

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Charge virale de l'Hépatite C : ARN-VHC

ARN-VHC

05VHC1

mars 2005

Edition : novembre 2006

Isabelle HELIAS (Afssaps)
Joliette COSTE, Chantal Fournier (EFS Montpellier)

Expédition	22 mars 2005
Clôture	25 avril 2005
Edition des compte-rendus individuels	28 juillet 2005
Paramètres contrôlés	ARN du virus de l'Hépatite C : 05-1C ; 05-2C ; 05-3C et 05-4C
Nombre de laboratoires concernés*	156
Nombre de laboratoires participants**	150

* Laboratoires ayant déclaré à l'Afssaps pratiquer les analyses concernées par l'envoi et ayant reçu le colis de l'opération

**Laboratoires ayant retourné un bordereau-réponse correctement identifié par le code laboratoire, avant la date de clôture de l'opération.

Résumé de l'opération

Les 156 laboratoires concernés ont reçu 4 échantillons différents pour la détection de l'ARN du virus de l'hépatite C (VHC) et/ou la quantification de cet ARN. Les échantillons sont envoyés en double si le laboratoire effectue la détection et la quantification.

Deux niveaux d'ARN-VHC ont été envoyés en doublon afin d'étudier la répétabilité des résultats.

Le niveau 1 se situe aux alentours de 3,3 log UI/ml d'ARN-VHC (génotype 1) et correspond aux échantillons 05-2C et 05-3C.

Le niveau 2 se situe aux alentours de 4,1 log UI/ml d'ARN-VHC et correspond aux échantillons 05-1C et 05-4C.

On compte 65 laboratoires n'ayant fait que la détection de l'ARN-VHC, 10 laboratoires n'ayant fait que la quantification de cet ARN, 70 laboratoires ayant fait la détection et la quantification et enfin 5 laboratoires n'ont fait aucune analyse.

Le taux de participation est de 96,2%. Les résultats des laboratoires sont satisfaisants.

Tous les échantillons ont été trouvés positifs (100% de bonnes réponses).

Les mesures quantitatives rendues par les laboratoires étaient en accord avec les valeurs attendues pour les deux niveaux de concentrations.

Détection de l'ARN-VHC

Définition de l'échantillon

Les échantillons proviennent d'un pool de plasmas humains défibrinés positifs en ARN-VHC génotype 1.

Les échantillons sont présentés dans le tableau I.

tableau I – échantillons de l'opération 05VHC1

Echantillon	Niveau 1 : 05-2C et 05-3C	Niveau 2 : 05-1C et 05-4C
Définition de l'échantillon	ARN-VHC positif (génotype 1)	ARN-VHC positif (génotype 1)

Résultats des participants

1- Réactifs de détection utilisés

On compte 135 laboratoires ayant pratiqué la détection de l'ARN-VHC, ce nombre est en baisse de 6% par rapport à 2003 (144 laboratoires).

La répartition des réactifs est présentée dans le tableau II.

Pour la première fois, un réactif basé sur une technique de PCR en temps réel est utilisé dans une opération de contrôle de qualité ARN-VHC : il s'agit du réactif Roche Diagnostics Cobas TaqMan HCV test. La version automatisée sur Cobas du test Amplicor HCV v.2.0 de la firme Roche Diagnostics est largement utilisée en France (65,2% des utilisateurs).

tableau II – réactifs de détection utilisés

Réactifs	Nombre d'utilisateurs
Bayer Versant HCV RNA qualitative assay	3 (2,2%)
Chiron HIV-1/HCV Procleix Assay	3 (2,2%)
Chiron HIV-1/HCV/HBV Ultrio	2 (1,5%)
Roche Diagnostics Cobas Ampliscreen HCV test	4 (3,0%)
Roche Diagnostics Amplicor HCV v.2.0	31 (22,9%)
Roche Diagnostics Cobas Amplicor HCV v.2.0	88 (65,2%)
Roche Diagnostics Cobas TaqMan HCV test	2 (1,5%)
Réactifs autres	2 (1,5%)

2- Résultats de la détection de l'ARN-VHC obtenus sur les échantillons de contrôle

Les résultats de la détection de l'ARN-VHC sont présentés dans les tableaux III et IV.

tableau III - récapitulatif des résultats de la détection de l'ARN-VHC pour les échantillons 05-2C et 05-3C (niveau 1)

Réactifs	Nombre d'utilisateurs	Echantillon 05-2C		% de bonnes réponses (1)	Echantillon 05-3C		% de bonnes réponses (1)
		Nbre mesures	Nbre Résultats positifs		Nbre mesures	Nbre Résultats positifs	
BAYER Versant HCV RNA qualitative assay	3	3	3	100,0	3	3	100,0
CHIRON HIV-1/HCV Procleix Assay	3	3	3	100,0	3	3	100,0
CHIRON HIV-1/HCV/HBV Ultrio	2	2	2	100,0	2	2	100,0
ROCHE Cobas Ampliscreen HCV test	4	4	4	100,0	4	4	100,0
ROCHE Amplicor HCV v.2.0	31	31	31	100,0	31	31	100,0
ROCHE Cobas Amplicor HCV v.2.0	88	88	88	100,0	88	88	100,0
ROCHE Cobas TaqMan HCV test	2	2	2	100,0	2	2	100,0
Réactifs autres	2	2	2		2	2	

(1) Nombre de résultats positifs obtenus sur des échantillons positifs

tableau IV - récapitulatif des résultats de la détection de l'ARN-VHC pour les échantillons 05-1C et 05-4C (niveau 2)

Réactifs	Nombre d'utilisateurs	Echantillon 05-1C		% de bonnes réponses (1)	Echantillon 05-4C		% de bonnes réponses (1)
		Nbre mesures	Nbre Résultats positifs		Nbre mesures	Nbre Résultats positifs	
BAYER Versant HCV RNA qualitative assay	3	3	3	100,0	3	3	100,0
CHIRON HIV-1/HCV Procleix Assay	3	3	3	100,0	3	3	100,0
CHIRON HIV-1/HCV/HBV Ultrio	2	2	2	100,0	2	2	100,0
ROCHE Cobas Ampliscreen HCV test	4	4	4	100,0	4	4	100,0
ROCHE Amplicor HCV v.2.0	31	31	31	100,0	31	31	100,0
ROCHE Cobas Amplicor HCV v.2.0	88	88	88	100,0	88	88	100,0
ROCHE Cobas TaqMan HCV test	2	2	2	100,0	2	2	100,0
Réactifs autres	2	2	2		2	2	

(1) Nombre de résultats positifs obtenus sur des échantillons positifs

On observe un pourcentage de bonnes réponses de 100% quel que soit le réactif utilisé pour les niveaux d'ARN-VHC étudiés.

Quantification de l'ARN-VHC

Définition de l'échantillon

Les échantillons ont été testés à l'Unité d'expertise en Virologie (Dr S. Laperche, INTS Paris) et les résultats sont présentés dans le tableau V.

Tableau V - Résultats des tests

Réactif	Niveau 1 : 05-2C et 05-3C		Niveau 2 : 05-1C et 05-4C	
	UI/ml	Log UI/ml	UI/ml	Log UI/ml
ROCHE Amplikor HCV v.2.0	7 800	3,89	83 000	4,92
	2 700	3,43	91 000	4,96
	8 500	3,93	85 000	4,93
	6 300	3,80	91 500	4,96

Résultats des participants

1- Réactifs de quantification utilisés

La répartition des réactifs parmi les participants (tableau VI) est similaire à celle de 2003, avec cependant l'apparition du réactif Roche Cobas TaqMan HCV (2 utilisateurs), test basé sur une technique de PCR en temps réel

Tableau VI – réactifs de quantification utilisés

Réactifs	Nombre d'utilisateurs
Bayer Versant HCV RNA	35 (43,8%)
Roche Diagnostics Amplikor HCV Monitor test v.2.0	9 (11,2%)
Roche Diagnostics Cobas Amplikor HCV Monitor test v.2.0	30 (37,5%)
Roche Diagnostics Cobas Taqman HCV test	2 (2,5%)
Réactifs autres	4 (5%)

2- Traitement statistique des données obtenues par les laboratoires

L'analyse des résultats quantitatifs de cette opération 2005 du Contrôle National de Qualité a été réalisée conformément à la norme ISO 5725-2, comme pour les opérations précédentes. L'analyse des résultats quantitatifs se décompose en plusieurs étapes :

- Exclusion des irrégularités évidentes
- Identification des mesures aberrantes et des valeurs isolées

L'existence de deux mesures au niveau 1 et 2 permet de détecter les laboratoires ayant une moyenne ou une variance soit aberrante soit isolée par rapport aux autres laboratoires, d'après les études statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k.

Les tracés de ces statistiques de cohérence sont respectivement représentés sur les figures 1 à 6 pour chaque réactif. Les valeurs critiques de ces statistiques à 5% et à 1% (caractérisant respectivement les valeurs isolées et les valeurs aberrantes) sont également représentées sur ces figures. Les valeurs aberrantes sont exclues de la suite de l'analyse statistique, à moins qu'elles ne puissent être expliquées et donc corrigées. Les valeurs isolées sont conservées dans la suite de l'analyse.

- Description générale des mesures par réactif

Après exclusion des valeurs détectées comme aberrantes dans l'analyse de cohérence, on peut décrire globalement l'ensemble des mesures pour chaque réactif en termes de moyenne générale et de variance de reproductibilité qui peut être décomposée en variance inter-laboratoires et variance de répétabilité. La variance de répétabilité représente la variance intra-laboratoire due à l'erreur aléatoire. La répétabilité peut être également étudiée en calculant l'écart observé entre deux mesures obtenues au niveau considéré par chaque laboratoire. La variance de reproductibilité exprime donc la variabilité totale d'une mesure combinant à la fois la variabilité intra-laboratoire et inter-laboratoires.

L'exploitation statistique n'a pas été effectuée pour les réactifs ayant moins de 5 laboratoires utilisateurs.

3- Statistiques de cohérence par réactif

Les tracés des statistiques de cohérence (h : inter-laboratoire et k : intra-laboratoire) sont respectivement représentés sur les figures 1 à 6 pour chaque réactif à chaque niveau. Les valeurs critiques de ces statistiques à 1% (caractérisant respectivement les valeurs aberrantes) sont également représentées sur ces figures.

Valeur critique de la statistique h à 1% :

Valeur critique de la statistique k à 1% :

.....

Les statistiques de cohérence du réactif ROCHE Cobas TaqMan HCV test n'ont pas été calculées du fait du faible nombre de laboratoires utilisateurs.

figure 1 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique par le réactif BAYER Diagnostics Versant HCV 3.0 RNA Assay (bDNA) au niveau 1

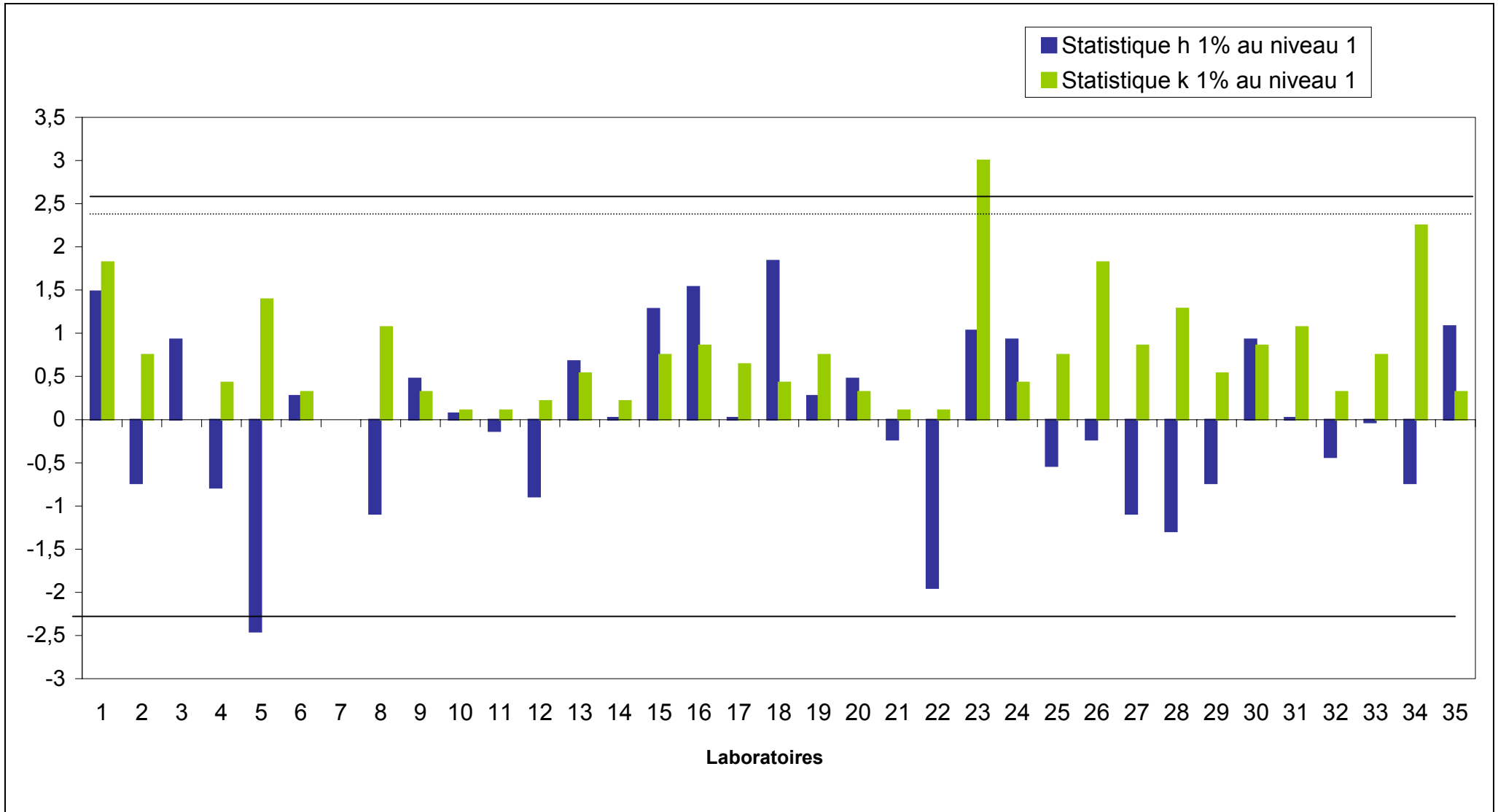


figure 2 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique par le réactif BAYER Diagnostics Versant HCV 3.0 RNA Assay (bDNA) au niveau 2

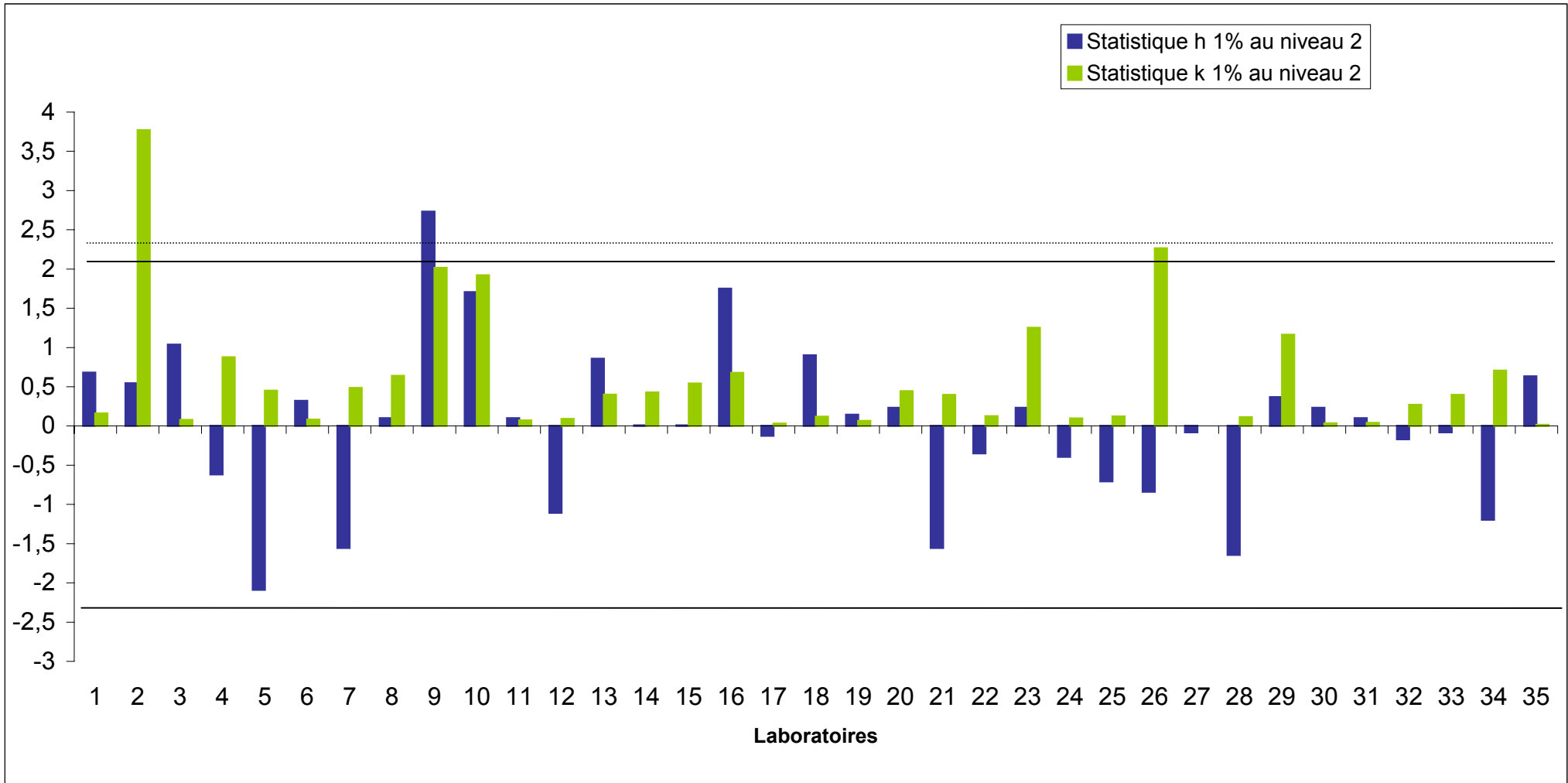


figure 3 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique par le réactif ROCHE Amplicor HCV Monitor Test v.2.0 au niveau 1

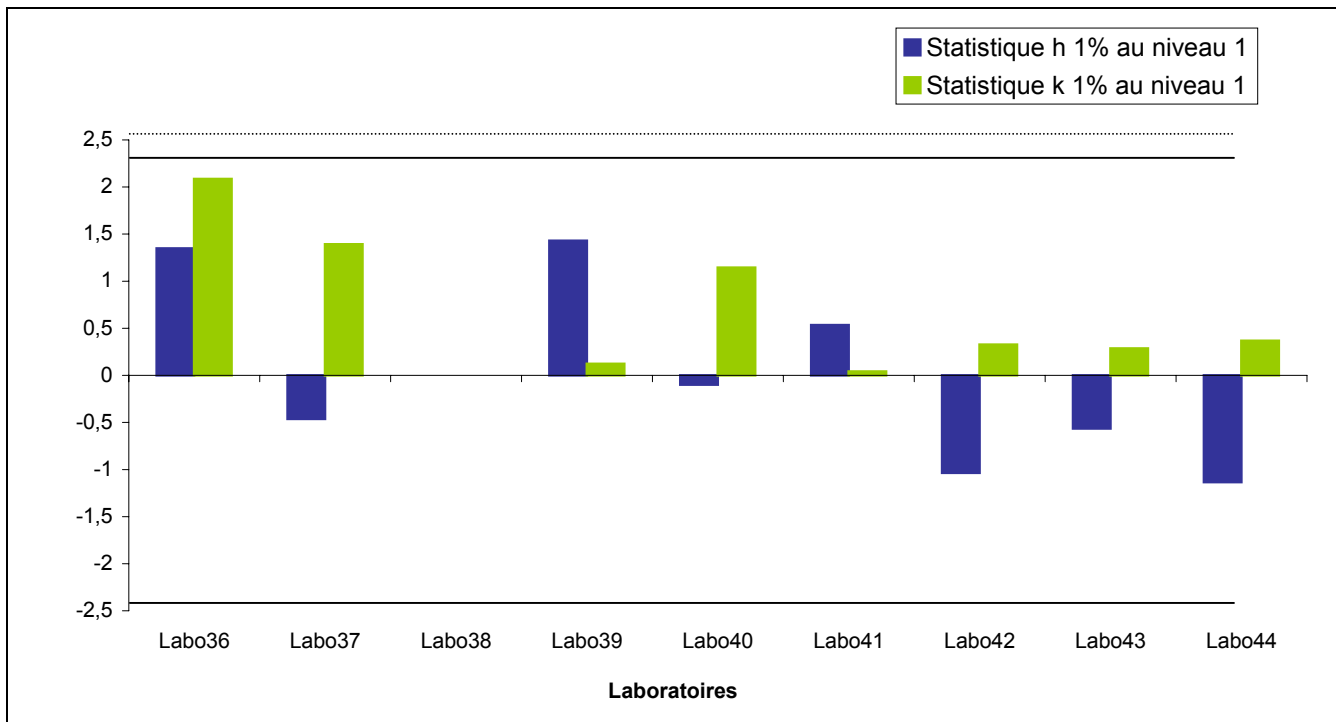


figure 4 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique par le réactif ROCHE Amplicor HCV Monitor Test v.2.0 au niveau 2

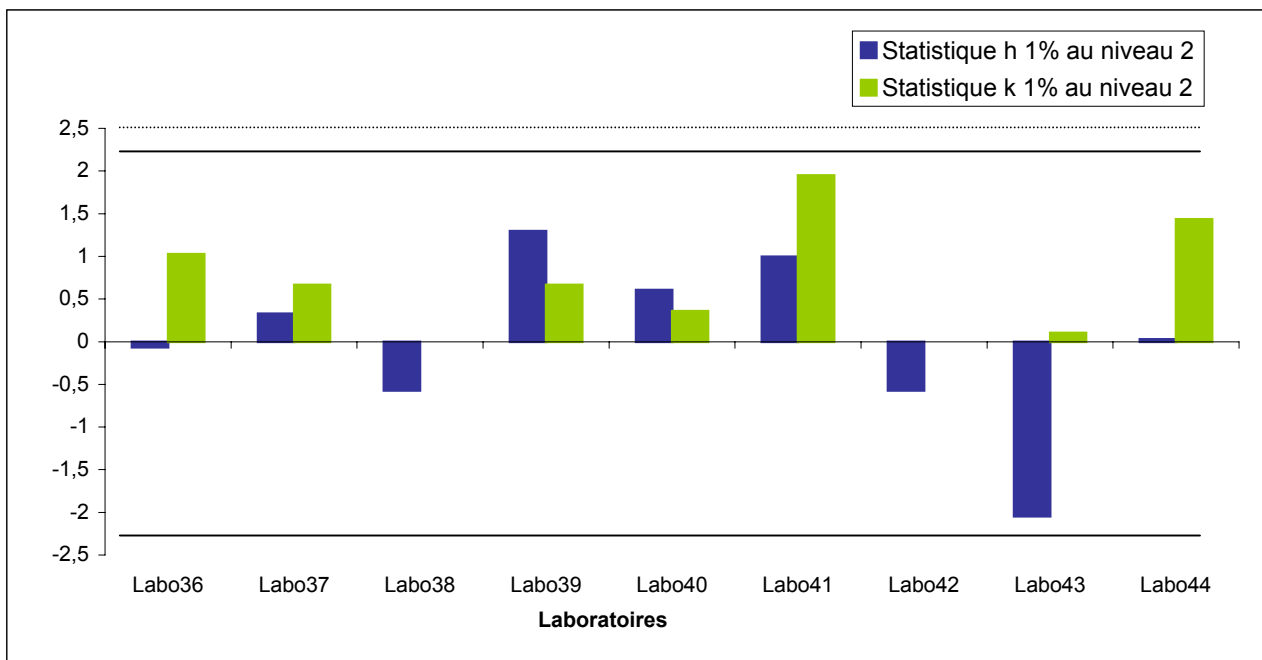


Figure 5 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique par le réactif ROCHE Cobas AmpliCor HCV Monitor Test v.2.0 au niveau 1

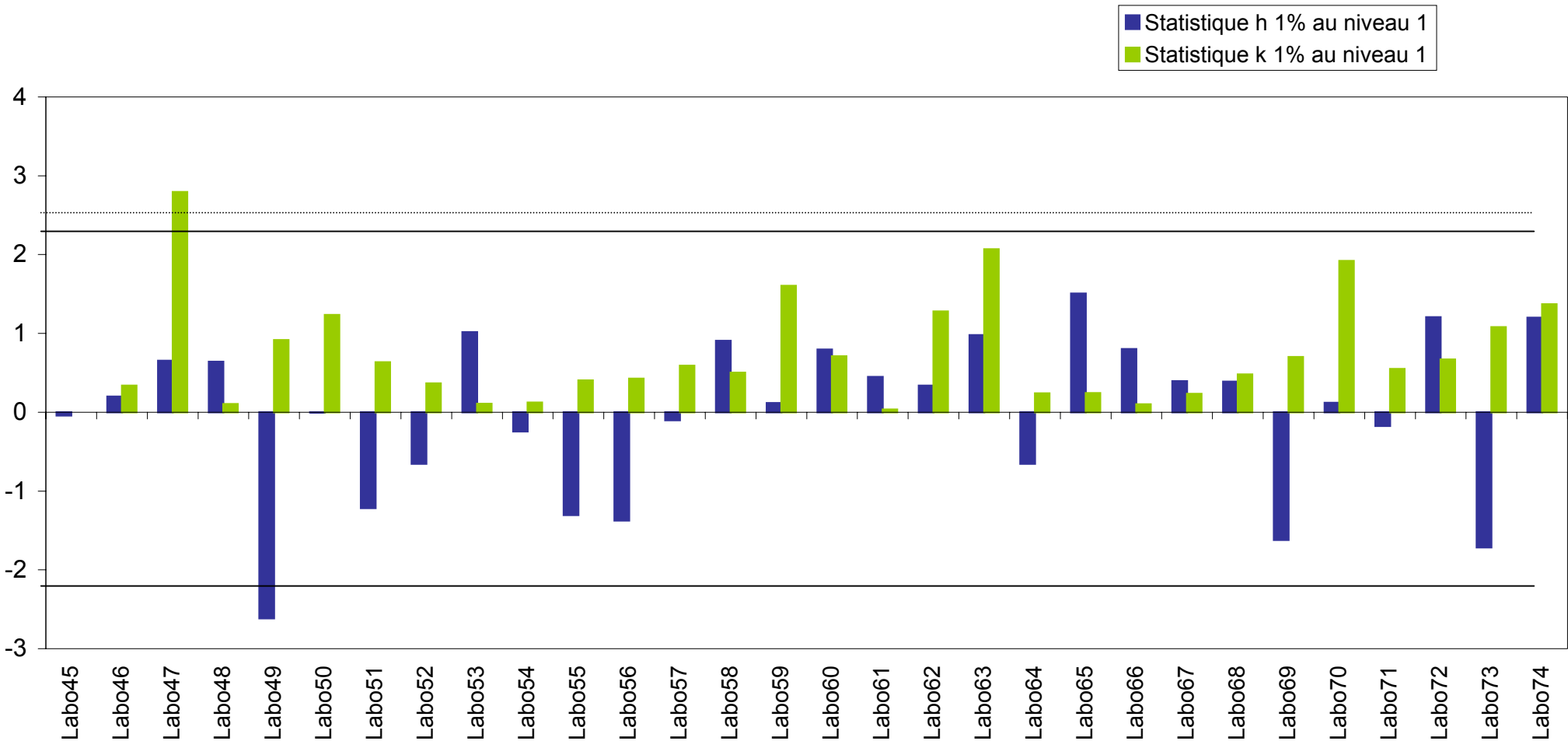
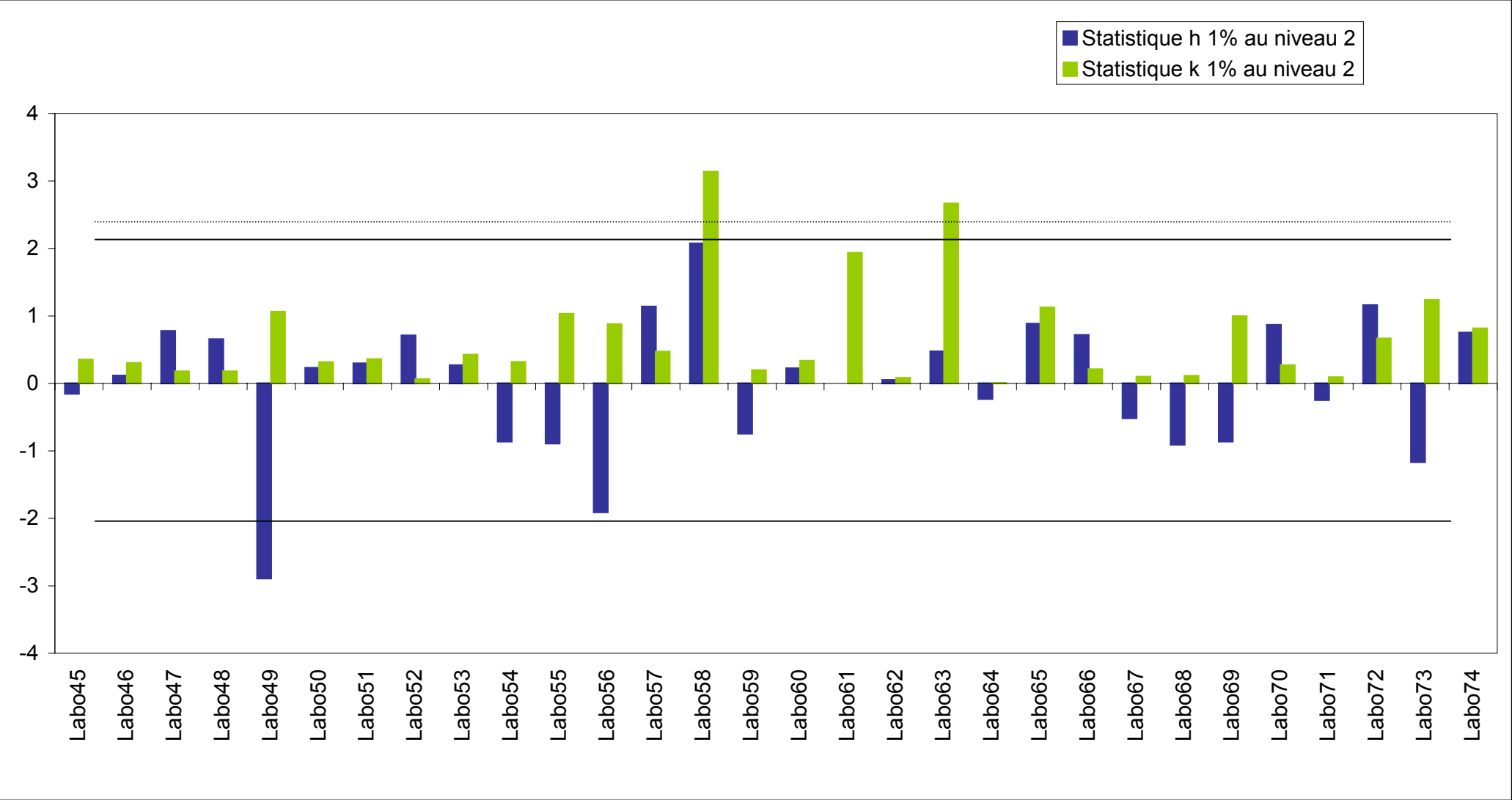


Figure 6 - Statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique par le réactif ROCHE Cobas Amplicor HCV Monitor Test v.2.0 au niveau 2



Au niveau 1, On note un laboratoire (laboratoire 7) ayant donné 2 valeurs identifiées comme irrégularités évidentes (<2,78 logUI /ml) avec le réactif Bayer Versant HCV et un laboratoire (laboratoire 45) ayant donné une irrégularité évidente (<2,78 logUI /ml) avec le réactif Roche Cobas Amplicor HCV au niveau 1.

L'étude des statistiques inter-laboratoires h et intra-laboratoire k (à 1%) met en évidence, pour le réactif Bayer Versant HCV, un laboratoire ayant obtenu une moyenne des mesures quantitatives aberrante due à une valeur basse (laboratoire 5) et un autre laboratoire présentant une variance aberrante (laboratoire 23). Au total 67 valeurs seront analysées dans la suite de l'analyse statistique (tableau VII). Pour le réactif Roche Amplicor HCV, un laboratoire (laboratoire 38) n'a pas donné de mesures.

Enfin pour le réactif Roche Cobas Amplicor HCV, 2 laboratoires présentent l'un, une moyenne aberrante due à une valeur anormalement basse (laboratoire 49) et l'autre, une variance aberrante (laboratoire 47) amenant à 58 le nombre de valeurs considérées dans la suite de l'étude.

Au niveau 2, On note un seul laboratoire (laboratoire 27) ayant rendu une irrégularité évidente (valeur très élevée) avec le réactif Bayer Versant HCV.

L'étude des statistiques montre pour le réactif Bayer Versant HCV un laboratoire ayant une moyenne aberrante due à une valeur anormalement haute (laboratoire 9) et un autre laboratoire (laboratoire 2) avec une variance aberrante. Au total 67 valeurs seront analysées dans la suite de l'analyse statistique (tableau VIII). Pour le réactif Roche Amplicor HCV, un laboratoire (laboratoire 38) n'a rendu qu'une mesure.

Enfin, pour le réactif Roche Cobas Amplicor HCV, un laboratoire présente une moyenne aberrante due à une valeur anormalement basse (laboratoire 49 comme au niveau 1) et un laboratoire (laboratoire 58) a obtenu une variance aberrante amenant à 58 le nombre de valeurs considérées dans la suite de l'étude.

Toutes les valeurs aberrantes ont été supprimées de la suite de l'analyse statistique.

4- Résultats globaux des réactifs de quantification de l'ARN-VHC

Les tableaux VII et VIII présentent l'ensemble des résultats obtenus par les réactifs utilisés par les laboratoires participants..

tableau VII - résultats de la quantification de l'ARN-VHC sur l'échantillon 05-2C et 05-3C (niveau 1)

REACTIFS	Echantillons niveau 1 : 05-2C et 05-3C									
	Nombre d'utilisateurs	n	n'	p	m (log UI/ml)	S _R	CV	S _r	S _r ² / S _R ²	
BAYER Versant HCV RNA 3.0	35	70	67	34	3,142	0,098	3,1%	0,055	31,2%	
ROCHE Amplicor HCV Monitor test v.2.0	8	16	16	8	3,574	0,246	6,9%	0,173	49,4 %	
ROCHE Cobas Amplicor HCV Monitor test v.2.0	30	60	58	30	3,345	0,169	5,0%	0,122	52,1%	
ROCHE Cobas TaqMan HCV test	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
Réactifs autres	4	-	-	-	-	-	-	-	-	

tableau VIII - résultats de la quantification de l'ARN-VHC sur les échantillons 05-1C et 05-4C (niveau 2)

REACTIFS	Echantillons niveau 2 : 05-1C et 05-4C									
	Nombre d'utilisateurs	n	n'	p	m (log UI/ml)	S _R	CV	S _r	S _r ² / S _R ²	
BAYER Versant HCV RNA 3.0	35	70	67	35	4,041	0,100	2,5%	0,085	54,5%	
ROCHE Amplicor HCV Monitor test v.2.0	9	17	17	9	4,304	0,217	5,0%	0,138	40,4%	
ROCHE Cobas Amplicor HCV Monitor test v.2.0	30	60	58	30	4,154	0,141	3,4%	0,071	25,3%	
ROCHE Cobas TaqMan HCV test	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
Réactifs autres	4	-	-	-	-	-	-	-	-	

- : nombre d'utilisateurs insuffisant

n : nombre total de valeurs

n' : nombre de valeurs hors irrégularités évidentes et valeurs aberrantes

p : nombre de laboratoires ayant donné au moins un résultat non exclu des statistiques au niveau considéré

m : moyenne

S_r : écart-type de répétabilité

S_R : écart-type de reproductibilité

S_r^2 / S_R^2 : part de la variance de répétabilité dans la variance totale des mesures.
 CV : coefficient de variation tronqué calculé pour chaque échantillon à partir de n'

Les moyennes et les dispersions des résultats obtenus aux niveaux 1 et 2 pour chaque réactif sont présentées sur les figures 7 et 8.

figure 7 – moyenne et dispersion des résultats en fonction du réactif pour les échantillons 05-2C et 05-3C : niveau 1

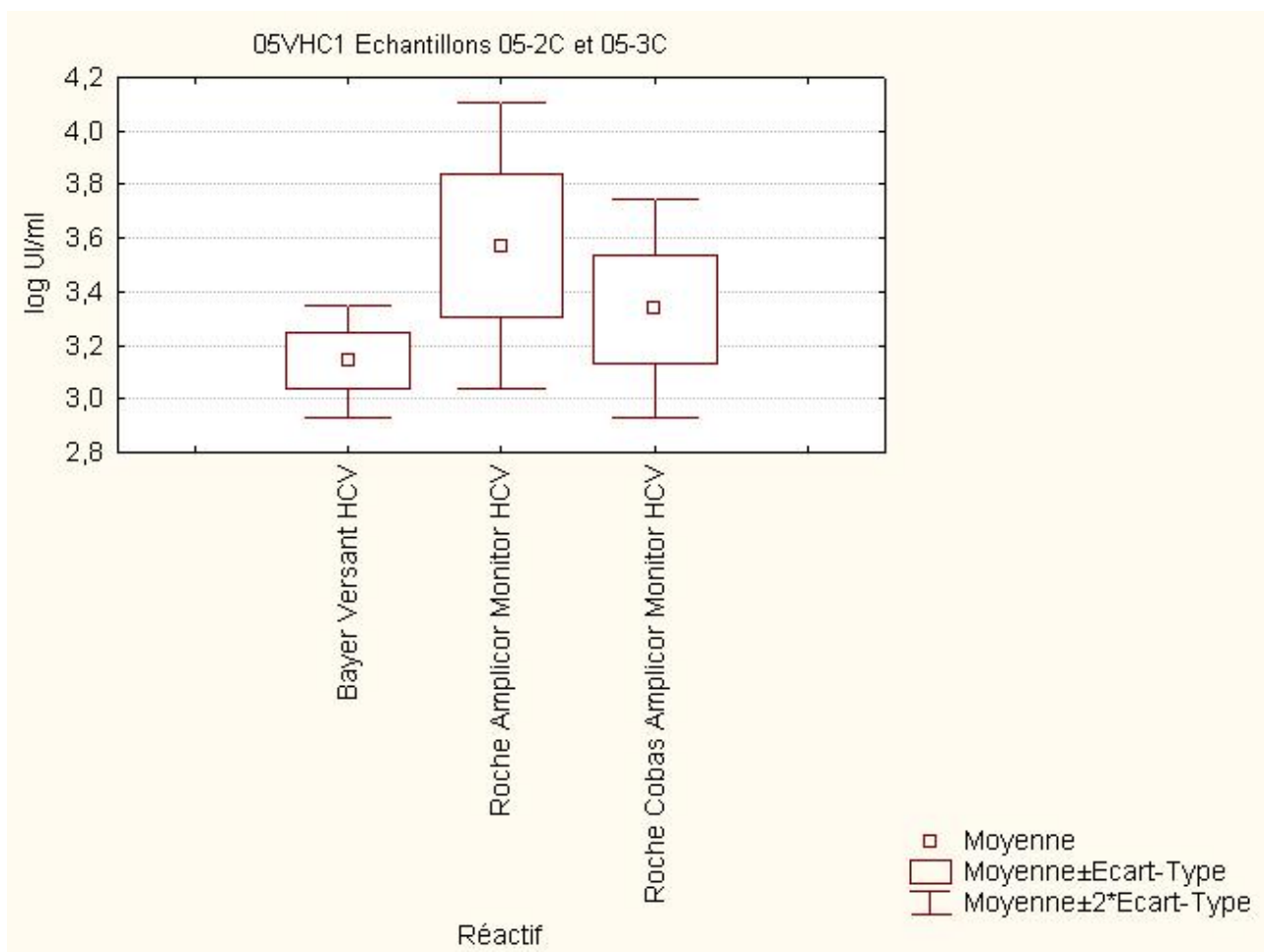
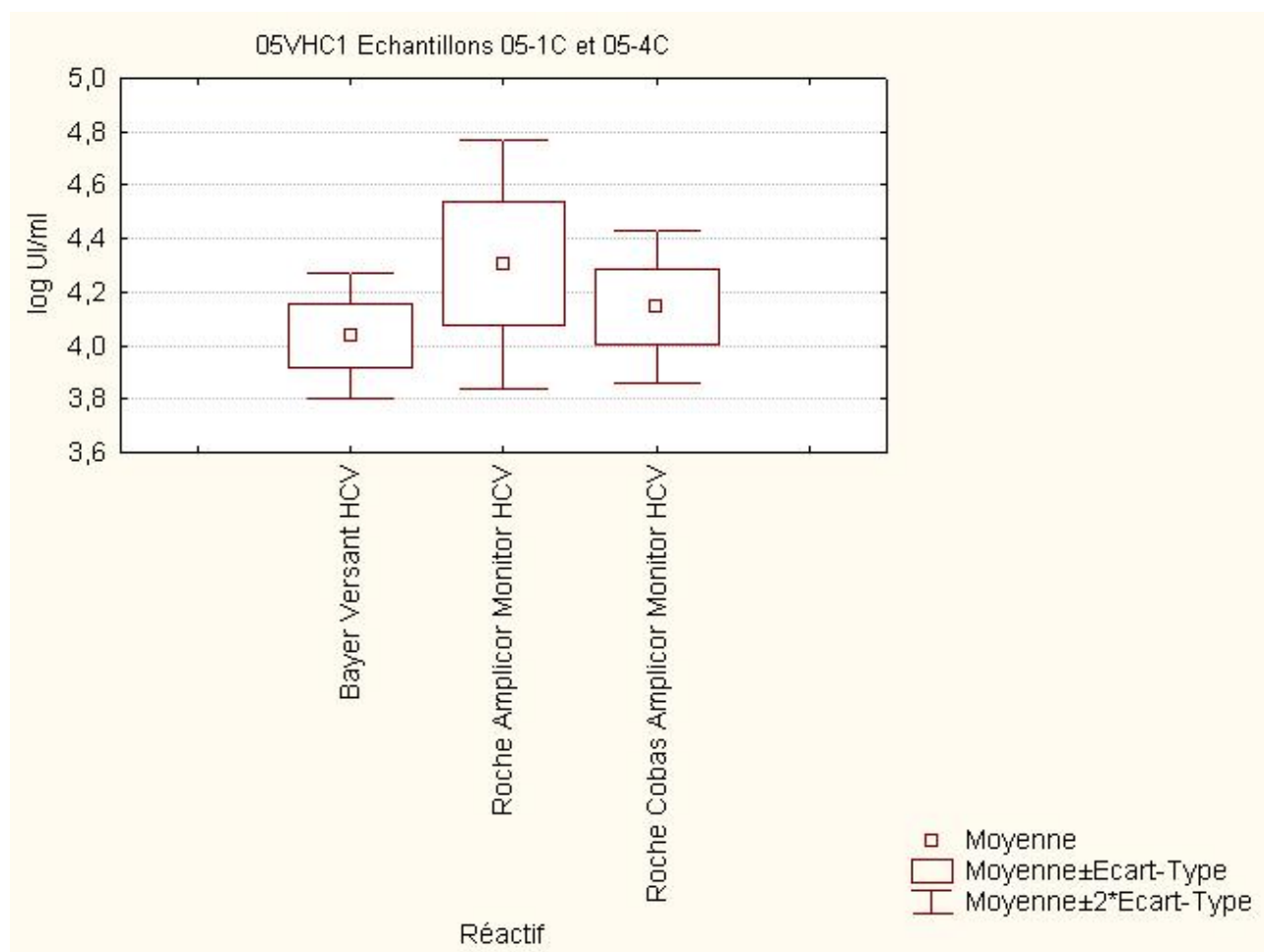


figure 8 – moyenne et dispersion des résultats en fonction du réactif pour les échantillons 05-1C et 05-4C : niveau 2



Commentaires

Les résultats des laboratoires sont satisfaisants, avec peu de valeurs exclues de l'analyse statistique.

L'analyse des tableaux VII et VIII montre une différence de 0,2 log UI/ml pour le niveau 1 et de 0,1 log UI/ml pour le niveau 2 entre la moyenne des résultats obtenus avec le réactif Bayer Versant HCV RNA 3.0 et le réactif Roche Cobas Amplicor HCV Monitor Test v.2.0 (pour un écart de 0,3 log UI/ml en 2003 sur un échantillon similaire au niveau 1). Un écart plus important de 0,4 log UI/ml pour le niveau 1 et de 0,3 log UI/ml pour le niveau 2 est enregistré entre la moyenne des résultats obtenus avec le réactif Bayer Versant HCV RNA 3.0 et la version non automatisée Roche Amplicor HCV Monitor Test v.2.0 (comme en 2003). Entre les moyennes des résultats obtenues avec les 2 réactifs de la société Roche, on note des écarts similaires à ceux de 2003 avec 0,2 log UI/ml au niveau 1 et 0,1 log UI/ml au niveau 2.

Il est donc préférable d'utiliser le même réactif pour effectuer les mesures de charge virale dans le cadre du suivi thérapeutique des patients. Néanmoins, une étude récente (1) vient de montrer une très bonne concordance des résultats obtenus avec le réactif Bayer et la version automatisée sur Cobas du réactif Roche pour déterminer la réponse précoce au traitement antiviral.

On remarque comme en 2003, une distribution plus étroite des résultats obtenus avec le réactif Versant HCV RNA 3.0 de la société BAYER (CV de 3,1% au niveau 1 et 2,5% au niveau 2) que ceux obtenus avec les réactifs de la société Roche Diagnostics (Cobas Amplicor HCV Monitor Test v.2.0 : CV de 5% au niveau 1 et 3,4% pour le niveau 2 et Amplicor HCV Monitor Test v.2.0 : 6,9% au niveau 1 et 5% au niveau 2).

Ces données sont représentées sur les figures 7 et 8.

Cependant, ces CV intra-réactif sont assez faibles ainsi, les résultats sont bien reproductibles pour un réactif donné. Si l'on analyse les écarts-types de répétabilité représentant la variance intra-laboratoire, on constate qu'ils sont assez faibles pour l'ensemble des réactifs utilisés.

Conclusion

Cette 5^{ème} opération du contrôle national de qualité d'ARN-VHC montre des résultats satisfaisants pour l'ensemble des laboratoires.

En ce qui concerne la détection de l'ARN-VHC, on note 100% de bonnes réponses.

En ce qui concerne la quantification de l'ARN-VHC, les résultats sont stables par rapport à la précédente opération de contrôle de 2003 avec une variabilité inter-laboratoires (CV) plus faible avec le réactif Bayer qu'avec les réactifs Roche. Les résultats de quantification obtenus avec les réactifs Roche demeurent supérieurs de 0,25 log en moyenne à ceux obtenus avec le réactif Bayer. Il est à noter qu'un nouveau standard international 96/798 a été produit récemment en remplacement du premier standard WHO 96/790 (2).

Enfin, l'arrivée des réactifs basés sur le principe de la PCR en temps réel marque un nouveau tournant dans le diagnostic de l'ARN du VHC. Il conviendra d'étudier les résultats obtenus par ces réactifs dans le cadre de la prochaine opération de contrôle national de qualité.

Bibliographie :

1. Desombere I., Van Vlierberghe H. , Couvent S. , Clinckspoor F. and Leroux-Roels G.
Comparison of qualitative (COBAS AMPLICOR HCV 2.0 versus VERSANT HCV RNA) and Quantitative (COBAS AMPLICOR HCV Monitor 2.0 versus VERSANT HCV RNA 3.0) assays for hepatitis C virus (HCV) RNA detection and quantification: impact on diagnosis and treatment of HCV infections.
J. Clin. Microbiol. 2005, 43 (6) : 2590-2597.

2. Saldanha J., Heath A., Aberham C., Albrecht J. , Gentili G. , Gessner M. and Pisani G.
World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays.
Vox Sanguinis 2005, 88 (3) : 202-204.