

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

**Charge virale de l'Hépatite C : détection et
quantification de l'ARN-VHC
Génotypage VHC**

Isabelle HELIAS (Afssaps)
Syria Laperche (INTS – Paris)

Expédition	28 mai 2008
Clôture	30 juin 2008
Edition des compte-rendus individuels	23 septembre 2008
Paramètres contrôlés/Echantillons	ARN du virus de l'Hépatite C : E1-08 , E2-08 , E3-08 et E4-08
Nombre de laboratoires concernés*	127
Nombre de laboratoires participants**	125

* 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 127 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 la charge virale et/ou le génotypage. Les échantillons ont été envoyés en double exemplaire si le laboratoire effectuait toutes les analyses prévues dans l'opération.

Les échantillons E1-08, E2-08 et E4-08 contenaient de l'ARN-VHC alors que l'échantillon E3-08 était négatif en ARN-VHC. Les échantillons étaient de génotype 1 pour E1-08, génotype 2 pour E4-08 et génotype 3 pour E2-08. Les résultats sont très satisfaisants en ce qui concerne la détection de l'ARN-VHC avec des pourcentages de bonnes réponses tous réactifs confondus allant de 98,8 à 100%.

Les résultats de la quantification ont été analysés uniquement par réactif. Ceux-ci sont tout à fait satisfaisants. Pour chacun des réactifs utilisés, on note un faible nombre de valeurs s'écartant significativement des moyennes que ce soit pour les niveaux faibles d'ARN-VHC (aux alentours de 2 log UI/ml, échantillons E1-08 et E4-08) ou pour le niveau plus élevé (5 log UI/ml, échantillon E2-08).

Les moyennes des résultats obtenus avec les deux réactifs de PCR en temps réel (utilisés par 87% des laboratoires effectuant la quantification de l'ARN-VHC) sont statistiquement différentes mais les écarts entre elles, quel que soit le niveau d'ARN-VHC étudié, sont faibles (de l'ordre de 0,3 log UI/ml) et sans impact clinique.

La détermination du génotype était proposée pour la première fois dans une opération du Contrôle national de qualité. La moitié des laboratoires n'a pas pu réaliser cette détermination sur les échantillons E1-08 et E4-08 du fait de la faible charge virale contenue dans ces échantillons. Toutefois, les laboratoires ayant pu fournir un résultat ont obtenu 100% de bonnes réponses pour tous les génotypes.

Détection de l'ARN-VHC

Définition des échantillons

Les échantillons E1-08, E2-08 et E4-08 proviennent d'un pool de plasmas humains défibrinés positif en ARN-VHC. L'échantillon E3-08 provient d'un pool de plasmas exempt d'ARN-VHC.

Ces échantillons ont été envoyés congelés.

Les échantillons sont présentés dans le tableau I.

tableau I – échantillons de l'opération 08VHC1

Echantillon	Echantillon E1-08	Echantillon E2-08	Echantillon E3-08	Echantillon E4-08
Définition de l'échantillon	ARN-VHC positif (génotype 1)	ARN-VHC positif (génotype 3)	ARN-VHC négatif	ARN-VHC positif (génotype 2)

Résultats des participants

1- Réactifs de détection utilisés

On compte 82 laboratoires ayant pratiqué la détection de l'ARN-VHC, ce nombre est en très nette baisse par rapport à la dernière opération de contrôle de 2005 où 135 laboratoires avaient rendu des résultats. Cela s'explique en partie par le fait que de plus en plus de laboratoires effectuent la détection et la quantification avec le même réactif quantitatif relevant de la PCR en temps réel (ces réactifs quantitatifs ont une sensibilité proche de celle des réactifs dédiés à la détection). Ces laboratoires n'ont pas rendu de résultats de détection sur le bordereau-réponse.

La répartition des réactifs d'extraction et de détection est présentée dans le tableau II.

tableau II – réactifs utilisés

Réactifs de détection	Réactifs d'extraction	Nombre d'utilisateurs
Réactifs utilisant la technique PCR en temps réel		35
ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit (16 laboratoires)	ABBOTT sample preparation system	14
	BIOMERIEUX Nuclisens	1
	QIAGEN Qiamp viral RNA	1
ROCHE Cobas Taq Man HCV test (19 laboratoires)	ROCHE Cobas Ampliprep	15
	ROCHE High Pure System viral nucleic acid kit	4
Réactifs utilisant la PCR classique		38
ROCHE Cobas Amplicor HCV detection kit v2.0 (16 laboratoires)	ROCHE Amplicor HCV specimen preparation kit v2.0	14
	BIOMERIEUX Nuclisens	1
	Autres	1
ROCHE Amplicor detection HCV kit v2.0 (18 laboratoires)	ROCHE Amplicor HCV specimen preparation kit v2.0	18
ROCHE Cobas Ampliscreen HCV test version 2.0 (4 laboratoires)	BIOMERIEUX Nuclisens	4
Réactif utilisant la technique du DNA branché		2
SIEMENS Versant HCV RNA qualitative assay	-	2
Réactifs utilisant la technique TMA multiplex		7
CHIRON Procleix HIV1/HCV	-	5
CHIRON Procleix Ultrio HIV1/HCV/HBV	-	2

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. A noter que les laboratoires ayant utilisé une technique de PCR en temps réel fournissant un résultat quantifié ont rendu un résultat qualitatif pour ce volet de l'opération.

tableau III - récapitulatif des résultats de la détection de l'ARN-VHC pour les échantillons E1-08 et E2-08

Réactifs	Echantillon E1-08 (positif)				Echantillon E2-08 (positif)			
	Nbre total de réponses	Nbre de réponses exploitables	Nbre de réponses exactes	% de réponses exactes (1)	Nbre total de réponses	Nbre réponses exploitables	Nbre de réponses exactes	% de réponses exactes (1)
ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit	16	16	16	100	16	15	15	100
CHIRON Procleix HIV1/HCV	5	5	5	100	5	5	5	100
CHIRON Procleix Ultrio HIV1/HCV/HBV	2	2	2	100	2	2	2	100
ROCHE Cobas Taq Man HCV test	19	19	19	100	19	19	19	100
ROCHE Cobas Amplicor HCV detection kit v2.0	16	16	15	93,8	16	16	16	100
ROCHE Amplicor detection HCV kit v2.0	18	18	18	100	18	18	18	100
ROCHE Cobas Ampliscreen HCV test version 2.0	4	4	4	100	4	4	4	100
SIEMENS Versant HCV RNA qualitative assay	2	2	2	100	2	2	2	100
Total	82	82	81	98,8	82	82	82	100

(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 E3-08 et E4-08

Réactifs	Echantillon E3-08 (négatif)				Echantillon E4-08 (positif)			
	Nbre total de réponses	Nbre de réponses exploitables	Nbre de réponses exactes	% de réponses exactes (1)	Nbre total de réponses	Nbre réponses exploitables	Nbre de réponses exactes	% de réponses exactes (1)
ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit	16	16	15	93,8	16	16	16	100
CHIRON Procleix HIV1/HCV	5	5	5	100	5	5	5	100
CHIRON Procleix Ultrio HIV1/HCV/HBV	2	2	2	100	2	2	2	100
ROCHE Cobas Taq Man HCV test	19	19	19	100	19	19	19	100
ROCHE Cobas Amplicor HCV detection kit v2.0	16	16	16	100	16	16	16	100
ROCHE Amplicor HCV detection kit v2.0	18	18	18	100	18	17	17	100
ROCHE Cobas Ampliscreen HCV test version 2.0	4	4	4	100	4	4	4	100
SIEMENS Versant HCV RNA qualitative assay	2	2	2	100	2	2	2	100
Total	82	82	81	98,8	82	81	81	100

(1) Nombre de résultats positifs obtenus sur des échantillons positifs ou nombre de résultats négatifs sur des échantillons négatifs par rapport au nombre de réponses exploitables

Commentaires

On observe des pourcentages de réponses exactes élevés : 98,8 à 100% tous réactifs confondus.

On note 2 réponses erronées. Un laboratoire a rendu un résultat négatif avec le réactif ROCHE Cobas Amplicor HCV kit detection v2.0 sur l'échantillon E1-08 qui contenait un taux d'ARN-VHC faible (< 2 logUI/ml). Un autre laboratoire a rendu un résultat positif pour l'échantillon négatif (E3-08) avec le réactif Abbott Real time HCV amplification reagent kit.

Enfin, un laboratoire a rendu un « résultat ininterprétable » pour l'échantillon E4-08 avec le réactif ROCHE Amplicor HCV detection kit v2.0.

Quantification de l'ARN-VHC

Définition des échantillons

Les charges virales des échantillons ont été déterminées dans l'Unité d'expertise en virologie de l'INTS (Dr S. Laperche). Les résultats des échantillons E1-08, E2-08 et E4-08 sont présentés dans le tableau V. L'échantillon E3-08 ne contenait pas d'ARN-VHC.

tableau V - résultats des tests

Réactif	E1-08		E2-08		E4-08	
	UI/ml	Log UI/ml	UI/ml	Log UI/ml	UI/ml	Log UI/ml
ROCHE Cobas Taq Man HCV test	229	2,36	204 877	5,31	1036	3,02
	253	2,40	250 698	5,40	1053	3,02

Résultats des participants

1- Réactifs utilisés

La répartition des réactifs de détermination de la charge virale du VHC a évolué depuis la précédente opération de 2005. En effet, la majorité des laboratoires (74/85) a utilisé une technique de PCR en temps réel en 2008 contre 2 en 2005. Les réactifs de quantification sont présentés dans le tableau VI.

tableau VI – réactifs utilisés

Réactifs de quantification	Réactifs d'extraction	Nbre d'utilisateurs
Réactifs utilisant la technique PCR en temps réel		74
ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit (32 laboratoires)	ABBOTT sample preparation system	30
	BIOMERIEUX Nuclisens	1
	QIAGEN Qiamp viral RNA	1
ROCHE Cobas Taq Man HCV test (42 laboratoires)	ROCHE Cobas Ampliprep	33
	ROCHE High Pure System viral nucleic acid kit	7
	ROCHE Magnapure	1
	ROCHE Amplicor HCV specimen preparation kit v2.0	1
Réactifs utilisant la PCR classique		4
ROCHE Cobas Amplicor HCV monitor test v2.0 (3 laboratoires)	ROCHE Amplicor HCV specimen preparation kit v2.0	2
	Réactif non reporté	1
ROCHE Amplicor HCV Monitor test v2.0 (1 laboratoire)	ROCHE Amplicor HCV specimen preparation kit v2.0	1
Réactif utilisant la technique du DNA branché		7
SIEMENS Versant Quantiplex HCV RNA 3.0 (7 laboratoires)	-	7
Total		85

2- Traitement statistique des données obtenues par les laboratoires

L'analyse des résultats quantitatifs de cette opération 2008 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 :

→ Elimination des irrégularités évidentes : par la méthode de Tukey. Il s'agit d'une méthode non paramétrique qui permet de positionner chaque résultat en fonction des limites externes. Les valeurs situées à l'extérieur des limites externes sont exclues de la suite de l'analyse statistique.

→ Identification des mesures aberrantes (mesures faisant partie des 1% de valeurs les plus extrêmes) et des valeurs isolées (mesures faisant partie des 5% de valeurs les plus extrêmes) grâce aux statistiques de cohérence h inter-laboratoires de Mandel.

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 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.

→ Test de comparaison des moyennes : le test de Student (t) a été utilisé.

L'exploitation statistique n'a pas été effectuée pour les réactifs ayant moins de 3 utilisateurs.

3- Irrégularités évidentes

L'analyse statistique a écarté une irrégularité évidente avec le réactif ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit pour l'échantillon E4-08 ainsi que deux irrégularités évidentes avec le réactif ROCHE Cobas Taq Man HCV test, une sur E1-08 et une autre sur E4-08.

4- Statistiques de cohérence par réactif

4-1- Tracés des statistiques de cohérence par réactif

Les tracés des statistiques de cohérence inter-laboratoires h sont représentés sur les figures 1 à 9 pour chaque réactif à chaque niveau d'ARN-VHC. Les valeurs critiques de ces statistiques à 1% (caractérisant les valeurs aberrantes) et à 5% (caractérisant les valeurs isolées) sont également précisées sur ces figures. Les laboratoires figurant en rouge correspondent aux laboratoires ayant trouvé une valeur aberrante et les laboratoires figurant en vert correspondent aux laboratoires ayant trouvé une valeur isolée.

figure 1 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique obtenues avec le réactif ABBOTT Real Time HCV amplification reagent kit : échantillon E1-08

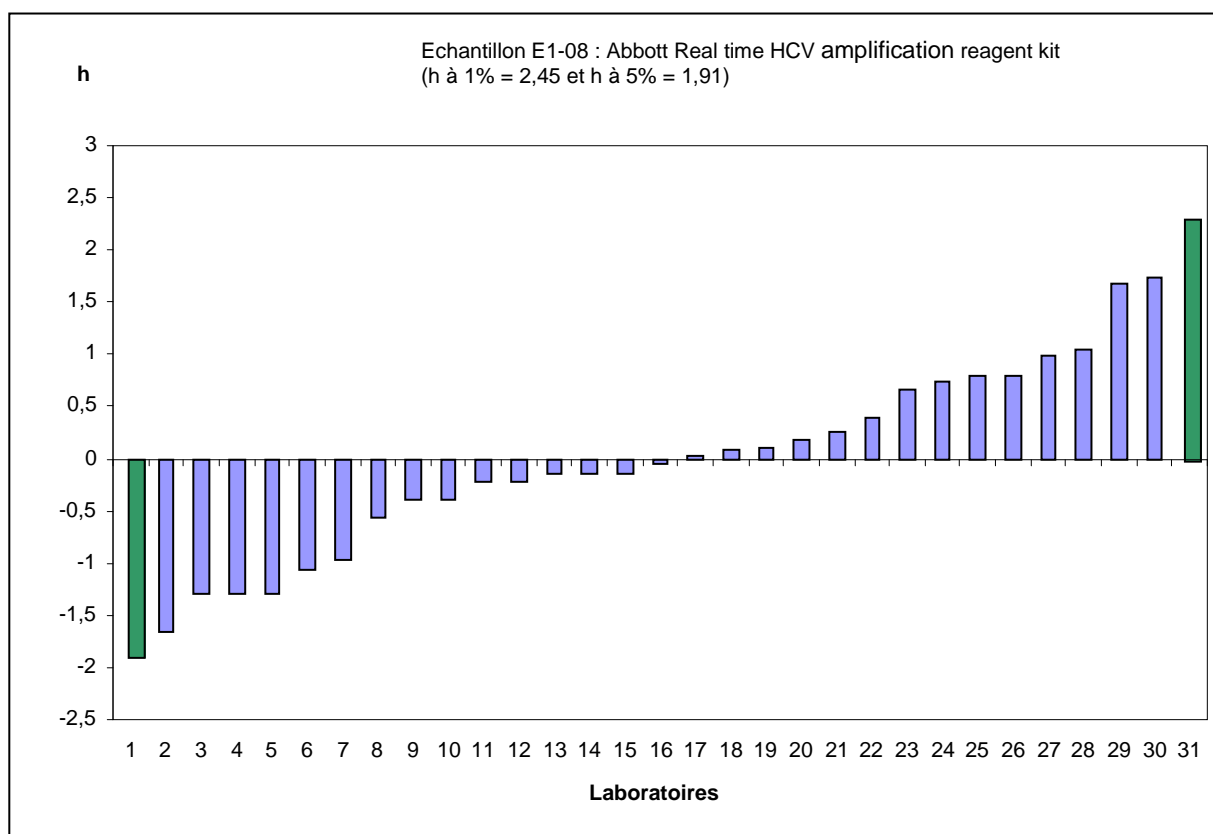


figure 2 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique obtenues avec le réactif ROCHE Cobas Taq Man HCV test : échantillon E1-08

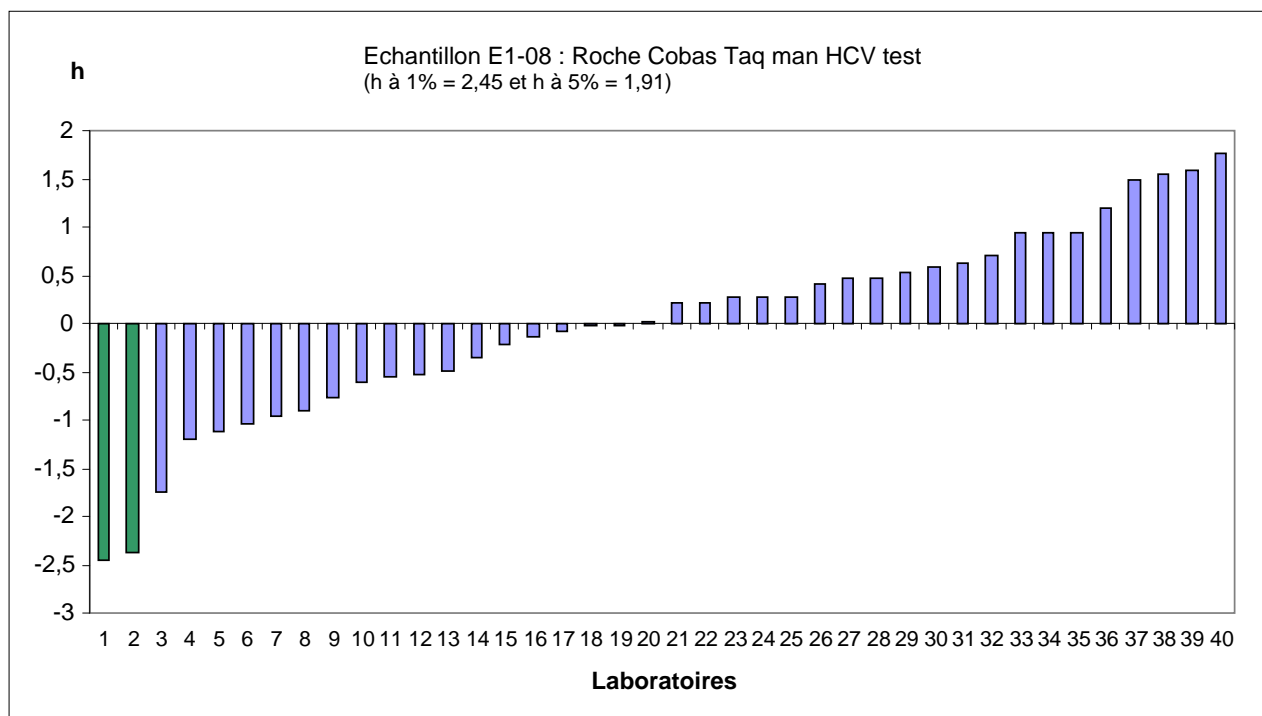


figure 3 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique obtenues avec le réactif ABBOTT Real Time HCV amplification reagent kit : échantillon E2-08

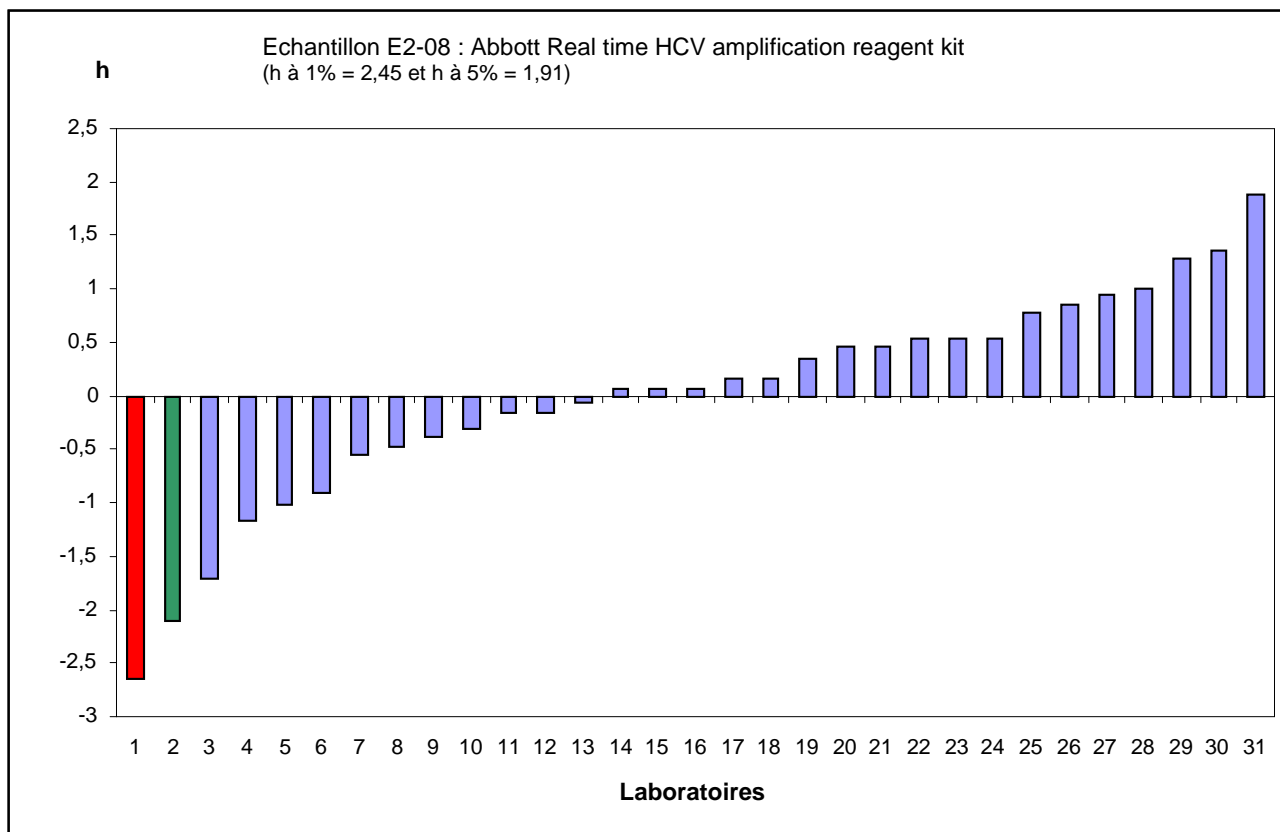


figure 4 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique obtenues avec le réactif ROCHE Cobas Taq Man HCV test : échantillon E2-08

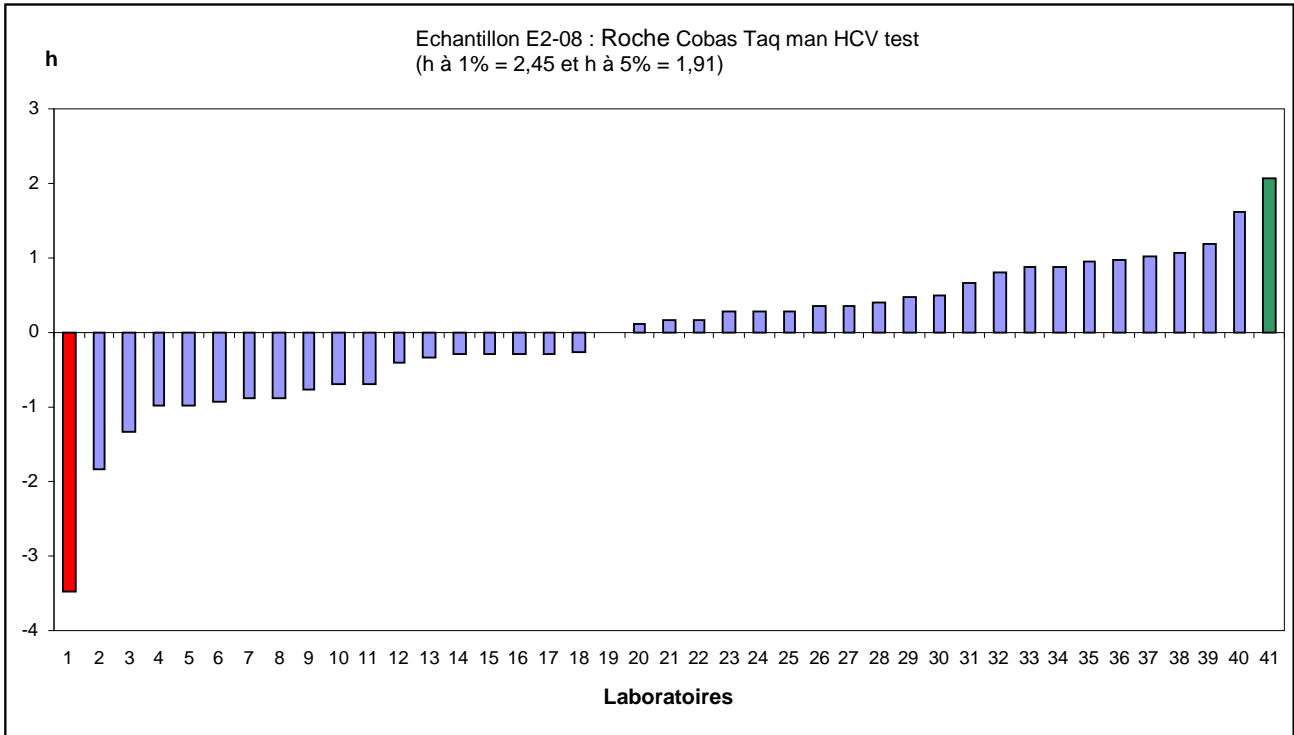


figure 5 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique obtenues avec le réactif ROCHE Cobas Amplicor HCV Monitor test v2.0 : échantillon E2-08

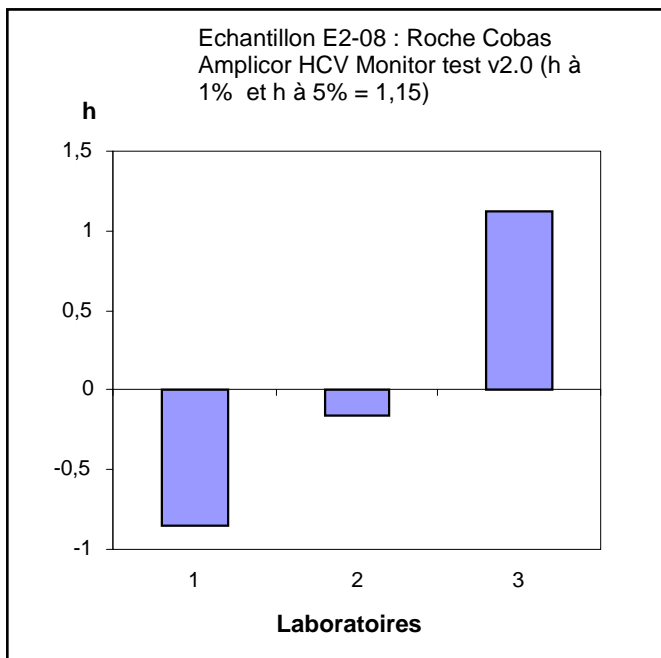


figure 6 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique obtenues avec le réactif SIEMENS Versant Quantiplex HCV RNA 3.0 : échantillon E2-08

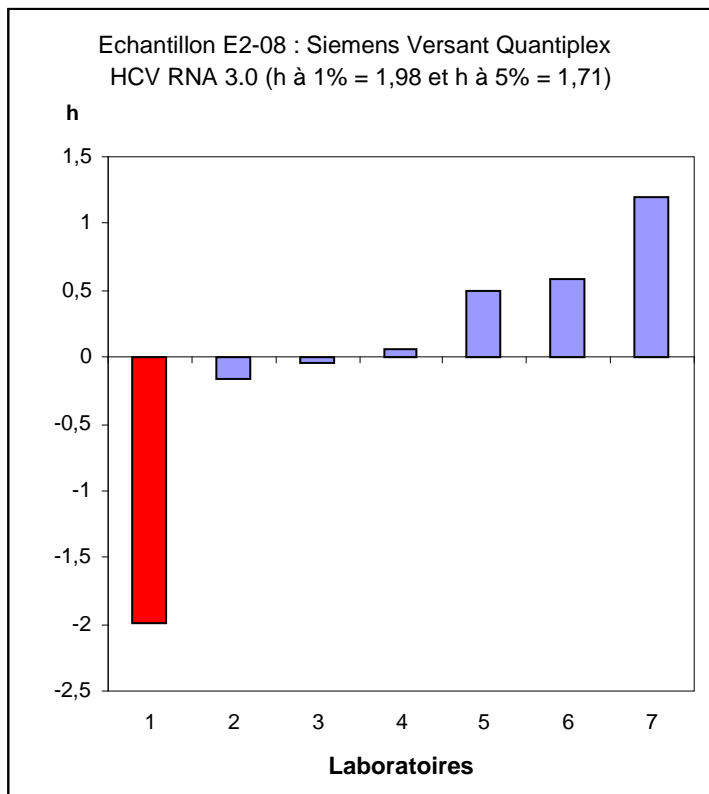


figure 7 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique obtenues avec le réactif ABBOTT Real Time HCV amplification reagent kit : échantillon E4-08

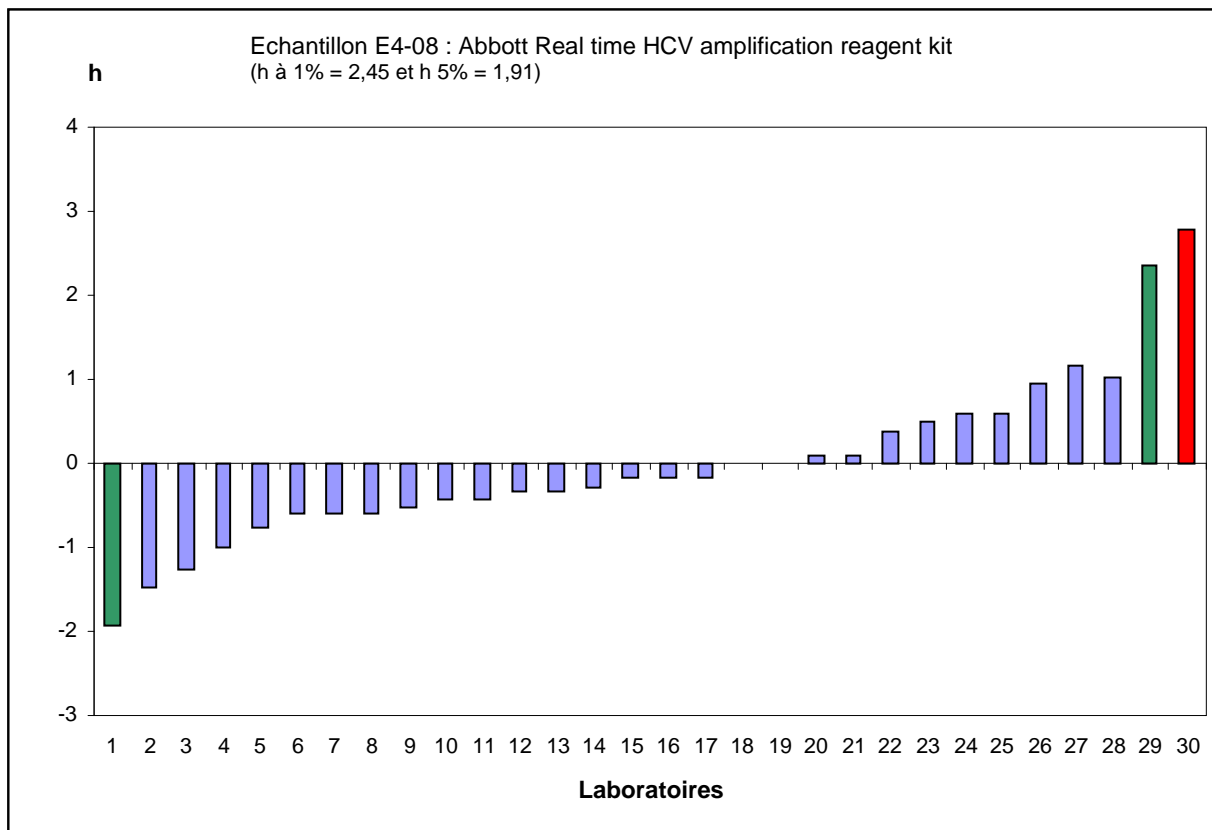


figure 8 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique obtenues avec le réactif ROCHE Cobas Taq Man HCV test : échantillon E4-08

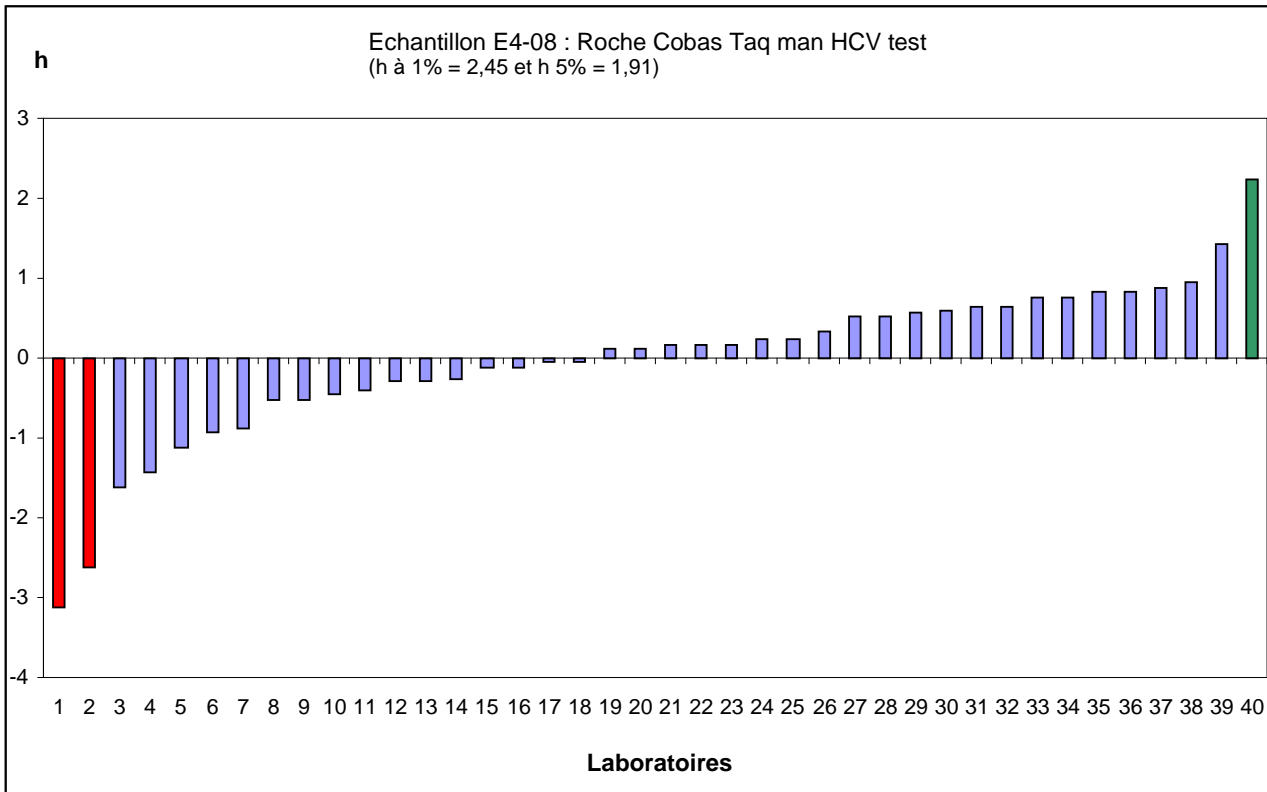
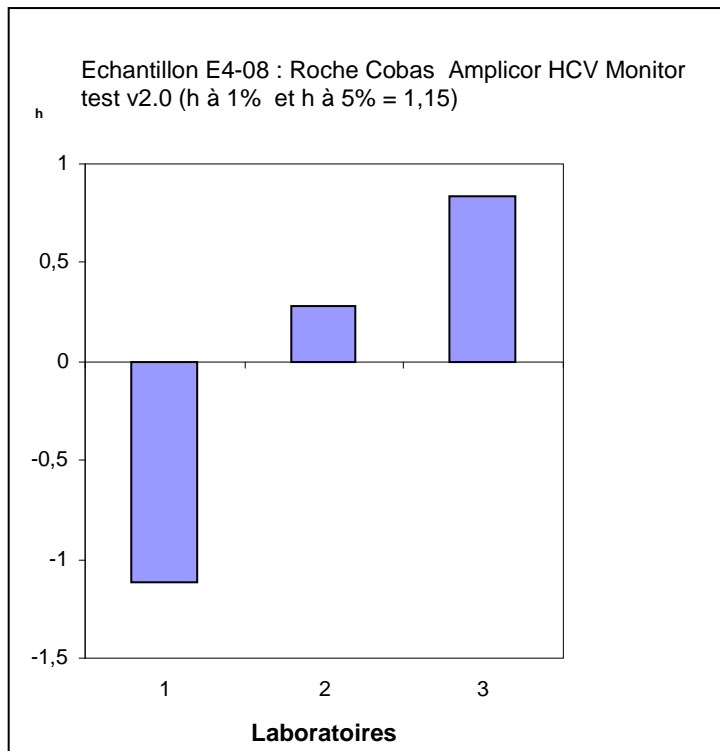


figure 9 - statistiques de cohérence inter-laboratoires h par laboratoire, des mesures d'ARN-VHC plasmatique obtenues avec le réactif ROCHE Cobas Amplicor HCV monitor test v2.0 : échantillon E4-08



4-2- Commentaires

Un laboratoire n'a pas rendu de résultats avec le réactif ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit pour les échantillons E1-08, E3-08 et E4-08 et un autre pour l'échantillon E2-08. De même, un laboratoire n'a pas rendu de résultat avec le réactif ROCHE Cobas Taq Man HCV test pour l'échantillon E2-08.

Aucun des laboratoires utilisant les réactifs ROCHE Cobas Amplicor HCV monitor test v2.0, ROCHE Amplicor HCV Monitor test v2.0 et SIEMENS Versant Quantiplex HCV RNA 3.0 n'a pu quantifier la charge virale de l'échantillon E1-08 car elle se trouvait à un niveau inférieur au seuil de détection de ces réactifs. Le même phénomène a été observé avec le réactif SIEMENS Versant Quantiplex HCV RNA 3.0 et l'échantillon E4-08. On rappelle ici que les seuils de quantification de ces trousseaux sont 600 UI/ml pour les réactifs de la société Roche et 615 UI/ml pour la société Bayer.

Avec le réactif ABBOTT Real Time HCV amplification reagent kit : on relève 2 valeurs isolées pour l'échantillon E1-08, une valeur aberrante et une valeur isolée pour l'échantillon E2-08 et une valeur aberrante et 2 valeurs isolées pour l'échantillon E4-08.

Avec le réactif ROCHE Cobas Taq Man HCV test : on note 2 valeurs isolées pour l'échantillon E1-08, une valeur aberrante et une valeur isolée pour l'échantillon E2-08, 2 valeurs aberrantes et une valeur isolée pour l'échantillon E4-08.

Avec le réactif ROCHE Cobas Amplicor HCV monitor test v2.0 : on ne compte pas de valeurs aberrantes ou isolées pour les 2 échantillons E2-08 et E4-08.

Avec le réactif SIEMENS Versant Quantiplex HCV RNA 3.0 : on compte une valeur aberrante avec l'échantillon E2-08.

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

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

5-1 - Echantillons positifs en ARN-VHC

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

tableau VII - résultats de la quantification de l'ARN-VHC sur l'échantillon E1-08

Réactifs	n	nq	p	ntr	m (log UI/ml)	S _R	CV%
ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit	31	31	31	31	1,650	0,123	7,4
ROCHE Cobas Taq Man HCV test	42	41	41	40	1,994	0,195	9,8
ROCHE Cobas Amplicor HCV monitor test v2.0	3	0	-	-	-	-	-
ROCHE Amplicor HCV Monitor test v2.0	1	0	-	-	-	-	-
SIEMENS Versant Quantiplex HCV RNA 3.0	7	0	-	-	-	-	-

Le niveau d'ARN-VHC de l'échantillon E1-08 se situant en dessous des seuils de quantification des réactifs ROCHE Cobas Amplicor HCV monitor test v2.0, ROCHE Amplicor HCV Monitor test v2.0 et SIEMENS Versant Quantiplex HCV RNA 3.0, aucun laboratoire utilisateur n'a pu rendre de résultats quantifiés.

tableau VIII - résultats de la quantification de l'ARN-VHC sur l'échantillon E2-08

Réactifs	n	nq	p	ntr	m (log UI/ml)	S _R	CV%
ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit	31	31	31	30	5,001	0,115	2,3
ROCHE Cobas Taq Man HCV test	41	41	41	40	5,244	0,145	2,8
ROCHE Cobas Amplicor HCV monitor test v2.0	3	3	3	3	5,296	0,096	1,8
ROCHE Amplicor HCV Monitor test v2.0	1	1	-	-	-	-	-
SIEMENS Versant Quantiplex HCV RNA 3.0	7	7	7	6	4,612	0,074	1,6

tableau IX - résultats de la quantification de l'ARN-VHC sur l'échantillon E4-08

Réactifs	n	nq	p	ntr	m (log UI/ml)	S _R	CV%
ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit	31	31	30	29	2,566	0,101	3,9
ROCHE Cobas Taq Man HCV test	41	41	40	38	2,881	0,131	4,5
ROCHE Cobas Amplicor HCV monitor test v2.0	3	3	3	3	2,940	0,072	2,4
ROCHE Amplicor HCV Monitor test v2.0	1	1	-	-	-	-	-
SIEMENS Versant Quantiplex HCV RNA 3.0	7	2	-	-	-	-	-

- : nombre de valeurs insuffisant pour effectuer les calculs statistiques

n : nombre total de valeurs

nq : nombre de valeurs quantifiables (> seuil de quantification spécifié dans la notice du réactif) hors irrégularités évidentes et valeurs aberrantes

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

ntr : nombre de valeurs quantifiables hors irrégularités évidentes et valeurs aberrantes

m : moyenne

S_R : écart-type de reproductibilité

CV : coefficient de variation tronqué calculé pour chaque échantillon à partir de nq

Commentaires

L'analyse sera plus particulièrement focalisée sur les réactifs utilisant la PCR en temps réel qui sont les plus représentés dans cette opération puisque 87% des laboratoires effectuant la quantification de l'ARN-VHC les ont utilisés.

Les tableaux VII et VIII et IX montrent une différence significative (test t de Student, $p < 0,05$) entre les moyennes obtenues avec les deux réactifs basés sur la PCR en temps réel allant de 0,25 pour le niveau d'ARN le plus élevé (E2-08) à 0,35 log UI/ml pour le niveau le plus bas (E1-08). Les charges virales moyennes les plus élevées ont dans tous les cas été observées avec le réactif ROCHE Cobas Taq Man HCV test.

Même si ces différences n'ont pas d'impact clinique majeur (il est généralement admis qu'une différence de plus de 0,5 logUI/ml a une valeur clinique), il est toutefois préférable d'utiliser le même réactif pour effectuer les mesures de charge virale dans le cadre du suivi thérapeutique des patients.

On remarque une distribution plus étroite des résultats obtenus avec le réactif ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit (CV de 2,3% au niveau le plus élevé d'ARN à 7,4% au niveau le plus faible) par rapport à celle des résultats obtenus avec le réactif ROCHE Cobas Taq Man HCV test (CV de 2,8% au niveau le plus élevé d'ARN à 9,8% au niveau le plus faible). Par ailleurs, pour les deux réactifs, les CV% sont plus importants pour le niveau de charge virale le plus faible.

Il est, de plus, à noter que les CV intra-réactif sont faibles, les résultats sont donc reproductibles pour un réactif donné.

Les moyennes et les dispersions des résultats obtenus avec les échantillons E1-08, E2-08 et E4-08 pour chaque réactif sont présentées sur les figures 10,11 et 12.

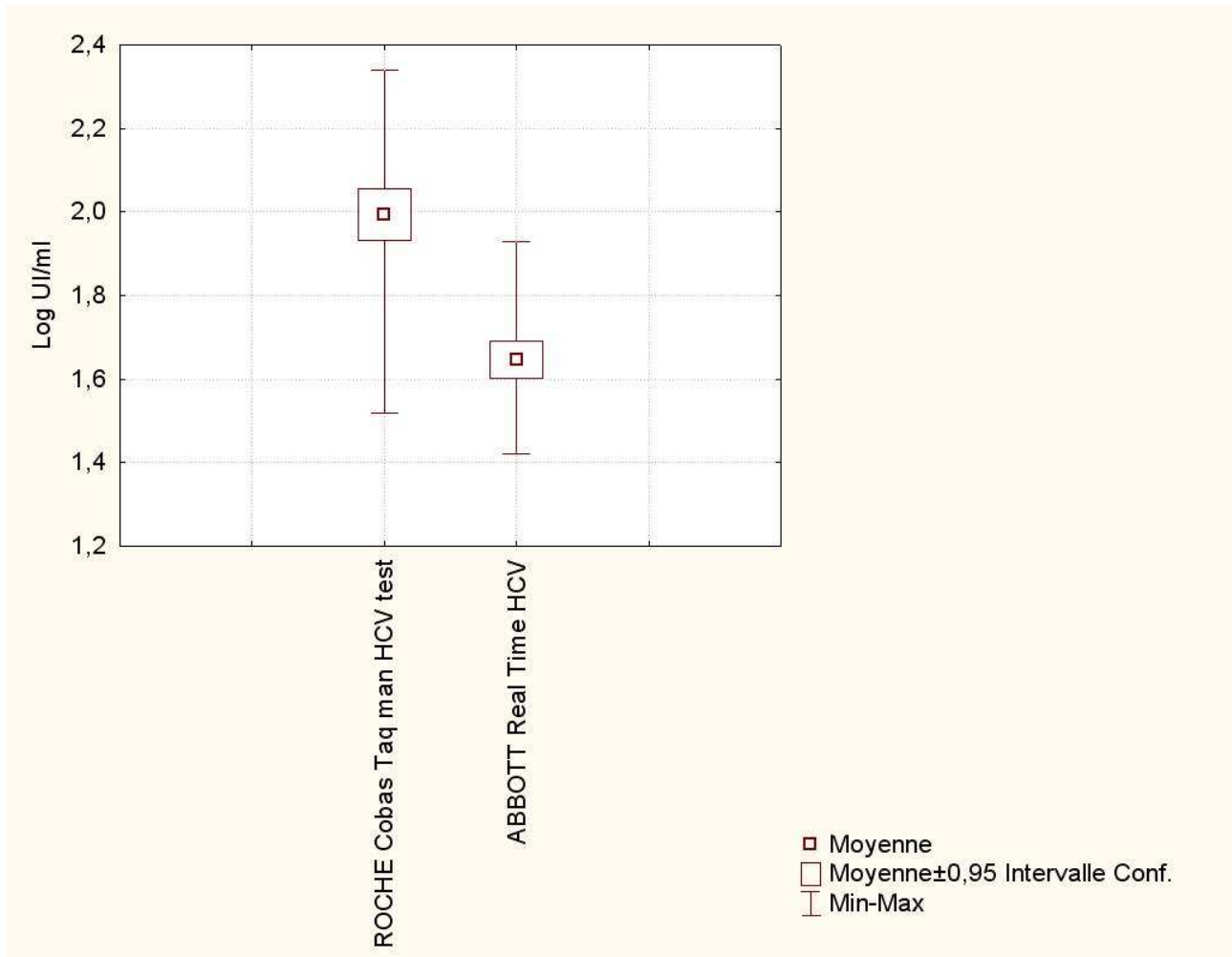
figure 10 – moyenne et dispersion des résultats en fonction du réactif pour l'échantillon E1-08

figure 11 – moyenne et dispersion des résultats en fonction du réactif pour l'échantillon E2-08

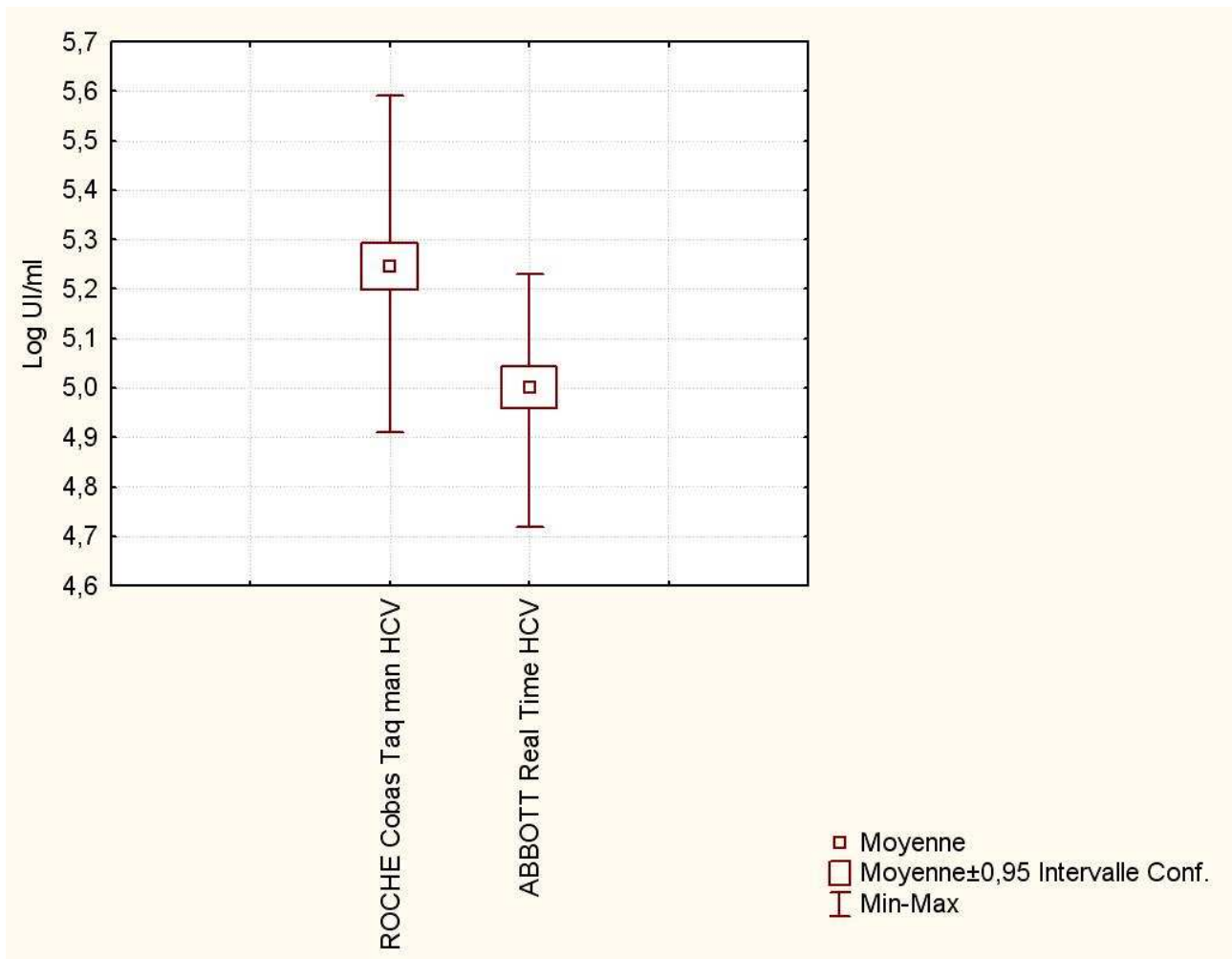
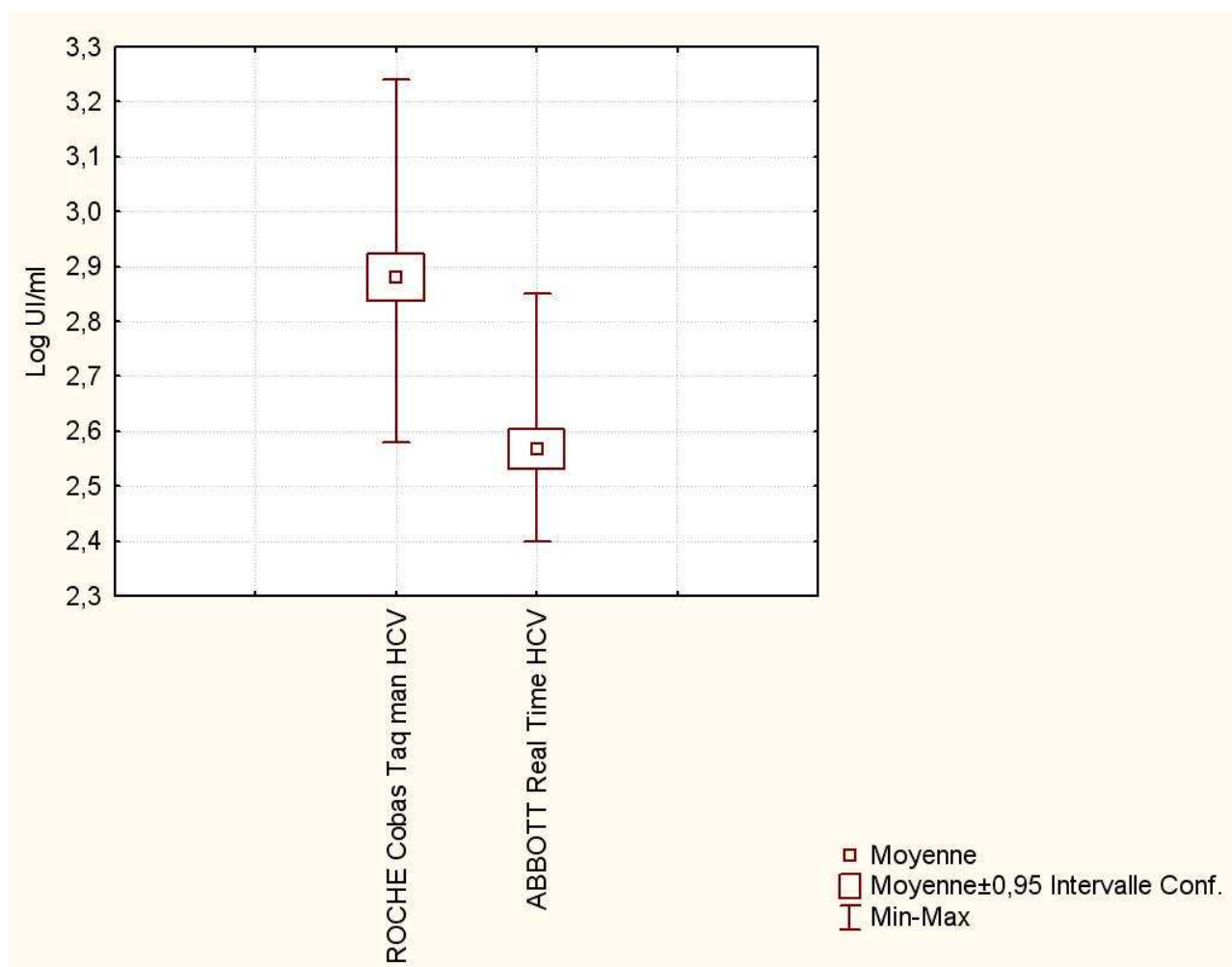


figure 12 – moyenne et dispersion des résultats en fonction du réactif pour l'échantillon E4-08



Les moyennes des résultats obtenus avec les deux réactifs de PCR en temps réel sont significativement différentes quels que soient les niveaux de charge virale même si les écarts entre elles sont faibles (de l'ordre de 0,3 log UI/ml).

5-2 - Echantillon négatif en ARN-VHC

Les résultats concernant l'échantillon négatif en ARN-VHC sont présentés dans le tableau X.

tableau X - résultats de la quantification de l'ARN-VHC sur l'échantillon E3-08

Réactifs	n	nq
ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit	30	1*
ROCHE Cobas Taq Man HCV test	40	0
ROCHE Cobas Amplicor HCV monitor test v2.0	2	0
ROCHE Amplicor HCV Monitor test v2.0	1	0
SIEMENS Versant Quantiplex HCV RNA 3.0	7	0

n : nombre total de résultats

nq : nombre de valeurs quantifiées

* : Un seul échantillon a été rendu positif avec le réactif ABBOTT Real time HCV amplification reagent kit mais à un taux inférieur au seuil de quantification spécifié dans la notice du réactif.

Génotypage VHC

Définition des échantillons

Les échantillons ont été testés à l'Unité d'expertise en Virologie (Dr S. Laperche, INTS Paris) et les résultats des échantillons E1-08, E2-08 et E4-08 sont présentés dans le tableau XI.

tableau XI - résultats des tests

Réactif	E1-08	E2-08	E4-08
INGEN/SIEMENS Innolipa/Versant HCV (Lipa) genotype 2.0 assay	Génotype 1a	Génotype 3a	Génotype 2b

Les réponses étaient considérées acceptables lorsque le génotype était exact indépendamment du sous-type fourni.

Résultats des participants

1- Réactifs de génotypage utilisés

Il était demandé aux laboratoires de préciser le nom de leurs réactifs d'extraction et de génotypage sur le bordereau-réponse. Les techniques utilisées ont été classées en deux catégories : d'une part, celles basées sur le séquençage et l'analyse moléculaire d'une partie du génome viral, d'autre part celles basées sur une technique de reverse dot blot (génotypage sur bandelette coâtée avec des oligonucléotides spécifiques Innolipa) (tableau XII).

tableau XII – couples réactifs de génotypage / réactifs d'extraction utilisés

Réactifs de génotypage	Réactifs d'extraction	Nbre d'utilisateurs
Réactifs utilisant le séquençage (32 laboratoires)	ABBOTT sample preparation system	5
	BIOMERIEUX Nuclisens	1
	QIAGEN Qiamp viral RNA	16
	ROCHE Cobas Ampliprep	3
	ROCHE High Pure System viral nucleic acid kit	1
	ROCHE Magnapure	3
INGEN/SIEMENS Innolipa/Versant HCV (Lipa) genotype 2.0 assay (29 laboratoires)	ROCHE Amplicor HCV specimen preparation kit v2.0	1
	ABBOTT sample preparation system	3
	QIAGEN Qiamp viral RNA	8
	ROCHE Cobas Ampliprep	1
	ROCHE High Pure System viral nucleic acid kit	2
	ROCHE Magnapure	2
	ROCHE Amplicor HCV specimen preparation kit v2.0	12
Réactif non reporté		
	Total	61

Le réactif INGEN/SIEMENS Innolipa/Versant HCV (Lipa) genotype 2.0 assay permet de déterminer le génotype par l'hybridation du produit PCR sur une combinaison de sondes issues des régions 5'NC et Core du génome viral.

Les laboratoires ayant pratiqué un séquençage ont fourni des résultats par l'analyse de la région 5'NC ou de la région NS5b du génome viral (tableau XIII).

tableau XIII – région du génome étudiée / réactifs de séquençage utilisés

Région étudiée	Réactifs de séquençage	Nombre d'utilisateurs
5'NC (13 laboratoires)	SiemensTrugène HCV 5'NC genotyping kit	10
	Autres ou non précisée	3
NS5b (8 laboratoires)	ANRS	5
	Autres ou non précisée	3
Région non précisée		11
	Total	32

2- Résultats

Les réponses rendues par les laboratoires sont présentées dans le tableau XIV.

tableau XIV - résultats du génotypage en fonction du réactif utilisé

Réactifs	Echantillon E1-08			Echantillon E2-08			Echantillon E4-08		
	n	nexploit	nBR	n	nexploit	nBR	n	nexploit	nBR
Réactifs utilisant le séquençage	27	7	7	32	32	32	29	16	16
Région 5'NC	10	4	4	13	13	13	12	10	10
Région NS5b	9	1	1	9	9	9	9	2	2
Région non précisée	8	2	2	10	10	10	8	4	4
INGEN/SIEMENS Innolipa/Versant HCV (Lipa) genotype 2.0 assay	24	13	13	29	29	29	28	26	26
<i>Tous réactifs confondus</i>	<i>51</i>	<i>20</i>	<i>20</i>	<i>61</i>	<i>61</i>	<i>61</i>	<i>57</i>	<i>42</i>	<i>42</i>

n : nombre total de réponses

nexploit : nombre de réponses exploitables (les réponses « non génotypable » sont exclues)

nBR : nombre de réponses acceptables

Contrairement à l'échantillon E2-08 pour lequel 100% des laboratoires ont fourni un résultat, un grand nombre de laboratoires n'a pas pu génotyper l'échantillon E1-08 (31/51 : 61%) et à un moindre degré l'échantillon E4-08 (15/57 : 26%) en raison d'un défaut d'amplification du matériel lié aux faibles charges virales de ces échantillons. A noter que le pourcentage d'échec de génotypage est plus élevé parmi les laboratoires ayant utilisé la technique de séquençage et plus particulièrement quand la PCR a porté sur la région NS5b. Ce phénomène a déjà été observé lors de précédentes études (Journal of Clinical Microbiol :2005.43 :733). En revanche, toutes les réponses données par les laboratoires ayant fourni un résultat sont acceptables.

Conclusion

Cette opération 08VHC1 montre la place prépondérante occupée par les réactifs basés sur la PCR en temps réel, correspondant aux besoins d'accroissement de la sensibilité de détection vis-à-vis des charges virales faibles et d'automatisation.

Les résultats sont très satisfaisants pour l'ensemble des laboratoires en ce qui concerne la détection de l'ARN-VHC, comme cela était le cas dans les précédentes opérations de contrôle.

Pour la quantification, les résultats sont très bons avec les réactifs utilisant la technique de PCR en temps réel. En revanche, les autres réactifs, basés sur la technique de PCR classique ou le DNA branché, ont été pris en défaut avec les échantillons présentant des taux d'ARN-VHC faibles (E1-08 et E4-08). Le niveau de charge virale de l'échantillon E1-08 était en dessous des seuils de détection de ces réactifs.

Le génotypage VHC a été introduit pour la première fois dans le programme du Contrôle national de qualité d'ARN-VHC lors de cette 7^{ème} opération.

Les résultats des laboratoires sont excellents pour l'échantillon contenant un taux élevé d'ARN-VHC (E2-08), avec 100% de réponses acceptables. Par contre, un nombre élevé de laboratoires n'a pas été en mesure de génotyper les deux échantillons contenant des taux faibles d'ARN-VHC (E1-08 et E4-08). Les réponses des laboratoires ayant pu génotyper ces deux échantillons sont, par ailleurs, exactes.