



Laboratoire de Sophia Antipolis

Unité Fièvre Q Animale

Les Templiers - 105, route des Chappes  
BP 111 - 06902 SOPHIA ANTIPOLIS CEDEX

Tél. : 04 92 94 37 00

Fax : 04 92 94 37 01

## Laboratoire National de Référence Fièvre Q

# **BILAN SUR LE SUIVI DES PERFORMANCES DES METHODES D'ANALYSE DU RESEAU FIEVRE Q**

**Données issues des laboratoires agréés  
Sept 2012 - Août 2015**

**Méthodes PCR quantitative**

## 1. OBJECTIF

Les missions d'un LNR sont notamment centrées sur l'harmonisation de la mise en œuvre des méthodes d'analyse. Un LNR contribue donc à valider les méthodes, les éprouver sur le terrain et stimuler leurs évolutions, voire accompagner les laboratoires dans leurs accréditations.

**Ainsi, un suivi auprès des laboratoires agréés durant le programme pilote sur la fièvre Q a été conduit pour :**

**1/ caractériser et vérifier le maintien de la qualité des méthodes d'analyses du réseau,**

**2/ définir les perfectionnements et clés d'harmonisation de ces méthodes mises à l'épreuve dans un réseau.**

**Ce suivi repose principalement sur les résultats obtenus pour des témoins en limite du seuil d'interprétation :**

- **un traceur de la méthode complète de PCR quantitative en temps réel (PCRq) au seuil de 10 000 bactéries/mL (i.e. 4,00 log<sub>10</sub> bact/mL).**

Ce témoin est préparé à partir d'un matériau de référence (MR) bactérien fourni par le LNR-fièvre Q.

Ce témoin nécessite d'être inclus dans chaque série d'analyses. Une carte de contrôle des résultats quantitatifs successifs est élaborée. Chaque résultat quantitatif du traceur conditionne la validité des résultats de la série avec une tolérance comprise dans la fourchette de  $4,00 \pm 0,70 \log_{10}$ .

- **deux contrôles de la méthode ELISA correspondant à 2 niveaux d'anticorps entourant le seuil de positivité du kit.**

Ces 2 témoins sont préparés à partir d'un sérum MR-calibrant du LNR-fièvre Q.

Il a été recommandé d'inclure ces témoins à minima lors de l'acceptation d'un nouveau lot de kit. Les 2 mêmes niveaux sont employés par les producteurs de kits pour vérifier la stabilité inter-lots de leur kit. Les résultats de ce contrôle qualité sont inscrits sur le certificat de lot et les laboratoires peuvent les comparer avec leurs valeurs obtenues. Une observation sur un nombre suffisant de lots et dans plusieurs laboratoires permettra de déterminer des limites d'acceptation pour vérifier la standardisation inter-lots.

**Dans ce rapport sont présentées les données de suivi des performances de la PCR.** En préambule, seront exposés les points de contexte suivants :

- principe de la méthode et garanties de standardisation,
- méthodes de PCR temps réel quantitatives du réseau.

## 2. PCR COXIELLA DU RESEAU AGREE

### PRINCIPE DE LA METHODE ET GARANTIES DE STANDARDISATION

La PCR est une méthode permettant un **diagnostic direct de l'agent infectieux**. Cette méthode cible spécifiquement l'**ADN** de l'agent infectieux : après une extraction des acides nucléiques totaux d'un prélèvement, la PCR consiste à copier (amplifier) spécifiquement et de façon exponentielle (répétition de cycles d'amplification) une séquence d'ADN propre à l'agent infectieux et correspondant à un marqueur génétique.

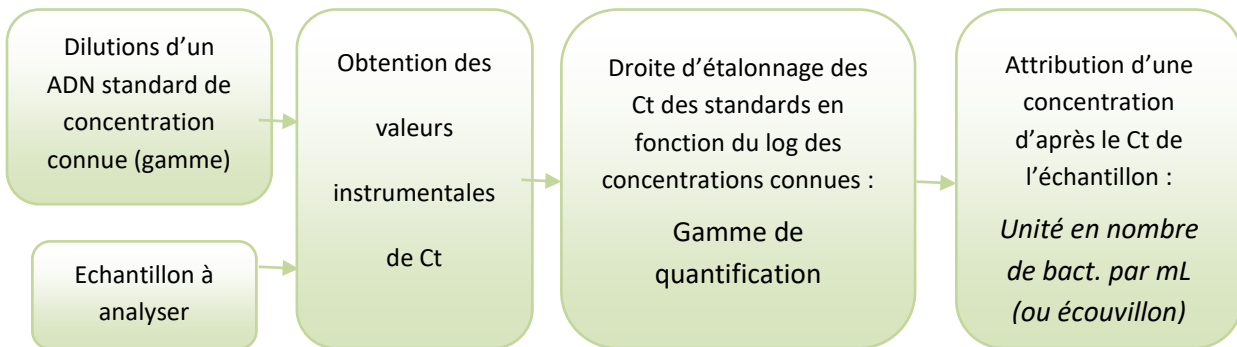
Les PCR dites en Temps Réel permettent de suivre cette amplification, au cours du temps, en associant la copie de la séquence cible à un signal fluorescent. La valeur de Ct (« Cycle threshold » ou cycle au seuil) est la valeur instrumentale obtenue par un appareil de PCR en Temps Réel (Fig 1). Elle correspond au nombre de cycles d'amplification de PCR pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles de PCR pour que la réaction démarre et donc plus la valeur de Ct sera précoce (forte concentration de la cible = valeur Ct faible).

On distingue ainsi 3 types de PCR en Temps Réel (PCR-TR) :

- la **PCR-TR qualitative** qui permet de formuler le résultat en « non détecté » ou « détecté » (selon l'absence ou la présence d'une valeur Ct),
- la **PCR-TR quantitative (PCRq)** lorsque la mesure de Ct est rapportée à une **gamme de quantification** ou d'étalonnage (Fig 1) et permet de déterminer le nombre de copies de séquence cible contenue initialement dans l'échantillon,
- la **PCR-TR relative (PCRr)**, la variable mesurée (en Ct) est transformée en variable relative (détecté en quantité supérieure, inférieure ou proche) par rapport à la valeur de Ct mesurée dans le même essai pour l'échantillon **MRSI (matériau de référence au seuil d'interprétation)**. Le terme de méthode semi-quantitative est aussi employé.

Dans le cadre du réseau, c'est une PCR quantitative en Temps Réel qui a été utilisée pour permettre une quantification entre au moins  $1.10^3$  et  $1.10^6$  bactéries par écouvillon et interpréter les résultats par rapport à des seuils compris dans ce domaine. Pour cela, une gamme de quantification, composée d'une série de dilutions d'un ADN standard de concentration connue, est incluse dans chaque essai. La gamme est préparée à partir d'un standard d'ADN du kit PCR, ou d'un matériau de référence (MR) d'ADN génomique fourni par le LNR-fièvre Q dans le cas de méthodes maison. Cette gamme permet la **transformation des valeurs de Ct des échantillons en concentration de séquences cibles de *Coxiella burnetii*** par PCR puis par unité de volume de l'échantillon. L'unité utilisée est un nombre de copies de génomes bactériens ou de bactéries par mL (mL ou écouvillon) (Fig 1).

Un **Contrôle Positif Interne (IPC)**, correspondant à une séquence du génome cellulaire de l'hôte, est amplifié simultanément avec la cible *Coxiella* afin de s'assurer, pour chaque échantillon, de la qualité de l'échantillon (bonne conservation, présence de cellules de ruminants en quantité suffisante), de l'extraction et de l'amplification (absence d'inhibiteurs de la réaction).



**Fig 1.** Transformation des valeurs instrumentales de Ct (Cycle seuil d'un échantillon ou « Cycle threshold »), obtenues après amplification par PCR en temps réel, en concentration de cible pour un échantillon.

En matière de témoins à inclure lors de la réalisation des analyses en routine, la PCRq Coxiella du réseau comporte par ailleurs 7 témoins obligatoires pour chaque série d'analyses, dont 5 réactions PCR pour établir la gamme (Tab 1).

**Tab 1.** Témoins requis lors de la réalisation des analyses selon les types de PCR Coxiella.

Témoins	Qualitative	Quantitative	Relative
Négatif de l'étape PCR	1	1	1
Positif de la PCR	1	0	1
Gamme ADN de Quantification ( $LQ_{PCR} - LQ_{max}$ ) *	0	5	0
Négatif de la méthode complète *	1	1	1
Positif (traceur) de la méthode complète *	1	1	0
MRSI de la méthode complète *	0	0	1

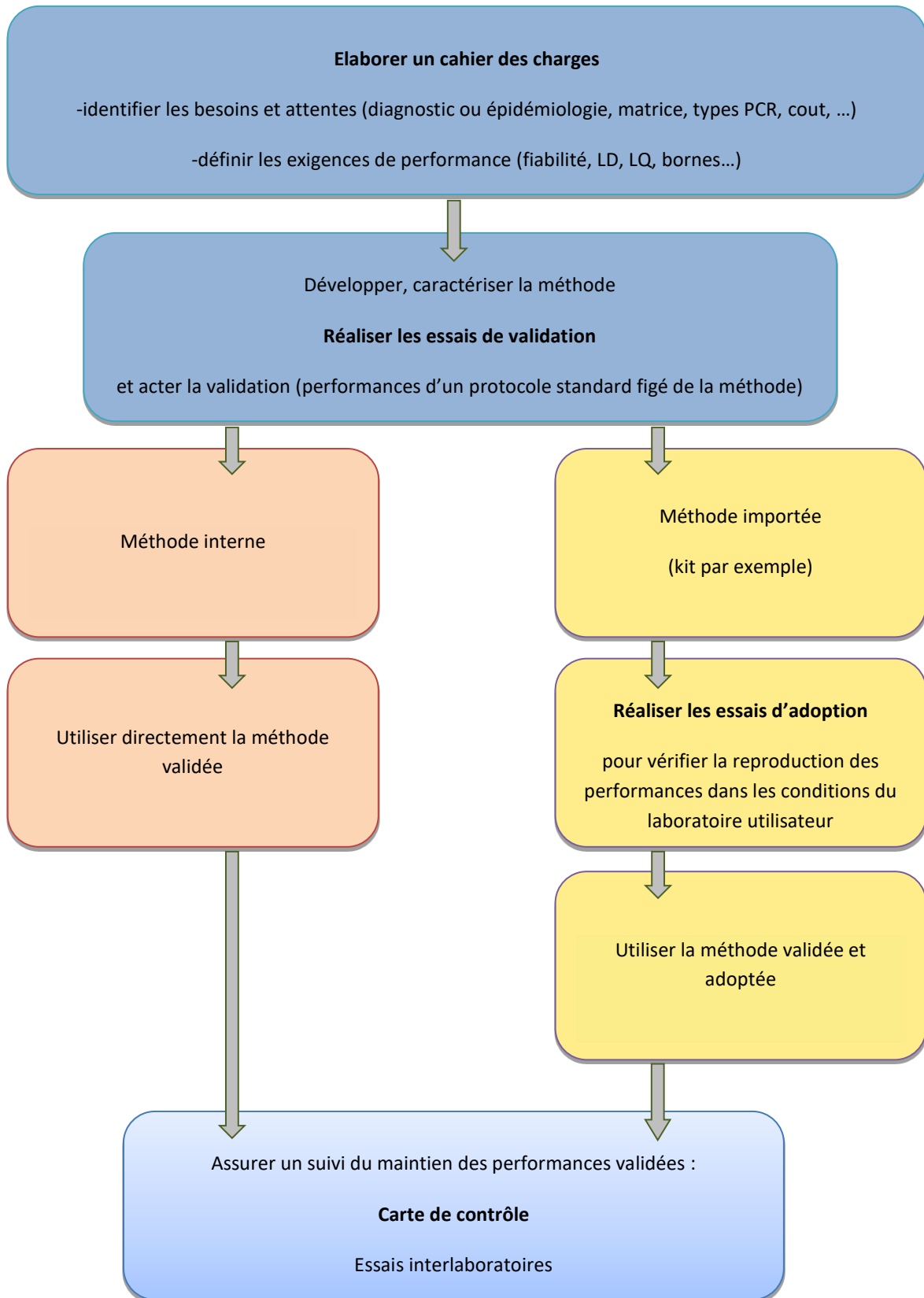
\* : obligatoire en routine selon la norme AFNOR U47-600, en dehors du témoin positif non cible dans l'échantillon (IPC).

A noter qu'un nombre restreint (et identique) de témoins est requis pour les PCR qualitative et relative (4 témoins dont 3 obligatoires).



La calibration de la PCRq Coxiella du réseau est assurée grâce à la gamme ADN et au positif bactérien (traceur) :

- ◆ un standard d'ADN cible pour la préparation de la **gamme de quantification**, étalonné par rapport au standard du LNR (Fig 1),
- ◆ l'élaboration d'une **carte de contrôle** de la méthode basée sur un traceur, préparé à partir d'une suspension bactérienne dosée du LNR, afin de vérifier le maintien de la reproductibilité et de la justesse de la méthode (Fig 2).



**Fig 2.** Synoptique de la mise en place d'une méthode validée.

(LD : Limite de détection ; LQ : Limite de Quantification).



La connaissance des caractéristiques de standardisation de la PCRq Coxiella du réseau est déterminée grâce à :

- ◆ la **validation** préalable de la méthode réalisée pour une matrice biologique donnée selon un **mode opératoire standard** de la méthode complète, c'est-à-dire l'extraction d'ADN et l'amplification de la cible (Fig 2),
- ◆ une séance d'**adoption**, permettant la vérification des performances validées lors de la mise en œuvre en laboratoire d'une méthode importée (Fig 2),

La validation de la méthode de PCRq Coxiella a été effectuée selon les prescriptions de la norme NF U47-600-2 qui décrit, pour chaque type de PCR, les essais à réaliser pour déterminer les caractéristiques de la PCR et de la méthode complète (Tab 2).

**Tab 2.** Caractéristiques validées (et adoptées) selon les types de PCR.

Caractéristiques	Qualitative	Quantitative	Relative
Limite de détection de la PCR, LD <sub>PCR</sub>	☑	☑	☑
Quantification et Limite de Quantification de la PCR, LQ <sub>PCR</sub>		☑	☑
Limite de détection de la méthode complète, LD <sub>METHODE</sub>	☑	☑	☑
Quantification et Limite de Quantification de la méthode complète, LQ <sub>METHODE</sub>		☑	☑
Fidélité pour le MRSI (méthode complète)			☑

En matière de performances, une PCR relative est obligatoirement dérivée d'une PCR quantitative : les caractéristiques de performances de la PCR quantitative doivent être toutes validées et adoptées en plus de la caractéristique de fidélité au niveau du MRSI.

## METHODES PCR TEMPS REEL QUANTITATIVES DU RESEAU

## DONNEES DE VALIDATION DES PERFORMANCES

Les méthodes PCR s'effectuent en plusieurs phases (la préparation de l'échantillon pour l'analyse, l'extraction/purification d'ADN, l'amplification spécifique, l'expression du résultat). Dans le cas de la PCRq Coxiella du réseau, les prélèvements sont des **écouvillons soit vaginaux, soit endocervicaux, soit de cotylédons placentaires**. La préparation de l'échantillon pour l'analyse consiste à réaliser une suspension de chaque écouvillon dans 1 mL. Le résultat est ainsi rendu pour l'unité mL ou écouvillon.

Plusieurs méthodes PCRq Coxiella sont utilisées dans le réseau de laboratoires agréés (Tab 3).

Les performances ont été validées par rapport à un cahier des charges du LNR prenant en compte les besoins pour la surveillance et les capacités techniques (Fig 2). Chaque caractéristique de performance a été vérifiée par les plans d'expérience et calculs respectant la norme AFNOR NF U47-600-2 pour la validation des méthodes PCR en santé animale.

**Tab 3. Méthodes PCR temps réel quantitatives validées sur les matrices de mucus vaginal, endocervical et de cotylédons placentaires des ruminants pour le diagnostic d'avortement fièvre Q.**

Méthodes	Extraction ADN	Amplification PCR	Abréviation du nom
<b>AES Adiagene</b>	manuel: QIAamp DNA Mini kit (Qiagen)	Kit AES ADI143	<i>AES mQIA</i>
	manuel: Nucleospin tissue (MACHERY-NAGEL)		<i>AES mMACH</i>
	robot: Billes magnétiques ARN/ADN (BIOMERIEUX)		<i>AES R</i>
<b>LSI Thermofisher</b>	manuel: QIAamp DNA Mini kit (Qiagen)	Kit LSI FQPAQ	<i>LSI mQIA</i>
	manuel: Nucleospin tissue (MACHERY-NAGEL)		<i>LSI mMACH</i>
	robot: MagVet Universal Isolation kit (LSI)		<i>LSI R</i>
<b>L71</b>	manuel: QIAamp DNA Mini kit (Qiagen)	Méthode interne	<i>Interne mQIA</i>
<b>Total</b>	<b>4 protocoles</b>	<b>3 protocoles</b>	<b>7 méthodes</b>

La méthode interne du LDA71 est déterminée par un protocole d'extraction basée sur le kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen) et une technique « maison » pour l'étape d'amplification par PCR. Trois protocoles pour chaque kit PCR permettent de réaliser l'étape d'extraction à partir des prélèvements : 2 de type manuel et 1 automatisé sur un robot. **Toutes ces méthodes sont utilisables car leurs performances répondent aux besoins édictés pour les analyses du programme pilote.**

Dans le tableau 4, les performances de limite de détection (LD) et de limite de quantification (LQ) sont spécifiées pour les 7 méthodes autorisées.

Selon le cahier des charges, le domaine de quantification inclus les seuils d'interprétation de 1000 (en mélange 3) et 10 000 bactéries (prélèvement individuel) par mL et s'étend au-delà de  $10^6$ . L'objectif était d'acquérir les données quantitatives sur cette étendue de manière à examiner la distribution de ces résultats de façon globale, mais aussi en fonction de l'espèce de ruminant ou de la nature du prélèvement (mucus versus placenta).

L'exactitude de la **méthode complète (extraction et PCR)** sur l'ensemble du domaine de quantification respecte des limites de  $\pm 0,70 \log_{10}$ .

**Tab 4.** Données de validation des méthodes PCRq Coxiella du réseau.

Caractéristiques de performance	Critères de conformité	Méthodes AES	Méthodes LSI	Méthode L71
<i>Spécificité analytique</i>				
<b>Inclusivité</b>	0% souches détectées parmi les non cibles (représentatives)	0%	0%	0%
<b>Exclusivité</b>	100% souches (ou échantillons vrais positifs) détectées parmi les cibles (représentatives)	100%	100%	100%
<i>PCR</i>				
<b>LD<sub>PCR</sub></b>	$\leq 5$ CGE /PCR ( $\leq 1000$ GEC/mL)	1,5 (300)	1 (200)	1 (200)
<b>LQ<sub>PCR</sub></b>	$\leq 5$ CGE /PCR ( $\leq 1000$ CGE /mL)	2 (400)	1,5 (300)	1 (200)
<b>Domaine de linéarité</b>	$\leq 5$ et $\geq 1,0 \times 10^4$ CGE /PCR 5 niveaux minimum	2,0 à $2,0 \times 10^5$ 6 pts validés	1,5 à $1,5 \times 10^5$ 6 pts validés	1,0 à $5,0 \times 10^5$ 6 pts validés
<b>Exactitude (domaine)</b>	$\pm 0,25 \log_{10}$ GEC/PCR	Conforme $U_{LIN}=0,17 \log_{10}$	Conforme $U_{LIN}=0,14 \log_{10}$	Conforme $U_{LIN}=0,21 \log_{10}$
<b>Gamme LQ à LQ<sub>max</sub> (CGE/mL)</b>	$LQ_{max} \geq 1,0 \times 10^6$	400 à $4,0 \times 10^6$	300 à $3,0 \times 10^6$	200 à $2,0 \times 10^6$
<i>Extraction ADN+ PCR (méthode complète)</i>				
<b>LD<sub>méthode</sub> (CGE/mL)</b>		300	200	200
<b>LQ<sub>méthode</sub> (CGE/mL)</b>		500	500	200
<b>Domaine (GEC/mL)</b>	$< 1000$ et $\geq 1,0 \times 10^6$ 5 niveaux minimum	500 à $5,0 \times 10^7$ 6 pts validés	500 à $5,0 \times 10^7$ 6 pts validés	200 à $1,0 \times 10^7$ 6 pts validés
<b>Exactitude (domaine)</b>	$\pm 0,70 \log_{10}$ CGE /mL	Conforme	Conforme	Conforme

CGE : copies de génome équivalent (ou nombre de bactéries).



Les limites de  $0,70 \log_{10}$  exigées pour la validation constituent une caractéristique inhérente de la méthode PCRq Coxiella du réseau. Ces limites doivent être respectées lors de l'utilisation en routine de la méthode. La connaissance et le maintien de cette variabilité maximale permet d'apprécier la fiabilité des résultats obtenus.



## DONNEES INITIALES D'ADOPTION DE LA METHODE DE CHAQUE LABORATOIRE

Un fois les modes opératoires en version définitive et les essais de validation réalisés, les laboratoires ont adopté les performances validées avant une mise en œuvre en routine (Fig 2). **Les résultats d'adoption constituent le point zéro des performances à maîtriser et maintenir.** Certains résultats sont présentés ici.

En février 2012, les laboratoires ont employé l'un des 2 kits PCR associé à l'une des 2 méthodes validées d'extraction d'ADN manuelle sur colonne (Tab 5). Deux laboratoires ont adopté 2 méthodes parallèlement pour permettre un choix (Lab5 et Lab3). Le Lab3 a opté pour la méthode AES mQIA initialement puis est passé à la méthode LSI mQIA courant avril 2015. Un laboratoire a souhaité disposer d'une des méthodes automatisées qui ont été validées ultérieurement (en 2013). Ce laboratoire (Lab6) a donc réalisé aussi une adoption d'une méthode sur billes magnétiques. Pour mémoire, le laboratoire « Lab10 » n'est pas concerné par la phase d'adoption car il a validé une méthode interne (Fig 2).

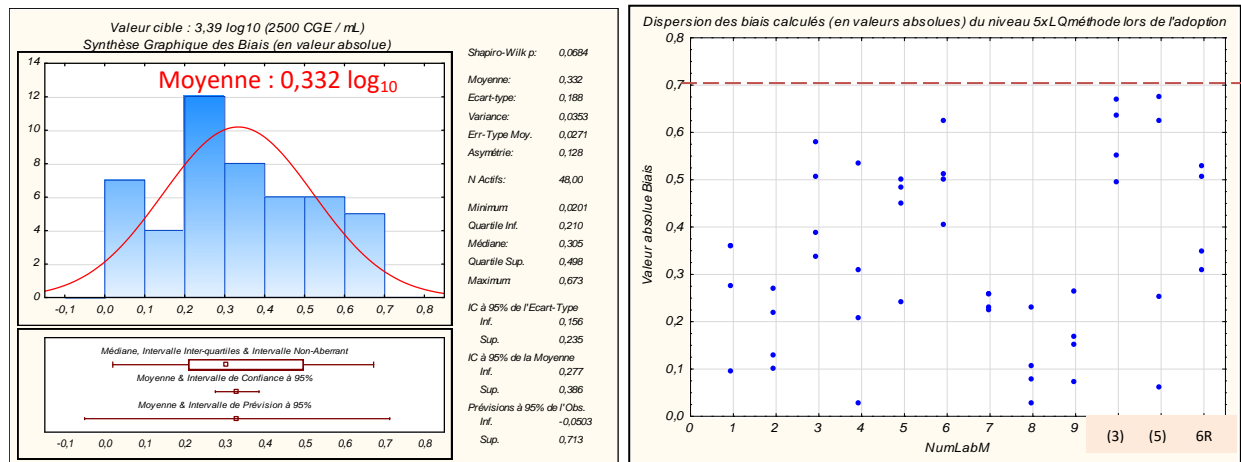
CONFIRMATION DE LA  $LQ_{METHODE}$  -NIVEAU DE 2500 BACTERIES/ML

Pour les méthodes basées sur kits PCR, la limite de quantification de la méthode ( $LQ_{methode}$ ) est identique : 500 CGE/mL (Tab 4). Les résultats d'adoption permettant de vérifier la limite de quantification sont donc comparables et sont présentés ci-après (Tab 5, Fig 3). L'essai consistait à quantifier une préparation bactérienne contenant 2500 bactéries/mL ( $5 \times LQ_{methode}$ ) en réalisant 2 essais indépendants de 2 répliques (obtention de 4 mesures en conditions de fidélité intermédiaire).

**Tab 5.** Résultats de biais, quantités et Ct obtenus avec la méthode PCRq Coxiella pour le niveau de 2500 bactéries par mL ( $3,40 \log_{10}$  bact/mL) lors des essais d'adoption.

Num Lab	Méthode	Moyenne biais (abs)	Ecart-type	Moyenne quantités (log10)	Ecart-type	Coef. Var. (%)	Moyenne Ct	Ecart-type	Coef. Var. (%)
1	AES mQIA	0,27	0,12	3,13	0,12	4,0	33,43	0,39	1,2
2	LSI mMACH	0,18	0,08	3,22	0,08	2,5	33,44	0,28	0,8
3	AES mQIA	0,45	0,11	2,95	0,11	3,7	32,70	0,38	1,2
(3)	LSI mQIA	0,58	0,08	2,82	0,08	2,8	34,18	0,33	1,0
4	AES mQIA	0,27	0,21	3,55	0,33	9,3	30,20	0,48	1,6
5	LSI mMACH	0,41	0,12	3,32	0,49	14,6	32,70	1,39	4,3
(5)	AES mMACH	0,40	0,30	3,00	0,30	9,9	31,73	0,34	1,1
6	LSI mMACH	0,51	0,09	2,89	0,09	3,1	32,98	0,37	1,1
6R	LSI R	0,42	0,11	3,82	0,11	2,9	31,17	0,44	1,4
7	LSI mQIA	0,24	0,02	3,16	0,02	0,5	33,63	0,27	0,8
8	LSI mQIA	0,11	0,09	3,50	0,09	2,5	31,06	0,36	1,2
9	LSI mQIA	0,16	0,08	3,35	0,19	5,7	32,50	0,72	2,2

**Fig 3. Résultats de biais (en log<sub>10</sub> bact/mL) obtenues avec la méthode PCRq Coxiella pour le niveau de 2500 bactéries par mL (3,40 log<sub>10</sub>). A/ Histogramme de distribution des données globales, B/ Dispersion des données en nuage de points par laboratoire (12 essais d'adoption de 9 laboratoires).**

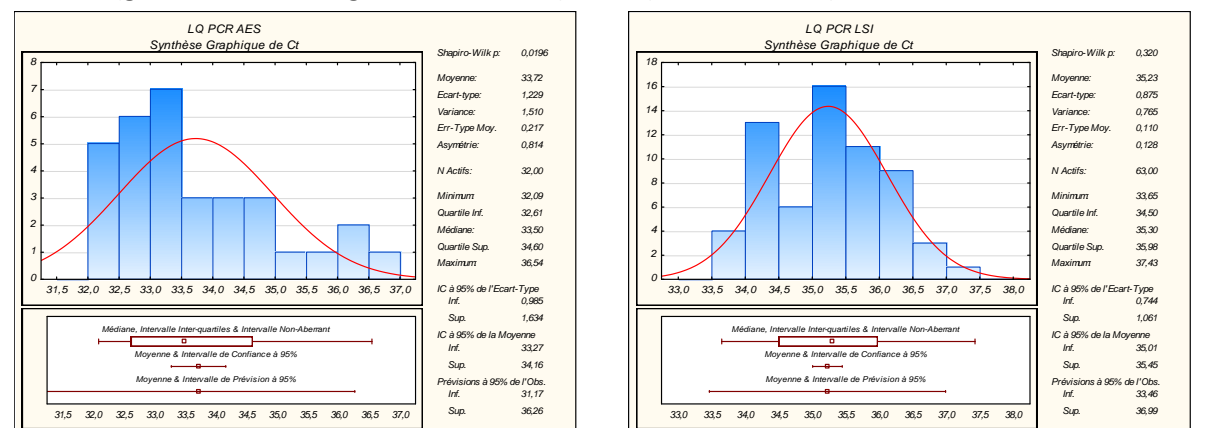


Les performances initiales sont bonnes pour la quantification d'un niveau de 2500 bact/ml (3,40 log<sub>10</sub>). La moyenne générale est de 1698 bact/ml (3,23 log<sub>10</sub>), celle des biais de 0,332 log<sub>10</sub>.

### GAMMES DE QUANTIFICATION

Les résultats d'adoption permettant de vérifier le point LQ et la linéarité de la gamme de quantification sont présentés ici selon le kit PCR à titre indicatif.

**Fig 4. Résultats de Ct pour la LQ<sub>PCR</sub> et pour la gamme de quantification selon les méthodes avec le kit PCR AES (gamme d'étalonnage de 400 à 4x10<sup>6</sup>) et LSI (de 300 à 3x10<sup>6</sup>).**



Qté std (GE/mL)	Nb valeurs	Moyenne	Ecart-type	Coef. Var. (%)
4 000 000	12	19,81	0,68	3,4
400 000	12	23,30	0,93	4,0
40 000	12	26,79	1,14	4,2
4 000	12	30,71	1,19	3,9
<b>400 (LQ<sub>PCR</sub>)</b>	<b>32</b>	<b>33,72</b>	<b>1,23</b>	<b>3,6</b>

Qté std (GE/mL)	Nb valeurs	Moyenne	Ecart-type	Coef. Var. (%)
3 000 000	25	21,88	0,43	2,0
300 000	25	25,27	0,50	2,0
30 000	25	28,72	0,78	2,7
3 000	25	31,93	0,61	1,9
<b>300 (LQ<sub>PCR</sub>)</b>	<b>63</b>	<b>35,23</b>	<b>0,87</b>	<b>2,5</b>



On conseille de recenser les valeurs Ct de la gamme dans un tableau.

## SUIVI DES METHODES PCR-TEMPS REEL QUANTITATIVES DU RESEAU

## DONNEES DES CARTES DE CONTROLE

Le recueil des données a concerné 6 périodes successives.

- du 1/07/2012 au 30/09/2013
- du 30/09/2013 au 28/02/2014
- du 3/03/2014 au 30/06/2014
- du 01/07/2014 au 31/10/2014
- du 01/11/2014 au 27/02/2015
- du 2/03/2015 au 7/09/2015

Les résultats ont été recensés sur des fiches de suivi propres à chaque laboratoire (fichier Excel avec un onglet par période définie). Une représentation de la distribution des données était retournée directement sur cette fiche individuelle (figures générées avec le logiciel statistiques JMP).

Chaque fiche individuelle renseignait sur les numéros codant les laboratoires (NumLab sur les illustrations de résultats ci-après).

Seules les 1274 valeurs conformes ont été intégrées à l'exploitation statistique des données (Tab 6). Les 10 laboratoires suivaient des règles comparables **en cas de résultat non conforme** (en dehors des limites de biais de  $0,70 \log_{10}$  autour de la valeur de référence de  $4,00 \log_{10}$ ) :

l'essai a été repris, notamment si des échantillons ont été trouvés positifs, pour obtenir une quantification valide.

## DISPERSION ET JUSTESSE DES DONNEES DES CARTES DE CONTROLE

Les données du traceur ont été exploitées de manière à visualiser leur dispersion et l'écart par rapport à la valeur de référence (traceur calibré à 10 000 bact/mL ou  $4,00 \log_{10}$ ). Les graphiques des données cumulées par laboratoire ont été retournés régulièrement sur la fiche individuelle, à titre de comparaison avec les autres laboratoires. Dans ce bilan, une description globale des données est présentée concernant les biais calculés (Tab 6, Fig 5), les quantifications mesurées (Tab 7, Fig 6), les valeurs de Ct obtenues (Tab 8, Fig 7).

Les données non conformes ont été répertoriées pour en apprécier la fréquence ainsi que l'amplitude du biais : 56 valeurs de traceur étaient non satisfaisantes (4,7% des essais quantitatifs) avec un maximum à  $1,471 \log_{10}$  de biais. Un laboratoire (Lab4) a présenté un biais systématique mais avec une bonne reproductibilité (CV <5%). Un facteur de correction a dû être appliqué et seules les données corrigées ont été exploitées.

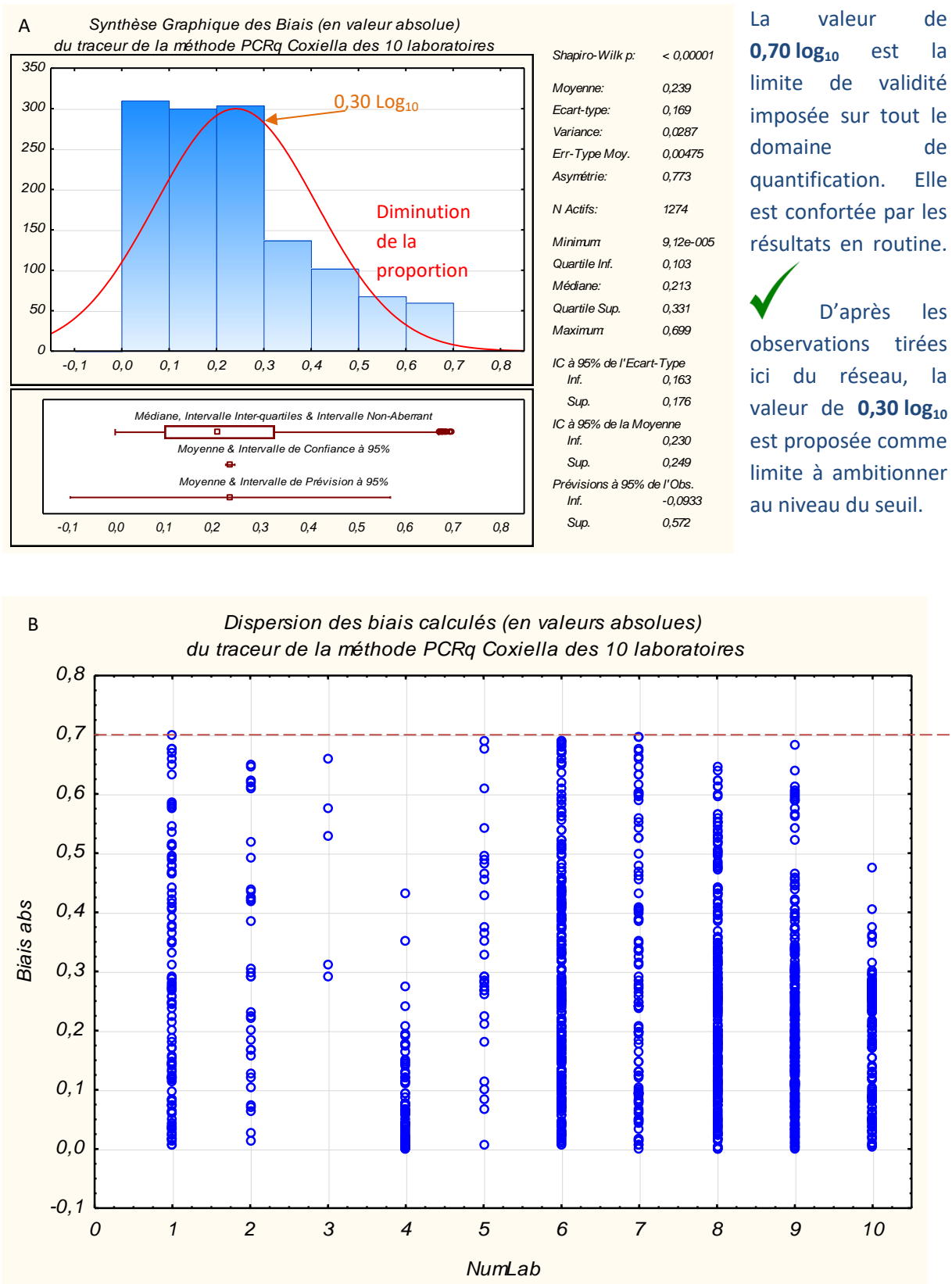
Sur les 1274 quantifications du traceur réalisées au cours des 3 années, la moyenne de biais (en valeur absolue) a été de  $0,239 \log_{10}$ . Les moyennes ont varié de 0,082 pour le Lab4 à  $0,473 \log_{10}$  pour le Lab3, ce dernier n'ayant réalisé que 5 essais de quantification suite à une étape de dépistage des positifs à quantifier.

**Tab 6.** Biais du traceur de la méthode PCRq Coxiella (performance de justesse).


Num Lab	Méthode	Nb valeurs	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
1	AES mQIA	105	0,265	0,006	0,699	0,199
2	LSI mMACH	34	0,313	0,015	0,649	0,200
3*	AES/LSI mQIA	5	0,473	0,290	0,660	0,165
4**	AES mQIA	76	0,082	0,000	0,432	0,081
5*	LSI mMACH	30	0,332	0,006	0,689	0,176
6	LSI mMAC, R	249	0,275	0,009	0,690	0,180
7	LSI mQIA	104	0,289	0,002	0,697	0,207
8	LSI mQIA	249	0,247	0,001	0,648	0,162
9	LSI mQIA	268	0,214	0,000	0,683	0,143
10	Interne mQIA	154	0,197	0,005	0,477	0,101
<b>Tous</b>		<b>1274</b>	<b>0,239</b>	<b>0,000</b>	<b>0,699</b>	<b>0,169</b>

\*PCR de dépistage des échantillons quantifiables (i.e. PCR qualitative avec un standard à la LQ de la gamme). \*\*facteur de correction appliquée.

**Fig 5. Biais du traceur de la méthode PCRq Coxiella.** A/ Histogramme de distribution des données globales, B/ Dispersion des données en nuage de points par laboratoire.



La moyenne globale des valeurs Ct a été de **30,40** avec un CV de 4,4 % pour une moyenne globale des mesures à **4,01 log<sub>10</sub>**.

 Une bonne reproductibilité des Ct a été observée au niveau intra-laboratoire. Néanmoins l'étendue des valeurs Ct des différents laboratoires a été grande (minimum et maximum de 25,43 et 36,75 Ct et étendues de 1,83 à 8,88 Ct selon les laboratoires). Au plan inter-laboratoire, l'étendue maximale a été de 11,32 Ct. Pour mémoire, un décalage de 3,3 Ct correspond théoriquement à 1 log<sub>10</sub>. Ces données confirment que les valeurs Ct ne peuvent pas être prises directement pour des résultats quantitatifs.

**Tab 7.** Quantités mesurées pour le traceur de la méthode PCRq Coxiella.

Num Lab	Nb valeurs	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	Coef. Var. (%)
1	105	4,17	3,34	4,72	0,30	7,3
2	34	4,08	3,39	4,69	0,37	9,2
3	5	3,57	3,38	3,75	0,16	4,6
4	76	3,97	3,57	4,21	0,11	2,8
5	30	3,93	3,32	4,69	0,38	9,5
6	249	4,05	3,31	4,69	0,33	8,0
7	104	3,80	3,30	4,47	0,30	7,8
8	249	4,00	3,40	4,69	0,29	7,3
9	268	4,04	3,36	4,68	0,26	6,3
10	154	3,97	3,70	4,48	0,20	5,0
<b>Tous</b>	<b>1274</b>	<b>4,01</b>	<b>3,30</b>	<b>4,72</b>	<b>0,29</b>	<b>7,3</b>

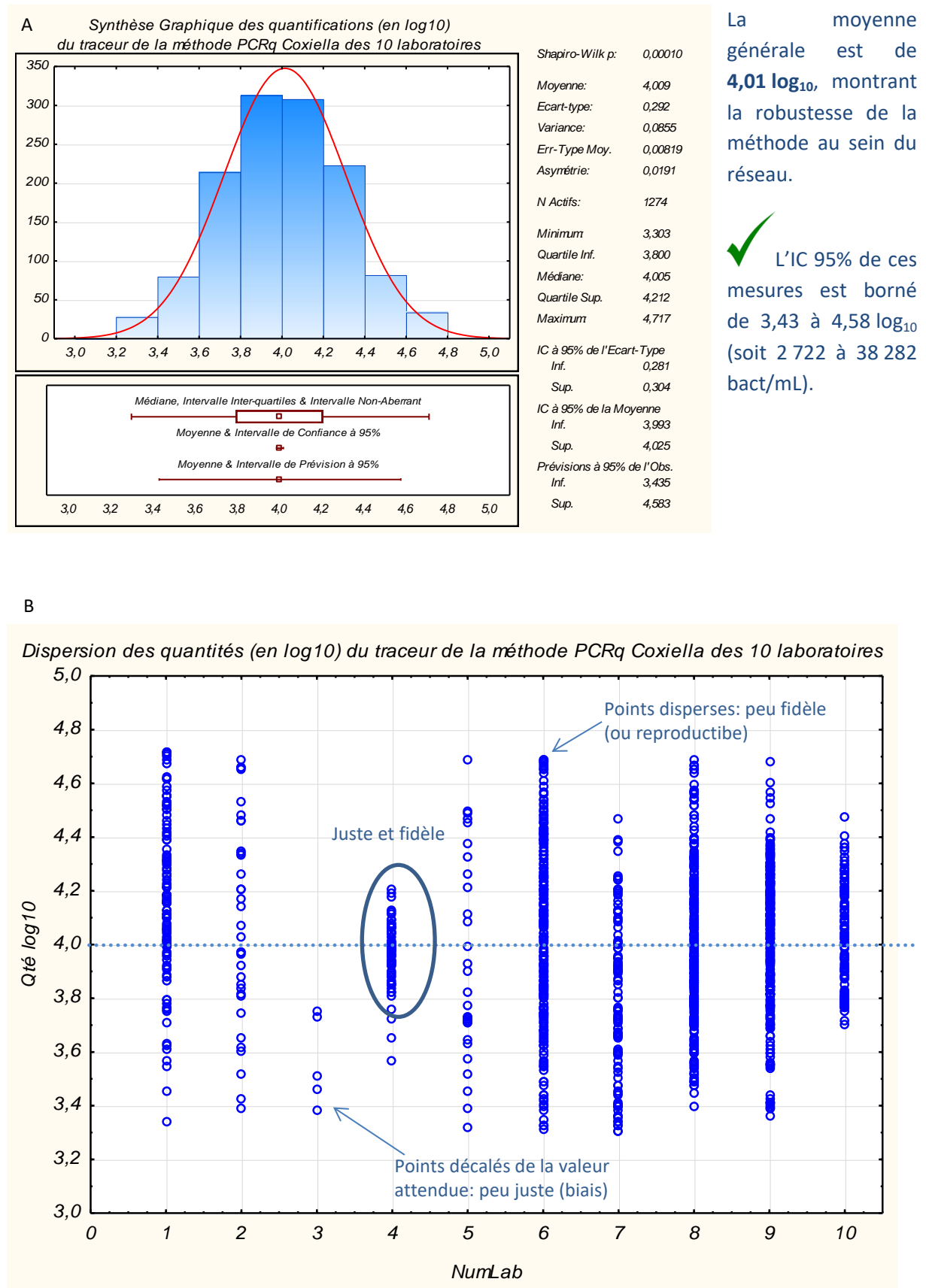
Une limite de **10%** est recommandée pour le coefficient de variation des quantifications, une limite intermédiaire de **5%** est envisageable.

**Tab 8.** Valeurs de Ct obtenues pour le traceur de la méthode PCRq Coxiella.

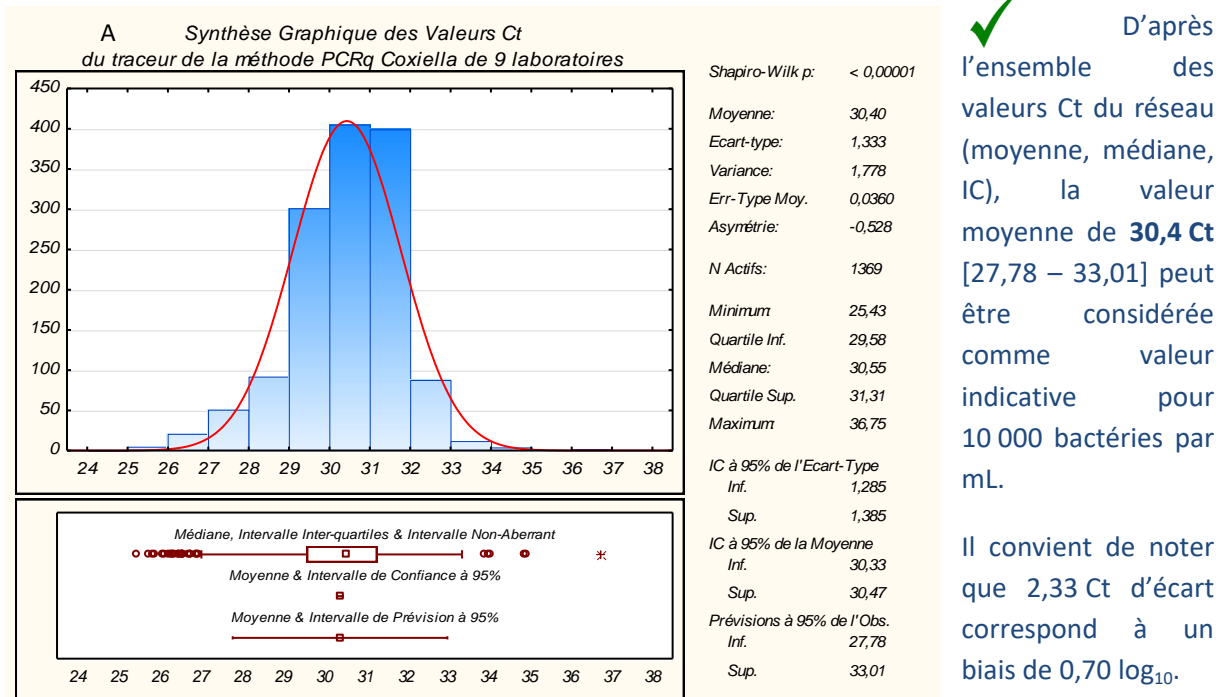
Num Lab	Nb valeurs	Moyenne	Min	Max	Etendue	Ecart-type	Coef. Var. (%)
1	105	27,73	25,43	30,77	5,34	1,06	3,8
2	34	31,38	29,42	34,94	5,52	1,34	4,3
3	28	30,70	29,77	31,60	1,83	0,54	1,8
4	148	29,66	28,65	31,05	2,40	0,48	1,6
5	129	31,41	29,70	33,93	4,23	0,58	1,9
6	249	30,51	27,35	34,08	6,73	1,27	4,2
7	Non suivi						
8	249	31,26	27,87	36,75	8,88	0,99	3,2
9	268	29,88	27,81	31,71	3,90	0,71	2,4
10	159	31,09	29,09	33,17	4,08	0,61	2,0
<b>Tous</b>	<b>1369</b>	<b>30,40</b>	<b>25,43</b>	<b>36,75</b>	<b>11,32</b>	<b>1,33</b>	<b>4,4</b>

Une limite de **5%** est recommandée pour le coefficient de variation des Ct, une limite intermédiaire de **3%** est envisageable.

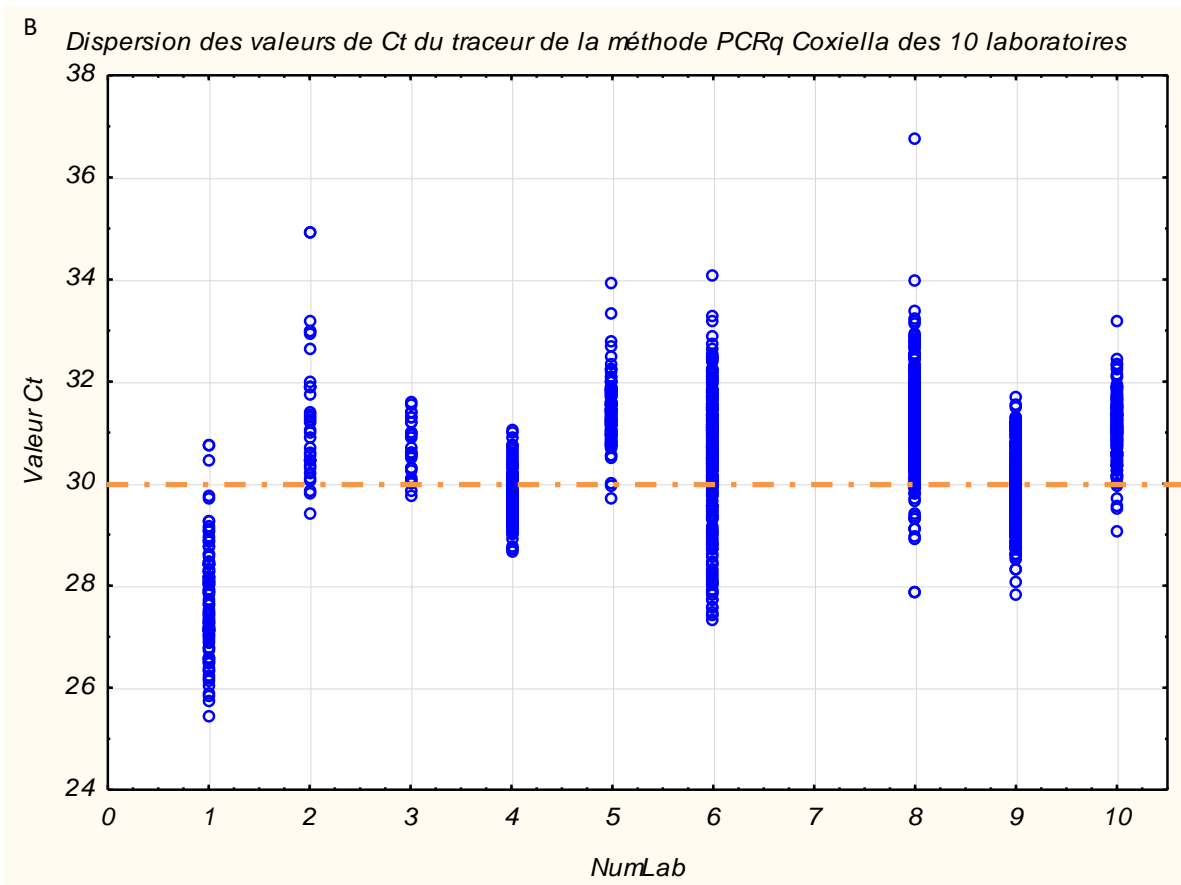
**Fig 6.** Quantités mesurées pour le traceur de la méthode PCRq Coxiella. A/ Histogramme de distribution des données globales, B/ Dispersion des données en nuage de points par laboratoire.



**Fig 7.** Valeurs de Ct obtenues pour le traceur de la méthode PCRq. A/ Histogramme de distribution des données globales, B/ Dispersion des données en nuage de points par laboratoire.



Dans le cas d'une PCR relative et d'un MRSI à 10<sup>4</sup> bactéries/mL, ces données peuvent être utilisées en tant que données informatives, avant de disposer de données de référence tirées d'au moins 30 essais successifs suivis en carte de contrôle dans les conditions de son laboratoire.





## PREPARATION DU TRACEUR DE LA CARTE DE CONTROLE DE LA METHODE

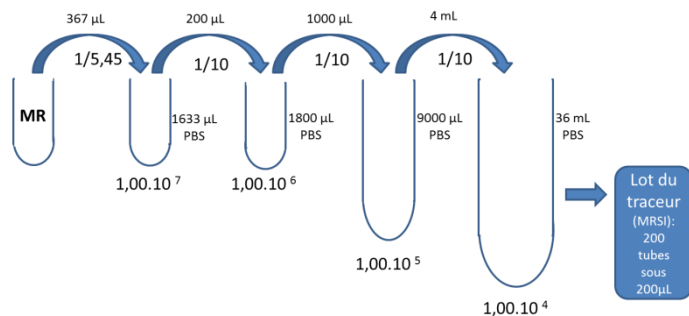
Pour les méthodes de laboratoire avec interprétation par rapport à un seuil, des contrôles proches du seuil sont privilégiés. En l'absence de contrôle commercialisé, le laboratoire peut établir un pool d'échantillons adapté au seuil de la technique. Dans le cadre du programme pilote, le témoin est préparé à partir d'un matériau de référence (MR) bactérien élaboré et qualifié par le LNR-fièvre Q.

Le réseau de laboratoires a partagé les procédures élaborées pour la préparation des lots de traceurs. **Des recommandations ont été tirées de ce retour d'expérience du réseau pilote sur :**

### - la préparation même du traceur

Avant tout, il est important de retenir cette particularité mentionnée sur le certificat du MR : les bactéries de *Coxiella burnetii* en suspension font l'objet d'une décantation rapide, il est nécessaire de bien vortexer lors des étapes de préparation et d'aliquotage. Le phénomène de décantation rapide justifie de travailler avec des volumes plutôt grands et de préparer des lots d'au moins 10 mL.

La proposition sur le schéma est le protocole le plus commun du réseau. Une dilution au 1/5 ou 1/5,45 suivie de 3 dilutions au 1/10 à partir du MR à  $5,45 \cdot 10^7$  permettent de préparer un traceur calibré à  $1 \cdot 10^4$  bact/mL.



**Fig 8.** Préparation d'un lot de 40 mL de traceur et de fractions aliquotes à partir du MR bactérien du LNR.

Le lot qualifié est réparti sous 200 µL, format prêt à l'emploi, tel que spécifié par le LNR. L'observation des valeurs des cartes des laboratoires indiquent qu'un lot de traceur aliquoté est stable sur une année et plus.

Le plus souvent, le lot a été préparé en PBS, une spécification du LNR pour limiter les éventuels problèmes d'homogénéisation. Deux laboratoires ont employé la matrice négative comme diluant : l'un ayant eu des difficultés de mise en place (Lab2') et l'autre présentant de bonnes performances (Lab6).

### - la vérification de la quantité de bactéries du traceur préparé

Le lot est ensuite qualifié. Un plan d'expérience couvrant la majorité des pratiques du réseau consiste à réaliser au moins 2 essais indépendants en analysant 3 ou 4 répliques du traceur. Mais plusieurs laboratoires ont mis en place un plan d'expérience encore plus fiable en analysant conjointement une ou des dilution(s) du traceur proche de la LD méthode, soit au 1/100, soit une au 1/10 et une au 1/100.

On préconise bien évidemment d'inclure le traceur de l'ancien lot en un exemplaire en tant que témoin des essais successifs pour la carte de contrôle.

La conformité des résultats est ensuite examinée tel qu'indiqué dans le tableau suivant, le niveau d'incertitude de la valeur obtenue étant basé sur les performances analytiques de la méthode. On conseille d'utiliser un biais de  $\pm 0,3 \log_{10}$  (limite de surveillance) pour la vérification du traceur, plutôt qu'un biais de  $\pm 0,7 \log_{10}$  (limite d'alerte, validité imposée au regard des données de validation de la méthode).

**Tab 9. Vérification de la valeur du traceur (valeur attendue à 10000 bactéries/mL)**

Plan d'expérience	Critères d'acceptabilité
Traceur du nouveau lot Répliques : 3 exemplaires au moins Essais indépendants : 2 au moins	Moyenne de la série d'essais conforme au résultat attendu de $4,0 \log_{10}$ [ $3,7 - 4,3 \log_{10}$ ]  Biais conseillé de $\pm 0,3 \log_{10}$
Dilution du traceur au 1/10 ( $3,0 \log_{10}$ )  au 1/100 (facultatif) ( $2,0 \log_{10}$ )	100% positifs, vérification du biais de $0,7 \log_{10}$  $\geq 95\%$ positifs  LQ <sub>METHODE</sub> étant de 500 bact/mL ( $2,7 \log_{10}$ ) Minimum de la LD <sub>METHODE</sub> étant de 200 bact/mL ( $2,3 \log_{10}$ )

A l'issue de cette qualification quantitative, la valeur de référence ainsi déterminée est rapportée sur la carte de contrôle.

Dans le cas d'un MRSI d'une PCR relative, il s'agira d'évaluer la cohérence de la valeur moyenne du Ct par rapport à des données de référence (par ex, les données antérieures de la carte de contrôle, i.e. moyennes et bornes de 2 et 3 écart-types sur au moins 30 valeurs).

- **son utilisation pour la carte de contrôle de la méthode**

Les préconisations du LNR-fièvre Q sur l'élaboration de la carte de contrôle et ses critères de validité ont été suivies. Néanmoins, 2 pratiques coexistent : carte de contrôle par lot de traceur ou carte unique aux lots successifs.



**LA PREPARATION D'UN TRACEUR DE CARTE DE CONTROLE CONCERNE LES 3 TYPES DE PCR (QUALITATIVE, QUANTITATIVE ET RELATIVE). DANS LE CAS DE LA PCR RELATIVE, LE TRACEUR EST AUSSI LE MRSI (MATERIAU DE REFERENCE AU SEUIL D'INTERPRETATION). CES CONSEILS SONT DONC UTILES POUR L'ENSEMBLE DES METHODES PCR CIBLANT *COXIELLA BURNETII*.**

### PROPORTION D'ÉCHANTILLONS AVEC RESULTAT **IPC>35CT**

Le contrôle positif interne (IPC) témoigne de la présence d'ADN extrait de cellules de l'animal dans l'échantillon testé. Il a été défini qu'un échantillon est considéré ininterprétable si le Ct de l'IPC est supérieur à 35. Ainsi, le signal d'IPC est tardif (Ct > 35, excepté cas de compétition avec la cible ADN Coxiella) en raison soit :

- de la présence de facteurs inhibiteurs de PCR (par exemple, l'hémoglobine -présence importante de sang lors d'écouillons de houppes placentaires-),
- d'un nombre de cellules eucaryotes très faible sur l'écouillon (raclage insuffisant de la muqueuse -liquide transparent après suspension de l'écouillon-),
- d'une dégradation de l'échantillon (conditions de conservation et/ou transport avant transmission au laboratoire).

L'inhibition de la PCR peut être levée en répétant l'analyse PCR sur l'ADN extrait dilué au 1/10 (voire au 1/100), voire en reprenant l'analyse sur le restant de suspension.

Un laboratoire a choisi de ne pas ré-analyser systématiquement cette catégorie d'échantillon, mais réalise un nouveau dépôt de l'extrait dilué uniquement si la suspension est "colorée". Il est possible de procéder à un nouveau prélèvement (sur l'animal, dans le délai de 8 jours après avortement, ou une reprise de 3 cotylédons sur le placenta).

Si le signal IPC fait toujours défaut, le résultat est rendu « ininterprétable ».

Le tableau suivant répertorie la proportion de résultats présentant une suspicion d'inhibition (valence IPC>35 Ct) et ceux dont le résultat a été rendu « ininterprétables » sur une année.

**Tab 10.** Bilan des échantillons rendus ininterprétables du 3 mars 2014 au 27 février 2015.

Num Lab	Nombre analyses	Nombre avec IPC>35	Nombre rendu Ininterp	Proportion rendue Ininterp
1	551	0	0	0%
2	75	5	0	0%
3	387	21	11	3%
4	125	5	3	2%
5	163	6	9	6%
6	1481	<i>nd</i>	42	3%
7	179	16	11	6%
8	840	17	9	1%
9	528	11	9	2%
10	614	27	27	4%

### 3. CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Pour les éleveurs, vétérinaires et gestionnaires concernés par les résultats de diagnostic d'avortements des ruminants, mais aussi pour les épidémiologistes statisticiens qui exploitent les données issues d'une surveillance ou d'une enquête, les caractéristiques de performance d'une méthode sont des composantes clés pour garantir l'obtention de résultats fiables et comparables.

Ainsi, pour veiller à la bonne performance du réseau des 10 laboratoires agréés du programme sur la fièvre Q, le LNR-FQ a demandé un retour d'informations relatif aux méthodes d'analyses officielles employées dans le cadre du programme pilote. Pour ces méthodes de laboratoire ELISA et PCR avec interprétation par rapport à un seuil, des contrôles proches du seuil ont été privilégiés. Ainsi, dans le cas des méthodes PCRq présentées dans ce rapport, chaque laboratoire a instauré une carte de contrôle basée sur un traceur défini par une valeur de référence et une incertitude associée.

Le suivi du maintien des performances a été un travail collaboratif nécessaire et formateur. La vue d'ensemble a permis à chaque laboratoire de se positionner et de savoir si ses résultats étaient corrects ou améliorables. A l'échelle globale, il a été possible de repérer également les points de progrès (dispositions pour permettre les investigations en cas de problème, simplification, harmonisation...).

#### PRECONISATIONS POUR LE MAINTIEN DES PERFORMANCES PCR<sub>Q</sub> COXIELLA

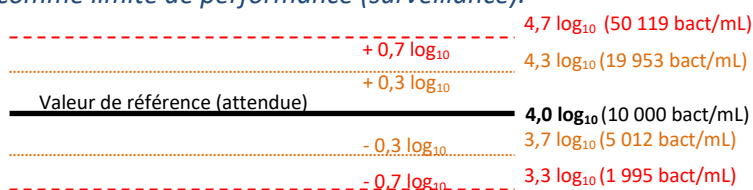
Les observations globales des données inter-laboratoires du traceur ont permis d'apprécier la robustesse des méthodes employées et d'affiner les préconisations concernant les performances :

- ◆ des biais calculés (mesure observée – mesure attendue)

*La valeur de **0,70 log<sub>10</sub>** est la limite de validité (contrôle, alerte) de la méthode telle que validée.*

*La valeur de **0,30 log<sub>10</sub>** est proposée comme limite de performance (surveillance).*

**Fig 9.** Limites inférieures et supérieures de la carte de contrôle de la PCRq Coxiella du réseau.



Biais et quantités en log<sub>10</sub> bact/mL (et en

- ◆ des quantifications mesurées

*Pour le coefficient de variation (CV), une limite de de **10%** est préconisée, une limite intermédiaire de **5%** est envisageable.*

- ◆ des valeurs de Ct

*Pour le CV, une limite de de **5%** est préconisée et une limite intermédiaire de **3%** est envisageable.*

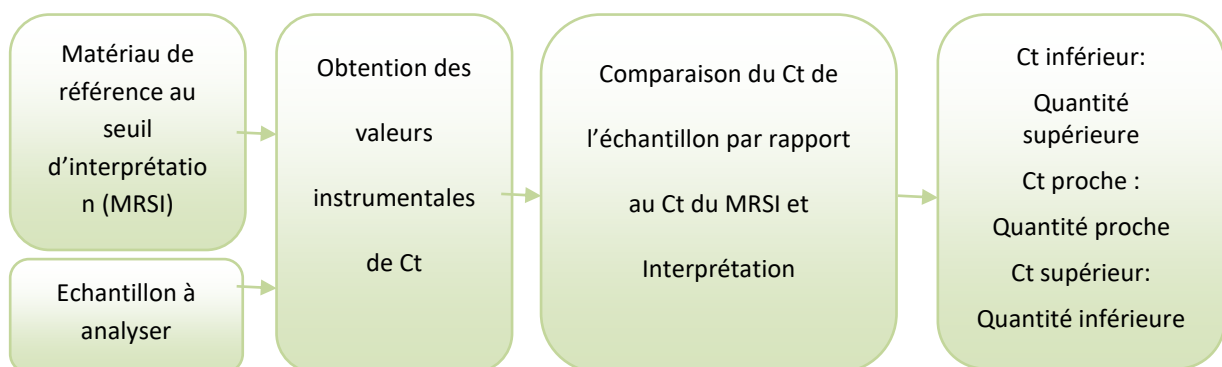
*NB. Un CV limite peut être pertinent pour le suivi de la reproductibilité des résultats sur les standards ADN de la gamme (Fig 4).*

Au cours du programme de 3 années, la performance de justesse pour le traceur par l'ensemble des laboratoires, estimée par le biais moyen, a été de 0,24  $\log_{10}$  sur 1274 données. La performance de dispersion, estimée par le coefficient de variation des mesures de quantification, a été de 7,3%.

## PROJET DE PCR RELATIVE

Afin de limiter le coût des essais de PCR quantitative, du fait des 5 réactions PCR requises pour établir la gamme, une première option pratiquée par certains laboratoires du réseau a été d'utiliser une **PCR qualitative (détecté/non détecté)** ou une **PCR qualitative/relative incluant le point LQ de la gamme** de manière à repérer les échantillons pour quantification par PCRq. Une nouvelle option est de mettre en œuvre une **PCR relative par rapport au seuil d'interprétation diagnostique** et ne pas réaliser de PCR quantitative (Tab 2).

Si un résultat par rapport à un seuil clinique est suffisant dans le cadre du diagnostic d'avortement alors le principe de la PCR dite relative est adapté (Fig 10). Le résultat en Ct de l'échantillon **MRSI (matériau de référence au seuil d'interprétation)** est mesuré dans le même essai que les échantillons à analyser. La valeur Ct de chaque échantillon positif est transformée en variable qualitative (détecté) et en variable relative par rapport à la valeur Ct du Matériau de Référence au Seuil d'Interprétation (quantité supérieure, inférieure ou proche de celle du MRSI).



**Fig 10.** Principe de la PCR relative. Interprétation des valeurs instrumentales de Ct pour un échantillon en résultat relatif par rapport à un témoin calibré au seuil.

Les données du réseau pilote ont illustré que les valeurs Ct ne sont pas suffisamment reproductibles entre laboratoires pour être utilisées directement comme résultats quantitatifs (Fig 7). On observe des écarts de Ct important pour le même échantillon (témoin à  $10^4$  bactéries par ml) entre les essais d'un laboratoire et entre les différents laboratoires qui utilisent des méthodes standardisées et validées partageant les mêmes performances. Le Ct correspond à une valeur instrumentale, une valeur approximative qui nécessite d'être transformée pour être calibrée. A l'instar de la DO d'un lecteur ELISA, on transforme la DO en %DO grâce à un calcul de ratio avec les mesures des témoins. Pour le Ct, il est nécessaire d'inclure des témoins dosés (de mesures connues), en l'occurrence la gamme pour la PCRq ou bien le témoin au seuil pour la PCRr.

Ainsi en l'absence d'une gamme, les valeurs Ct peuvent être considérées comme résultats si elles sont interprétées par rapport à une valeur seuil. Au moins un témoin calibré est requis.

De plus, un MR bactérien dosé, et qualifié par le LNR, est disponible. Il a été éprouvé au sein du réseau pilote. Les consignes de préparation et vérification d'un lot de traceur ou de MRSI ont été édictées grâce aux laboratoires du réseau (Fig 8).

Enfin, une carte de contrôle basée sur le biais en Ct est concevable afin de suivre la reproductibilité d'une méthode de PCR relative (Fig 11).

✓ **Certaines préconisations peuvent être émises pour favoriser la mise en place d'une PCR relative à un MRSI (PCRr).**

◆ La fidélité de mesure d'un Ct au seuil d'interprétation à partir du MRSI devra être préalablement validée (Tab 1). Les laboratoires auront à vérifier qu'ils obtiennent bien une incertitude des valeurs de Ct pour le MRSI respectant les limites d'acceptabilité d'incertitude demandées. Pour l'adoption, le laboratoire réalisera 2 essais indépendants sur 6 répliques de MRSI.

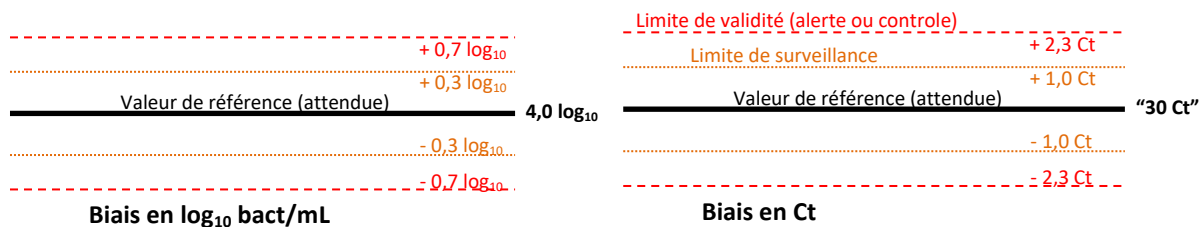
ⓘ Si le laboratoire n'a pas préalablement adopté la méthode PCR quantitative sous-jacente à la PCRr, il devra réaliser les essais d'adoption pour la vérification de la  $LQ_{PCR}$  et du domaine de quantification.

Le LNR-fièvre Q accompagne ces démarches. Il fournit notamment les consignes pour la réalisation des essais d'adoption et un formulaire de résultats à compléter.

◆ Une carte de contrôle basée sur le MRSI comme traceur de la méthode de PCRr est requise. L'exploitation permettra de connaître la valeur moyenne en Ct au niveau du seuil ainsi que l'incertitude de mesures propre au laboratoire (moyenne et bornes de 2 et 3 écart-types sur au moins 30 valeurs) et de suivre la bonne reproductibilité de la méthode de PCR relative.

⊙ Pour cela, les conseils de préparation du traceur tirés de ce programme sont utiles pour la PCRr (Fig 8). Pour la vérification de la valeur du traceur MRSI, il s'agira d'évaluer la cohérence de la valeur moyenne en Ct par rapport aux données de référence disponibles.

⊙ De plus, les limites d'acceptabilité de  $\pm 0,70 \log_{10}$  et  $\pm 0,30 \log_{10}$  peuvent être appliquées à cette carte, une correspondance théorique est calculée en Ct (Fig 11). Pour mémoire, un écart de 3,33 Ct entre 2 échantillons correspond à une différence d'1,00  $\log_{10}$ .



**Fig 11.** Limites inférieures et supérieures des cartes de contrôle de la PCRq et de la PCRr.

Pour un MRSI calibré à 10 000 bact/mL, d'après les données du réseau, la valeur moyenne de **30 Ct** est indicative. Elle devra être précisée dans les conditions propres au laboratoire (données des essais d'adoption et de carte). Les limites de la carte élaborée seront fixées à  $\pm 2,3 \text{ Ct}$  (ex : 27,7 et 32,3 Ct) comme limite de validité et  $\pm 1,0 \text{ Ct}$  (ex : 29,0 et 31,0 Ct) comme limite de surveillance.

---

**RESULTATS PROCHES DU SEUIL D'INTERPRETATION DIAGNOSTIQUE**

◆ L'interprétation diagnostique pour la fièvre Q se base sur un seuil : à  $10^4$  pour les analyses individuelles et à  $10^3$  pour les analyses de mélange de 3 écouvillons (individus petits-ruminants et placenta bovin, ovin ou caprin). La présence de l'agent n'est pas suffisante, une certaine charge associée à l'étiologie est considérée. Cette approche permet de limiter les faux positifs et par là même les résultats de co- ou multi-infection, donc d'améliorer la spécificité et le taux de résultats de certitude du diagnostic différentiel des avortements.



Les limites résumées sur la figure 11 permettent de valider la série d'analyse mais aussi de repérer les échantillons dont les résultats (quantités en PCRq ou Ct en PCRr) sont proches du seuil d'interprétation.

Compte tenu de l'intervalle d'incertitude de mesure observé dans les essais en routine sur le traceur (Fig 5), tout résultat compris dans l'intervalle de  $\pm 0,3 \log_{10}$  ou  $\pm 1,0$  Ct sera considéré proche du seuil (Fig 11).

Concernant le seuil de décision clinique en analyse individuelle, les résultats proches de 10 000 bact/mL ( $4,0 \log_{10}$ ) sont compris entre 5 012 bact/mL ( $3,7 \log_{10}$ ) et 19 953 bact/mL ( $4,3 \log_{10}$ ). En analyse de mélange de 3, les résultats proches de 1 000 bact/mL ( $3,0 \log_{10}$ ) sont compris entre 501 bact/mL ( $2,7 \log_{10}$ ) et 1 995 bact/mL ( $3,3 \log_{10}$ ).

Le laboratoire peut mentionner la formulation de résultat proche du seuil d'interprétation clinique et l'incertitude au seuil sur le rapport de résultats.