



HAL
open science

Vers la standardisation des lots de kits ELISA pour la sérologie de la fièvre Q chez les ruminants : calibration analytique dans la zone de seuil d'interprétation

Elodie Rousset, Aurélie Couesnon, Myriam Prigent, Elsa Jourdain, T. Lurier

► To cite this version:

Elodie Rousset, Aurélie Couesnon, Myriam Prigent, Elsa Jourdain, T. Lurier. Vers la standardisation des lots de kits ELISA pour la sérologie de la fièvre Q chez les ruminants : calibration analytique dans la zone de seuil d'interprétation. Rencontres Nationales de Santé Publique Vétérinaire, Oct 2023, Chorges (Hautes Alpes), France. 2023. hal-04245939

HAL Id: hal-04245939

<https://hal.inrae.fr/hal-04245939>

Submitted on 17 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Vers la standardisation des lots de kits ELISA pour la sérologie de la fièvre Q chez les ruminants : calibration analytique dans la zone de seuil d'interprétation

Elodie Rousset ⁽¹⁾, Aurélie Couesnon ⁽¹⁾, Myriam Prigent ⁽¹⁾, Elsa Jourdain ⁽²⁾, Thibaut Lurier ^(2,3)

Contexte

Trois kits sérologiques ELISA commercialisés sont largement utilisés pour détecter la fièvre Q chez les ruminants.

✓ Problème : un taux important de résultats discordants entre ces 3 méthodes

- ⇒ Incidence majeure pour les enquêtes épidémiologiques sur la fièvre Q [1] et sa surveillance [2]
 - ⇒ Impact sur le diagnostic des avortements, des analyses sérologiques étant recommandées en plus de la qPCR [1, 2]
 - ⇒ Difficultés pour garantir des données fiables et comparables au niveau d'un réseau de laboratoires de diagnostic et de référence
- Un projet global a donc été entrepris pour évaluer et améliorer leur performances diagnostiques et analytiques entre ces 3 kits.

Objectifs

Une première étude, utilisant une approche bayésienne à classes latentes, a révélé que les performances diagnostiques sont variables selon les kits : certains tests sont plus sensibles mais moins spécifiques et vice versa au niveau individuel, sans indiquer un meilleur test pour les applications diagnostiques à l'échelle de groupe ou du troupeau [3, 4].

➔ Ici, l'objectif du projet KitQal est de définir des règles de décision supplémentaires pour la validation des lots de kit afin de mieux calibrer leurs performances analytiques autour du seuil d'interprétation (SI), qui est le domaine critique de la méthode [4, 5, 6].

Explication du raisonnement

Le seuil d'interprétation (SI) est le domaine critique où les résultats positifs et négatifs sont distingués

Les résultats ELISA semi-quantitatifs ou qualitatifs dérivent de données quantitatives

Le calibrage des données quantitatives est donc crucial

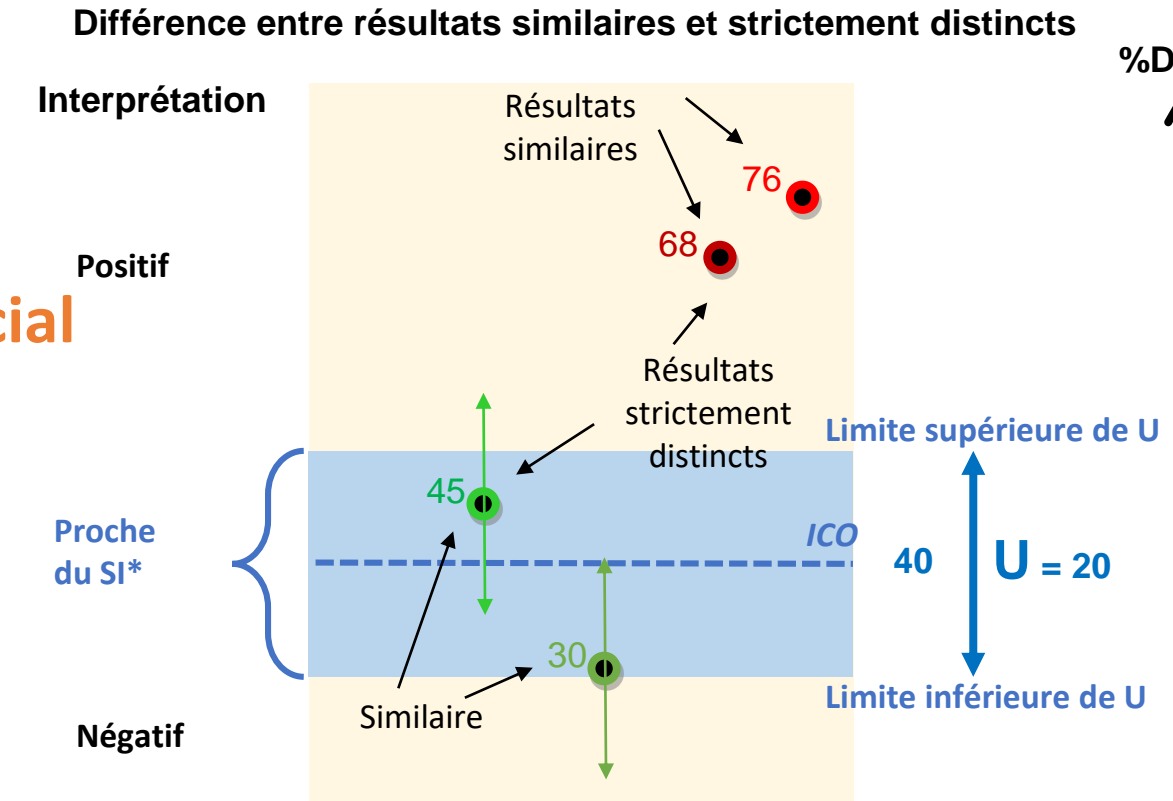
Notamment au SI

Justesse des valeurs

Incertitude de mesure

$U = 2 \times \text{Ecart-type} (k=2)$

Autres options : coefficient de variation (CV), intervalles de confiance, gammes



- ➔ Pour obtenir des interprétations diagnostiques fiables relatives au SI
- ➔ Pour différencier les résultats similaires et strictement distincts

Exemple pratique de l'importance de la calibration des méthodes qualitatives basées sur des mesures quantitatives

Interprétation qualitative : Un radar utilisé pour alerter "vitesse limite dépassée". Ces informations qualitatives dépendent de la mesure quantitative (justesse et fidélité dans la zone proche du seuil).

Décision au seuil : Un radar de contrôle de la vitesse des voitures est utilisé pour établir des amendes en cas de dépassement. Une marge de tolérance de ± 5 km/h est requise. Le conducteur est pénalisé si la limite supérieure est atteinte.

*Proche du SI est une expression utilisée par certains laboratoires de diagnostic et qui devrait être adoptée dans la prochaine version de la norme U47-019. [6]

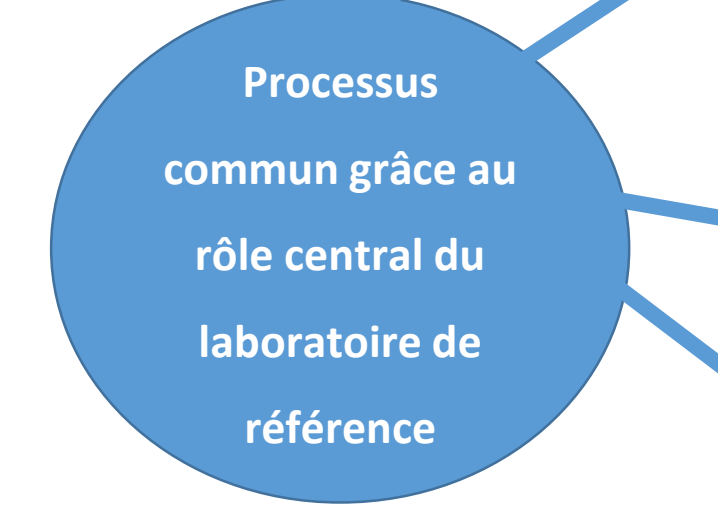
1 : proposer un schéma expérimental et un matériau de référence (MR) aux trois fournisseurs, afin d'évaluer les performances analytiques (justesse, répétabilité, reproductibilité) dans la zone du SI

Une procédure commune a été appliquée par chaque producteur de kit

Basé sur un MR commun (le même MR distribué aux labo utilisateurs)

Deux traceurs distincts préparés à partir du MR (deux dilutions sélectionnées dans la zone SI fixée par chaque producteur de kit) et testés selon un schéma expérimental commun

Pour chaque lot de chaque kit : 3 analyses indépendantes de 30 réplicats de chacun des 2 traceurs



Estimation de paramètres statistiques (calculs à partir d'un fichier Excel commun) et inscription sur le certificat de lot (format commun de présentation)

Moyenne (justesse)
Ecart-type de répétabilité (ET_R)
Inter-séries (ET_I)
Reproductibilité (ET_R, limites de $\pm 2xET_R$)
Coefficients de variation (CV)

Suivi des deux traceurs autour de la zone du SI (données indiquées sur le certificat de lot)

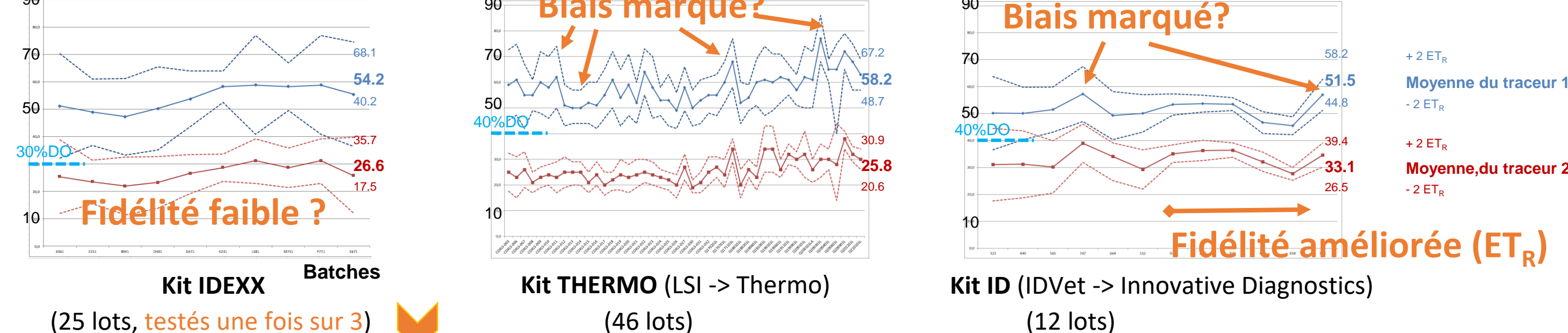
MRE dilution Niveau du MRE calibrant FQ	Titre	Low limit of 2 Standard Deviation Limite basse de 2 écart-types	High limit of 2 Standard Deviation Limite haute de 2 écart-types	Repeatability Répétabilité (%CV)	Reproducibility CV (% de fidélité inter-série (F))
1/2	54	43	65	8.3	10.3
1/4	24	18	30	8.4	13.0

Matériels et Méthodes

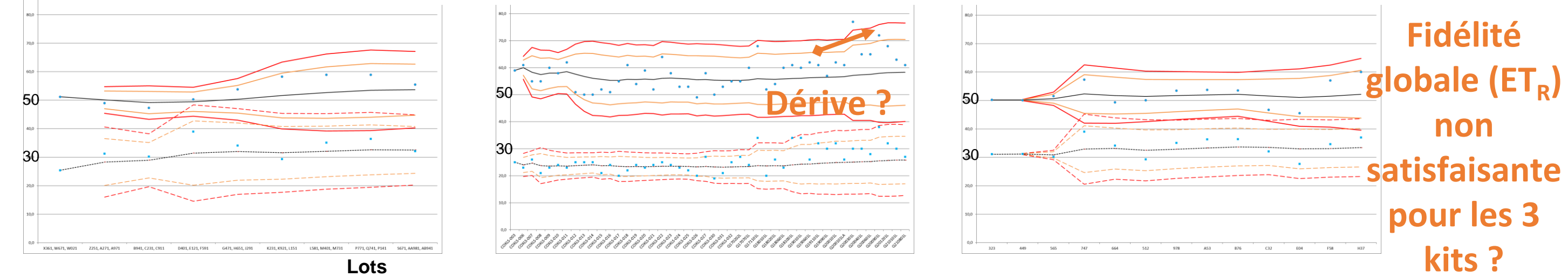
2 : réaliser une étude préliminaire, afin d'obtenir des données sur les paramètres de variabilité de lots successifs selon le plan d'expérience défini à l'étape 1

Deux représentations du suivi des données des certificats de lots depuis 2012

Moyennes des 2 niveaux de traceurs dans chaque essai de contrôle (incertitude de mesure calculée selon $U = 2 \times \text{Ecart-Type } ET_R$)



Moyennes cumulées des 2 niveaux dans chaque essai de contrôle (incertitude de mesure calculée selon $U = 2 \times \text{Ecart-Type } ET_R + \text{Biais}$)



Paramètres de variabilité estimés à partir de mesures, de deux niveaux de traceurs préparés d'un matériau de référence, avec tous les lots de chaque kit pendant 10 ans

3 : définir des critères de calibration pour contrôler la zone du SI pour chaque kit

Producteurs de kit (données des certificats de lots, cf. 1)

Labo utilisateur (traceur dans chaque série d'analyses du LNR depuis 2012)

Essais Inter-laboratoire d'aptitude en 2019 (focus sur la zone du SI)

Traceurs (2 par kit)	Paramètres	KIT IDEXX	KIT THERMO	KIT ID
MR 1:1	Moyenne (en %DO)	54,2	58,2	51,5
MR 1:2		26,6	25,8	33,1
MR 1:4				
MR 1:8				
MR 1:1	U	14,0	9,0	6,7
MR 1:2	(k=2)	9,1	5,2	6,3
MR 1:4				
MR 1:8				
MR 1:1	CV _R (en %)	11,4	7,6	7,2
MR 1:2		10,4	6,2	10,8
MR 1:4				
MR 1:8				
Nombre de lots		25	45	12
Nombre d'analyses		10	45	12

Traceurs (2 par kit)	Paramètres	KIT IDEXX	KIT THERMO	KIT ID
MR 1:1	Moyenne (en %DO)	54,3	55,9	55,2
MR 1:2		29,0	25,6	34,5
MR 1:4				
MR 1:8				
MR 1:1	U	17,1	13,8	14,1
MR 1:2	(k=2, +biais)	9,4	7,8	12,3
MR 1:4				
MR 1:8				
MR 1:1	CV _R (en %)	13,3	9,4	10,6
MR 1:2		12,9	10,7	13,2
MR 1:4				
MR 1:8				
Nombre de lots		9	21	9
Nombre d'analyses		193	407	199

Echantillons EILA	Paramètres	KIT IDEXX	KIT THERMO	KIT ID
E4	Moyenne (en %DO)	84,7	83,7	86,8
E8		55,7	35,5	63,4
E16		34,1	18,6	45,2
E32		20,3	9,0	31,6
E4	U	9,0	8,4	11,5
E8	(k=2, +biais)	10,1	7,8	10,3
E16		5,2	4,5	7,8
E32		5,2	3,1	5,6
E4	CV _R (calculés de résultats réduits)	10,6	13,6	13,2
E8		18,1	22,0	16,2
E16		15,2	23,1	17,3
E32		25,8	34,4	17,7
Nombre de lots		4	6	2
Nombre d'analyses		24	20	30

Deux sources de données : dilutions communes (1:1 à 1:8) du MR fourni pour calibration

Cohérence entre les deux sources de données (alors que les plans d'expériences intra-laboratoires sont différents)

Les résultats ont permis de proposer un processus de calibration pour chaque lot des 3 kits

Critères	IDEXX	THERMO	ID
Dilution du MR (zone du SI)	1 : 2	1 : 2	1 : 4
Choix d'un seul traceur			
Résultat attendu (valeurs de référence)	26 %DO	58 %DO	51 %DO
Limites basse et haute de contrôle	15 - 41 %DO	43 - 73 %DO	36 - 66 %DO
Incertitude de mesure ($U=2xET_R$)	± 15 %DO	± 15 %DO	± 15 %DO
CV _R (reproductibilité)	< 15 %	< 15 %	< 15 %
Plan expérimental	1 lot / 1 opérateur / 3 séances indépendantes / 24 réplicats par plaque (72 mesures)	1 lot / 1 opérateur / 3 séances indépendantes / 28 réplicats par plaque (84 mesures)	1 lot / 37 opérateur / 3 séances indépendantes / 28 réplicats par plaque (84 mesures)
SI fixé par le producteur du kit	30 - 40 %DO	40 %DO	40 - 50 %DO

Résultats

Conclusions et discussion

- ❖ Un processus commun a été défini pour standardiser les performances analytiques des trois méthodes ELISA, ce qui constitue une première étape vers l'harmonisation de leurs résultats.
- ❖ Le processus est à présent adopté par les trois fournisseurs des kits, il doit être suivi et ajusté si nécessaire.
- ❖ L'incertitude analytique connue et maintenue dans la zone du SI sera utile aux laboratoires utilisateurs pour fixer les modalités d'acceptation de chaque nouveau lot et pour établir une carte de contrôle unique inter-lots sur la base de la valeur assignée d'un traceur par kit (améliorer la validité interne des résultats ainsi que la qualité externe de l'EILA).
- ❖ Une fois ce processus standardisé pour chaque kit, l'étape suivante sera d'améliorer encore le taux de concordance entre les kits (hypothèse de travail tenant compte de l'espèce).

Références

- [1] Gache K, Rousset E, Perrin JB, DE Cremoux R, Hosteing S, Jourdain E, Guatteo R, Nicolle P, Touratier A, Calavas D, Sala C. Estimation of the frequency of Q fever in sheep, goat and cattle herds in France: results of a 3-year study of the seroprevalence of Q fever and excretion level of *Coxiella burnetii* in abortive episodes. Epidemiol Infect. 2017 Nov;145(15):3131-3142.
- [2] EFSA. Sidi-Boumedine K, Rousset E, Henning K, Ziller M, Niemczuck K, Roest HJ, Thiéry R. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. EFSA Support Publ. 2010;7:48E.
- [3] Lurier T, Rousset E, Gasqui P, Sala C, Claustre C, Abrial D, Dufour P, de Crémoux R, Gache K, Delignette-Muller ML, Ayrat F, Jourdain E. Evaluation using latent class models of the diagnostic performances of three ELISA tests commercialized for the serological diagnosis of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants. Vet Res. 2021 Apr 14;52(1):56.
- [4] Lurier T, Jourdain E, Ayrat F, Couesnon A, Rousset E. Performances des méthodes diagnostiques de la fièvre Q chez les ruminants domestiques : état de l'art et intérêt de l'activité de référence du LNR. Journées Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires. Bulletin des GTV 2022 615-632. accessible sur HAL
- [5] WOA. Ed. A. Colling & I.A. Gardner. Diagnostic test validation science. WOA Scientific and technical review. 2021 April; Vol.40 (1).
- [6] AFNOR. NF U47-019. Méthodes d'analyses en santé animale - Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA. Version en révision en 2023. (associée aux normes ISO 17025 et ISO 17043).

Remerciements et déclarations

Nous remercions tous les producteurs de kits pour leur collaboration responsable et leur confiance. Le laboratoire de référence pour la fièvre Q agit, seul ou en collaboration, avec le secteur commercial, lorsque cela est nécessaire, et en toute impartialité, pour s'assurer que les nouveaux tests sont correctement standardisés ou évalués afin de contribuer à l'amélioration continue des outils de diagnostic.