études réalisées sur les mutants de l'AgHBs .
Le tableau ci-après présente les éléments des notices d'utilisation de ces réactifs.

Access HBs Ag (Beckman Coulter)	[...] un panel de 15 protéines recombinantes représentant les mutations majeures sur les séquences des acides aminées de l'antigène HBs a été testé. Tous les échantillons du panel recombinant ont été détectés avec le test Access HBs Ag.												
Architect AgHBs (Abbott)	La susceptibilité de mutation de l'AgHBs a été évaluée par le dosage ARCHITECT AgHBs. Le mutant de l'AgHBs le plus fréquent, le Gly→Arg145 (mutation de la glycine [GLY] en arginine [ARG] sur la position 145 de l'acide aminée de l'AgHBs), était facilement détectable par le dosage ARCHITECT AgHBs avec une sensibilité équivalente à la détection de l'AgHBs de type sauvage. ¹⁹ (19 : Oon C. et al. Vaccine 1995)												
ELECSYS HBs AG II (Roche)	<p>Un total de 115 échantillons comprenant différentes mutations de l'Ag HBs ont été testés avec le test Elecsys HBsAg II et comparés à 3 tests HBsAg agréés.</p> <table border="1" data-bbox="491 808 1390 1368"> <thead> <tr> <th data-bbox="491 808 943 869">Panel de mutants</th> <th data-bbox="943 808 1390 869">Elecsys HBsAg II Testés positifs</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="491 869 943 1088">Panel 1 de mutants natifs (souches présentant des substitutions d'acide aminés causées par une résistance au vaccin ou au traitement à l'immunoglobuline humaine de l'hépatite B, ou uneréactivité entravée de l'Ag HBs)</td> <td data-bbox="943 869 1390 1088">41/40^d</td> </tr> <tr> <td data-bbox="491 1088 943 1200">Panel 2 de mutants natifs (souches présentant d'autres modifications d'acide aminés)</td> <td data-bbox="943 1088 1390 1200">24/24</td> </tr> <tr> <td data-bbox="491 1200 943 1256">Panel 3 de mutants natifs</td> <td data-bbox="943 1200 1390 1256">19/17^e</td> </tr> <tr> <td data-bbox="491 1256 943 1312">Panel de mutants recombinant</td> <td data-bbox="943 1256 1390 1312">31/31</td> </tr> <tr> <td data-bbox="491 1312 943 1368">Total</td> <td data-bbox="943 1312 1390 1368">115/112</td> </tr> </tbody> </table> <p>d) échantillon négatif (mutation G145R) dans tous les tests (E/S 0,1-0,8) ; tous les échantillons dosés ont été dilués au 1/40e à l'aide de SFV (sérum foetal de veau). e) échantillons négatifs (mutations M133L/M143T/G145R et T45S/I49R/113T114/I186P) dans tous les tests ; 1ère mutation testée dans 3 tests (E/S 0,03-0,76), 2e mutation testée dans 4 tests (E/S 0,03-0,78).</p>	Panel de mutants	Elecsys HBsAg II Testés positifs	Panel 1 de mutants natifs (souches présentant des substitutions d'acide aminés causées par une résistance au vaccin ou au traitement à l'immunoglobuline humaine de l'hépatite B, ou uneréactivité entravée de l'Ag HBs)	41/40 ^d	Panel 2 de mutants natifs (souches présentant d'autres modifications d'acide aminés)	24/24	Panel 3 de mutants natifs	19/17 ^e	Panel de mutants recombinant	31/31	Total	115/112
Panel de mutants	Elecsys HBsAg II Testés positifs												
Panel 1 de mutants natifs (souches présentant des substitutions d'acide aminés causées par une résistance au vaccin ou au traitement à l'immunoglobuline humaine de l'hépatite B, ou uneréactivité entravée de l'Ag HBs)	41/40 ^d												
Panel 2 de mutants natifs (souches présentant d'autres modifications d'acide aminés)	24/24												
Panel 3 de mutants natifs	19/17 ^e												
Panel de mutants recombinant	31/31												
Total	115/112												
Monolisa HBsAg ULTRA (Bio-Rad)	Un panel de 15 protéines recombinantes mimant les plus importantes mutations en séquences d'acides aminés de l'AgHBs a été testé et a été entièrement détecté avec MONOLISA [®] HBsAg ULTRA.												

VII- Réponses des industriels

V-1 Procédure suivie

L'état des lieux a été transmis aux industriels en février 2009. Une période contradictoire a été respectée pour permettre aux industriels de répondre aux remarques signalées dans le rapport de l'état des lieux.

V-2 Action entreprises par les industriels sur les dispositifs

Cinq fabricants sur les 10 concernés nous ont transmis une réponse au rapport de l'état des lieux. Le tableau suivant résume les actions en cours ou réalisées par les fabricants à l'issue de l'état des lieux réalisé par l'Afssaps.

Réactif	Etudes	Bibliographie	Information dans la notice	Action réalisées par les industriels ou en cours
PRISM HBsAg (ABBOTT DIAGNOSTIC)		X		
ARCHITECT HBsAg (ABBOTT DIAGNOSTIC)		X	X	
AxSYM HBsAg V2 (ABBOTT DIAGNOSTIC)		X		
EIAgen HBsAg (ADALTIS)				Modification de l'analyse de risque
ACCESS HBs Ag (BECKMAN COULTER)	X		X	
MONOLISA Ag HBs ULTRA (BIO-RAD)	X	X	X	
VIDAS HBs Ag Ultra (BIOMERIEUX)	X			Modification de la notice du réactif
Hepanostika HBsAg Ultra (BIOMERIEUX)		X		Modification de la notice du réactif
Enzygnost HBsAg 5.0 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGN.)	X			Nouvelle version du réactif disponible : Enzygnost HBsAg 6.0, modification de la notice de ce nouveau réactif.
ETI-MAK-4 (DIASORIN)	X	X		Modification de la notice du réactif
Liaison HBsAg (DIASORIN)	X	X		Modification de la notice du réactif
Immulite 2000, 2500 HBsAg (SIEMENS HEALTHCARE DIAGN.)	X	X		
ImmunoComb II HBs Ag (INVERNESS Médical France)				
ELECSYS HBsAg II (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH)	X		X	
ADVIA CENTAUR HBsAg (SIEMENS HEALTHCARE DIAGN.)				
VITROS AgHBs (ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS)	X		X	Nouveau réactif disponible : Vitros AgHBs ES avec notice modifiée

Siemens Healthcare Diagnostics nous a informé de la future disponibilité du réactif Enzygnost HBsAg 6.0 (marqué CE en décembre 2008) en remplacement du réactif

Enzygnost HBsAg 5.0. Des études complémentaires concernant les mutants de l'AgHBs ont été conduites sur ce réactif. Une modification de la notice d'utilisation est prévue après publication des résultats des études complémentaires. La nouvelle notice intégrera les données relatives à la détection des mutants.

Ortho Clinical Diagnostics commercialise depuis le mois de février 2009 la trousse Vitros AgHBs ES en remplacement de la version précédente. Le chapitre « performances cliniques » de la notice d'utilisation de la nouvelle version intègre un paragraphe concernant la détection des mutants (sur la base de l'article de JM Echevarria, J. Med. Virol. 2008, 80 :598-602)

Deux fabricants (Diasorin et Biomérieux) nous ont fait part de leur intention de modifier les notices d'utilisation de leurs produits pour préciser les performances de leur produit vis-à-vis des souches mutées.

Enfin, la société Adaltis nous a informés que l'analyse de risque concernant le réactif EIAgen AgHBs allait être révisée afin de prendre en compte l'absence de données relatives aux mutants de l'AgHBs.

VI- Discussion –Conclusions -Recommandations

Le contrôle du marché réalisé par l'Afssaps concernant les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro de dépistage de l'AgHBs avait pour but de faire un état des lieux en questionnant les fabricants quant à la disponibilité pour leur(s) réactif(s) de bibliographie et/ou d'études sur des panels de virus mutants et en étudiant si les notices d'utilisation des réactifs mentionnent les performances du produit sur les souches mutées du virus.

L'état des lieux met en avant une grande hétérogénéité entre le nombre et le type de mutants testés lorsque des études ont été réalisées.

Bien que l'étude des mutants de l'antigène HBs ne soit pas une exigence réglementaire, l'émergence de nouveaux mutants et l'augmentation de la fréquence d'apparition de ceux-ci devrait inciter les fabricants à :

- revoir périodiquement l'analyse de risque de leur produit en fonction de l'évolution de l'épidémiologie du virus ;
- mettre systématiquement en place des études de sensibilité de leur réactif vis-à-vis des principaux mutants connus (G145R, mutants compris dans la région 120 par exemple), voire de souches poly-mutées ;

Enfin, le biologiste devrait pouvoir retrouver dans la notice d'utilisation du réactif :

- les performances du produit vis-à-vis des principaux mutants sous forme d'une synthèse des résultats, lorsque des études ont été réalisées.
- les limites du test pour la détection des mutants de l'AgHBs si aucune étude n'a été réalisée, ou si les résultats obtenus ont montré un défaut de sensibilité du test.

ANNEXE I- Bibliographie

Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. *J Med Virol.* 1999 Sep;59(1):19-24.

Ly TD, Servant-Delmas A, Bagot S, Gonzalo S, Férey MP, Ebel A, Dussaix E, Laperche S, Roque-Afonso AM. Sensitivities of four new commercial hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) assays in detection of HBsAg mutant forms. *J Clin Microbiol.* 2006 Jul;44(7):2321-6.

Nick S, Scheiblaue H. Sensitivities of CE-marked HIV, HCV, and HBsAg assays. *J. Med Virol.* 2007; 79 suppl. 1 : S59-S64

Oon CJ, Lim GK, Ye Z, Goh KT, Tan KL, Yo SL, Hopes E, Harrison TJ, Zuckerman AJ. Molecular epidemiology of hepatitis B virus vaccine variants in Singapore. *Vaccine.* 995;13(8):699-702.

Ly TD. Detection HBsAg mutants by immunoassays. *J. Med Virol.* 2007; 79 suppl. 1 : S37-S41

Ly TD, Servant-Delmas A, Bagot S, Gonzalo S, Férey MP, Ebel A, Dussaix E, Laperche S, Roque-Afonso AM. Sensitivities of four new commercial hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) assays in detection of HBsAg mutant forms. *J Clin Microbiol.* 2006; 44 : 2321-6

Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J. Clin Virol.* 2005; 34 Suppl. 1 : S125-S129

Roque-Afonso AM, Férey MP, Ly TD, Graube A, Costa-Faria L, Samuel D, Dussaix E. Viral and clinical factors associated with surface gene variants among hepatitis B virus carriers. *Antivir. Ther.* 2007; 12 : 1255-63.

Scheiblaue H, Soboll H, and Nick S. Evaluation of 17 CE-marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection. *J. Med Virol.* 2006; 78 suppl. 1 : S66-S70.

Tian Y, Xu Y, Zhang Z, Meng Z, Qin L, Lu M, Yang D. The amino acid residues at position 120 to 123 are crucial for the antigenicity of hepatitis B surface antigen. *J. Clin Microbiol.* 2007; 45 : 2971-8

Weber B. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. *J. Med Virol.* 2006; 78 suppl. 1 : S59-S65.Y.