

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Charge virale du VIH 1 : ARN-VIH

ARN-VIH

05CHV1

mars 2005

Edition : octobre 2006

Isabelle HELIAS (Afssaps)

Christine ROUZIOUX, Marianne Burgard (Hôpital Necker Paris), Valérie Potard, Dominique Costagliola (INSERM UMRS720)

Expédition	22 mars 2005
Clôture	25 avril 2005
Edition des compte-rendus individuels	10 octobre 2005
Echantillons/Paramètres contrôlés	4 panels de volume et de codage différents ont été envoyés en fonction des réactifs utilisés : 05-1A ; 05-2A ; 05-3A et 05-4A 05-1B ; 05-2B ; 05-3B et 05-4B 05-1D ; 05-2D ; 05-3D et 05-4D 05-1E ; 05-2E ; 05-3E et 05-4E : ARN du virus du VIH 1
Nombre de laboratoires concernés*	131
Nombre de laboratoires participants**	127

* 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 objectifs de l'opération de contrôle 05CHV1 étaient :

- l'évaluation des performances des laboratoires pour la quantification de l'ARN-VIH 1 plasmatique en termes de variabilité inter-laboratoires et intra-laboratoire,
- la comparaison de ces performances entre les protocoles utilisés,
- et l'étude de l'évolution des résultats des laboratoires observés depuis 1997, date d'initiation de ce contrôle.

Pour cela, les 131 laboratoires concernés par la quantification de l'ARN du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1(VIH1) ont reçu un panel de 4 échantillons ou deux panels de 4 échantillons s'ils utilisent deux réactifs.

Ces 4 échantillons se décomposent comme suit : un échantillon négatif (05-4A, 05-1B, 05-3D et 05-2E), un échantillon positif de niveau 1 (05-2A, 05-3B, 05-4D et 05-4E) et un échantillon positif de niveau 2 présenté en duplicate (05-1A et 05-3A, 05-2B et 05-4B, 05-1D et 05-2D, 05-1E et 05-3E).

L'échantillon de niveau 1 a été préparé à partir de plasmas d'un patient connu pour être infecté par un virus CRF02 (Cameroun). Il s'agit d'un virus VIH-1 appartenant à un groupe de virus assez présents en France.

Les solutions présentes dans les échantillons positifs du niveau 2 avaient été préparées en 2003 à partir d'un surnageant de culture de virus VIH-1 (groupe M) de sous-type B et avaient déjà été envoyées à l'opération de contrôle de 2003 (03CHV1). La même souche est utilisée depuis 1997.

La quantité du niveau 2 avait été choisie autour de 10000 copies/ml (soit autour de 4,0 log de copies/ml) et ce niveau est présenté en duplicate afin de mettre en évidence les éventuelles difficultés des laboratoires à reproduire des mesures au seuil de 10000 copies/ml.

Les résultats de cette opération de contrôle sont satisfaisants, on note peu de valeurs aberrantes. Cela a permis une comparaison des résultats entre laboratoires et entre réactifs utilisés.

Pour le niveau 1, de grosses différences de résultats ont été enregistrées, cela peut s'expliquer par la nature du génotype du virus et par le niveau d'ARN-VIH1 proche du seuil de détection de certains réactifs.

L'écart entre les quantifications obtenues avec les réactifs Roche Amplicor Monitor et celles obtenues avec le réactif Bayer Versant (bDNA) est à peu près similaire à celui observé lors de la dernière opération de contrôle de décembre 2003 et est de 0,09 log copies/ml au niveau 2.

Cette opération de 2005 a permis de constater pour la première fois l'utilisation d'un réactif de PCR en temps réel : Roche Diagnostics Cobas taq Man HIV1 test. Cependant, avec ce réactif, on note un écart important entre les résultats obtenus avec l'extracteur automatique Ampliprep et ceux obtenus avec extraction manuelle.

Analyse quantitative de l'ARN-VIH1

ARN-VIH1 : échantillon positif de niveau 1 (05-2A, 05-3B, 05-4D et 05-4E) et échantillons positifs de niveau 2 (05-1A et 05-3A, 05-2B et 05-4B, 05-1D et 05-2D, 05-1E et 05-3E).

Méthode statistique et expression des résultats

L'analyse des résultats quantitatifs de cette opération 2005 du Contrôle National de Qualité a été réalisée par Valérie Potard et Dominique Costagliola (INSERM E0214) conformément à la norme ISO 5725-2, comme pour les 6 opérations précédentes. Rappelons que pour le niveau 2, les laboratoires devaient rendre deux mesures d'ARN-VIH plasmatique, mais une seule pour le niveau 1. L'analyse des résultats quantitatifs se décompose selon plusieurs étapes.

→ Elimination des irrégularités évidentes et identification des mesures aberrantes et valeurs isolées

L'existence de deux mesures au niveau 2 permet de détecter les laboratoires ayant une moyenne ou une variance soit aberrante soit isolée par rapport aux autres laboratoires, d'après les statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k. Sur les échantillons du niveau 1, la variabilité intra-laboratoire ne pouvant être étudiée, il est possible de détecter les mesures aberrantes ou isolées en termes de variabilité inter-laboratoires par la statistique de cohérence inter-laboratoires h.

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 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 2 par chaque laboratoire. La variance de reproductibilité exprime la variabilité totale d'une mesure combinant à la fois la variabilité intra-laboratoire et inter-laboratoires.

Nous avons converti les valeurs rendues « un seuil inférieur au seuil recommandé par le fabricant des réactifs utilisés » en la valeur de ce seuil utilisé par le laboratoire (exemple : <50 a été changé en 50 log copies/ml).

→ Comparaisons des résultats en fonction du réactif

Le test d'Anova est utilisé pour ces comparaisons.

Résultats des participants

1- Réactifs utilisés

Les laboratoires pouvaient utiliser un ou deux réactifs différents. On note que 86 laboratoires ont donné des mesures avec un seul réactif et 34 laboratoires avec deux réactifs. On a donc exploité 154 résultats de panels. Les réactifs utilisés sont présentés dans le tableau I.

tableau I – Réactifs utilisés

Réactifs	Nombre d'utilisateurs	Volume d'échantillon	Seuil de quantification
Roche Diagnostics Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, en protocole standard (Amplicor ps)	3	260 µl	400 copies/ml 2,60 log copies/ml
Roche Diagnostics Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, en protocole Ultrasensible (Amplicor us)	4	600 µl	50 copies/ml 1,70 log copies/ml
Roche Diagnostics Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, en protocole standard (Cobas ps)	30	260 µl	400 copies/ml 2,60 log copies/ml
Roche Diagnostics Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, en protocole ultrasensible (Cobas us)	57	600 µl	50 copies/ml 1,70 log copies/ml
Bayer Diagnostics HIV RNA 3.0 Assay (bDNA)	37	1200 µl	50 copies/ml 1,70 log copies/ml
ABBOTT Lcx HIV RNA	4	1400 µl	50 copies/ml 1,70 log copies/ml
ROCHE Cobas Taq Man HIV-1 test sans extraction et avec extraction « cobas Ampliprep »	8	1200 µl	40 copies/ml 1,60 log copies/ml
Biomérieux Nuclisens easy Q HIV-1	6	1200 µl	50 copies/ml 1,70 log copies/ml

2- Statistiques de cohérence

Les résultats des statistiques de cohérence inter-laboratoire et intra-laboratoire par réactif sont présentés sur les figures 1 à 6.

Figure 1: Statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VIH plasmatique par le réactif Roche Diagnostics Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, protocole ultrasensible

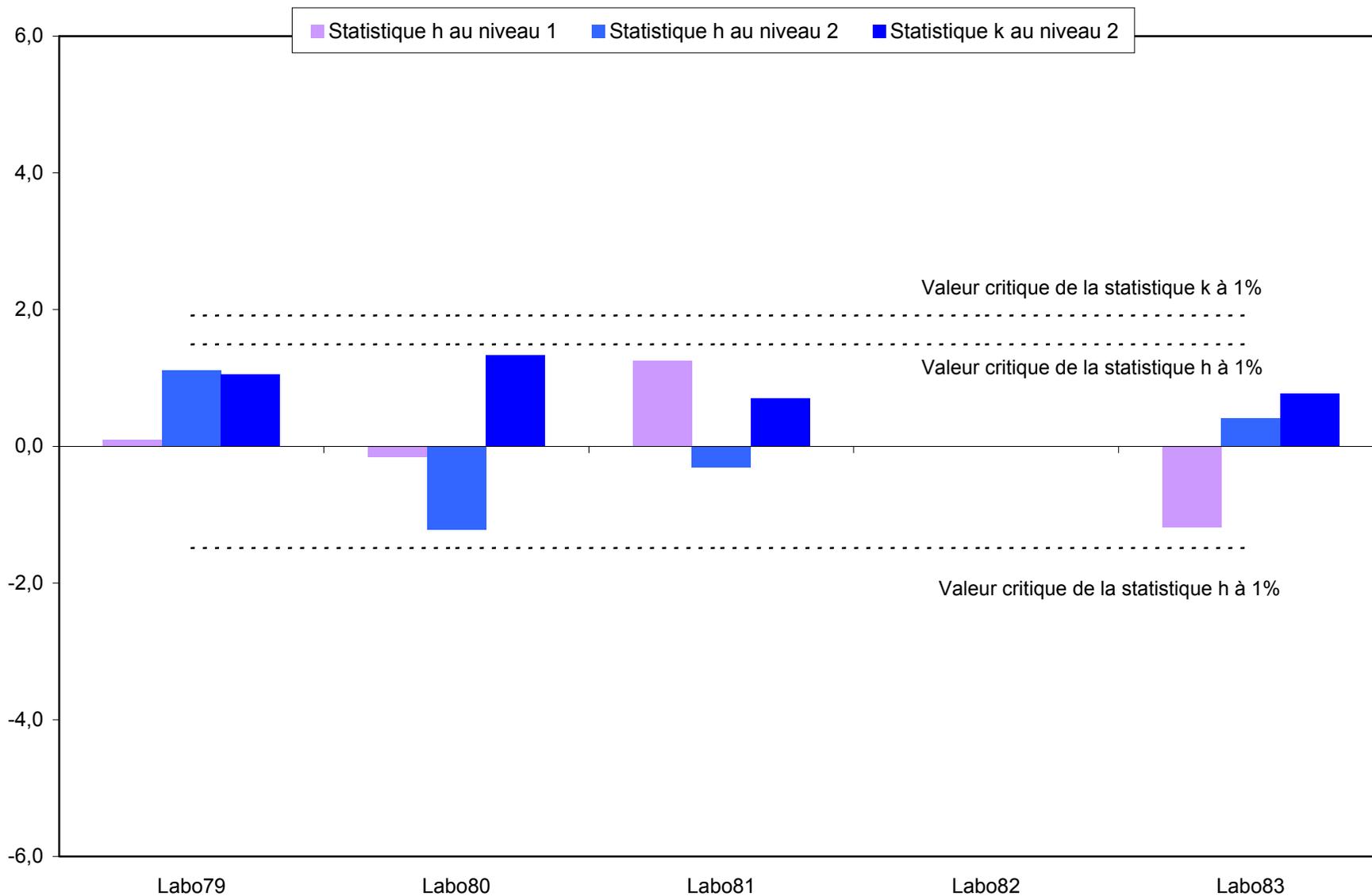


Figure 2: Statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VIH plasmatique par le réactif Roche Diagnostics Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, protocole standard

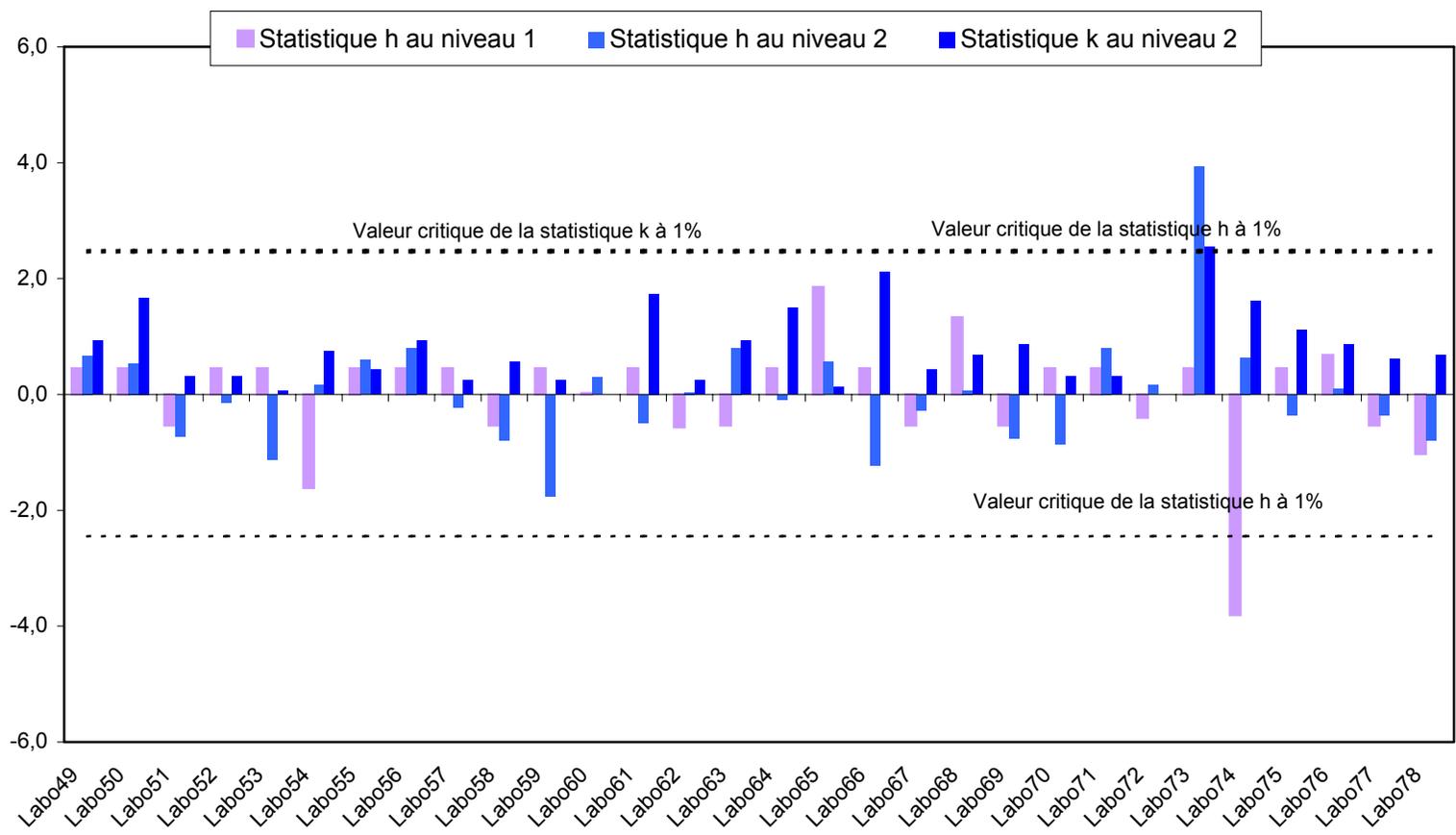


Figure 3 : Statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VIH plasmatique par le réactif Roche Diagnostics Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, protocole ultrasensible

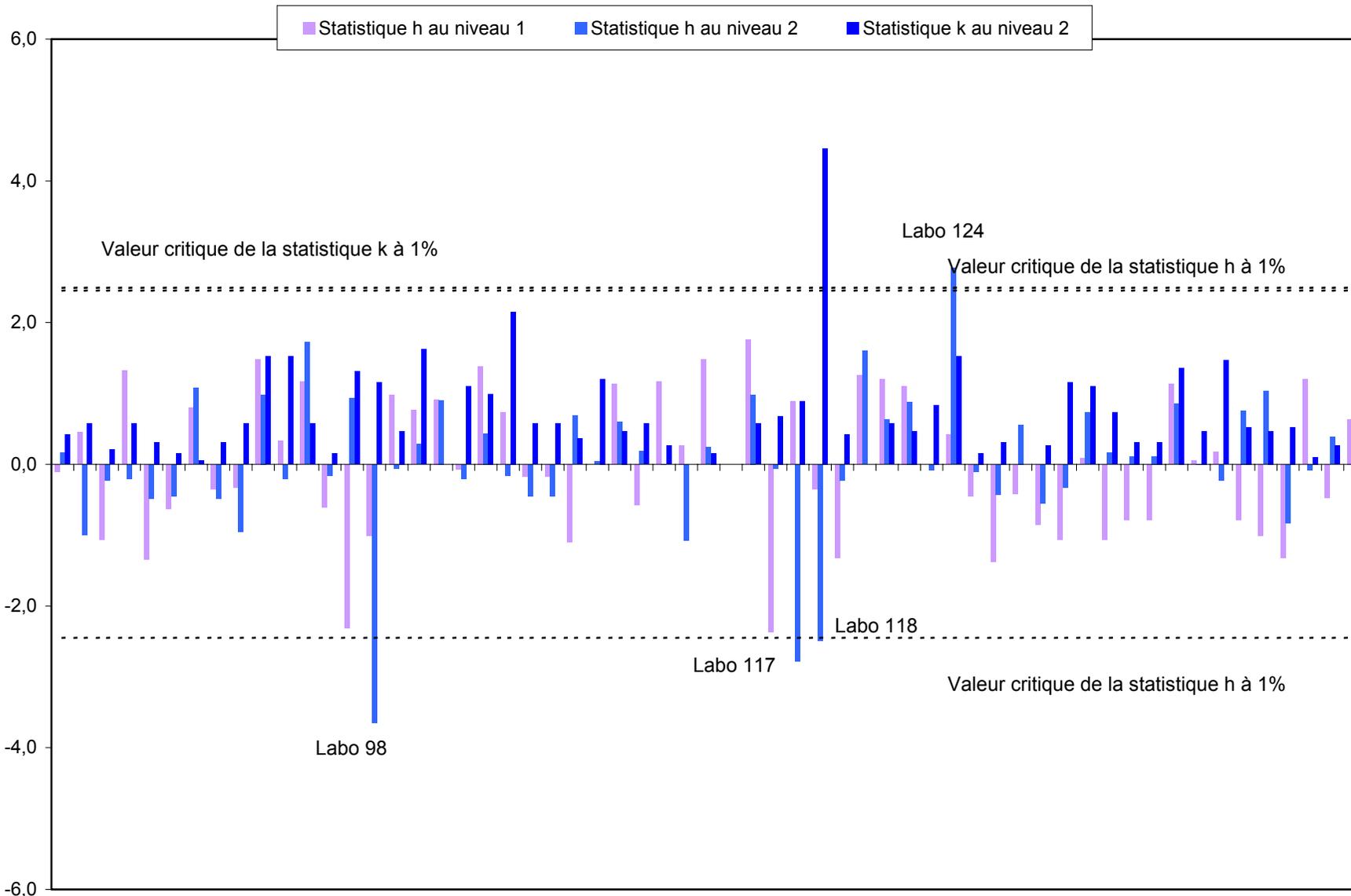


Figure 4 : Statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VIH plasmatique par le réactif BAYER
Diagnostics Versant HIV RNA 3.0 Assay (bDNA)

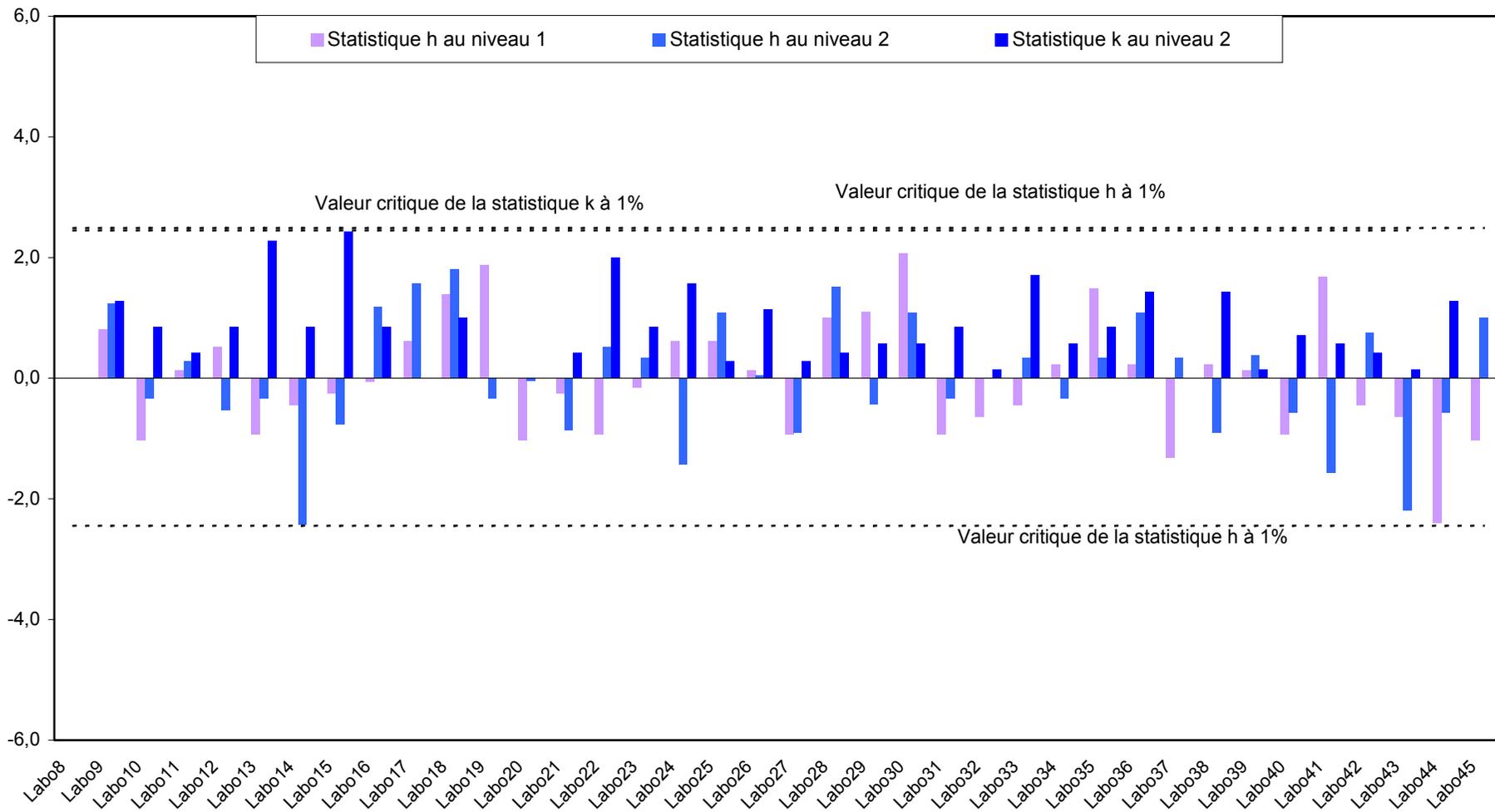


Figure 5 : Statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VIH plasmatique par le réactif Roche Cobas Taq Man HIV-1 test avec extraction manuelle

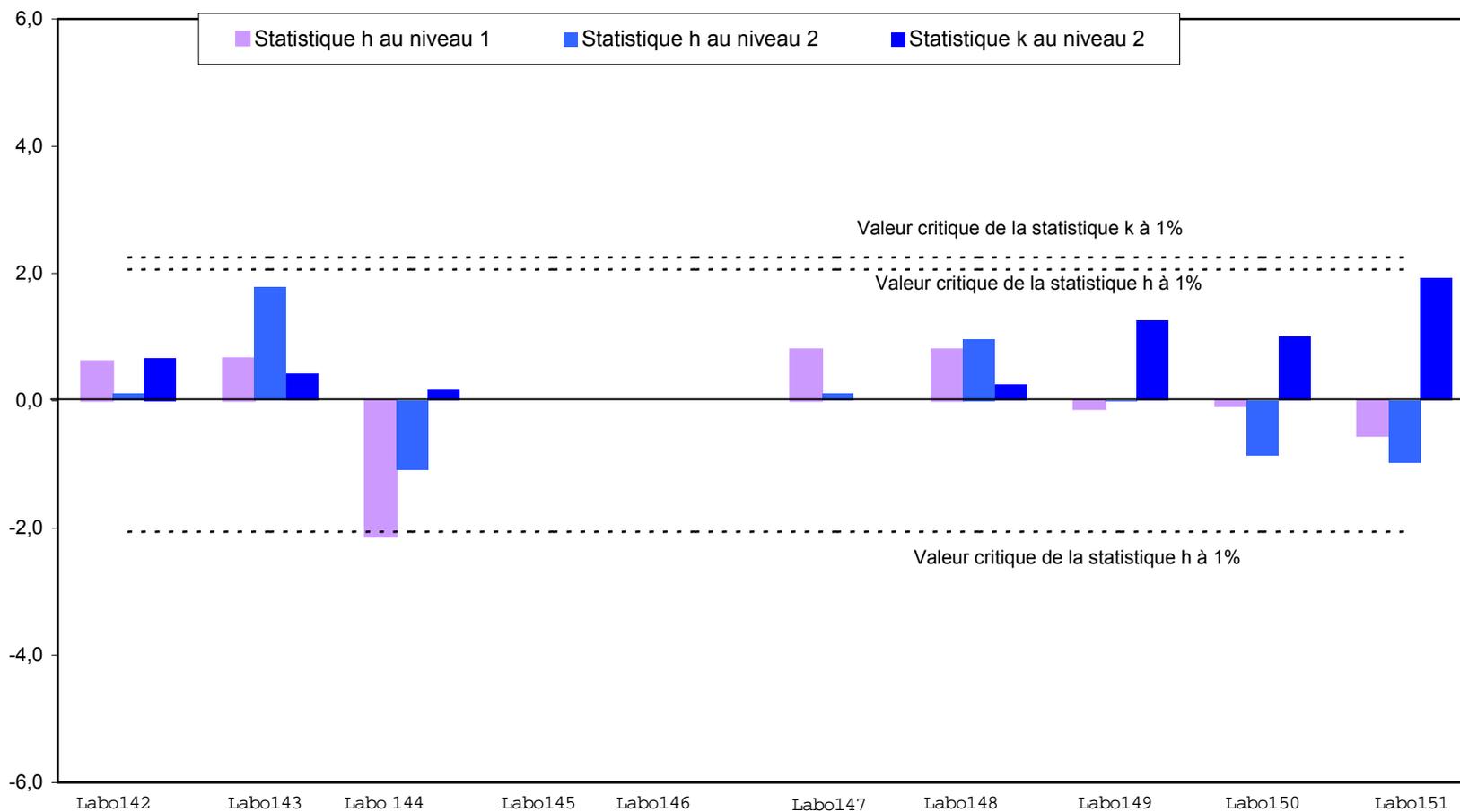
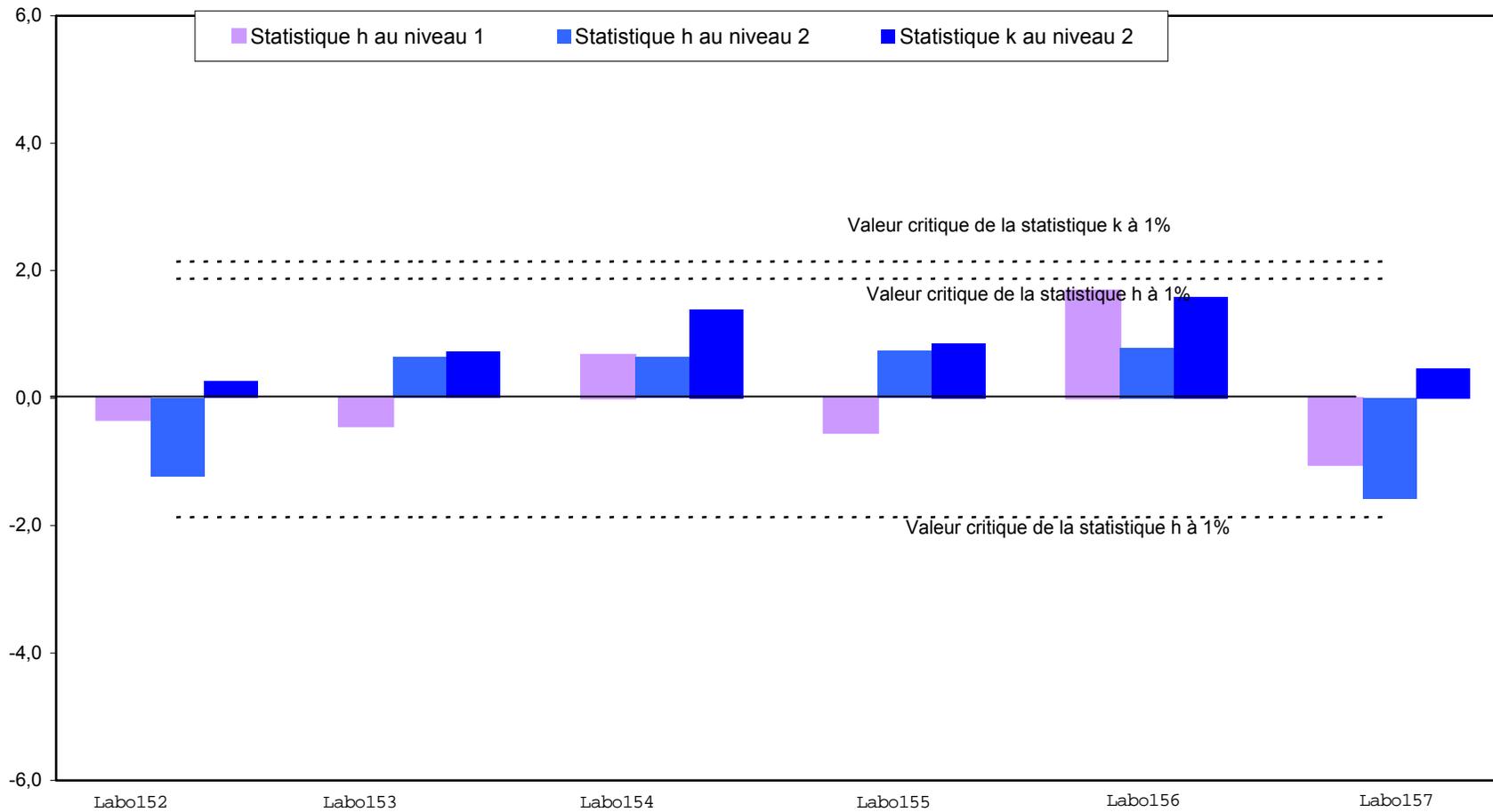


Figure 6 : Statistiques de cohérence inter-laboratoires h et intra-laboratoire k, par laboratoire, des mesures d'ARN-VIH plasmatique par le réactif Roche Cobas Taq Man HIV-1 test avec l'utilisation de l'extracteur Cobas AmpliPrep



L'analyse de cohérence a permis de détecter quelques valeurs aberrantes :

- Au niveau 1, l'étude de la statistique inter-laboratoires n'a pas détecté de mesures aberrantes sur les résultats des laboratoires utilisant les réactifs Roche Amplicor et Cobas Amplicor ps, Roche Cobas Amplicor us, Cobas us, Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA), Abbott LCX HIV RNA et Taq Man HIV1 test avec l'extracteur automatique AmpliPrep.

Seul un laboratoire a présenté une moyenne aberrante due à une valeur anormalement basse avec le réactif Roche Diagnostics Cobas Taq Man HIV1 test associé à une extraction manuelle.

- Au niveau 2, aucune mesure n'est caractérisée comme aberrante pour les laboratoires utilisant les réactifs Roche Amplicor ps, Roche Amplicor us, Bayer bDNA, Abbott LCx et Roche Taq Man.

Un laboratoire a présenté une moyenne aberrante et une variance aberrante dues à une des 2 mesures anormalement élevée avec le réactif Roche Cobas Amplicor ps.

L'analyse de la cohérence a montré 4 laboratoires ayant une moyenne aberrante (un laboratoire avec 2 valeurs anormalement basses, 2 laboratoires avec 1 valeur anormalement basse et un laboratoire avec une valeur anormalement élevée) avec le réactif Roche Cobas Amplicor us. Un laboratoire présentait aussi une variance aberrante due à une de ses 2 mesures très basse.

L'analyse de cohérence a permis également de mettre en évidence des valeurs isolées :

- Au niveau 1, on remarque 2 laboratoires ayant rendu 2 mesures isolées avec le réactif Roche Cobas Amplicor us, 2 mesures isolées pour 2 laboratoires utilisant le réactif Bayer Versant bDNA, une mesure isolée pour un laboratoire utilisant le réactif Abbott LCX.

- Au niveau 2, on observe 1 variance isolée pour un laboratoire utilisant Roche Cobas Amplicor ps et une autre pour un laboratoire utilisant le réactif Roche Cobas Amplicor us. Chacun avait une des 2 mesures anormalement basse. On note aussi 3 laboratoires ayant une variance isolée avec le réactif Bayer Versant bDNA et 2 ayant une moyenne isolée avec ce même réactif dues à des mesures basses. Un laboratoire présente une moyenne isolée avec le réactif Roche Taq Man associé à une extraction manuelle avec une mesure anormalement élevée et un autre laboratoire présente une variance isolée due à une mesure basse.

On constate que quel que soit le réactif, il y a très peu de valeurs aberrantes, ce qui montre une bonne qualité des résultats des laboratoires et ce qui permet une bonne exploitation complémentaire de ces résultats pour la comparaison des réactifs.

3 – Résultats de l'ensemble des laboratoires par réactif et par niveau

Le tableau II présente les moyennes, valeurs minimum et maximum, et les écarts-types des échantillons des mesures d'"ARN-VIH plasmatique" en log de copies/ml des laboratoires selon les réactifs et les niveaux de charge virale choisis.

Ces éléments sont donnés pour chaque réactif dans le tableau II.

Nous n'avons pas calculé de moyenne ni d'écart-type pour les réactifs ayant moins de 5 utilisateurs.

Nous n'avons pas calculé de moyenne ni d'écart-type pour le réactif Roche Cobas Amplicor en protocole standard car beaucoup de laboratoires utilisateurs ont donné des mesures inférieures au seuil pour le niveau 1 (22 laboratoires, soit 76%).

tableau II - résultats de l'ensemble des laboratoires par réactif pour le niveau 1 (05-2A, 05-3B, 05-4D et 05-4E) et 2 (05-1A et 05-3A, 05-2B et 05-4B, 05-1D et 05-2D, 05-1E et 05-3E)

Réactif	Niveau	Nbre labos	n	p	n'	m en log copies/ml	Min	Max	S _R	CV (%)	S _r	S _r ² /S _R ² (%)	Ecart (Nv2-Nv1)
Roche Diag. Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps*	1	3	3	--	--	--	2,66	2,71	--	--	--	--	--
	2	3	6	--	--	--	3,86	4,24	--	--	--	--	--
Roche Diag. Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us**	1	4	4	--	--	--	<1,7	2,08	--	--	--	--	--
	2	4	8	--	--	--	3,72	4,26	--	--	--	--	--
Roche Diag. Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps*	1	30	30	--	--	--	--	3,03	--	--	--	--	--
	2	30	59	30	58	3,94	3,71	4,34	0,14	3,5	0,09	39,8	--
Roche Diag. Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us**	1	55	55	55	55	2,04	1,28	2,61	0,28	16,0	--	--	1,91
	2	57	112	56	107	3,95	3,45	4,34	0,17	4,4	0,10	36,8	--
Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA)	1	37	37	37	37	2,76	2,51	2,97	0,10	3,7	--	--	1,1
	2	37	74	37	74	3,86	3,63	4,08	0,11	2,9	0,05	20,1	--
Abbott LCX HIV RNA	1	4	--	--	--	--	2,83	2,95	--	--	--	--	--
	2	4	--	--	--	--	3,91	4,18	--	--	--	--	--
Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test extraction manuelle	1	8	8	7	7	2,81	2,63	2,92	0,12	4,2	--	--	0,89
	2	8	15	8	15	3,70	3,45	3,96	0,15	4,0	0,09	33,1	--
Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec Ampliprep	1	6	6	6	6	3,48	3,38	3,65	0,10	2,8	--	--	0,85
	2	6	12	6	12	4,33	4,14	4,53	0,13	3,1	0,11	65,4	--
Biomérieux Nuclisens easy Q HIV1	1	1	1	--	--	--	--	3,41	--	--	--	--	--
	2	1	2	--	--	--	4,15	4,49	--	--	--	--	--

* : protocole standard

** : protocole ultrasensible

-- : pas de résultats statistiques du fait du faible nombre de laboratoires

- : pas de résultats statistiques du fait du niveau d'ARN-VIH proche du seuil de certains réactifs

⇒ n : le nombre total de mesures

⇒ p : le nombre de laboratoires (pour lesquels on dispose d'une ou deux mesures non exclue des calculs statistiques),

⇒ n' : nombre tronqué de mesures (les valeurs aberrantes ne sont pas prises en compte).

⇒ m : la quantité moyenne d'ARN-VIH plasmatique calculée sur n'

⇒ S_R : l'écart-type de reproductibilité calculé sur n' (variance de répétabilité + variance inter-laboratoire)

⇒ CV : le coefficient de variation calculé sur n'

⇒ S_r : l'écart-type de répétabilité,

⇒ S_r²/S_R² : la part de la variance de répétabilité dans la variance totale des mesures.

⇒ Ecart (Nv2-Nv1) : m(niveau 2)-m(niveau1)

4- Estimation de la quantité d'ARN-VIH plasmatique dans les échantillons positifs

Le tableau III présente les résultats des laboratoires tous réactifs confondus.

La moyenne n'a pas été calculée pour le niveau 1 du fait de la dispersion des résultats.

tableau III - résultats tous réactifs confondus des échantillons niveau 1 (05-2A, 05-3B, 05-4D et 05-4E) et 2 (05-1A et 05-3A, 05-2B et 05-4B, 05-1D et 05-2D, 05-1E et 05-3E)

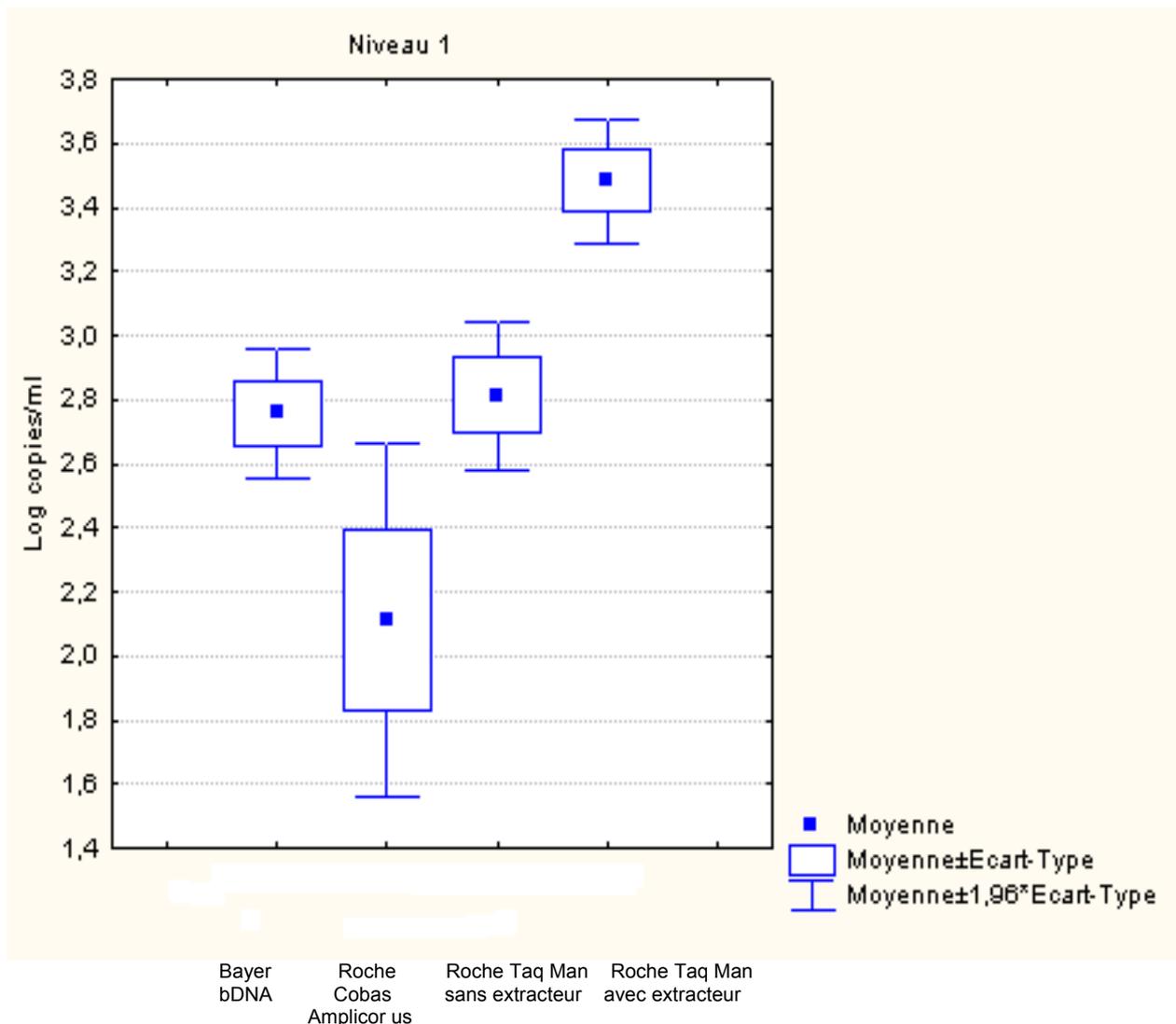
Réactif	Niveau	p	n	n'	médiane	Moyenne	S _R	CV%	S _r	S _r ² /S _R ²
Tous réactifs	Niveau 1	147	148	117	2,605	-	-	-	-	-
	Niveau 2	150	296	292	3,915	3,93	0,17	4,2	0,09	30%

Les réactifs Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 protocole ultrasensible (niveau 1 et 2) et protocole standard (niveau 2), Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA), et Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec et sans utilisation de l'extracteur Cobas AmpliPrep ont pu être comparés (les autres réactifs ayant été utilisés par moins de 4 laboratoires).

Pour les 2 niveaux, on observe que les quantités moyennes d'ARN-VIH plasmatique sont significativement différentes selon le réactif ($p=10^{-4}$ pour le niveau 1 et $p=10^{-4}$ pour le niveau 2 avec le test d'ANOVA).

Les figures 7 et 8 montrent la moyenne et la dispersion des résultats en fonction du réactif aux 2 dilutions étudiées.

figure 7 – moyenne et dispersion des résultats en fonction du réactif utilisé au niveau 1

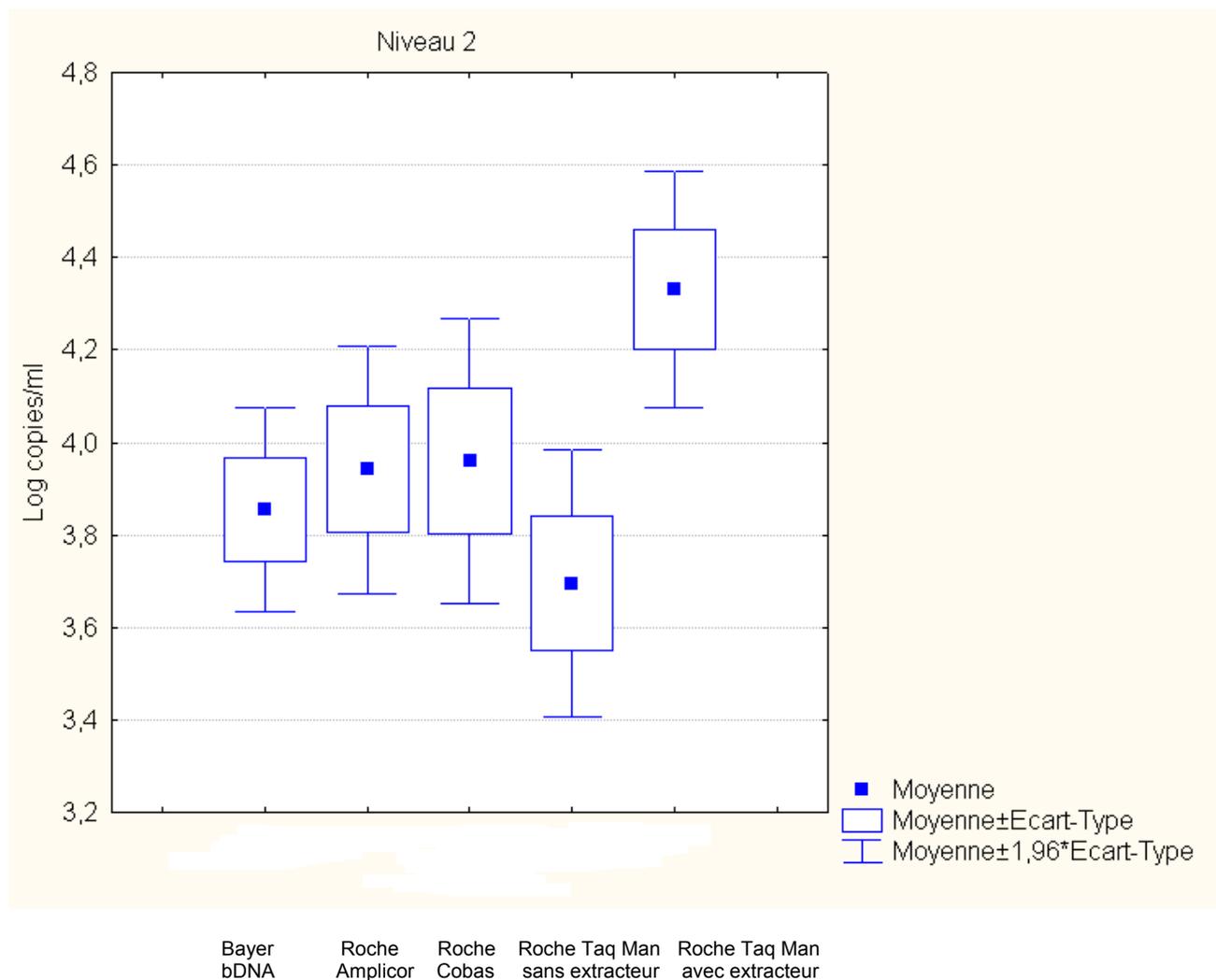


Sur l'échantillon de niveau 1, les mesures obtenues avec le réactif Roche Diag.Cobas AmpliCor HIV1 Monitor 1.5 us sont significativement plus basses que celles obtenues avec Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay ($p=10^{-4}$) et avec Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test en utilisant l'extracteur AmpliPrep ($p=10^{-4}$) ou avec extraction manuelle ($p=10^{-4}$) : les laboratoires qui ont utilisé le réactif Roche Diag. Cobas AmpliCor HIV1 Monitor 1.5 us obtiennent en moyenne des mesures plus basses de 0,72 log de copies/ml par rapport Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA), de 0,77 log de copies/ml par rapport à Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction manuelle et de 1,44 log de copies/ml par rapport à Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction AmpliPrep.

Les quantités moyennes estimées par Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA), sont significativement plus basses de 0,7 log de copies/ml par rapport à celles obtenues avec Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec AmpliPrep ($p=10^{-4}$). Ces dernières sont significativement plus élevées de 0,7 log de copies/ml par rapport à celles obtenues avec Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction manuelle ($p=10^{-4}$). On n'observe pas de différence significative entre les quantités moyennes de Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA) et Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction manuelle ($p=0,20$).

L'analyse des résultats de l'échantillon niveau 1 montre une grande dispersion des valeurs selon le réactif utilisé avec notamment une importante sous-estimation de ce virus CRF02 par le réactif Roche Cobas AmpliCor (us) par rapport aux réactifs Bayer (bDNA) et Roche TaqMan.

figure 8 – moyenne et dispersion des résultats en fonction du réactif utilisé au niveau 2



Au niveau 2, on n'observe aucune différence entre les mesures du protocole standard de Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 et celles du protocole ultrasensible (3,94 log de copies/ml en ps contre 3,95 en us ($p=0,61$)).

Les mesures obtenues avec le réactif Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction manuelle sont significativement plus basses que celles obtenues avec Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA) ($p=10^{-4}$), Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us ou ps ($p=10^{-4}$) et avec Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction par AmpliPrep ($p=10^{-4}$) : 3,70 log de copies/ml en moyenne contre 3,86 log de copies/ml pour le réactif Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (R2) (bDNA), contre 3,95 log de copies/ml pour les réactifs Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 et contre 4,33 log de copies/ml pour le réactif Taq Man avec AmpliPrep.

Les mesures obtenues avec le réactif Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA), le réactif Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction manuelle et le réactif Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps ou us sont significativement plus basses que celles obtenues avec Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction par AmpliPrep ($p=10^{-4}$ à chaque fois) (tableau I).

Le nouveau réactif Roche Diag. Cobas Taq Man HIV1 test utilisé avec l'extracteur AmpliPrep donne des résultats de charges virales plus élevés que tous les autres réactifs alors que ce même réactif utilisé avec extraction manuelle donne les résultats les plus bas.

La différence entre la moyenne des résultats obtenus avec le réactif Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec l'extracteur AmpliPrep et la moyenne des résultats obtenus avec le réactif Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction manuelle est très importante : 0,63 log copies/ml.

L'échantillon de niveau 2 était le même que celui de niveau 2 de 2003. Les résultats moyens de 2005 ne sont pas différents de ceux obtenus en 2003 que ce soit pour les réactifs Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps ou us (respectivement 4,00 et 3,95 en 2003 et 2005) ou pour le réactif Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA) (respectivement 3,89 et 3,86 en 2003 et 2005).

5 - Précision de la mesure d'ARN-VIH plasmatique

Globalement, les résultats montrent que la variabilité totale des mesures est basse pour un niveau haut de charge virale.

Le niveau 1 est caractérisé par des coefficients de variation compris entre 2,8% pour Roche Taq Man avec extracteur et 16% pour Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us.

Au niveau 2, on observe des coefficients de variation plus faibles variant de 2,9% pour Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA) à 4,4% pour Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us (Tableau I).

Il est possible que la mauvaise détection du virus de niveau 1 par le réactif Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us soit également due à une variabilité élevée (niveau bas de charge virale)

La dispersion des mesures d'ARN-VIH plasmatique est significativement plus faible avec le réactif bDNA qu'avec le réactif Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us au niveau 1 ($p < 10^{-4}$) et au niveau 2 ($p = 0.002$).

La mesure de Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us est donc moins précise que celle de Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA) pour les 2 niveaux. Au niveau 2 cette dispersion n'est pas significativement plus faible que l'on compare Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA) et Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps ou que l'on compare Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us et Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec ou sans l'extracteur AmpliPrep.

Pour le niveau de dilution 2, on note que les résultats fournis par les laboratoires ont une bonne reproductibilité pour tous les réactifs.

En conclusion, on peut observer que les échantillons du niveau 2 analysés par le réactif Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA) sont caractérisés, par des mesures moyennes plus basses de 0,09 log de copies/ml par rapport aux résultats des réactifs Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us ou Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps. Les résultats du réactif Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction AmpliPrep sont plus élevés que tous les autres réactifs et ceux du réactif Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction manuelle sont plus bas que tous les autres réactifs.

Lors du contrôle de qualité précédent de 2003 l'écart observé entre les réactifs Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA) et Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us ou ps était de 0,11 log copies/ml proche de celui observé lors de l'opération 2005 (0,09 log copies/ml). Aucune différence significative n'a été observée entre les résultats de 2003 et 2005 pour le réactif bDNA ($p = 0,21$) ainsi que pour Cobas us ($p = 0,21$) et Cobas ps ($p = 0,24$).

Analyse qualitative des résultats

ARN-VIH : échantillons négatifs (05-4A, 05-1B, 05-3D et 05-2E), échantillon positif de niveau 1 (05-2A, 05-3B, 05-4D et 05-4E) et échantillons positifs de niveau 2 (05-1A et 05-3A, 05-2B et 05-4B, 05-1D et 05-2D, 05-1E et 05-3E).

Méthode et expression des résultats

Les laboratoires ont rendu une mesure qui peut être interprétée comme « détectable » ou « indétectable ».

→ Toutes quantifications supérieures au seuil de quantification impliquent un résultat qualitatif détectable.

→ Si la mesure quantitative est donnée sous la forme "< au seuil de quantification", le résultat qualitatif est considéré comme indétectable.

→ En revanche, si le laboratoire a rendu une quantification, mais que celle-ci est inférieure au seuil de quantification recommandé par le fabricant, le résultat n'est pas exploité. C'est le cas d'une valeur pour le réactif Roche Diag. Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps avec l'échantillon négative et 5 valeurs pour le réactif Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps et 4 valeurs pour le réactif Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us avec les échantillons positifs.

Résultats des participants

1- Résultats qualitatifs des laboratoires par réactif pour l'échantillon négatif en ARN-VIH1

Les résultats qualitatifs des laboratoires par réactif pour l'échantillon négatif sont présentés dans le tableau IV.

tableau IV –résultats qualitatifs des laboratoires par réactif pour l'échantillon négatif (05-4A,05-1B, 05-3D et 05-2E)

Réactifs	Seuil de quantification* (log copies/ml)	Nombre de résultats rendus « < à un seuil de quantification » (Indétectables)		Nombre de résultats quantitatifs supérieurs au seuil de quantification* (détectables)	% de résultats indétectables [IC à 95%]	% de résultats acceptables (indétectables et bon seuil)
		Bon seuil (*)	Mauvais seuil (**)			
Roche Diag. Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps***	2,60	2	-	-	100,0 [15,8-100,0]	100,0
Roche Diag. Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us****	1,70	4	-	-	100,0 [39,8-100,0]	100,0
Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps***	2,60	20	10	-	100,0 [88,4-100,0]	66,7
Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us****	1,70	38	18	-	100,0 [93,6-100,0]	67,8
Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA)	1,70	33	1	3	91,9 [78,0-98,3]	89,2
Abbott LCX HIV RNA	1,70	1	3	-	100,0 [39,8-100,0]	25,0
Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test extraction manuelle	1,60	7	-	-	100,0 [59,0-100,0]	100,0
Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec Ampliprep	1,60	6	-	-	100,0 [54,1-100,0]	100,0
Biomérieux Nuclisens easy Q HIV1	1,70	1	-	-	100,0 [2,5-100,0]	100,0

*: Seuil recommandé par le fabricant

** : Seuil différent du seuil recommandé par le fabricant

*** protocole standard

**** : protocole ultrasensible

On constate que certains laboratoires n'utilisent pas le seuil recommandé par le fabricant :

→ Pour le réactif Roche Diagnostic Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 en protocole standard, beaucoup de laboratoires utilisent 2,30 log copies/ml et pour le même réactif en protocole ultrasensible 1,30 ou 1,60 log copies/ml.

→ Pour le réactif Abbott LCX HIV RNA, 2 laboratoires ont utilisé respectivement 1,30 et 1,40 log copies/ml.

D'autre part, on note que 3 laboratoires ayant utilisé le réactif Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA) ont trouvé un résultat détectable (1,70 ; 1,86 et 1,94 log copies/ml). C'est le seul réactif pour lequel des résultats détectables et supérieurs au seuil recommandé par le fabricant ont été trouvés, sa spécificité est donc de 91,9% [IC à 95% = 78,0-98,3] pour 100% pour tous les autres réactifs.

1- Résultats qualitatifs des laboratoires par réactif pour le niveau 1 positif en ARN-VIH1

Les résultats qualitatifs des laboratoires par réactif pour le niveau 1 sont présentés dans le tableau V.

tableau V – résultats qualitatifs des laboratoires par réactif pour le niveau 1 (05-2A, 05-3B, 05-4D et 05-4E)

Réactifs	Seuil de quantification* (log copies/ml)	Nombre de résultats rendus « < à seuil de quantification » (Indétectables)	Nombre de résultats quantitatifs supérieurs au seuil de quantification (détectables)	% de résultats acceptables (détectables) [IC à 95%]	Nombre de résultats quantitatifs inférieurs au seuil de quantification (non exploités)
Roche Diag. Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps**	2,60	1	2	66,7 [9,4-99,2]	-
Roche Diag. Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us****	1,70	1	3	75,0 [19,4-99,4]	-
Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps**	2,60	22	3	12,0 [2,5-31,4]	5
Roche Diag.Cobas	1,70	5	46	90,2	4

Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us***				[78,7-96,8]	
Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA)	1,70	-	37	100,0 [90,9-100,0]	-
Abbott LCX HIV RNA	1,70	-	4	100,0 [42,3-100,0]	-
Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction manuelle	1,60	-	8	100,0 [59,0-100,0]	-
Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec Ampliprep	1,60	-	6	100,0 [54,1-100,0]	-
Biomérieux Nuclisens easy Q HIV1	1,70	-	1	100,0 [2,5-100,0]	-

* : Seuil recommandé par le fabricant

** : protocole standard

*** : protocole ultrasensible

On retrouve la sous-estimation en ARN-VIH1 pour le virus CRF02 (Cameroun) avec les réactifs Roche Diagnostic Amplicor HIV1 Monitor 1.5 et Roche Diagnostic Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 en protocole standard et en protocole ultrasensible.

3 - Résultats qualitatifs des laboratoires par réactif pour le niveau 2 positif en ARN-VIH1

Les résultats qualitatifs des laboratoires par réactif pour le niveau 2 sont présentés dans le tableau VI.

tableau VI – résultats qualitatifs des laboratoires par réactif pour le niveau 2 (05-1A et 05-3A, 05-2B et 05-4B, 05-1D et 05-2D, 05-1E et 05-3E).

Réactifs	Seuil de quantification (log copies/ml)	Nombre de résultats rendus « < au seuil de quantification » (Indétectables)	Nombre de résultats quantitatifs supérieurs au seuil de quantification (détectables)	% de résultats acceptables (détectables) [IC à 95%]
Roche Diag. Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps	2,60	-	6	100,0 [54,1-100,0]
Roche Diag. Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us	1,70	-	8	100,0 [61,1-100,0]
Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 ps	2,60	-	59	100,0 [93,8-100,0]
Roche Diag.Cobas Amplicor HIV1 Monitor 1.5 us	1,70	-	112	100,0 [96,7-100,0]
Bayer Versant HIV1 RNA 3.0 assay (bDNA)	1,70	-	74	100,0 [95,0-100,0]
Abbott LCX HIV RNA	1,70	-	8	100,0 [52,4-100,0]
Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec extraction manuelle	1,60	-	15	100,0 [78,2-100,0]
Roche Diag. Cobas TaqMan HIV1 test avec Ampliprep	1,60	-	12	100,0 [73,5-100,0]
Biomérieux Nuclisens easy Q HIV1	1,70	-	2	100,0 [2,5- 100,0]

On observe des résultats corrects sur tous les échantillons au niveau 2 pour tous les réactifs.

Commentaires

Lors de cette 7^{ème} opération du Contrôle National de Qualité de l'ARN-VIH plasmatique, on constate au niveau des réactifs :

→ l'utilisation toujours aussi importante du réactif Roche Diagnostics Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, protocole ultrasensible (47,5% des utilisateurs).

→ une stabilité du nombre de laboratoires utilisant Bayer Diagnostics HIV RNA 3.0 Assay bDNA (30,8%).

→ une diminution du nombre de laboratoires utilisant le réactif Roche Diagnostics Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, protocole standard (2,5%) et Roche Diagnostics Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, protocole ultrasensible (3,3%).

→ la mise sur le marché d'un nouveau réactif : Roche Diagnostic Cobas Taq Man HIV1 test avec 14 laboratoires dont 6 ont utilisé l'extracteur Cobas Ampliprep.

Les quantifications sont à nouveau caractérisées cette année par une bonne homogénéité de l'ensemble des mesures avec des coefficients de variation inférieurs à 8% aux 2 niveaux à l'exception du réactif Roche Diagnostics Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, protocole ultrasensible au niveau 1 (16%). Les résultats obtenus pour l'échantillon de niveau 2 déjà testé en 2003 ont montré la stabilité des quantifications mesurées par les réactifs Roche Diagnostics Cobas Amplicor HIV1 Monitor version 1.5 et Bayer Diagnostics HIV RNA 3.0 Assay bDNA.

Quelques points importants sont toutefois à souligner :

→ On a pu observer lors de cette opération de contrôle, comme lors des précédentes, que les mesures obtenues avec le réactif Bayer Diagnostics HIV RNA 3.0 Assay (bDNA) sont inférieures aux mesures des réactifs Roche Cobas Amplicor, ces deux réactifs étant les plus utilisés lors de cette opération de contrôle 2005. Ici cette différence est en moyenne de 0,09 log de copies/ml au niveau 2. Toutefois, Il est à noter que cette différence est plus faible que celle observée en 2002 (0,50 log de copies/ml) mais peu différente de 2003 (0,11 log de copies/ml).

→ De même qu'en 2003, on ne note pas en 2005 de différence entre la quantité moyenne obtenue avec le réactif Roche Diagnostics Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5, protocole standard et ultrasensible au niveau 2 (contrairement à 2002 où il existait une différence entre les 2 protocoles).

→ Le nouveau réactif Roche Diag. Cobas Taq Man HIV1 test montre des différences importantes selon que l'on utilise l'extracteur Cobas AmpliPrep ou une extraction manuelle. Ce réactif utilisé avec une extraction par Cobas AmpliPrep mesure des charges virales plus élevées que tous les autres réactifs alors que ce même réactif utilisé avec une extraction manuelle a la moyenne la plus basse au niveau 2 (0,63 log copies/ml de différence).

→ L'analyse des résultats qualitatifs a permis de montrer que le risque de faux positifs sur des échantillons VIH négatifs n'est pas négligeable avec le réactif Bayer Diagnostics HIV RNA 3.0 Assay (bDNA), estimé à 8,1%. Lors du contrôle de 2003, le risque de faux positifs était identique (8,3%).

→ Pour les résultats négatifs, la conformité des seuils recommandés par les fabricants n'est pas toujours respectée, pour les réactifs Roche Diagnostics Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5 protocole standard et ultrasensible. Cependant la proportion de seuils conformes ne cesse de s'améliorer depuis le contrôle de qualité de 2002 : pour Roche Diagnostics Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5 protocole standard elle était de 28,6% en 2002, 54,8% en 2003 et 66,7% en 2005 et pour le protocole ultrasensible, elle était de 58,5% en 2002 ; 60,9% en 2003 et 67,9% en 2005.

Conclusion

Globalement, on note peu de valeurs aberrantes et isolées, ce qui montre que les résultats rendus par les laboratoires sont bien homogènes en intra-réactif, avec des coefficients de variation très bas.

On note cependant une hétérogénéité des résultats en inter-réactifs surtout pour l'échantillon niveau 1 (les moyennes des résultats selon les réactifs montrent un écart allant jusqu'à 0,72 log copies/ml). Ce niveau présentait un taux bas d'ARN-VIH1 peut-être proche du seuil de certains réactifs et une souche CRF02 qui s'est révélée être quantifiée différemment selon les réactifs du marché. Cela souligne l'intérêt de l'utilisation d'une deuxième réactif en cas d'incohérence entre le statut immunitaire du patient et le résultat de sa charge virale particulièrement pour les virus africains.

Pour la première fois, des résultats ont été rendus par un réactif utilisant une technique de PCR en temps réel : le réactif Roche Cobas Taq Man HIV1 test. Les quantifications étaient très différentes selon l'utilisation d'une extraction manuelle ou automatique par AmpliPrep (0,6log copies/ml).

Ces résultats montrent l'intérêt de renouveler un tel contrôle tant pour l'information donnée aux biologistes que pour le suivi de la qualité globale des réactifs.