

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

ARN du virus de l'hépatite C : ARN-VHC

I.HELIAS (Afssaps)
Joliette COSTE (EFS Montpellier Pyrénées méditerranée)

Expédition	03 novembre 2003
Clôture	08 décembre 2003
Edition des compte-rendus individuels	13 avril 2004
Paramètres contrôlés	03-1 ; 03-2 ; 03-3 et 03-4 : ARN du virus de l'Hépatite C
Nombre de laboratoires concernés*	161
Nombre de laboratoires participants**	158

* Laboratoires ayant déclaré à l'Afssaps pratiquer les analyses concernées par l'envoi

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

Un échantillon (03-3) ne comportait pas d'ARN du VHC.

Les 3 autres échantillons étaient positifs pour l'ARN du VHC. Pour l'échantillon 03-2, l'ARN était associé à l'ARN du VIH1, alors que l'échantillon 03-4 avait été prélevé sur héparine.

Le taux d'ARN VHC était situé entre 3 et 4 logUI/ml dans chaque échantillon positif.

Un des objectifs de cette opération était la mise en évidence potentielle de l'influence de l'héparine sur les résultats de la détection de l'ARN du VHC.

Le taux de participation (98,1%) est en augmentation par rapport à 2001 où il était seulement de 90,9%. Pour ce contrôle, 69 laboratoires (soit 43,7% des participants) ont fait la détection de l'ARN-VHC, 5 laboratoires (soit 3,2% des participants) ont fait la quantification de cet ARN et 75 laboratoires (soit 47,4%) ont fait la détection et la quantification. On note que 9 laboratoires (5,7%) n'ont pas effectué ces analyses.

Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus lors des dernières opérations notamment en ce qui concerne les différences entre les réactifs.

La co-infection VIH1 n'influence pas les résultats, en revanche la présence d'héparine diminue la sensibilité des réactifs.

Résultats qualitatifs détection de l'ARN -VHC

Définition de l'échantillon

Les échantillons sont présentés dans le tableau I.

Tableau I : Echantillons de l'opération de contrôle

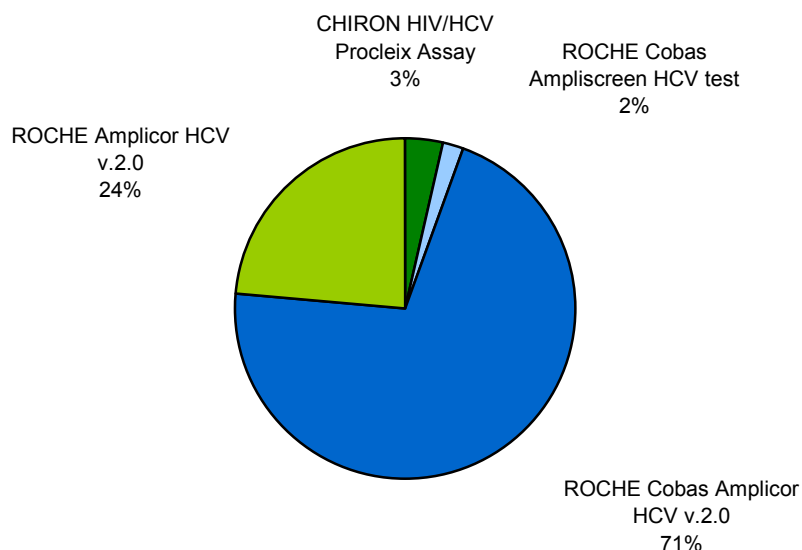
Echantillon	03-1	03-2	03-3	03-4
Définition de l'échantillon	ARN-VHC positif (génotype 1)	ARN-VHC positif (génotype 1) et ARN-VIH1 (génotype 8E5 souche defective)	Négatif	ARN-VHC positif (génotype 1) et héparine

Résultats des participants

1- Réactifs utilisés

La répartition des réactifs de détection est représentée par la figure 1.

Figure 1 : Répartition des réactifs de détection



2- Résultats des réactifs de détection de l'ARN-VHC sur les échantillons de contrôle

Les résultats qualitatifs pour l'échantillon négatif (03-3) sont regroupés dans le tableau II.

Tableau II : Résultats qualitatifs de l'ARN-VHC pour l'échantillon négatif

Réactifs	Nombre d'utilisateurs	Echantillon ARN-VHC 03-3		Spécificité (1)
		Nbre résultats	Nbre résultats négatifs	
CHIRON HIV/HCV Procleix Assay	5	5	3	60,0%
ROCHE Cobas Ampliscreen HCV test	3	3	3	100,0%
ROCHE Amplicor HCV v.2.0	34	34	34	100,0%
ROCHE Cobas Amplicor HCV v.2.0	102	101	99	98,0%

(1) Nombre de résultats négatifs obtenus sur l'échantillon négatif

La version automatisée sur Cobas du test Amplicor HCV v2.0 de la firme Roche Diagnostics est largement utilisée en France (71% des participants). Deux résultats faussement positifs ont été trouvés avec ce réactif : le taux de bonnes réponses obtenu après analyse de l'échantillon négatif 03-3 est égale à 98% contre 100% pour les versions manuelle Amplicor et automatisée Cobas AmpliScreen. Le test Procleix HIV/ HCV de la firme Chiron n'a été utilisé que par cinq participants et l'obtention de deux résultats faux positifs réduit la spécificité à 60%.

Ces pourcentages de bonnes réponses sont inférieures à ceux obtenus lors du précédent contrôle de qualité dans lequel une spécificité de 100% était observée pour tous les réactifs.

Les résultats qualitatifs pour les échantillons positifs (03-1, 03-2 et 03-4) sont regroupés dans le tableau III.

Tableau III : Résultats de la détection de l'ARN-VHC pour les échantillons positifs

Réactifs	Echantillons ARN-VHC					
	03-1		03-2		03-4	
	Nombre de résultats	Sensibilité (1)	Nombre de résultats	Sensibilité (1)	Nombre de résultats	Sensibilité (1)
CHIRON HIV/HCV Procleix Assay	5	100,0%	5	100,0%	5	80,0%
ROCHE Cobas Ampliscreen HCV test	3	100,0%	3	100,0%	3	100,0%
ROCHE Amplicor HCV v.2.0	34	100,0%	34	100,0%	34	91,2%
ROCHE Cobas Amplicor HCV v.2.0	102	100,0%	102	100,0%	102	93,1%
Tous réactif confondus	144	100,0%	144	100,0%	144	92,4%

(1) Nombre de résultats positifs obtenus sur l'ensemble des échantillons positifs

L'ARN VHC est détecté dans 100% des échantillons positifs 03-1 analysés quel que soit le réactif utilisé. La co-infection par le VIH1 présente dans les échantillons 03-2 ne modifie pas le taux de bonnes réponses de 100% obtenue sur la détection de l'ARN VHC. L'échantillon 03-4 qui contenait de l'héparine montre que le taux de bonnes réponses passe de 100% à 92,4%.

Résultats quantitatifs ARN-VHC

Définition de l'échantillon

Les échantillons ont été testés par nos experts : Joliette Coste (EFS Montpellier), Syria Laperche (INTS Paris) et sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Résultats des experts

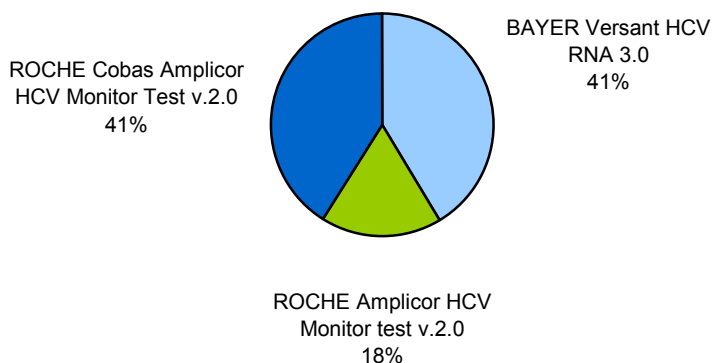
Réactif	03-1	03-2	03-4
BAYER Versant HCV RNA 3.0	3,5 logUI/ml	3,4 logUI/ml	3,8 logUI/ml
ROCHE Monitor HCV v 2.0	4,0 logUI/ml 3,7 logUI/ml	3.9 logUI/ml 3,97 logUI/ml	4,4 logUI/ml 4,35 logUI/ml

Résultats des participants

1- Réactifs utilisés

La répartition des réactifs de quantification est représentée par la figure 2.

Figure 2 : Répartition des réactifs de quantification de l'ARN-VHC



Le réactif de quantification Versant HCV RNA 3.0 de la société Bayer et la version Cobas du réactif Amplicor Monitor v2.0 de Roche Diagnostics sont les plus utilisés lors de ce contrôle pour effectuer les mesures quantitatives et leur répartition parmi les participants est homogène (41% chacun). Les 18 % des laboratoires restants travaillent avec la version microplaque Amplicor Monitor v2.0.

2- Méthode statistique et expression des résultats

Les données ont été traitées réactif par réactif. Seuls les échantillons positifs en ARN-VHC ont été étudiés, c'est-à-dire 03-1, 03-2 et 03-4.

Après exclusion des irrégularités évidentes de l'analyse statistique, la norme ISO-5725-2 est appliquée.

Un examen de cohérence inter-laboratoire et des valeurs aberrantes est effectué (tableaux de statistiques de Mandel à 1 et 5% = h). Les valeurs aberrantes sont éliminées des statistiques (si elles sont inexplicables et donc non corrigées). Les valeurs isolées sont aussi repérées mais ne sont pas exclues des calculs. Puis la **moyenne (m)**, l'**écart-type de reproductibilité (SR)** et le **coefficient de variation (CV%)** sont calculés pour chaque échantillon à partir de n' (nombre de valeurs hors irrégularités évidentes et valeurs aberrantes). Le nombre p représente le nombre de laboratoires ayant donné un résultat pour l'échantillon considéré.

Lors de ce contrôle, la variation intra-laboratoire ne peut pas être calculée car nous n'avons envoyé qu'un seul échantillon pour chaque niveau de dilution.

3- Résultats des réactifs de quantification de l'ARN-VHC obtenus sur les échantillons de contrôle

Les résultats quantitatifs pour les échantillons positifs (03-1, 03-2, 03-4) sont regroupés dans les tableaux V et VI et ceux de l'échantillon négatif dans le tableau VII.

tableau V - résultats quantitatifs de l'ARN-VHC sur l'échantillon 03-1

ECHANTILLON	03-1				
	p	n'	m (logUI/ml)	SR	CV (%)
BAYER Versant HCV RNA 3.0	33	33	3,141	0,1021	3,3
ROCHE Amplicor HCV Monitor test v.2.0	14	14	3,616	0,3235	8,9
ROCHE Cobas Amplicor HCV Monitor Test v.2.0	33	32	3,448	0,2263	6,6

tableau VI - résultats quantitatifs de l'ARN-VHC sur les échantillons 03-2 et 03-4

ECHANTILLON	03-2					03-4				
	p	n'	m (logUI/ml)	SR	CV (%)	p	n'	m (logUI/ml)	SR	CV (%)
BAYER Versant HCV RNA 3.0	33	32	3,202	0,1121	3,5	33	30	3,578	0,0657	1,8
ROCHE Amplicor HCV Monitor test v.2.0	13	13	3,567	0,1804	5,0	13	13	3,966	0,2344	5,9
ROCHE Cobas Amplicor HCV Monitor Test v.2.0	33	32	3,472	0,1877	5,4	32	31	3,940	0,1738	4,4

tableau VII - résultats quantitatifs de l'ARN-VHC sur l'échantillon 03-3 (négatif)

ECHANTILLON	03-3		Taux de bonnes réponses
	p	n*	
BAYER Versant HCV RNA 3.0	30	30	100,0%
ROCHE Amplicor HCV Monitor test v.2.0	9	8	88,9%
ROCHE Cobas Amplicor HCV Monitor Test v.2.0	28	28	100,0%

* : nombre de résultats rendus non détectables c'est-à-dire < au seuil recommandé par le fabricant

L'analyse des tableaux V et VI montre une différence de 0,3 logUI/ml entre le réactif Cobas Amplicor HCV Monitor Test v.2.0 de la société ROCHE et le réactif Versant HCV RNA 3.0 de la société BAYER et de 0,4 logUI /ml entre le réactif Amplicor HCV Monitor Test v.2.0 de la société ROCHE et le réactif Versant HCV RNA 3.0 de la société BAYER.

On remarque aussi une répartition plus homogène des résultats obtenus avec le réactif Versant HCV RNA 3.0 à de la société BAYER (CV allant de 1,8 à 3,5%) que celles des réactifs de la société Roche Diagnostics (Cobas Amplicor HCV Monitor Test v.2.0 : CV de 4,4 à 6 ,6% et Amplicor HCV Monitor Test v.2.0 : 5,0 à 8,9%).

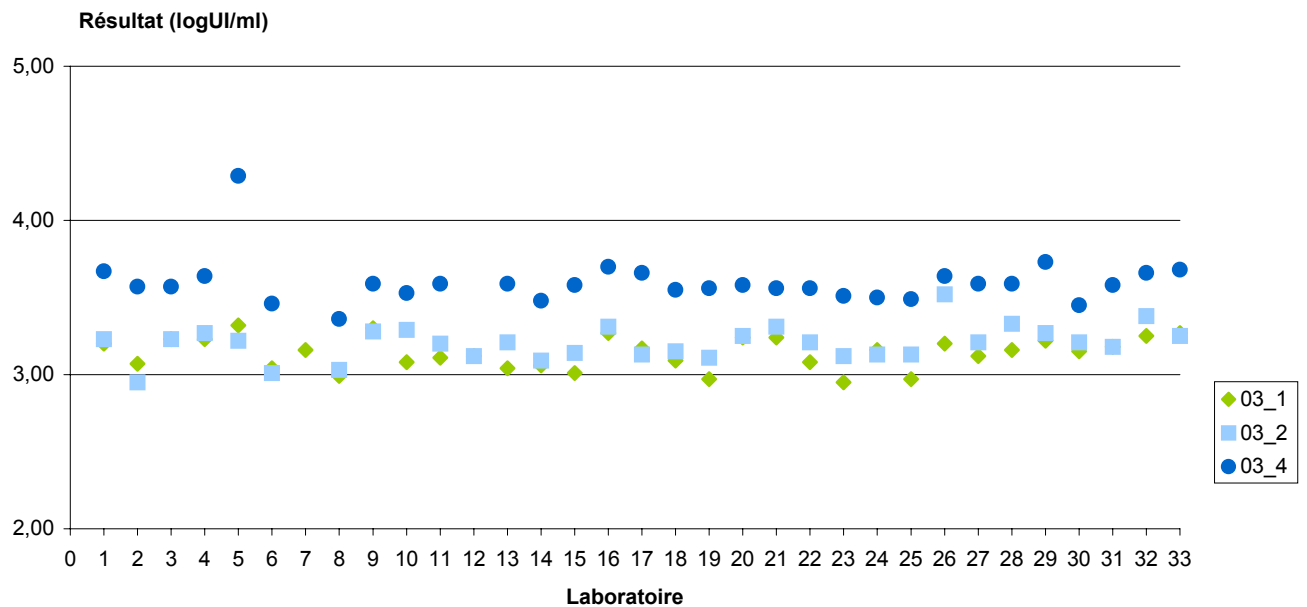
Les figures 3, 4 et 5 le confirment.

Les résultats de l'échantillon négatif (tableau VII) montre des taux de bonnes réponses très élevés. Un seul laboratoire a donné un résultat quantitatif inférieur au seuil de son réactif (ROCHE Amplicor HCV Monitor test v.2.0).

4- Résultats réactif par réactif

4-1- Résultats du réactif BAYER Diagnostics Versant HCV 3.0 RNA Assay (bDNA)

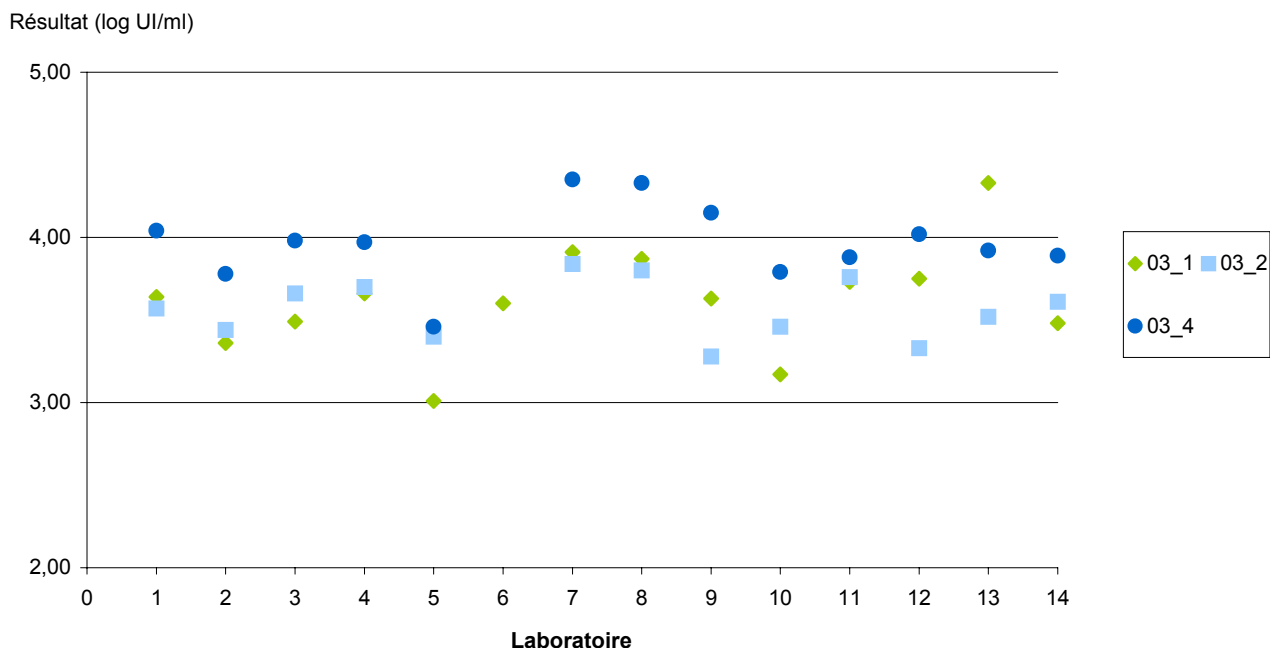
figure 3 - représentation par laboratoire et par niveau des résultats quantitatifs obtenus avec le réactif BAYER Diagnostics Versant HCV 3.0 RNA Assay (bDNA)



Les résultats obtenus sur les échantillons positifs 03-4 (ARN VHC en présence d'héparine) par les laboratoires 5 et 12 (mesure rendue < au seuil du réactif) ont été écartés de l'analyse statistique en raison d'une irrégularité évidente. Trois mesures obtenues sur les échantillons 03-4 ont ainsi été exclues contre une seule sur les échantillons 03-2 (ARN VHC et co-infection VIH) et aucune sur les échantillons 03-1 (ARN VHC seul).

4-2- Résultats du réactif ROCHE Diagnostics Amplicor HCV Monitor Test v.2.0

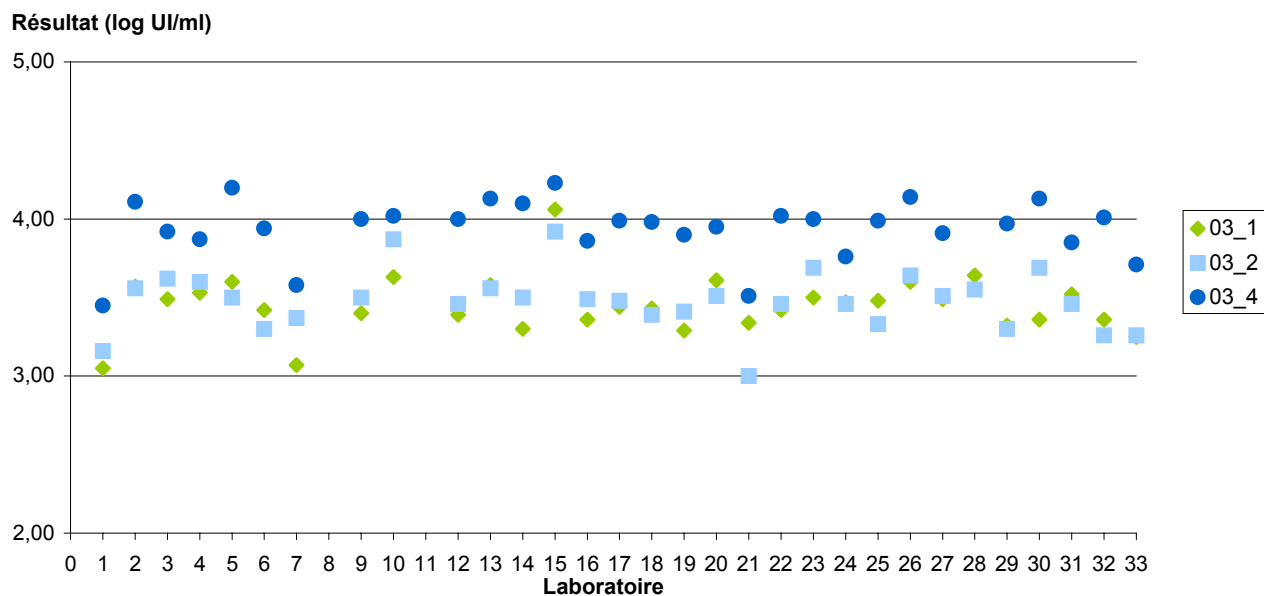
figure 4 - représentation par laboratoire et par niveau des résultats quantitatifs obtenus avec le réactif ROCHE Amplicor HCV Monitor Test v.2.0



Les résultats des échantillons 03-2 et 03-4 n'ont pas été rendus par le laboratoire 6.

4-3- Résultats du réactif ROCHE Diagnostics Amplicor HCV Monitor Test v.2.0

figure 5 - représentation par laboratoire et par niveau des résultats quantitatifs obtenus avec le réactif ROCHE Cobas Amplicor HCV Monitor Test v.2.0



Une mesure aberrante a été écartée de l'analyse statistique sur chaque niveau positif (laboratoire 15 pour l'échantillon 03-1 ; laboratoire 11 pour l'échantillon 03-2 et laboratoire 1 pour l'échantillon 03-4).

Commentaires

Le nombre de laboratoires pratiquant la détection et/ou la quantification de l'ARN du VHC a augmenté de 143 en 2001 à 161 en 2003.

Le taux de participation au Contrôle National de Qualité ARN-VHC 2003 (98.1%) est en augmentation par rapport à 2001 où il était seulement de 90.9%. Près de la moitié des laboratoires (47,4%) ont rendu à la fois des mesures qualitatives et quantitatives comme en 2001.

Les données qualitatives mettent en évidence une forte utilisation (71% des participants) du réactif Roche Cobas Amplicor HCV v2.0. Nous observons des taux de bonnes réponses de 98% et de 60% respectivement avec ce réactif et avec le test Procleix HIV/HCV de Chiron. Ceci est dû à l'obtention avec les deux tests de deux résultats faussement positifs. Un taux de bonnes réponses de 100% a été atteint avec la version Amplicor HCV V 2.0 et avec le Cobas AmpliScreen HCV test de la société Roche Diagnostics. Ces résultats mettent en évidence de moins bons résultats que ceux obtenus lors des précédents contrôles pour lesquels des taux de 100 % étaient atteints quel que soit le réactif utilisé.

L'analyse qualitative des échantillons positifs met en évidence une sensibilité inférieure à 100% pour 3 tests sur 4, celle-ci étant conditionnée par la sensibilité obtenue lors de l'analyse de l'ARN-VHC en présence d'héparine (échantillon 03-4). Les deux techniques d'amplification moléculaire basées sur le principe du TMA et sur celui de la PCR semblent sensibles à la présence de l'héparine connue pour interagir avec les acides nucléiques. L'hypothèse d'une inversion de tube par un utilisateur de la technique Procleix (sur 5 au total) pourrait expliquer la sensibilité de 80% obtenue avec ce réactif. L'héparine est co-purifiée avec l'ADN lors des extractions utilisant la combinaison phénol-chloroforme (1). On constate que 11 laboratoires ont eu un mauvais résultat avec l'héparine, les fabricants préconisant l'emploi d'un autre anticoagulant pour ces tests.

Ce contrôle visait enfin à étudier l'effet d'une co-infection par le VIH1 sur les résultats de la détection de l'ARN du VHC et l'ensemble des résultats obtenus sur l'ARN VHC montre des taux de 100% de bonnes réponses atteints pour chaque réactif.

Les données quantitatives montrent que le réactif de quantification Bayer Versant HCV RNA 3.0 et le réactif Roche Cobas Amplicor HCV Monitor sont les plus utilisés et à part égale (41% chacun) par les laboratoires tandis que 18% d'entre eux utilisent la version microplaque du test Roche. Nous constatons dans ce contrôle que, pour les charges virales analysées (< 5 log UI/ml), les résultats de quantification obtenus avec les réactifs Roche sont supérieurs de 0,35 log en moyenne à ceux obtenus avec le réactif Bayer. Cette observation a déjà été faite lors du précédent contrôle national et peut être liée au principe même de l'amplification. Il est donc nécessaire d'utiliser le même réactif pour effectuer les mesures de charge virale dans le cadre du suivi thérapeutique des patients (2 et 3).

La variabilité inter-laboratoire (CV) est plus faible avec le réactif Bayer qu'avec les réactifs Roche et ce sur l'ensemble des échantillons positifs testés dans ce CNQ. La présence de l'héparine paraît néanmoins perturber les analyses car c'est à ce niveau que les irrégularités ou les valeurs aberrantes ont été observées.

Comme pour les résultats qualitatifs, la co-infection par le VIH1 ne modifie pas les résultats.

Bibliographie

1. W.A AL-SOUD and P. RADSTROM

Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells.
J. Clin. Microbiol., 2001 : 485-493.

2. M. BELD, *et al.*

Performance of the new Bayer Versant HCV RNA 3.0 Assay for quantification of HCV RNA in plasma and serum : conversion to international units and comparison with the Roche Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0 Assay.
J. Clin. Microbiol., 2002 : 343-382.

3. C. MORISHIMA *et al.*

Strength and limitations of commercial tests for Hepatitis C Virus RNA quantification.
J. Clin. Microbiol., 2004 : 421-425.