

Laboratoire National de Référence Fièvre Q

Expression des résultats PCR (temps réel) pour la recherche de C. burnetii dans le diagnostic d'avortement chez les ruminants

Note de décision pour les résultats proches du seuil « clinique »

1. TYPES DE PCR POUR LE PROTOCOLE OSCAR

Dans le cadre du diagnostic d'avortements, les méthodes PCR temps réel (PCR-TR) utilisées pour l'analyse des écouvillons vaginaux/endocervicaux ou placentaires sont soit de type Quantitatif, soit de type Relatif (au MRSI¹) pour la recherche des positifs supérieurs au seuil de décision clinique. Le nombre de témoins inclus obligatoirement dans chaque série d'analyse est respectivement de 7 et 3, selon le tableau ci-dessous.

Témoin	Positif d'extraction (méthode complète)	Positif PCR	Négatif d'extraction	Négatif PCR (facultatif)
PCR-TR Quantitative (PCRq)	Traceur bactérien à 10 ⁶ 4	Gamme ADN (5 points de LQ _{PCR} à LQ _{maxPCR})	PBS ou matrice négative	Eau
PCR-TR Relative à un MRSI (PCRr) *	MRSI (un ou deux témoins bactériens dosés aux seuils « clinique » **)	1 témoin ADN « détecté » (à la LD ou LQ de la méthode : entre 200 et 800)	PBS ou matrice négative	Eau

*Témoins similaires pour la PCR de type Qualitatif. ** à 10⁶4 pour les analyses individuelles et à 10⁶3 pour les analyses de mélange de 3 écouvillons (individus petits-ruminants et cotylédons placentaire bovin, ovin ou caprin).

Une analyse PCR de type Qualitatif peut être réalisée en amont pour le dépistage des prélèvements (résultat : Non Détecté - ND - ou Détecté - D -). Les échantillons détectés peuvent être repris en PCR Quantitative.

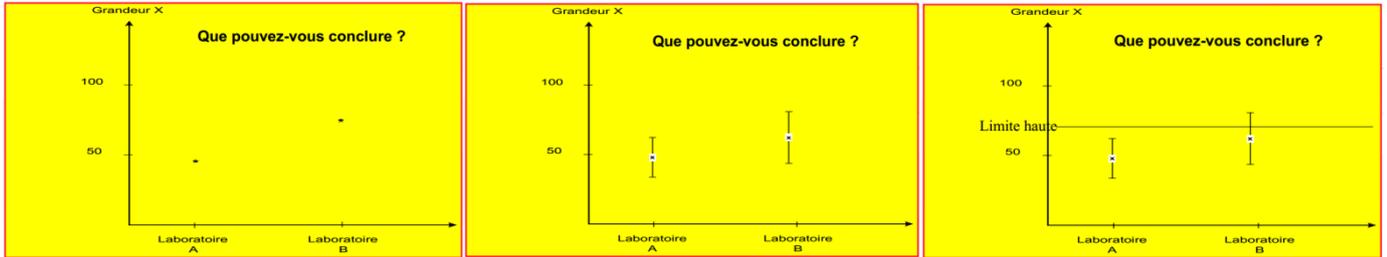
Pour rappel, le plus petit nombre de cibles par unité de volume qui peut être détecté dans 95% des cas correspond à la LD (limite de détection). La LQ (limite de quantification) correspond à celui déterminé dans 100% des cas et dans un intervalle d'acceptabilité maximal préalablement défini, à savoir de $\pm 0,70 \log_{10}$ sur l'ensemble du domaine de quantification (de $< 3 \log_{10}$ à $\geq 6 \log_{10}$ bactéries par écouvillon) pour les méthodes PCR validées².

¹ MRSI : matériau de référence au seuil d'interprétation (norme AFNOR U47-600)

² Liste accessible [ici](#)

2. INCERTITUDE DE MESURE AU SEUIL

Les 3 schémas suivants illustrent l'intérêt d'annoncer l'incertitude. Le résultat de mesure sert de base à la décision. Son incertitude fournit une indication sur la qualité du résultat. Sans incertitude, les résultats de mesures ne peuvent pas être comparés entre eux ou par rapport à des valeurs de référence spécifiées.

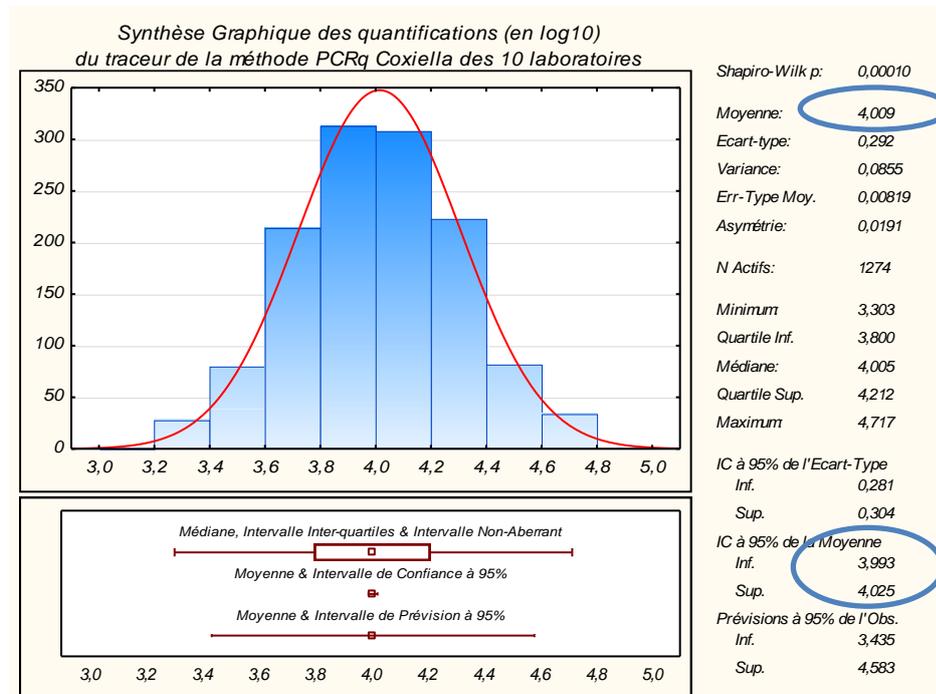


Pour le diagnostic de la fièvre Q abortive, les résultats PCR sont interprétés par rapport à une valeur de référence : le(s) seuil(s) actuellement considéré(s) pour attribuer les avortements à la fièvre Q. Les résultats proches du seuil sont repérés si l'on prend en compte l'incertitude de mesure au seuil. La zone d'incertitude, qui représente la variabilité technique d'un essai à l'autre, élargit donc la zone des résultats positifs «clinique».

L'incertitude de mesure maximale a été validée à 0,70 log₁₀ :

- La zone de résultats proche du seuil à 10⁴ bactéries par écouvillon (ou 4 log₁₀) est comprise entre 1 995 bactéries (3,30 log₁₀) et 50 119 bactéries (4,70 log₁₀).
- La zone de résultats proche du seuil à 10³ bactéries par écouvillon (ou 3 log₁₀) est comprise entre 199 bactéries (2,30 log₁₀) et 5 012 bactéries (3,70 log₁₀).

Les analyses des 10 laboratoires agréés³ ont permis d'éprouver la variabilité inhérente aux méthodes PCR en conditions de laboratoire durant 3 années⁴. La moyenne générale des 1 274 essais rapportés a été de 4,01 log₁₀ sur le témoin bactérien à 10e4 (ou 4,00 log₁₀) utilisé pour le suivi de la reproductibilité et justesse des essais en carte de contrôle. La distribution des quantités mesurées est montrée sur l'histogramme suivant.



³ Liste des laboratoires agréés actualisée [ici](#)

⁴ Le bilan complet de cette étude est disponible sur demande auprès du LNR (sophiaufqa@anses.fr).

L'IC 95% de ces mesures était bornée de 3,43 à 4,58 log₁₀ (soit 2 722 à 38 282 bact/mL. On montre ainsi une bonne **reproductibilité** intra- et inter-laboratoire. Sur le tableau suivant, la **justesse** est appréciée grâce aux biais qui ont été calculés. La moyenne de biais (observée – attendue en valeur absolue) a été de 0,239 log₁₀.

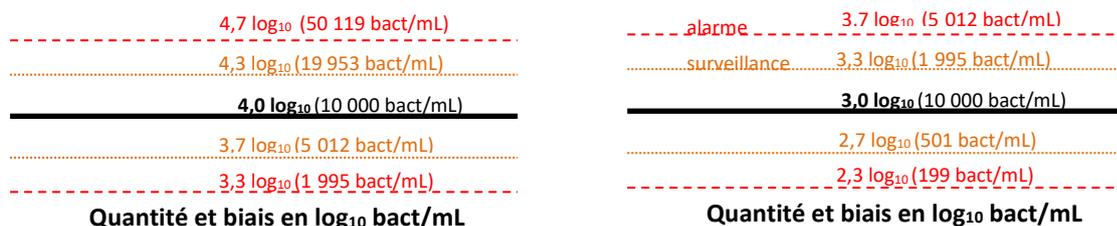
Num Lab	Méthode	Nb valeurs	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
1	AES mQIA	105	0,265	0,006	0,699	0,199
2	LSI mMACH	34	0,313	0,015	0,649	0,200
3*	AES/LSI mQIA	5	0,473	0,290	0,660	0,165
4**	AES mQIA	76	0,082	0,000	0,432	0,081
5*	LSI mMACH	30	0,332	0,006	0,689	0,176
6	LSI mMAC, R	249	0,275	0,009	0,690	0,180
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
Tous		1274	0,239	0,000	0,699	0,169

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

Selon la distribution des mesures, la probabilité de dépasser un biais de 0,3 log₁₀ est faible. L'incertitude de mesure en routine a ainsi été établie à 0,30 log₁₀ :

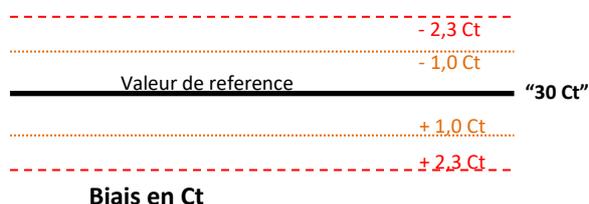
- La zone de résultats proche du seuil à 10⁴ bactéries par écouvillon (ou 4 log₁₀) est comprise entre 3,70 log₁₀ (5 012 bactéries) et 4,30 log₁₀ (19 953 bactéries).
- La zone de résultats proche du seuil à 10³ bactéries par écouvillon (ou 3 log₁₀) est comprise entre 2,70 log₁₀ (501 bactéries) et 3,30 log₁₀ (1 995 bactéries).

La figure suivante montre les limites inférieures et supérieures des **cartes de contrôle** de la PCR-TR quantitative et de la PCR-TR relative.



La LQ est comprise entre 2,69 log₁₀ (500 bactéries) et 2,90 log₁₀ (800 bactéries) selon les méthodes validées. La zone d'incertitude de 0,3 est compatible avec les 2 seuils, la limite basse pour le seuil de 3,0 log₁₀ étant à 2,70 log₁₀ (501 bactéries).

En matière de PCR relative au MRSI, le résultat est une valeur Ct comparée à la valeur Ct du MRSI. L'incertitude correspondant à 0,70 log₁₀ est de 2,3 Ct et celle à 0,3 log₁₀ est de 1 Ct. La valeur de référence du MRSI est déterminée par le laboratoire, elle est voisine de 30 Ct.



3. DECISION ETABLIE POUR LES RESULTATS PROCHES DU SEUIL D'INTERPRETATION CLINIQUE

Afin de prendre en compte tous les résultats significatifs pour l'étiologie des avortements, **les résultats proches du seuil sont interprétés comme positifs supérieurs au seuil de décision clinique (positif fort ou clinique)**. La figure suivante récapitule les différentes configurations de résultats et la décision établie pour les résultats proches du seuil. **L'intervalle associé à la valeur seuil est de 0,30 log₁₀ en PCRq ou de 1,0 Ct en PCRr.**

Résultats Décisions	LD	LQ	Limite basse	Seuil	Limite haute
			← -0,30 log ₁₀ +1,0 Ct		+0,30 log ₁₀ -1,0 Ct →
PCR-TR : > seuil					✕ ✕
PCR-TR proche du seuil (> seuil)			✕ ✕ ✕ ✕ ✕ ✕ ✕ ✕		
PCR-TR : détecté < limite basse (< seuil)		✕ ✕			
PCR-TR : détecté < LD ou < LQ (< seuil)	✕ ✕ ✕				
PCR-TR : non détecté					

En résumé, les critères ont été définis sur la base des données obtenues par 10 laboratoires sur 3 années. Les bornes de suivi du traceur ou du MRSI sur la carte de contrôle de +/- 0,70 log₁₀ ou +/- 2,33 Ct ont été confortées, cette incertitude de mesure maximale est valide à l'échelle d'un réseau de laboratoires.

De plus, dès lors que la série d'analyse est validée, pour tout résultat situé dans la zone de +/- 0,30 log₁₀ ou +/- 1,00 Ct, il est recommandé d'indiquer si le résultat est proche du seuil diagnostique sur le rapport de résultats, avec la mention « *Résultat proche du seuil clinique, à interpréter comme supérieur au seuil compte tenu de l'incertitude de mesure* ».