

# Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Charge virale du VHB : ADN-VHB

Francis POISSON (Afssaps)  
Muriel Duran CORDOBES (Afssaps)  
Syria LAPERCHE (INTS, Paris)

---

Expédition : 4 avril 2011  
Clôture : 2 mai 2011  
Edition des comptes-rendus individuels : 23 juin 2011  
Paramètres contrôlés/Echantillons

**ADN du virus de l'hépatite B (VHB)  
11-CB1 ; 11-CB2 ; 11-CB3 et 11-CB4**

Nombre de laboratoires concernés\* : 64  
Nombre de laboratoires participants\*\* : 61

\* 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 cette première opération de contrôle 11CHB1 étaient :

- l'évaluation des performances des laboratoires pour la détection de **l'ADN du Virus de l'Hépatite B (ADN-VHB)** en termes de variabilité inter-laboratoires,
- la comparaison de ces performances selon les protocoles utilisés,

Pour cela, les 64 laboratoires concernés par la quantification de l'ADN-VHB ont reçu un panel de 4 échantillons. Les caractéristiques de ces 4 échantillons sont : un échantillon négatif (11-CB3), un échantillon positif de génotype D (11-CB1), un échantillon positif de génotype A (11-CB2) et un échantillon positif de génotype E (11-CB4).

Les résultats de cette opération de contrôle sont satisfaisants. On note peu de valeurs aberrantes, ce qui a permis une comparaison des résultats entre laboratoires et entre réactifs utilisés. Aucun faux positif n'a été relevé.

Aucune différence entre les concentrations moyennes obtenues avec les 3 réactifs n'a été observée pour les échantillons de charges virales faibles (11-CB2) et moyenne (11-CB1). En revanche, les concentrations obtenues pour l'échantillon ayant la charge virale la plus élevée (11-CB4) étaient significativement plus basses avec le réactif ABBOTT RealTime HBV que celles obtenues avec les 2 autres réactifs : ROCHE Cobas TaqMan HBV Test ( $p=5 \times 10^{-4}$ ) et ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0 ( $p=1 \times 10^{-23}$ ). Les différences observées étaient toutefois inférieures à 0,5 log UI/mL sauf pour un laboratoire.

# Analyse quantitative et qualitative de l'ADN-VHB

## ADN-VHB : échantillons 11-CB1, 11-CB2, 11-CB3 et 11-CB4.

### Définition des échantillons

Chaque échantillon a été préparé à partir du plasma d'un sujet, soit porteur du VHB (pour les positifs) soit négatif pour les marqueurs du VHB, VIH et VHC. Ils ont été expédiés sous forme liquide et congelés.

Les échantillons de contrôle ont préalablement été testés par l'expert (tableau I)

tableau I - résultats : échantillons 11-CB1, 11-CB2, 11-CB3 et 11-CB4

Paramètre ADN VHB	High Pure System / ROCHE COBAS TaqMan HBV Test		ABBOTT RealTime HBV	
	UI/mL	Log UI/mL	UI/mL	Log UI/mL
11-CB1 (génotype D)	2 996	3,48	420	2,62
11-CB2 (génotype A)	113	2,05	42	1,62
11-CB3 (négatif)	ND	-	ND	-
11-CB4 (génotype E)	123 355	5,09	13 205	4,12

### Méthode statistique et expression des résultats

L'analyse des résultats quantitatifs de cette opération du Contrôle National de Qualité a été réalisée conformément à la norme ISO 5725-2, comme pour les opérations concernant l'ARN-VIH et l'ARN-VHC. L'analyse des résultats quantitatifs se décompose selon plusieurs étapes.

→ Elimination des irrégularités évidentes : par la méthode de Tukey. Il s'agit d'une méthode non paramétrique, peu sensible aux valeurs aberrantes, 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 (ce qui équivaudrait pour une distribution gaussienne à exclure les valeurs à +/- 4,7x l'écart-type).

→ 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. 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 4 utilisateurs.

### Résultats des participants

#### 1. Réactifs utilisés

Sur les 61 laboratoires ayant fourni des résultats, 2 ont rendu des résultats qualitatifs (CHIRON Procleix assay +/- Tigris) qui n'ont pas été pris en compte dans l'étude statistique.

Les réactifs utilisés sont présentés dans le tableau II.

**tableau II** – réactifs utilisés lors de l’opération 11CHB1

Réactifs de quantification ou de détection	Réactifs d'extraction	Nbre d'utilisateurs
ABBOTT RealTime HBV	ABBOTT Sample Preparation System DNA	21
CHIRON Procleix assay +/- Tigris	CHIRON Procleix assay	2
QIAGEN ARTUS HBV TM PCR kit ABI PRISM	QIAGEN Qiaamp DNA Blood mini kit	1
QIAGEN ARTUS HBV LC PCR kitLightCycler	ROCHE Magna Pure	1
ROCHE COBAS TaqMan HBV Test	ROCHE High Pure System viral nucleic acid kit	6
ROCHE COBAS TaqMan HBV Test	réactif non précisé	1
ROCHE COBAS TaqMan HBV Test V2.0	ROCHE Cobas Ampliprep	29
	Total	61

## 2. Irrégularités évidentes

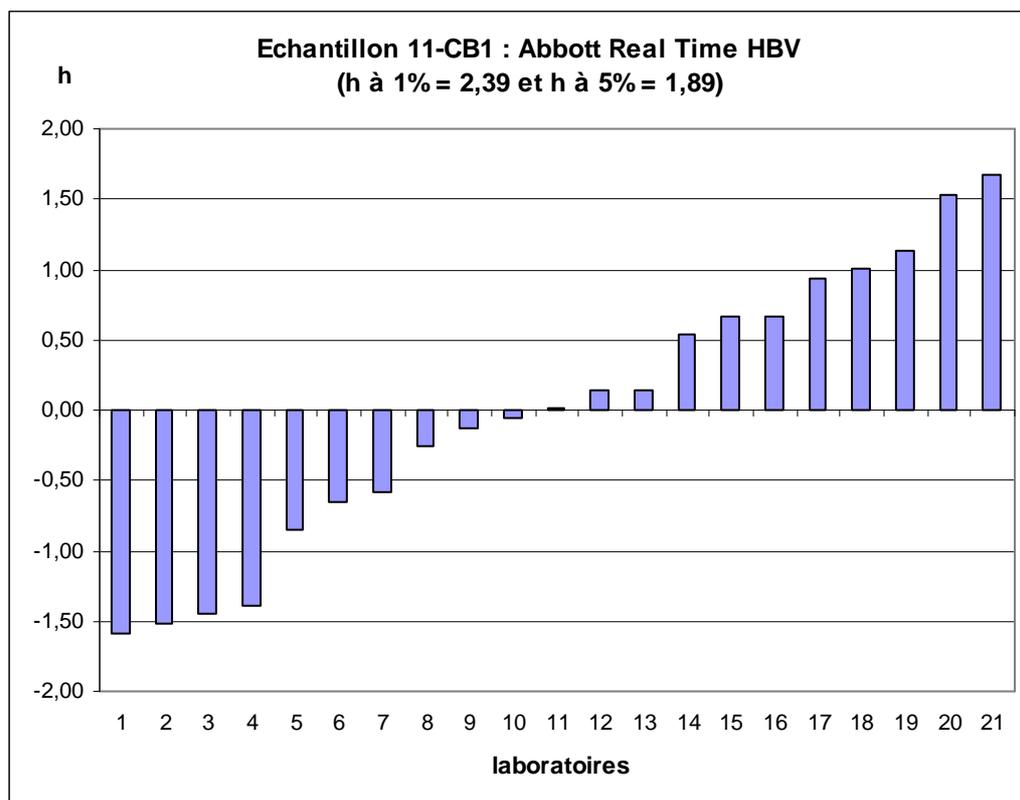
L’analyse statistique a écarté deux irrégularités évidentes avec le réactif High Pure System/ROCHE Cobas TaqMan HBV Test, l’une sur 11-CB1, l’autre sur 11-CB2. Ces mesures ont été rendues par le même laboratoire.

## 3. Statistiques de cohérence par réactif

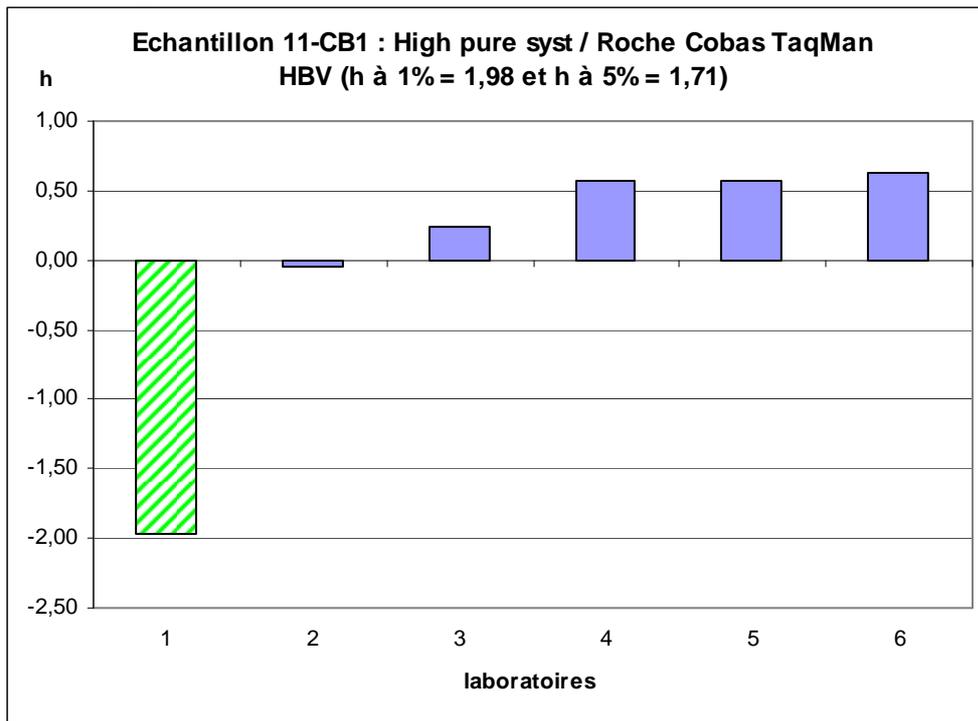
### 3.1. Tracés des statistiques de cohérence par réactif

Les tracés des statistiques de cohérence inter-laboratoire h sont présentés sur les figures 1 à 9 pour chaque réactif à chaque niveau d’ADN-VHB. 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 pointillé rouge correspondent aux laboratoires ayant trouvé une valeur aberrante et les laboratoires figurant en hachuré vert correspondent aux laboratoires ayant trouvé une valeur isolée.

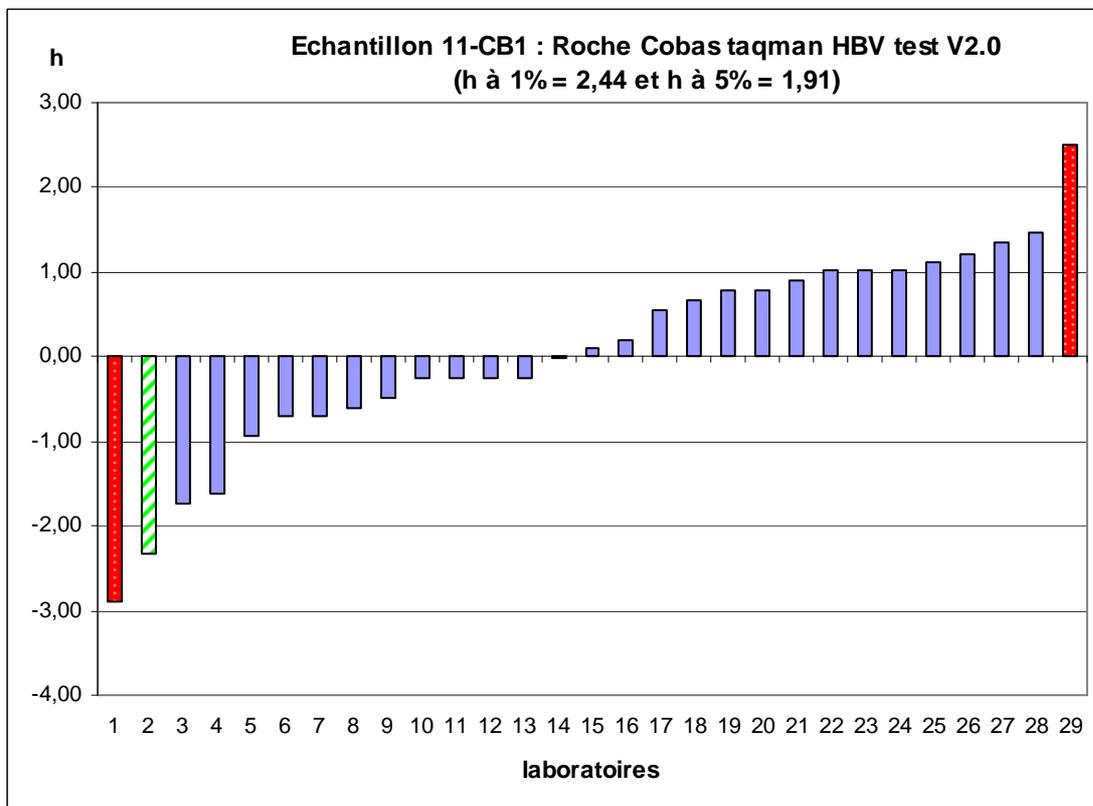
**figure 1** – statistiques de cohérence inter-laboratoires h pour chaque laboratoire (1 à 21), des mesures d’ADN-VHB obtenues avec le réactif ABBOTT Real Time HBV : échantillon 11-CB1



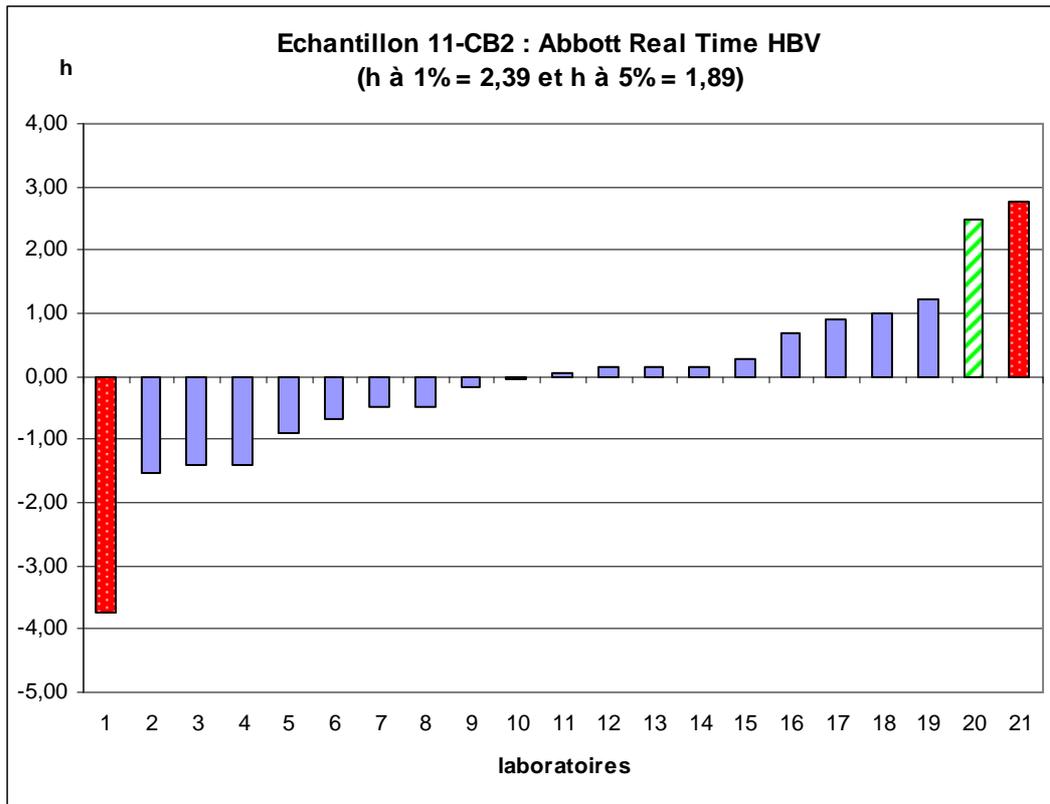
**figure 2** – statistiques de cohérence inter-laboratoires h pour chaque laboratoire (1 à 6), des mesures d'ADN-VHB obtenues avec le réactif High Pure System/ROCHE COBAS TaqMan HBV Test : échantillon 11-CB1



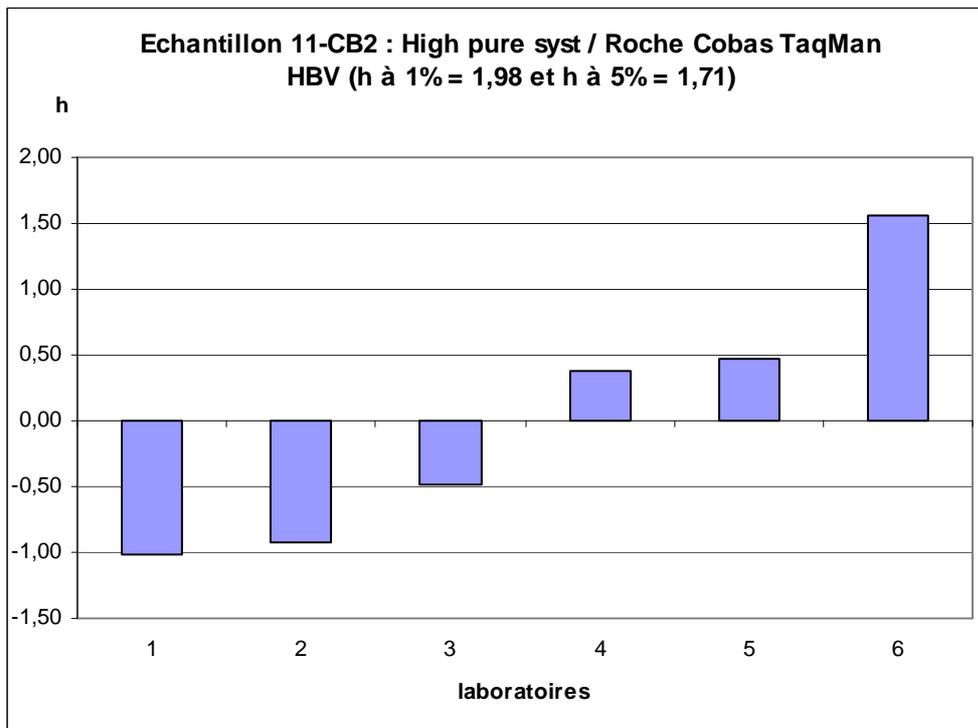
**figure 3** – statistiques de cohérence inter-laboratoires h pour chaque laboratoire (1 à 29), des mesures d'ADN-VHB obtenues avec le réactif ROCHE COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HBV Test V2.0 : échantillon 11-CB1



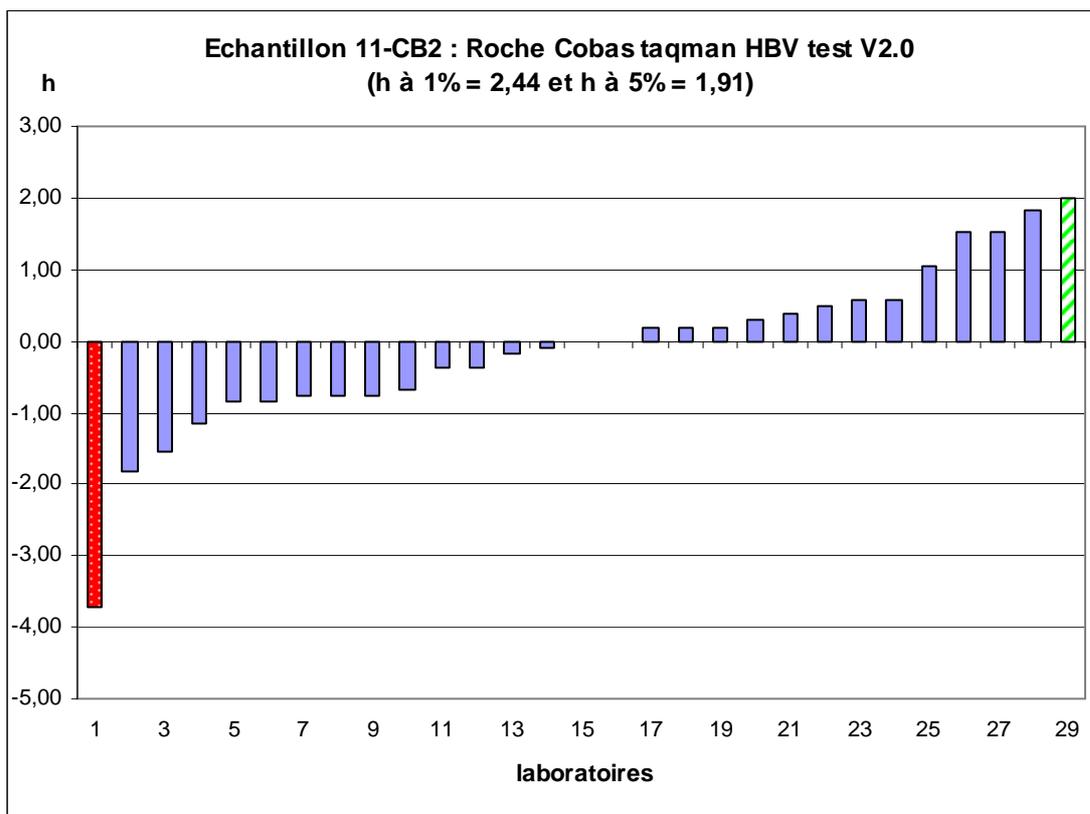
**figure 4** – statistiques de cohérence inter-laboratoires h pour chaque laboratoire (1 à 21), des mesures d'ADN-VHB obtenues avec le réactif ABBOTT Real Time HBV : échantillon 11-CB2



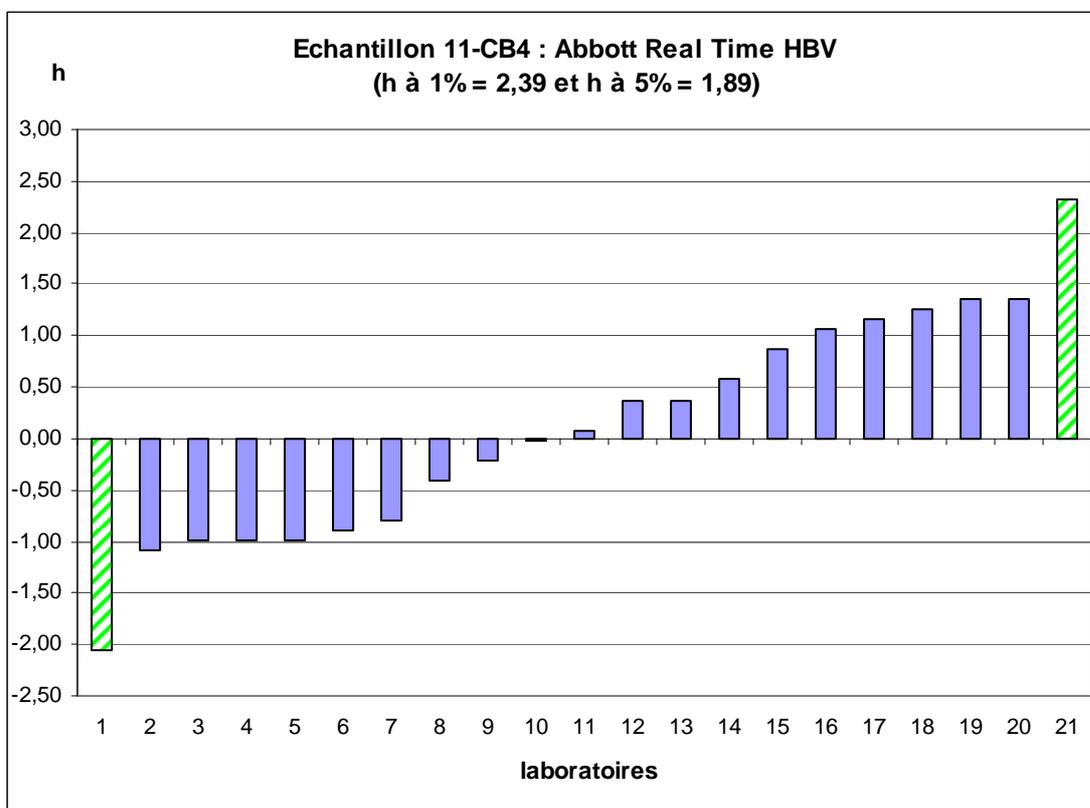
**figure 5** – statistiques de cohérence inter-laboratoires h pour chaque laboratoire (1 à 6), des mesures d'ADN-VHB obtenues avec le réactif High Pure System/ ROCHE COBAS TaqMan HBV Test : échantillon 11-CB2



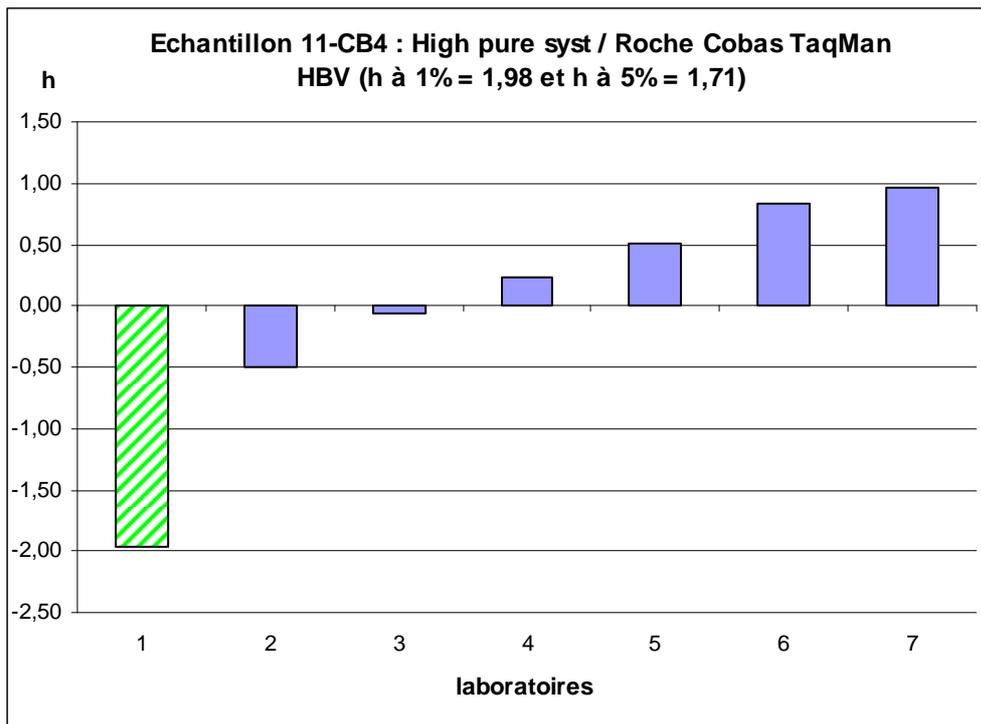
**figure 6** – statistiques de cohérence inter-laboratoires h pour chaque laboratoire (1 à 29), des mesures d'ADN-VHB obtenues avec le réactif ROCHE COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HBV Test V2.0 : échantillon 11-CB2



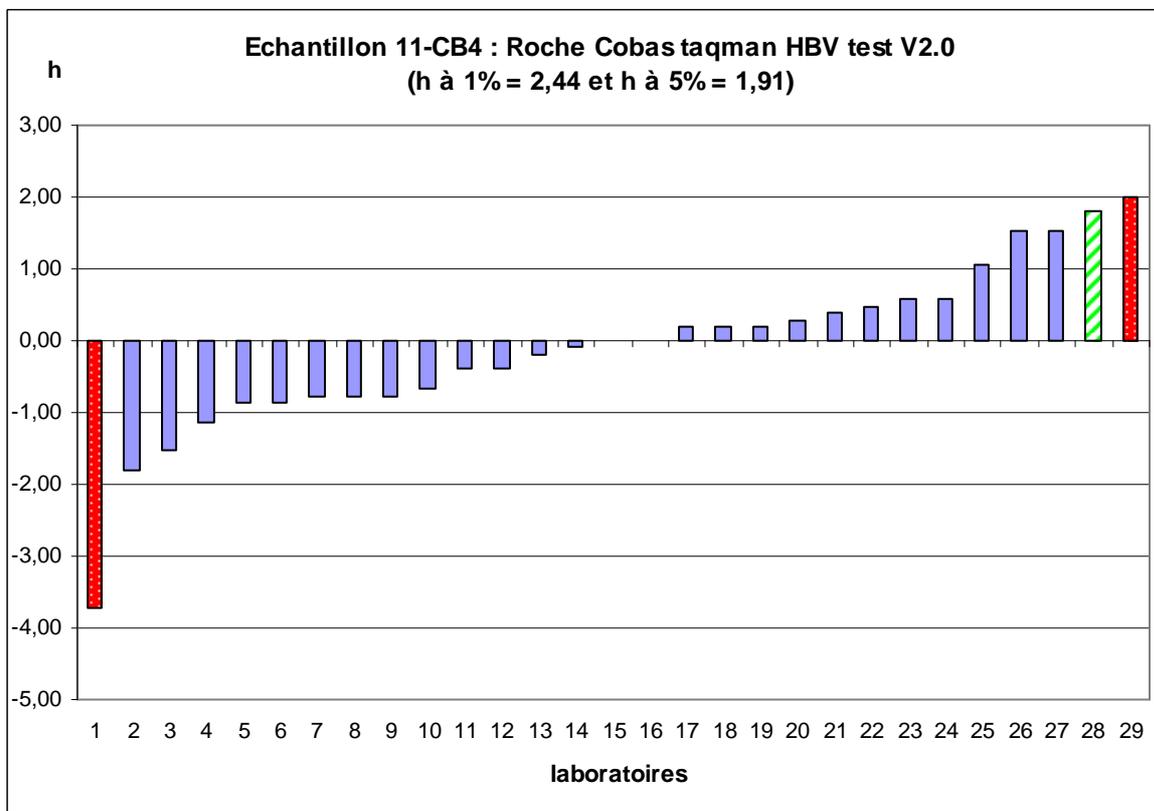
**figure 7** – statistiques de cohérence inter-laboratoires h pour chaque laboratoire (1 à 21), des mesures d'ADN-VHB obtenues avec le réactif ABBOTT Real Time HBV : échantillon 11-CB4



**figure 8** – statistiques de cohérence inter-laboratoires h pour chaque laboratoire (1 à 6), des mesures d'ADN-VHB obtenues avec le réactif High Pure System /ROCHE COBAS TaqMan HBV Test : échantillon 11-CB4



**figure 9** – statistiques de cohérence inter-laboratoires h pour chaque laboratoire (1 à 29), des mesures d'ADN-VHB obtenues avec le réactif ROCHE COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HBV Test V2.0 : échantillon 11-CB4



### 3.2. Commentaires

L'analyse de cohérence effectuée sur les résultats obtenus avec les réactifs ayant été utilisés par au moins 4 laboratoires (soit 3 réactifs concernés), a permis d'identifier un certain nombre de valeurs aberrantes :

- Pour l'échantillon 11-CB1, l'étude de statistique inter-laboratoires n'a pas mis en évidence de valeurs aberrantes sur les résultats des laboratoires utilisant les réactifs ABBOTT RealTime HBV et High Pure System / ROCHE Cobas TaqMan HBV Test. En revanche, 2 laboratoires ayant utilisé le réactif ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0, ont présenté une valeur aberrante due à une charge virale anormalement basse pour l'un et une charge virale anormalement haute pour l'autre.
- Pour l'échantillon 11-CB2, aucune valeur aberrante n'a été notée pour les laboratoires ayant utilisé le réactif High Pure System / ROCHE Cobas TaqMan HBV Test. Trois laboratoires ont présenté une valeur aberrante due à une charge virale anormalement basse avec les réactifs ABBOTT RealTime HBV et ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0. et une charge virale anormalement haute avec le réactif ABBOTT RealTime HBV.
- Pour l'échantillon 11-CB4, les laboratoires utilisant les réactifs ABBOTT RealTime HBV et High Pure System/ ROCHE Cobas TaqMan HBV Test n'ont pas rendu de valeurs aberrantes. Seuls 2 laboratoires ont présenté une valeur aberrante due à une charge virale anormalement basse pour l'un et une charge virale anormalement haute pour l'autre avec le réactif ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0.

Parmi les 5 mesures aberrantes observées sur les résultats obtenus avec le réactif Roche Cobas TaqMan HBV test V2.0, 3 proviennent d'un même laboratoire.

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

- Pour l'échantillon 11-CB1, 2 valeurs isolées ont été observées, une pour 1 laboratoire utilisant High Pure System/ ROCHE Cobas TaqMan HBV Test et l'autre pour 1 laboratoire utilisant le réactif ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0.
- Pour l'échantillon 11-CB2, 2 laboratoires ont rendu 1 valeur isolée, une avec le réactif Abbott RealTime HBV et l'autre avec le réactif ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0.
- Pour l'échantillon 11-CB4, 4 laboratoires ont rendu 1 valeur isolée, 2 avec le réactif ABBOTT RealTime HBV, 1 avec le réactif High Pure System / ROCHE Cobas TaqMan HBV Test et 1 avec le réactif ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0.

Concernant l'échantillon négatif 11-CB3, 9 laboratoires ont rendu un résultat « négatif », 13 ont rendu « 0 » et 39 ont indiqué « inférieur à un seuil » ; ce seuil correspondant dans la majorité des cas au seuil de quantification de la technique.

### 4. Résultats de l'ensemble des laboratoires par réactif

Les tableaux III, IV et V présentent l'ensemble des résultats obtenus avec les réactifs utilisés par les laboratoires participants. L'analyse n'a pas été réalisée pour les réactifs ayant moins de 4 utilisateurs.

**tableau III** - résultats de la quantification de l'ADN-VHB sur l'échantillon 11-CB1 pour l'ensemble des laboratoires (en log UI/mL)

Réactifs	Nb	Nbtr	Moytr	ETtr	Med	CV %
ABBOTT RealTime HBV	21	21	3,20	0,15	3,2	4,71%
QIAGEN ARTUS HBV TM PCR kit ABI PRISM	1	1	2,50	-	-	-
QIAGEN ARTUS HBV LC PCR kitLightCycler	1	1	2,54	-	-	-
ROCHE COBAS TaqMan HBV Test	7	6	3,13	0,21	3,18	6,65%
ROCHE COBAS TaqMan HBV Test V2.0	29	27	3,19	0,09	3,20	2,75%

**tableau IV** - résultats de la quantification de l'ADN-VHB sur l'échantillon 11-CB2 pour l'ensemble des laboratoires (en log UI/mL)

Réactifs	Nb	Nbtr	Moytr	ETtr	Med	CV %
ABBOTT RealTime HBV	21	19	2,08	0,10	2,09	4,57%
QIAGEN ARTUS HBV TM PCR kit ABI PRISM	1	1	2,10	-	-	-
QIAGEN ARTUS HBV LC PCR kitLightCycler	1	1	2,29	-	-	-
ROCHE COBAS TaqMan HBV Test	7	6	2,04	0,12	1,98	5,66%
ROCHE COBAS TaqMan HBV Test V2.0	29	28	2,08	0,10	2,08	4,86%

**tableau V** - résultats de la quantification de l'ADN-VHB sur l'échantillon 11-CB4 pour l'ensemble des laboratoires (en log UI/mL)

Réactifs	Nb	Nbtr	Moytr	ETtr	Med	CV %
ABBOTT RealTime HBV	21	21	4,56	0,10	4,57	2,25%
QIAGEN ARTUS HBV TM PCR kit ABI PRISM	1	1	3,30	-	-	-
QIAGEN ARTUS HBV LC PCR kitLightCycler	1	1	4,98	-	-	-
ROCHE COBAS TaqMan HBV Test	7	7	4,80	0,18	4,84	3,72%
ROCHE COBAS TaqMan HBV Test V2.0	29	27	5,10	0,06	5,10	1,19%

Nb : nombre total de mesures

Nbtr : nombre tronqué de mesures (les irrégularités évidentes et les valeurs aberrantes ne sont pas prises en compte)

Moytr : quantité moyenne d'ADN-VHB exprimée en log UI/mL et calculée sur Nbtr

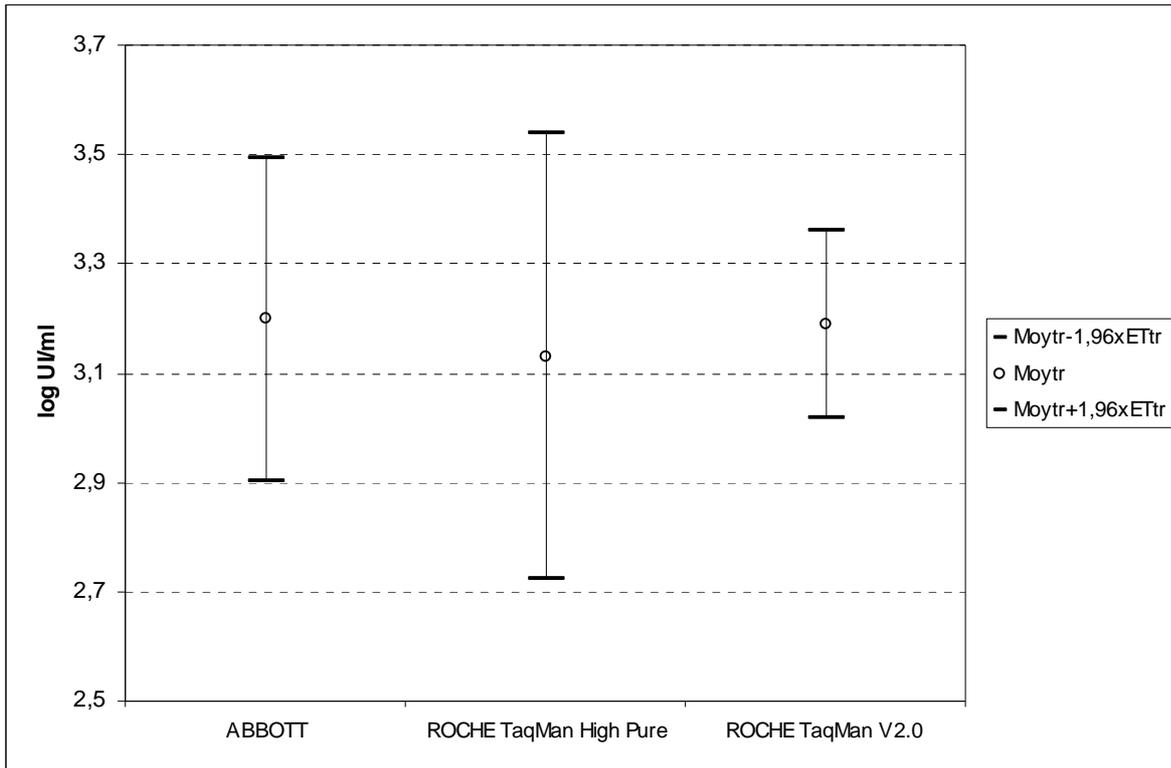
ETtr : écart-type calculé sur Nbtr

CV : coefficient de variation

- : effectif trop faible pour effectuer des statistiques

Les figures 10, 11 et 12 montrent la moyenne et l'intervalle de confiance des résultats en fonction du réactif pour chaque échantillon. Une comparaison de moyenne selon le test t de Student ( $p < 0.05$ ) a été effectuée.

**figure 10** – résultats en fonction du réactif utilisé avec 11-CB1 : moyenne  $\pm 1,96$  x écart-type



**figure 11** – résultats en fonction du réactif utilisé avec 11-CB2 : moyenne  $\pm 1,96$  x écart-type

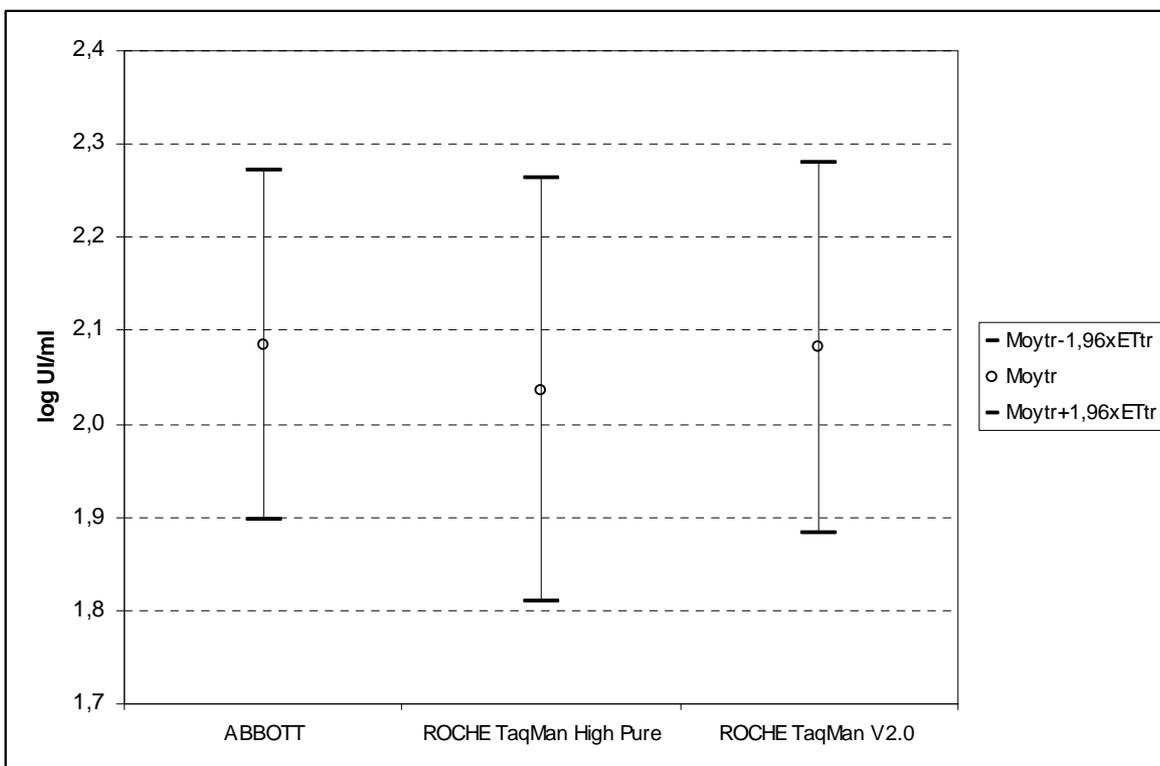
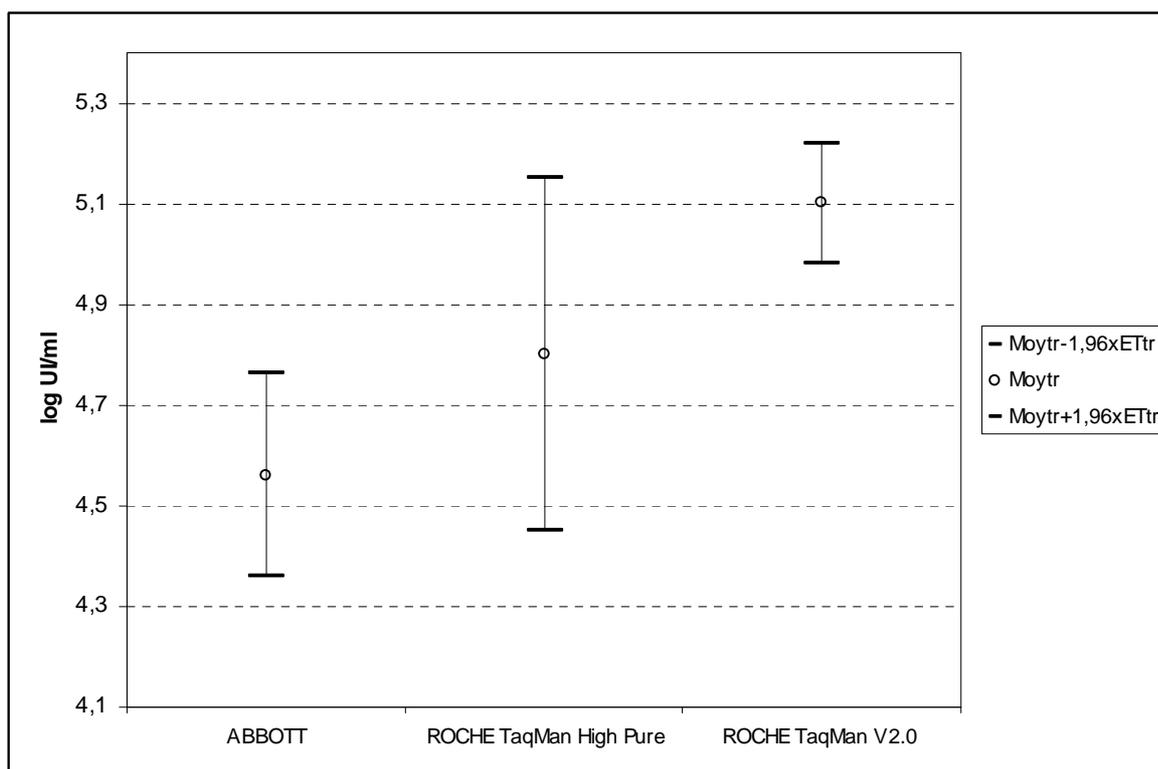


figure 12 – résultats en fonction du réactif utilisé avec 11-CB4 : moyenne  $\pm 1,96 \times$  écart-type



Pour les échantillons 11-CB1 et 11-CB2, aucune différence entre les concentrations moyennes obtenues avec les 3 réactifs n'a été observée.

En revanche, les concentrations obtenues pour l'échantillon 11-CB4 avec le réactif ABBOTT RealTime HBV sont significativement plus basses que celles obtenues avec les 2 autres réactifs : ROCHE Cobas TaqMan HBV Test ( $p=5 \times 10^{-4}$ ) et ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0 ( $p=1 \times 10^{-23}$ ) : les laboratoires qui ont utilisé le réactif Abbott RealTime HBV obtiennent en moyenne des mesures plus basses de 0,24 log de UI/mL par rapport à ROCHE Cobas TaqMan HBV Test et de 0,54 log de UI/mL par rapport à ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0. De même, les quantités moyennes estimées par ROCHE Cobas TaqMan HBV Test sont significativement plus basses de 0,30 log de UI /mL par rapport à celles obtenues avec ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0 ( $p=1,6 \times 10^{-7}$ ).

## 5. Précision de la mesure d'ADN-VHB

On remarque une distribution plus étroite des résultats obtenus avec les réactifs ABBOTT RealTime HBV (CV inter-laboratoire de 4,71%, 4,57% et 2,25% respectivement pour les échantillons 11-CB1, 11-CB2 et 11-CB4) et ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0 (CV inter-laboratoire de 2,75%, 4,86% et 1,19%) par rapport à celle des résultats obtenus avec le réactif ROCHE Cobas TaqMan HBV Test (CV inter-laboratoire de 6,65%, 5,66% et 3,72%).

## 6. Analyse qualitative

Concernant les résultats qualitatifs, seuls 2 laboratoires ont utilisé le réactif CHIRON Procleix assay +/- Tigris, Les résultats obtenus par ces 2 laboratoires sont conformes aux résultats attendus que ce soit pour les 3 échantillons positifs (11-CB1, 11-CB2 et 11-CB4) ou pour l'échantillon négatif (11-CB3).

## Conclusion

Il s'agit de la première opération du Contrôle National de Qualité dédiée à la recherche de l'ADN du VHB. Elle impliquait 64 laboratoires dont 61 ont renvoyé un bordereau-réponse, soit environ 2 fois moins que pour l'ARN-VIH1 ou l'ARN-VHC.

Trois éléments se dégagent de cette 1<sup>ère</sup> opération :

- Globalement, on note un très faible nombre de valeurs aberrantes ou isolées, montrant une homogénéité dans les résultats obtenus pour un même réactif, avec de plus une variation inter-laboratoire faible comme le montre les faibles valeurs du coefficient de variation (<7%). Il convient par ailleurs de noter que les coefficients de variation les plus élevés ont été mis en évidence avec les techniques basées sur une extraction manuelle.
- Une différence significative a pu être notée pour la quantification de l'échantillon 11-CB4 entre les 3 techniques analysées. Cette différence était toutefois inférieure à 0,5 log UI/mL, sauf pour un laboratoire ayant utilisé le réactif ABBOTT RealTime HBV (lorsque le résultat a été comparé à celui obtenu avec le réactif ROCHE Cobas TaqMan HBV test V2.0). Comme il est généralement admis qu'une différence de plus de 0,5 log UI/mL a une signification clinique, il reste recommandé d'utiliser le même réactif pour effectuer les mesures de charge virale dans le cadre du suivi thérapeutique des patients.
- Parmi les 61 laboratoires, 39 (64%) n'ont pas conclu à un résultat « négatif » ou « 0 » pour l'échantillon négatif (11-CB3). Ces laboratoires ont fourni un résultat qui aurait pu laisser penser à la présence d'ADN du VHB à un taux non quantifiable. Il convient de souligner, qu'en fonction du contexte clinique, la distinction entre la présence à un taux non quantifiable (c'est-à-dire se situant entre le seuil de détection et le seuil de quantification de la technique) et l'absence totale d'ADN (ADN indétectable, c'est-à-dire en dessous du seuil de détection) est importante.