

# **RESTITUTION EIL-SARS-SCV-01**

ESSAI INTER-LABORATOIRES DE VALIDATION CONCERNANT LA  
QUANTIFICATION DE GÉNOME DU SARS-COV-2 PAR BIOLOGIE  
MOLÉCULAIRE (RT-PCR) DANS DES EAUX RÉSIDUAIRES BRUTES.

*Journée d'animation SARS-CoV-2 et eaux résiduaires du 30 mars 2023*

## *Consignes pour la réunion :*

- *Ne pas utiliser la vidéo*
- *Couper son micro*
- *Privilégier les questions en fin de présentation*
- *Si nombreuses interventions demander la parole via le chat*
- *Donner son nom lorsque prise de parole / préciser le N° de diapositive le cas échéant*

## **PLAN DE LA PRESENTATION**

### **SOMMAIRE**

- 1 – CONTEXTE
- 2 – OBJECTIF DE L'EIL
- 3 – METHODES D'ANALYSES COUVERTES PAR L'EIL
- 4 – CIBLES RETENUES POUR L'AMPLIFICATION
- 5 – NATURE DES ECHANTILLONS, HOMOGENEITE ET STABILITE
- 6 – PRATIQUES ANALYTIQUES DES PARTICIPANTS
- 7 – ETUDE DE LA VALIDITE DES DONNEES
- 8 – ANALYSE DES DONNEES
- 9 – PROCHAIN EILA

## DES PROJETS DE NORMES EN COURS

### QUELS SONT-ILS ?

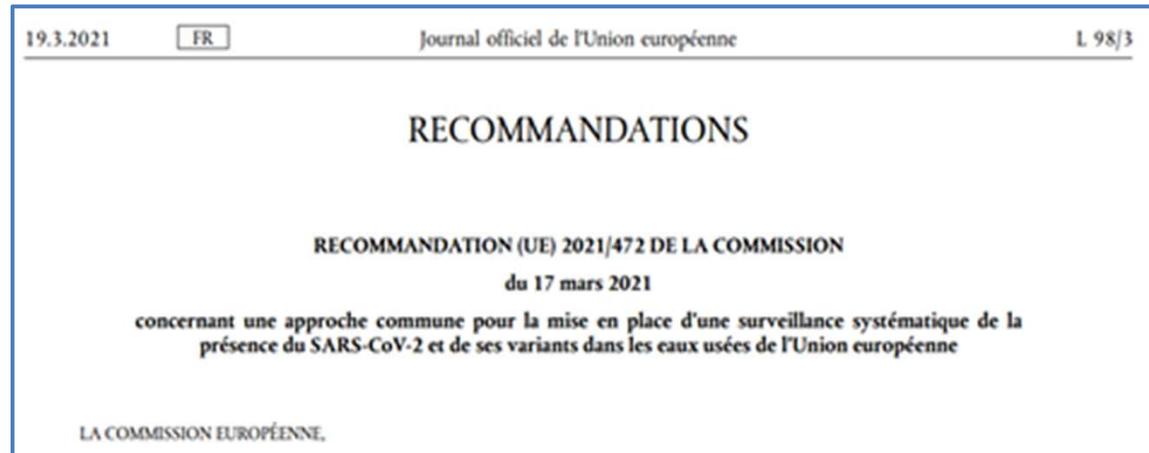
Organisation	Référence	Titre
AFNOR 	<b>XP T90-804</b>	Echantillonnage et/ou détection et quantification de virus dont le SARS-Cov-2 dans les eaux usées par qPCR.
ISO 	<b>ISO/WD 7014</b>	Water quality — General Requirements for the Surveillance Detection of SARS-CoV-2 and its variants in wastewater

Concernant la norme ISO, l'Allemagne et la France sont associées pour le pilotage du projet de norme. Peu d'avancement depuis septembre 2022.

Concernant le projet de norme AFNOR, les derniers avancements de fin d'année 2022 concernent un élargissement du périmètre au-delà du suivi du SARS-CoV-2.

**DANS LES DEUX CAS, L'OBJECTIF EST DE PRODUIRE DES DOCUMENTS QUI PORTERONT DES EXIGENCES GÉNÉRALES ET DES OBJECTIFS DE PERFORMANCE.**

## POUR REpondre A UN BESOIN REgLEMENTAIRE

**CONTEXTE**


### Extraits du courrier de la DGS à l'AFNOR lors de la mise en place des travaux de normalisation.

Aussi, j'accueille favorablement la proposition de l'AFNOR pour la mise en place d'un groupe d'experts représentatif de l'ensemble des acteurs membres des commissions T90 « microbiologie des eaux » et T91E « Eaux - échantillonnage et conservation », afin de travailler à la normalisation des techniques d'échantillonnage et d'analyses du génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes. Les travaux de ce groupe d'experts devront permettre de proposer un protocole consensuel et adopté par tous.

Par ailleurs, dans la mesure où nombre de travaux sont ou pourraient être en cours au niveau européen, il apparaît également nécessaire de les prendre en compte. En ce sens, les éléments techniques en annexe de la recommandation UE 2021/472, ainsi que les travaux du Comité européen de normalisation (CEN) et du Joint Research Centre (JRC) serviront les travaux du groupe d'experts.

## QUELLES ORIENTATIONS ?

Au niveau français,

le projet AFNOR XP T90-804 ..

### NORME DE PERFORMANCES :

«Le présent document décrit des **exigences méthodologiques générales** et des **exigences d'évaluation des performances**, ainsi que les contrôles qualité requis pour la détection et quantification de séquences d'acides nucléiques (ADN ou ARN) de virus par concentration et amplification génique par des méthodes de réaction de polymérisation en chaîne (PCR), comme la **PCR quantitative**, la **RT-PCR** et la **digitale PCR**, dans tous les types d'eaux usées. »

### NOMBRE DE CIBLES :

- (i) « **Il est recommandé de disposer de deux régions cibles** compte-tenu de la diversité de SARS-CoV-2 et de l'émergence de nouveaux variants »
- (ii) « **Le choix de amorces et sondes peut être imposé par une réglementation nationale** »

### EXPRESSION DES RESULTATS :

« Les résultats sont exprimés en **nombre d'unités génome de virus par litre d'échantillon** »

### NORMES DE REFERENCE CITEES DANS LE PROJET XP T90-804 (performance des méthodes d'amplification) :

- (i) ISO/TS 16 099
- (ii) ISO 20 395



# APPORT D’INFORMATIONS AU GROUPE D’EXPERTS AFNOR

**OBJECTIFS**



ANFOR norm'info Recherche : mot clé, sujet, n° norme

Accédez aux tutoriels Identifiez-vous

< Retour SUIVRE

**EN CONCEPTION**

Qualité de l'eau : Echantillonnage et/ou Détection et quantification du SARS-Cov-2 dans les eaux usées par concentration et amplification génique, par reverse transcription et réaction de polymérisation en chaîne (RT qPCR), ou par Digital PCR.  
PR XP T90-804

Suivi par la commission : Microbiologie des eaux

Origine des travaux : Française

Type : Expérimentale

Motif : Nouveau document

Je veux en savoir plus

Vie de la norme

Norme En conception	Norme Enquête publique	Norme Publiée	Norme En réexamen
Inscrite le : 08/10/2021		Prévue le : 30/10/2023	

Prise en compte des éléments normatifs déjà disponibles au niveau de l’EIL

RAPPORTS ET FACTURATION	
Rapport général EILA	Le rapport final fera le bilan de la campagne de cet EIL. Les données seront traitées de manière confidentielle. La liste des participants ne sera pas publique. Les données seront exploitées à des fins d'évaluation méthodologique en lien avec les ministères de tutelles du LNR et la commission de normalisation AFNOR. Le rapport sera mis à disposition sous l'application LEILA (un courriel vous sera automatiquement envoyé pour avertir de la mise à disposition de ce rapport).
Résultats individuels	Une conclusion nominative sera communiquée à chacun des participants.

**MISE EN PLACE DE L’EIL POUR ALIMENTER LES TRAVAUX DE L’AFNOR : OBSERVATION DES PRATIQUES ANALYTIQUES ET SI POSSIBLE EVALUATION PRELIMINAIRE DES PERFORMANCES ASSOCIEES AUX DIFFERENTES METHODES**

# METHODES D’ANALYSE EVALUEES PENDANT L’EIL

METHODE ANALYTIQUE

Anses – Laboratoire d’Hydrologie de Nancy Laboratoire National de Référence pour la surveillance du SARS-CoV-2 dans les eaux usées et les boues de stations d’épuration	<a href="#">Fiche de présentation des EIL</a>	2022_SCV_1	Version 01	Page 1/2
--	---	------------	------------	----------



## Fiche de présentation des EIL

Les rubriques proposées ci-dessous sont non exhaustives.

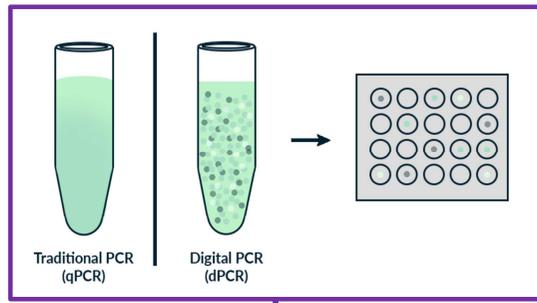
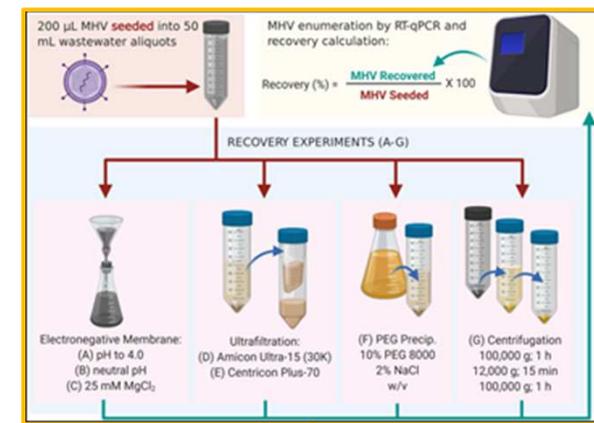
<b>Campagne</b>	Quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les eaux résiduaires.	<b>Année</b>	2022
-----------------	---	--------------	------

**Objectifs** Cet EIL est organisé dans le cadre des activités du laboratoire National de Référence (LNR) pour la surveillance du SARS-CoV-2 dans les eaux usées et les boues de station d’épuration.  
Il concerne la quantification de génome de SARS-CoV-2 selon la méthode de RT-qPCR ou de RT-dPCR.

**Il ne s’agit pas d’un essai d’aptitude mais d’une première évaluation des méthodes utilisées par les participants à partir d’échantillons d’eau résiduaire naturellement contaminée.**

EIL ORGANISÉS			
Agent	Méthode	Matrice	Code EILA
Génome de SARS-CoV-2 : cible portée par le gène E et une autre cible au choix du laboratoire.	RT-qPCR ou RT-dPCR	Eaux usées naturellement contaminées	2022_SCV_1

Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. Ahmed et al., 2020.



**Evaluation de méthodes (et non aptitude) :**

- Méthodes de préparation et de concentration laissées au libre choix des participants
- Méthodes d’amplification : RT-qPCR et RT-dPCR

## QUELLE STRATEGIE DE QUANTIFICATION : CIBLE E PRIORITAIRE

CIBLES

INFORMATIONS PARTICULIÈRES	
Cet EIL s’adresse tout particulièrement aux laboratoires d’analyses ayant préalablement indiqué leur souhait de participer à des EILs lors de l’enquête en ligne menée par le LHN en juin 2021. Les laboratoires d’analyses qui disposent d’une méthode analytique éprouvée pour la quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les eaux usées peuvent également adresser leur demande de participation à l’adresse de messagerie suivante : <a href="mailto:lnrsarscov2@anses.fr">lnrsarscov2@anses.fr</a>	
Protocole/Méthode	<p>La méthode à mettre en œuvre pour cet EIL n’est pas imposée mais devra permettre une quantification du génome de SARS-CoV-2 soit par une méthode de RT-PCR quantitative (RT-qPCR) soit par une méthode de RT-PCR digitale (RT-dPCR).</p> <p>Des résultats de quantification sont attendus pour au moins deux cibles incluant prioritairement une cible portée par le gène E et une autre cible au choix du laboratoire. Le résultat devra être exprimé en UG/l.</p>
Engagement du participant	<p>Le laboratoire s’engage à ne pas mettre en place de collusion entre les participants ou une falsification des résultats.</p> <p>Le participant s’engage à ne pas utiliser les résultats à des fins commerciales.</p> <p>Toute inscription vaut pour accord implicite de l’exploitation des données à des fins d’évaluation méthodologique en lien avec les ministères de tutelles du LNR et la commission de normalisation AFNOR.</p>

### OBJECTIF DE COMPARAISON DES RÉSULTATS DE QUANTIFICATION À PARTIR D’UNE MÊME CIBLE :

- **Cible E :**  
CIBLE COMMUNE DE QUANTIFICATION
- **Sde cible,** au choix du laboratoire :  
CIBLE DE CONFIRMATION

Prise en compte de deux cibles dont la cible E (sarbeco) :

- stratégie basée sur celle proposée par les équipes de «Charité-Universitätsmedizin Berlin Institute of Virology » (1),
- reprise par l’OMS (2),
- encouragée par les données collectées pendant l’enquête menée par le LHN en 2021
- ainsi que par l’historique des données déjà disponibles

**SARS-CoV-2 :**  
Genre : Betacoronavirus  
Sous genre : **Sarbecovirus**  
Famille : Coronaviridae

- (1) Corman, V.M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D.K.; Bleicker, T.; Brunink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M.L.; et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-ncov) by real-time RT-PCR. Eurosurveill. Bull. Eur. Mal. Transmissibles Eur. Commun. Dis. Bull. 2020, 25, 2000045.
- (2) World Health Organization. Coronavirus Disease (Covid-19) Technical Guidance: Laboratory Testing for 2019-Ncov in Humans.

## QUELLE STRATEGIE DE QUANTIFICATION : CIBLE E PRIORITAIRE

**CIBLES**

### Les arguments au niveau français :

(COD). The results of the quantification (in number of genome unit per liter) and other related data were then processed by mathematical tools. RT-qPCR or RT-dPCR were performed on the E and RdRp genes, the former being routinely used to compute the WWI and the latter being used for validation purpose. Notably, RdRp quantification was used to confirm E quantification when outliers were detected on the E gene and as a motive to double check those values by performing the quantification process a second time.

Obépine



Enquête LHN

 1  
2

Effectif	26	
<b>E</b>	23	88%
RdRp	18	69%
N1	12	46%
N2	7	27%
ORF1ab	7	27%
S	2	8%

OMS, Corman

Inst. Pasteur

CDC

Depuis 2020

Utilisation de la cible E de manière prioritaire dans la surveillance des eaux usées depuis 2020.

Constat 2021

Cible E = la plus représentée parmi les laboratoires ayant répondu à l'enquête du LHN de 2021.

Depuis 2022

Utilisation de la cible E de manière prioritaire dans la phase transitoire de surveillance mise en place depuis juillet 2022

**PHASE TRANSITOIRE DE SURVEILLANCE :**  
**12 STEU SUIVIES PAR LE LHN ET SPF**

XP T 90-804 :

« **Le choix de amorces et sondes peut être imposé par une réglementation nationale** »



## NATURE DES ECHANTILLONS UTILISES PENDANT L’ESSAI

**ECHANTILLONS**

**ARN SYNTHÉTIQUE STABILISÉ :**

Solution commerciale, choisie car

- **niveau de concentration** adaptée sans besoin de dilution : 200 copies/ $\mu$ l d’extrait.
- large spectre de cibles disponibles non bloquant pour le libre choix de la seconde cible : cible **E** mais également **N, ORF1ab, RdRP (IP2 et IP4) et S**.
- **stabilité** sur un temps limité à 5°C et sur une longue durée pour des températures < à -20°C.



70  $\mu$ l par tube

**EAU USÉE BRUTE N°1 :** prélèvement unique issu d’une STEU urbaine conservé à 5+/-3°C dans l’attente de son utilisation pour l’EIL. **Echantillon naturellement contaminé.**



Environ 100 ml par flacon

4 codes flacons différents

**EAU USÉE BRUTE N°2 :** Echantillon composite issus du mélange de plusieurs échantillons tous issus d’une même STEU urbaine et conservés à 5+/-3°C dans l’attente de leur utilisation pour l’EIL. **Echantillon naturellement contaminé.**



En mg/l	DBO <sub>5</sub>	DCO	MES	Azote NTK	Azote ammoniacal
Eau usée brute n°1	110	280	140	47,6	28,3
Eau usée brute n°2	140	392	96	96,5	72,5

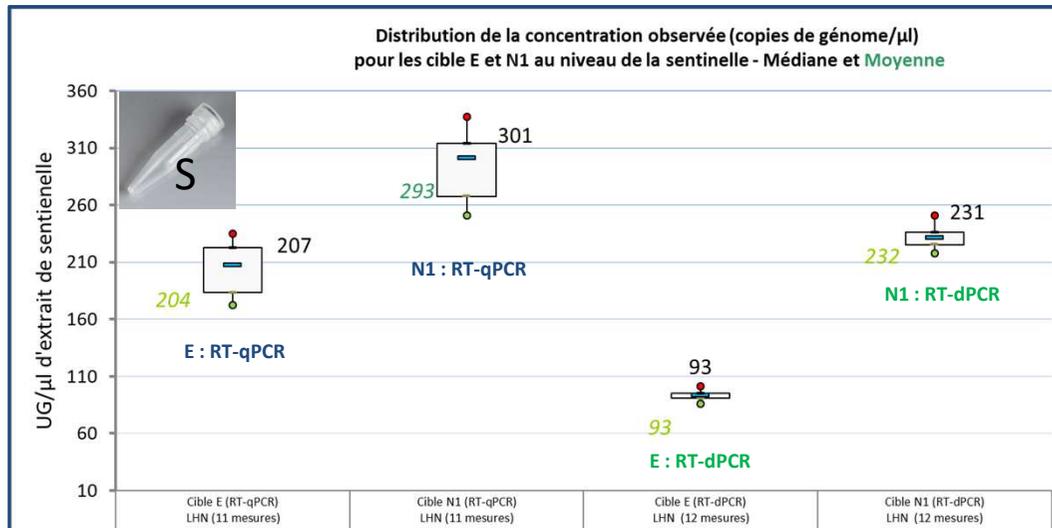
*Eau usée plutôt « faiblement chargée »*

*Charge en N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> plutôt élevée*

# HOMOGÉNÉITÉ DE LA SENTINELLE

## Préparation :

Plusieurs tubes d’un même lot commercial de sentinelle ont été rassemblés et homogénéisés puis distribués en microtubes à raison de 70 µl.



## Vérification de l’homogénéité :

- 6 tubes\* avec 2 mesures pour chacun
- mesures réalisées en **RT-qPCR (côté gauche)** et (**en RT-dPCR côté droit**)

\*Réalisation d’un nombre limité de mesures du fait des coûts associés au matériau et du fait de la bonne connaissance de ce matériel par le LHN.

**Valeur annoncée par le fournisseur :** environ 200 copies /µl quelle que soit la cible.

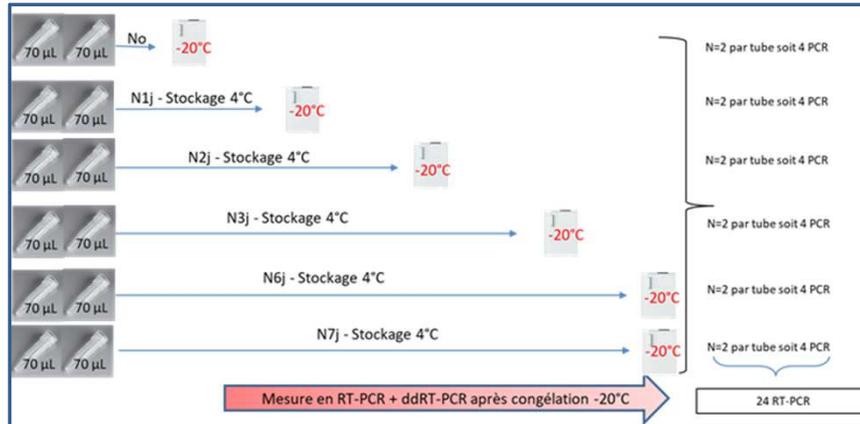
### Décalage entre les deux méthodes :

- Pour les deux méthodes :  $E < N1$
- plus marqué pour la cible E que pour la cible N1.

\* La quantification obtenue par RT-qPCR s’appuie sur une gamme étalon calibrée à partir de la concentration annoncée par le fournisseur (200 copies/µl) et non sur les concentrations déterminées par RT-dPCR.

## STABILITÉ DE LA SENTINELLE

Plan de suivi de la stabilité



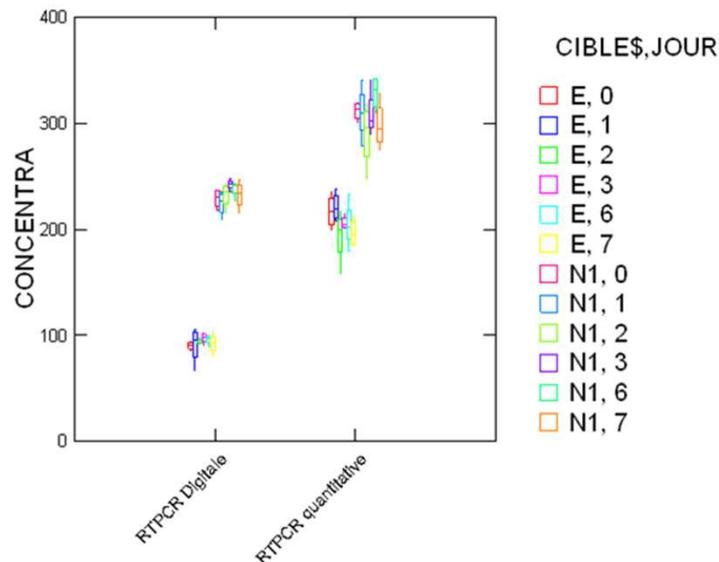
Test de stabilité dans la configuration de l'essai :

- **maintien à 5°C pendant 1 à 7 jours**
- **puis congélation à -20°C\***
- **et analyse.**

\* Un essai complémentaire a été réalisé avec une congélation à -80°C sur un nombre plus restreint de jours à savoir  $J_0$  et  $J_7$ , au cas où cette température aurait été employée par un laboratoire en remplacement de la congélation à -20°C.

### L'analyse statistique :

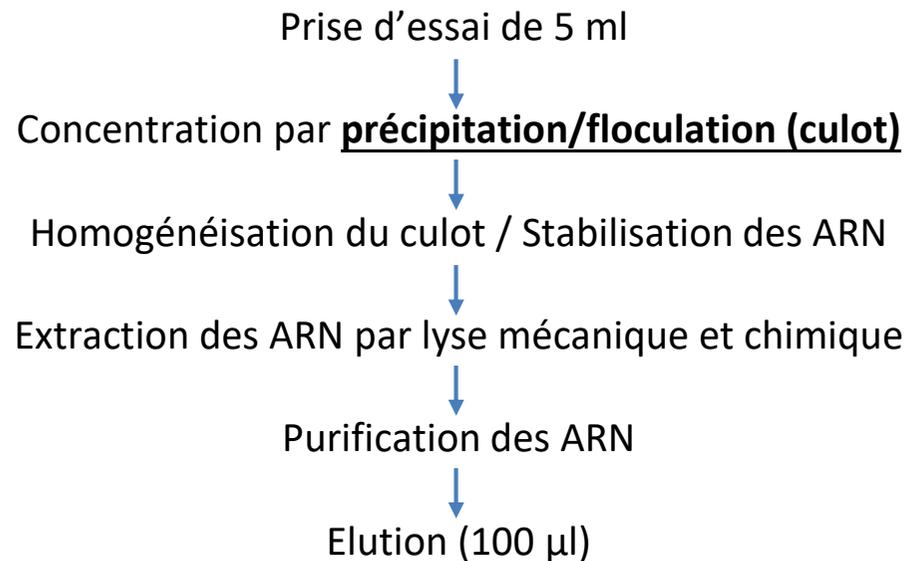
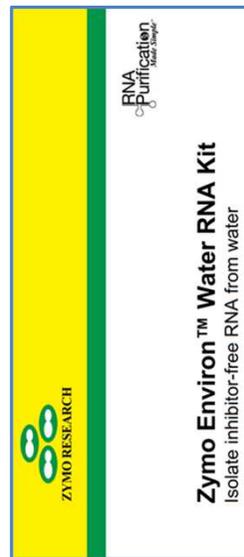
- recherche de mise en évidence de tendances révélant l'existence d'une pente pouvant être déterminée par une **analyse de régression linéaire**.
- analyse par température (-20°C, -80°C), par jour, par méthode (RT-qPCR et RT-dPCR) et par cible (E, N1).



	Sentinelle
<b>Homogénéité</b>	Oui
<b>Stabilité à 5°C incluant une étape de congélation à -20°C</b>	Stable sur 7 jours
<b>Stabilité à 5°C incluant une étape de congélation à -80°C</b>	Stable sur 7 jours

## HOMOGENEITE ET STABILITE DES ECHANTILLONS A ET B

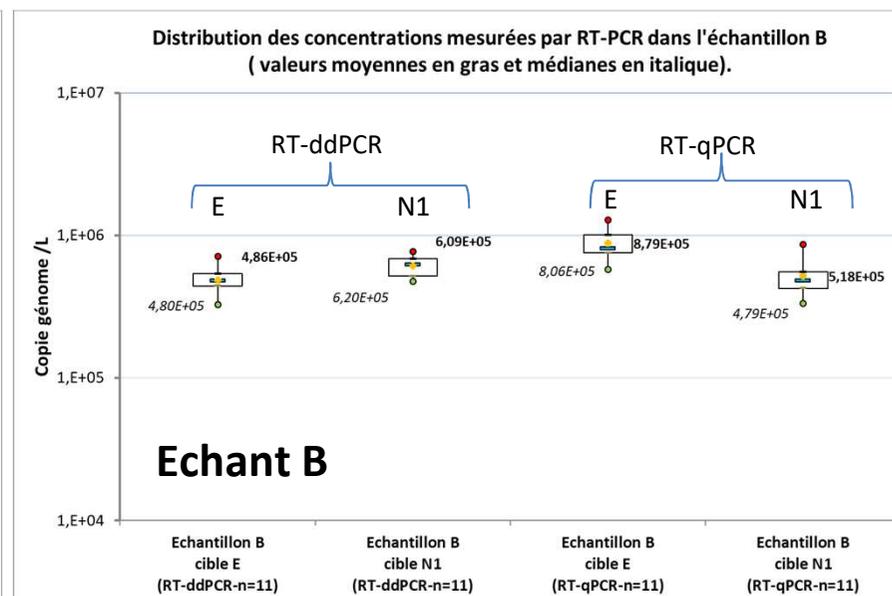
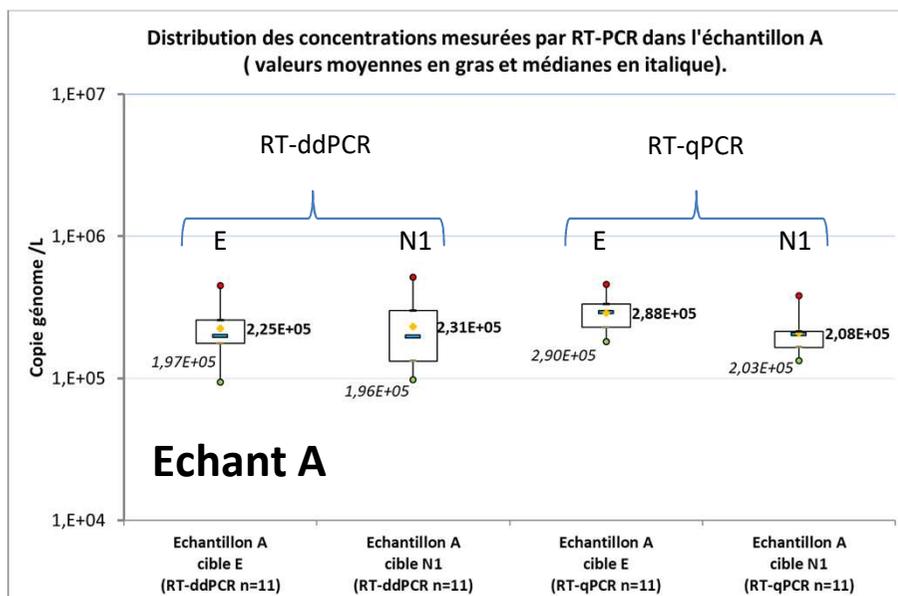
Méthode d’analyse utilisée par le LHN pour déterminer les mesures obtenues dans le cadre de la vérification de l’homogénéité et de la stabilité des échantillons :



### Préparation des échantillons A et B :

- Lors de la phase de préparation des échantillons, des flacons ont été prélevés aléatoirement afin de constituer un ensemble destiné à vérifier l’homogénéité ainsi que la stabilité à 5+/-3°C après 1, 2, 3, 4 et 7 jours.
- La stabilité des échantillons après une exposition à 22+/-2°C pendant 2, 4, 8 et 24 h a également été évaluée.

# HOMOGENEITE DES ECHANTILLONS A ET B



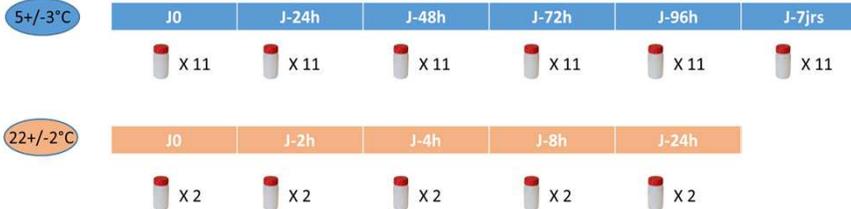
Cible E UG/I	Echantillon A			Echantillon B		
	RT-ddPCR	RT-qPCR	Ratio	RT-ddPCR	RT-qPCR	Ratio
Médiane	1,97.10 <sup>e5</sup>	2,90.10 <sup>e5</sup>	1,47	4,80.10 <sup>e5</sup>	8,06.10 <sup>e5</sup>	1,68
Moyenne	2,25.10 <sup>e5</sup>	2,88.10 <sup>e5</sup>	1,28	4,86.10 <sup>e5</sup>	8,79.10 <sup>e5</sup>	1,81
CV%	43%	30%	/	22%	24%	/

[Echantillon B] >> [Echantillon A]

Echantillon B, 2 à 3 fois plus concentré que l'échantillon A

Ratio entre RT-ddPCR et RT-qPCR sur les données du LHN < 2

## STABILITE DES ECHANTILLONS A ET B

 Plan de suivi  
de la stabilité


Test de stabilité dans la configuration de l'essai :

- **maintien à 5°C\* pendant 1, 2, 3, 4 et 7 jours**

\* Un essai complémentaire a été réalisé afin d'étudier la stabilité des échantillons conservés à température ambiante (20°C) pendant 2, 4, 8 et 24 H.

### L'analyse statistique :

(i) Recherche de mise en évidence de tendances révélant l'existence d'une pente pouvant être déterminée par une **analyse de régression linéaire**. Analyse par

- échantillon : A et B,
- température : 5°C et 20°C,
- durée (en jours ou en heures),
- méthode : RT-qPCR et RT-dPCR
- cible (E, N1).

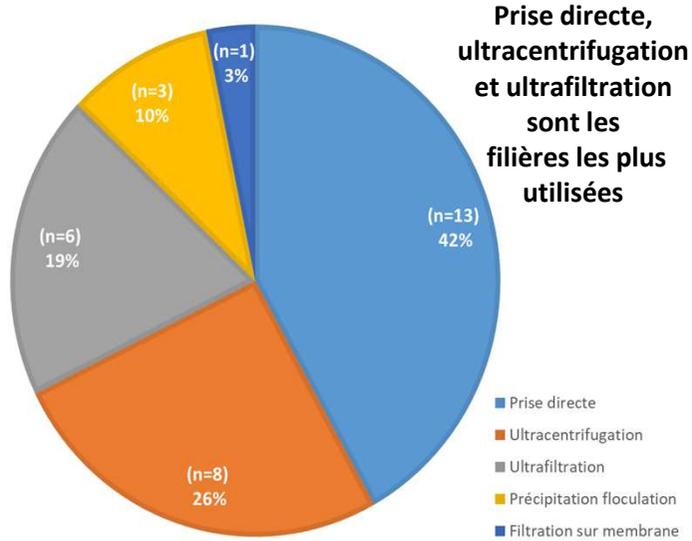
(ii) **ANOVA à deux facteurs** (durée, répétition) avec interactions pour vérifier l'absence d'impact sur les moyennes.

	Echantillon A	Echantillon B
<b>Homogénéité</b>	Oui	Oui
<b>Stabilité à 5°C</b>	Stable sur 4 jours	Stable sur 7 jours
<b>Stabilité après 24h à température ambiante.</b>	Stable	
	Bonne cohérence de la RT-qPCR et de la RT-ddPCR pour N1 et variabilité plus grande pour la cible E. Décalage entre RT-qPCR et RT-dPCR plus important avec la cible E (décalage de gamme).	

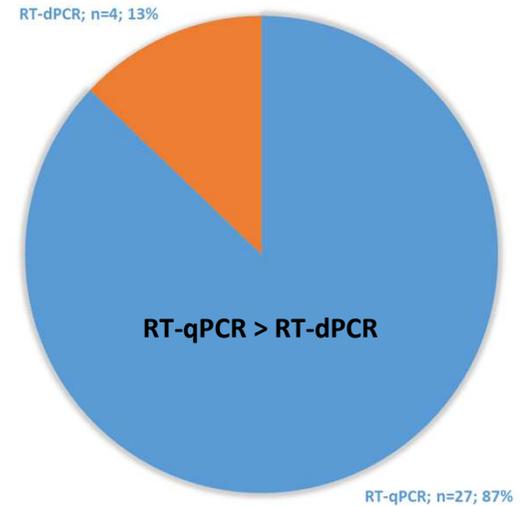
# PRATIQUES ANALYTIQUES OBSERVÉES PARMI LES PARTICIPANTS

PRATIQUES ANALYTIQUES

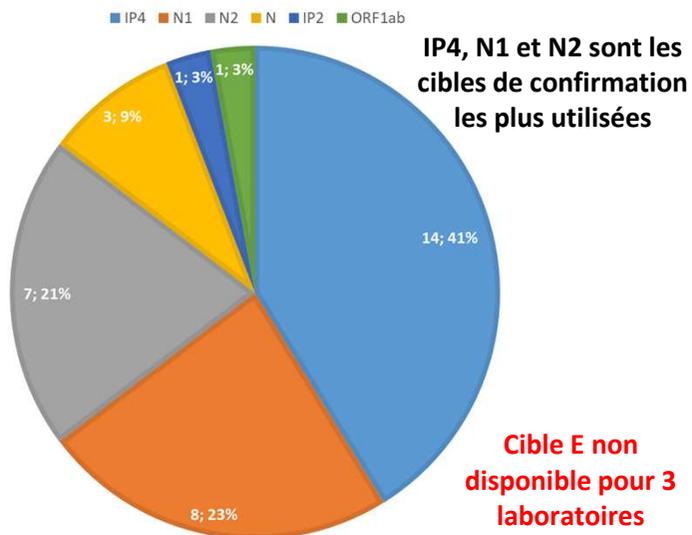
RÉPARTITION DES DIFFÉRENTES FILIÈRES UTILISÉES PARMI LES PARTICIPANTS



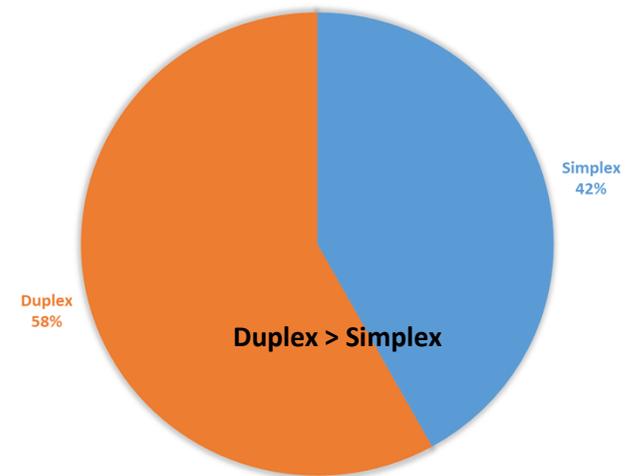
METHODE D'AMPLIFICATION UTILISÉE



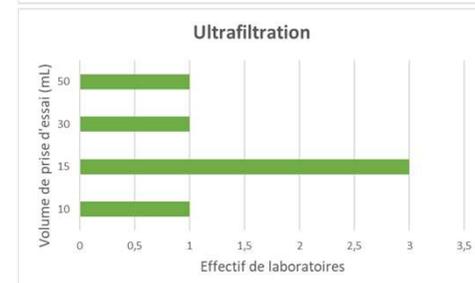
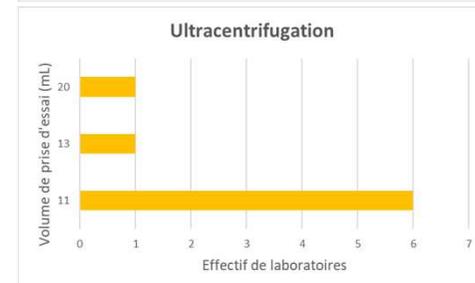
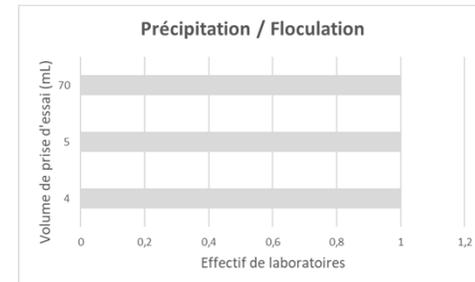
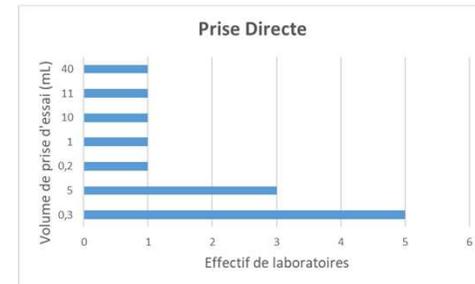
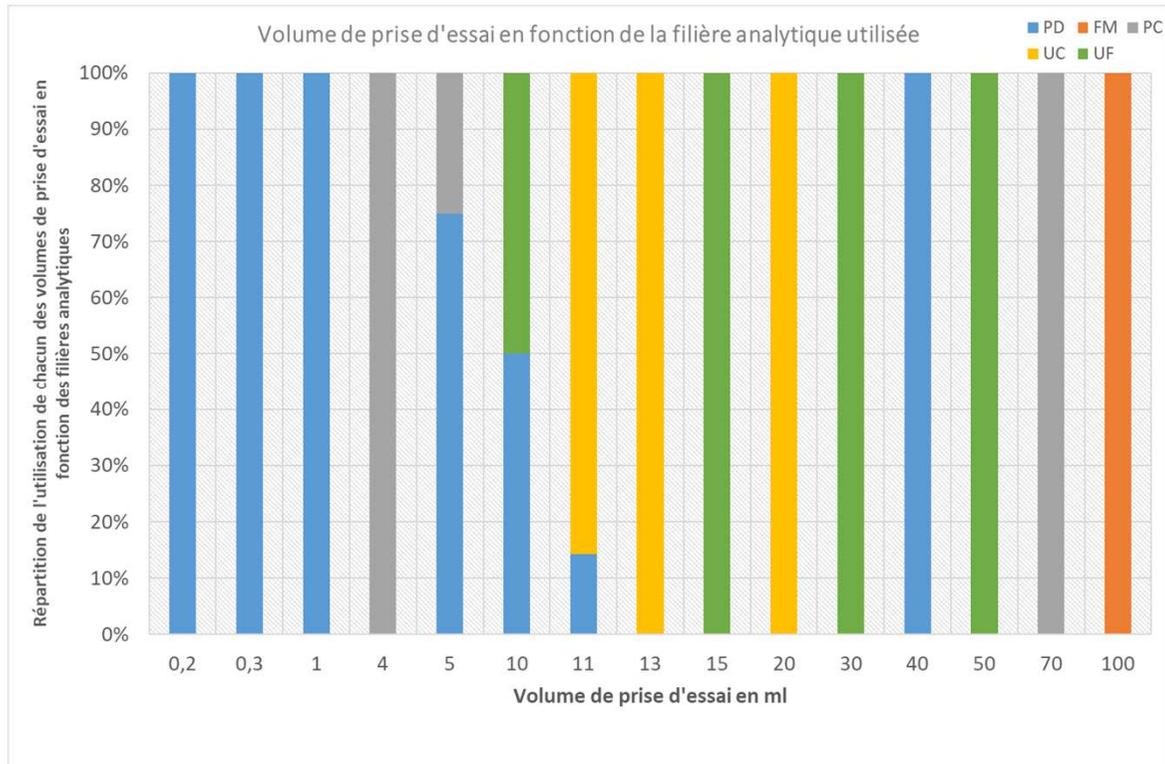
CIBLES AUTRE QUE E UTILISÉES AU COURS DE L'EIL



PROPORTION DE PCR DUPLEX



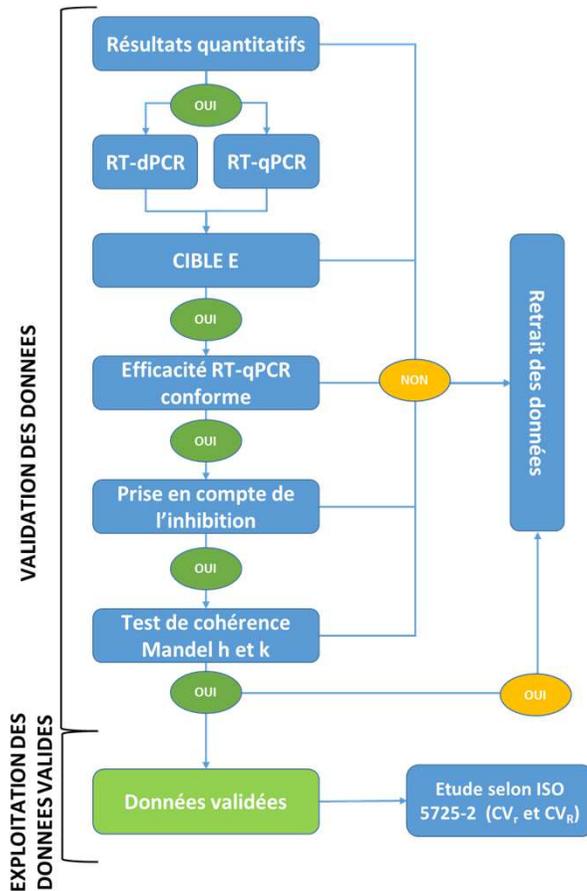
## PRATIQUES ANALYTIQUES OBSERVÉES PARMI LES PARTICIPANTS



Volume prise d'essai (ml)	Volumes utilisés	Commentaires
Prise directe (n= 13) (absence d'étape de concentration)	De 0,2 à 40 ml	Volume le plus fréquent : 300 µl et 5 ml. Méthode qui conduit à l'utilisation des plus faibles volumes de prise d'essai
Précipitation/flocculation (n=3)	De 4 à 70 ml	/
Ultracentrifugation (n=8)	De 11 à 20 ml	Essentiellement 11 ml
Ultrafiltration (n=6)	De 10 à 50 ml	Essentiellement 15 ml
Filtration membranaire (n=1)	100 ml	100 ml

# PROCESSUS DE VALIDATION DES DONNEES COLLECTEES

Nombre de données attendues : 620 résultats réparties sur 31 laboratoires réalisant 2 mesures sur 2 cibles différentes pour 5 échantillons : S, A1, A2, B1, B2.



Critères d'exclusion	Laboratoires concernés	Nombre de mesures retirées	Commentaires
Données non quantifiées	6	16	59 Seule la sentinelle a permis d'obtenir des valeurs quantifiées PCR uniquement qualitative Quantification < LQ pour certaines mesures sur A1, B1 et B2 1 seule mesure (pas de réplicat) pour S, A1, A2, B1 et B2 1 mesure non détectée pour A2 1 seule mesure (pas de réplicat) pour S Absence de détection pour les mesures réalisées sur A2
	8	20	
	10	6	
	11	10	
	27	1	
	29	2	
	31	4	
Absence de mesure pour la cible E	2	20	54 Retrait de l'ensemble des mesures restantes pour ces laboratoires.
	10	14	
	26	20	
Critère d'efficacité de RT-PCR pour l'amplification de la cible E	6	4	4 Pente > à -2,839
Non prise en compte de l'inhibition des extraits (absence de dilution)	/	0	0 Les extraits identifiés comme inhibiteurs ont tous été dilués avant analyse
Test de cohérence intra et interlaboratoires : test de Mandel h et k.	11	10	106 Une seule mesure réalisée par le laboratoire (et non deux comme attendu) La concentration déterminée pour la sentinelle s'écarte significativement des concentrations observées par les autres laboratoires Les concentrations déterminées pour les échantillons A et B s'écartent significativement des concentrations observées par les autres laboratoires La concentration déterminée pour l'échantillon A s'écarte significativement des concentrations observées par les autres laboratoires. La concentration déterminée pour l'échantillon B s'écarte significativement des concentrations observées par les autres laboratoires.
	5	20	
	31	16	
	3	20	
	15	20	
	16	20	

**Nombre de données validées : 397 mesures**

**Nombre de données manquantes ou écartées du panel : 223 mesures**

Laboratoires	Filière analytique	Type de PCR	Délai de réception	Début d'analyse	Exposition <0°C	Exposition >8°C	Disponibilité cible E	Données non quantifiées	Valeur aberrante	Commentaires
2	PD	RT-qPCR								
10	UF	RT-qPCR								
26	UF	RT-dPCR								
6	FM	RT-qPCR								Seule la sentinelle a été quantifiée
8	PD	RT-qPCR				>8°C				PCR uniquement qualitative
11	UC	RT-qPCR	J+2							Absence de réplcats
5	PD	RT-qPCR				>8°C			S	
31	UC	RT-qPCR				>8°C			S	
3	PD	RT-qPCR							A et B	
15	PD	RT-qPCR	J+2			>8°C			A	
16	PC	RT-qPCR			<0°C				B	
1	UF	RT-qPCR								
4	UC	RT-qPCR								
7	UC	RT-qPCR								
9	PC	RT-qPCR								
12	PD	RT-qPCR								
13	UC	RT-qPCR				>8°C				
14	UF	RT-qPCR								
17	PD	RT-qPCR			<0°C	>8°C				
18	PD	RT-qPCR		J-1						
19	PC	RT-dPCR								
20	UC	RT-qPCR				>8°C				
21	UF	RT-dPCR								
22	PD	RT-qPCR				>8°C				
23	PD	RT-qPCR								
24	PD	RT-qPCR								
25	PD	RT-qPCR								
27	UC	RT-qPCR				>8°C				
28	PD	RT-dPCR				>8°C				
29	UF	RT-qPCR		J-1						1 seule mesure pour S
30	UC	RT-qPCR		J-1		>8°C				

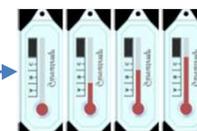
Stabilité des échantillons à 5+/-3°C, et à temp. ambiante sur une période 24h.

	Echantillon A	Echantillon B
Homogénéité	Oui	Oui
Stabilité à 5°C	Stable sur 4 jours	Stable sur 7 jours
Stabilité après 24h à température ambiante.	Stable	
Bonne cohérence de la RT-qPCR et de la RT-ddPCR pour N1 et variabilité plus grande pour la cible E. Décalage entre RT-qPCR et RT-dPCR plus important avec la cible E (décalage de gamme).		

Maintien des laboratoires ayant déclarés des non conformités de température.

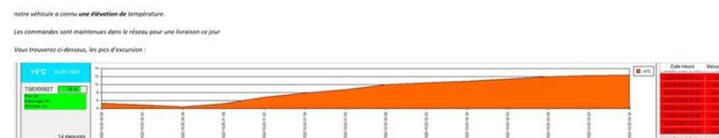
### Suivi de la température

Nature de l'écart : exposition à une température	Participants impactés	
	Nombre	% par rapport au nombre total de participants (n = 31)
- inférieure à 0°C pendant au moins 2 h	2	6,4%
- supérieure à 8°C pendant au moins 1 h	12	38,7%



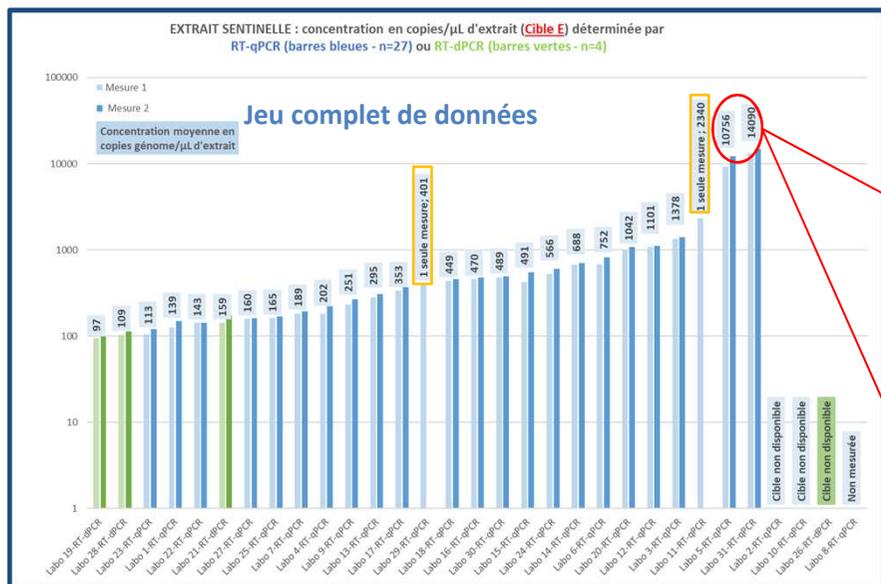
Indicateur de suivi utilisé parfaitement

Transport en froid dirigé 5+/-3°C avec des rapports d'alerte en cas d'anomalie

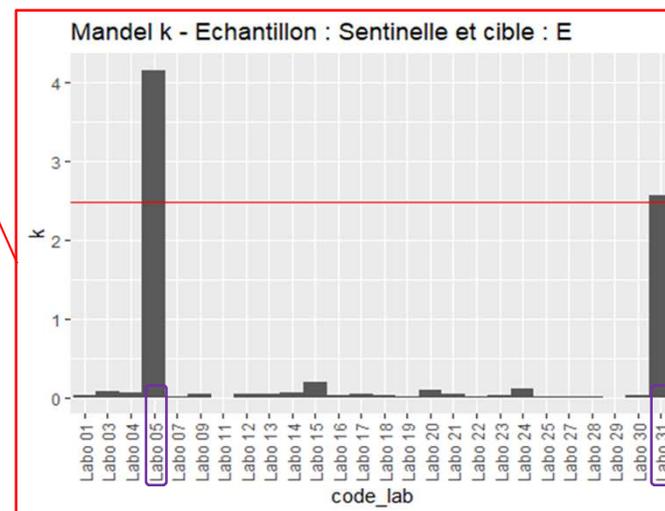
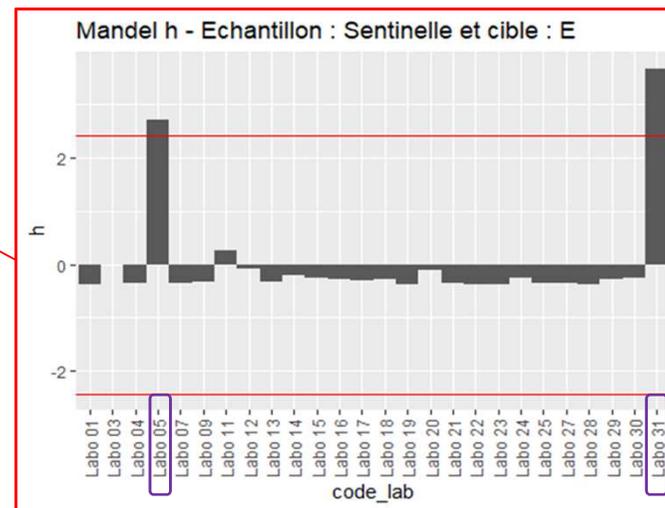


# DONNEES BRUTES SENTINELLE

SELECTION DES DONNEES

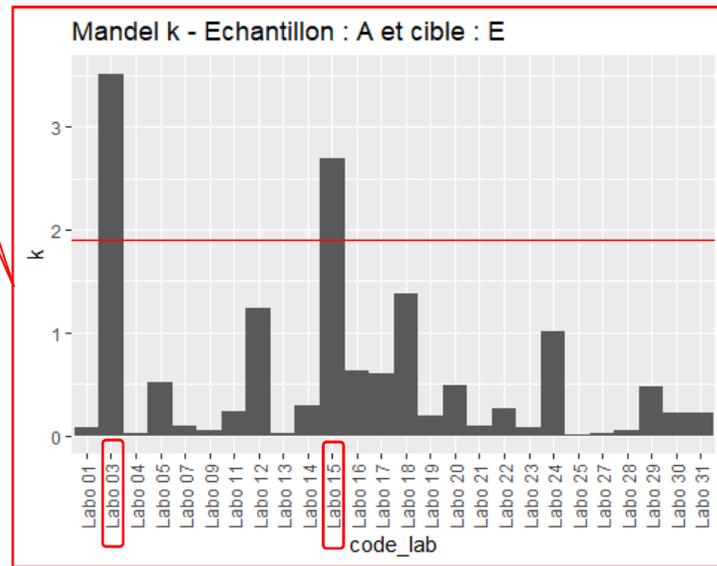
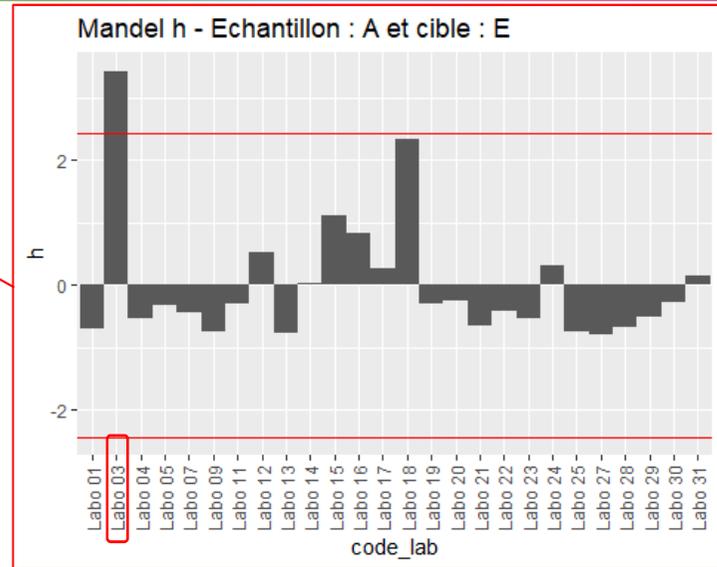
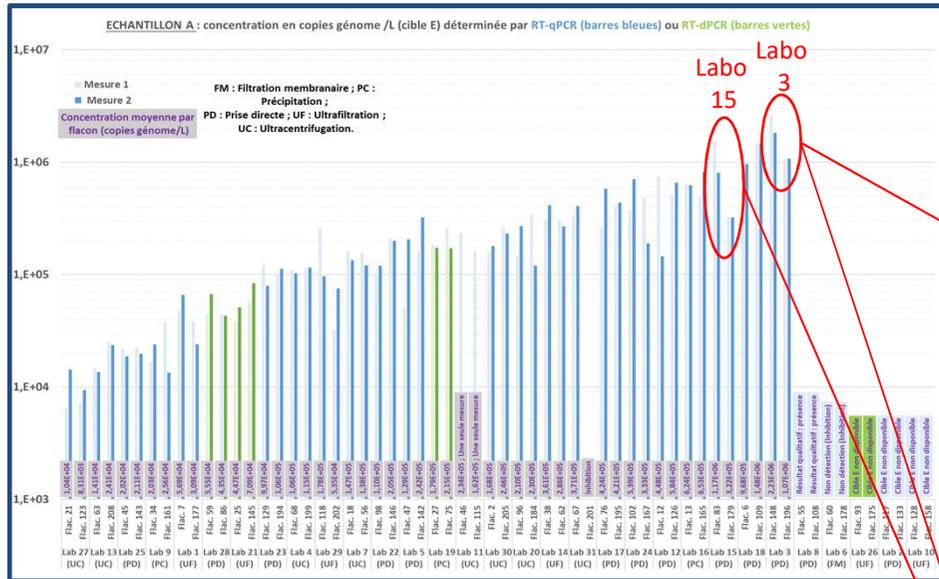


Conclusion concordante du test Mandel h et k pour les laboratoires 5 et 31 qui met en évidence des valeurs qui s'écartent de celles des autres participants : **retrait des jeux de données.**



# DONNES BRUTES ECHANTILLON A

SELECTION DES DONNEES



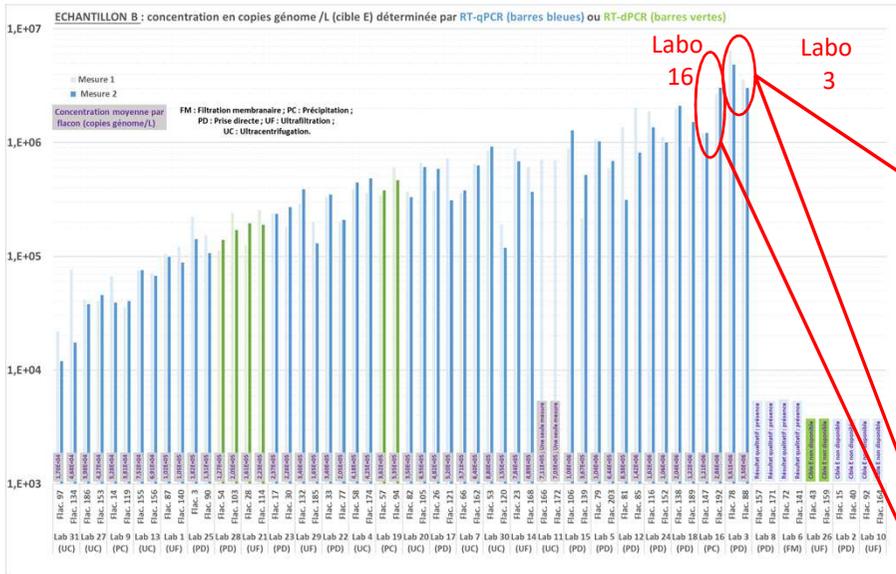
Conclusion concordante du test Mandel h et k pour le laboratoire 3 qui met en évidence des valeurs qui s'écartent de celles des autres participants.

Cernant le laboratoire 15 le test de Mandel k conclue à un défaut cohérence en terme de répétabilité des mesures.

Retrait des 2 jeux de données.

# DONNES BRUTES ECHANTILLON B

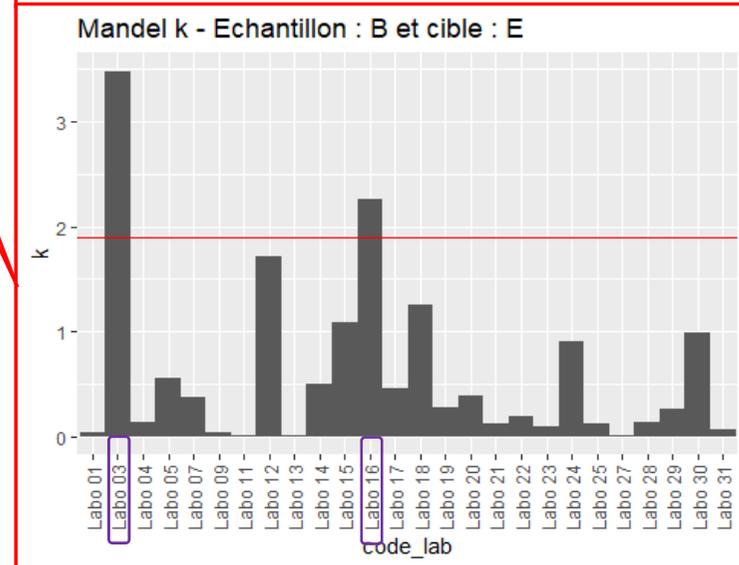
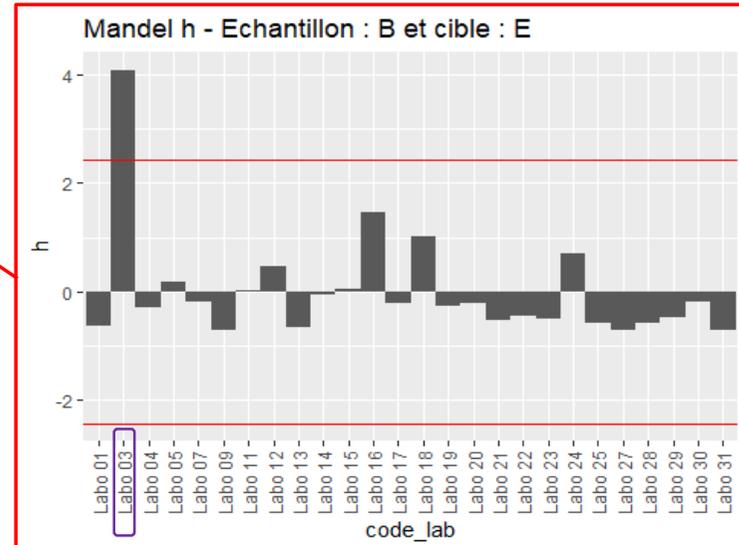
SELECTION DES DONNEES



Conclusion concordante du test Mandel h et k pour le laboratoire 3 qui met en évidence des valeurs qui s’écartent de celles des autres participants.

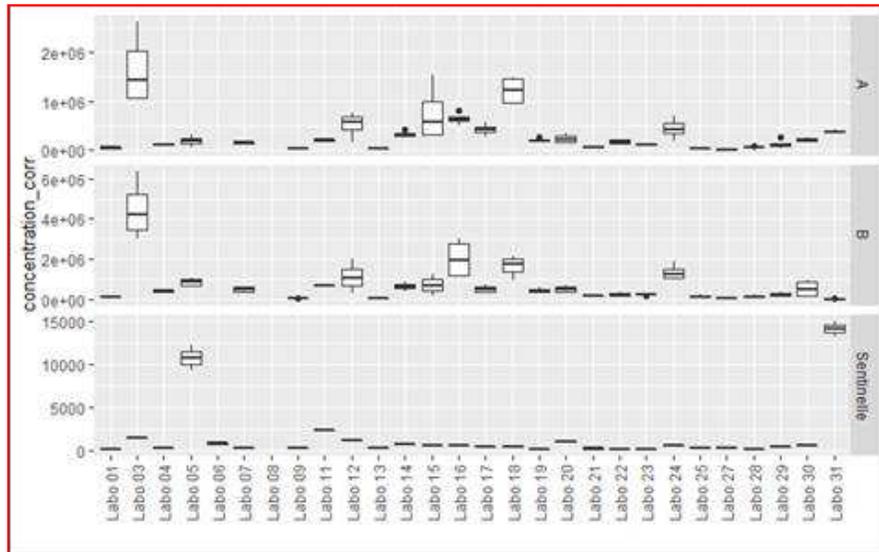
Concernant le laboratoire 16 le test de Mandel k conclue à un défaut cohérence en terme de répétabilité des mesures.

**Retrait des 2 jeux de données.**

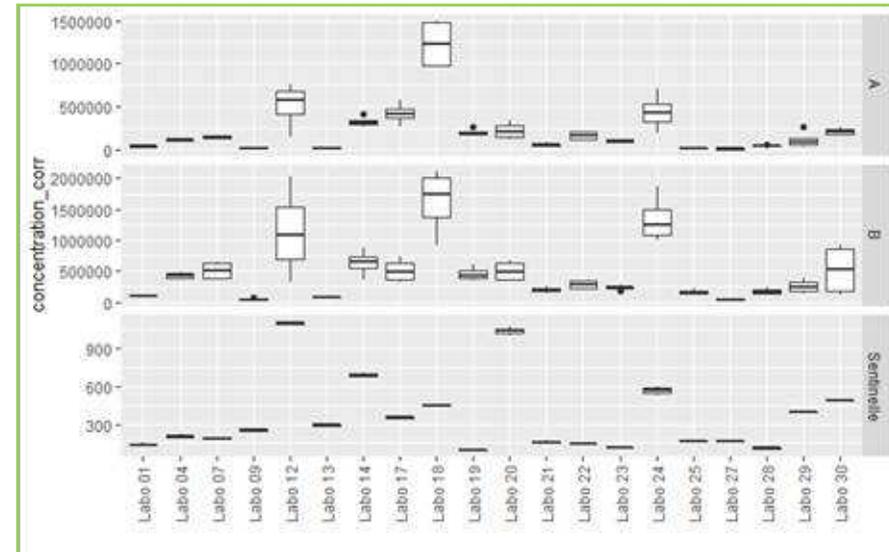


## IMPACT DE LA SELECTION DES DONNEES

### Evolution du profil de la distribution des données au terme de la démarche de validation des données



Données brutes : 28 laboratoires avec des données quantitatives

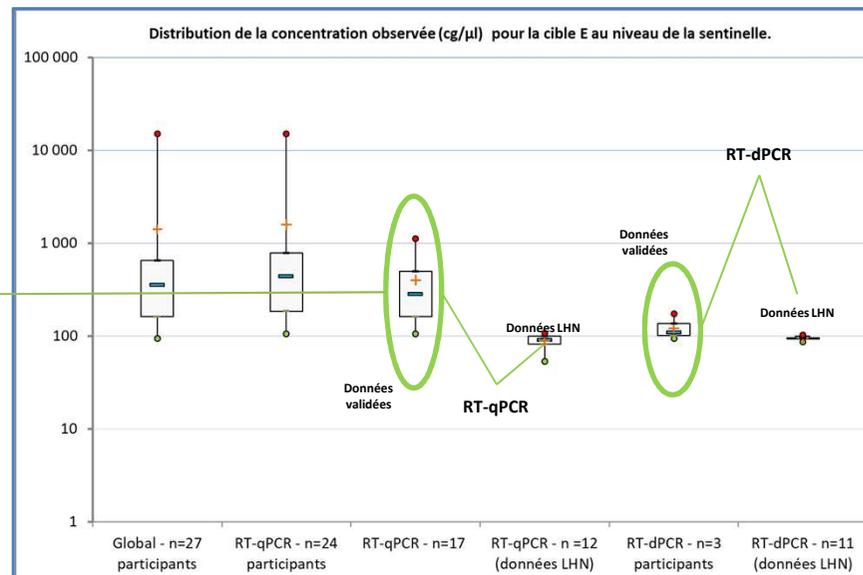
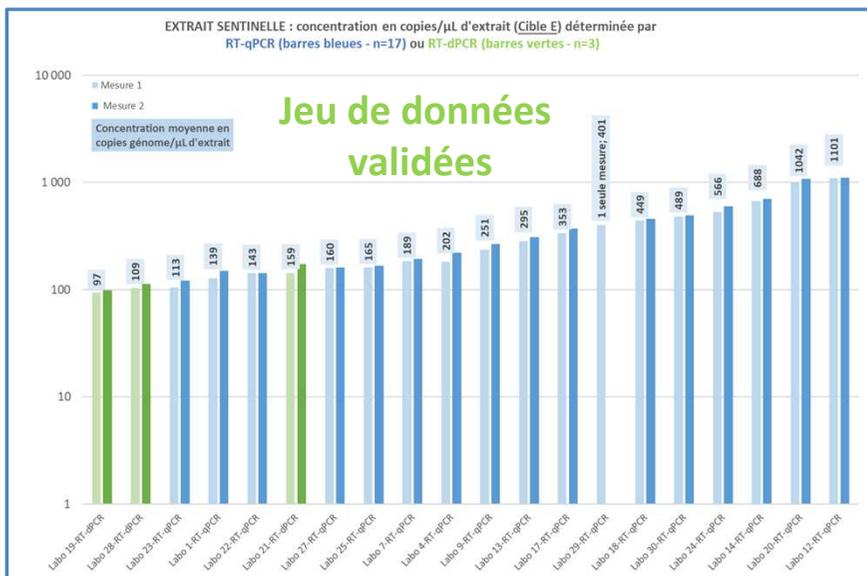


Données validées : 20 laboratoires

Au niveau des échantillons A et B : persistance d’une dispersion importante des données pour au moins 4 laboratoires :

- laboratoires 12, 18 et 24 pour A et B
- laboratoire 30 pour l’échantillon B

# ANALYSE DES DONNEES RELATIVES A LA SENTINELLE



## RT-dPCR :

- Valeur LHN, cible E : 93 (moy) / 93 (méd)
  - Valeur participants (n=3\*) : 121 (moy) / 109 (méd)
- \* dont le LHN

## RT-qPCR :

- Valeur LHN, cible E : 204 (moy) / 207 (méd)
- Valeur participants (n=17) : 397 (moy) / 282 (méd)

**Toutes méthodes confondues :** CV<sub>R</sub> 84,9 % et CV<sub>r</sub> 6,2 %

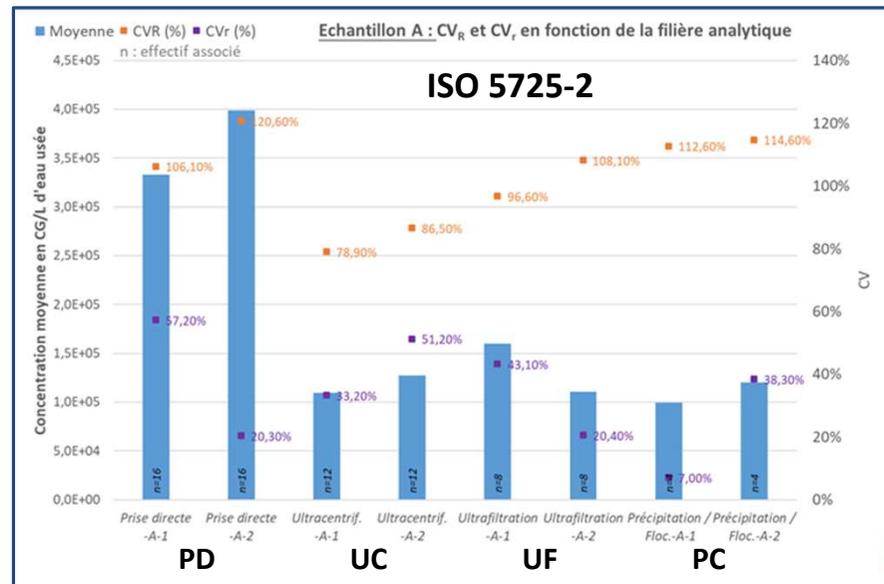
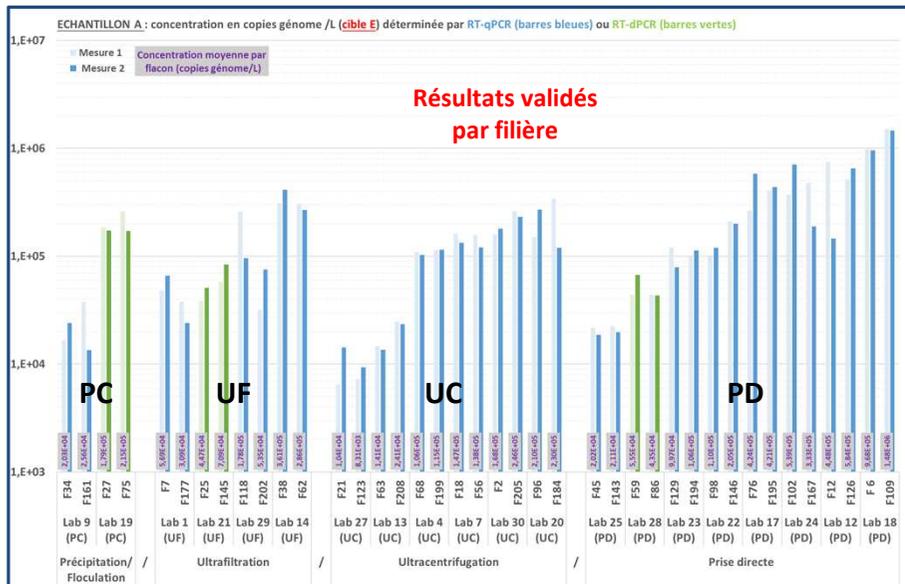
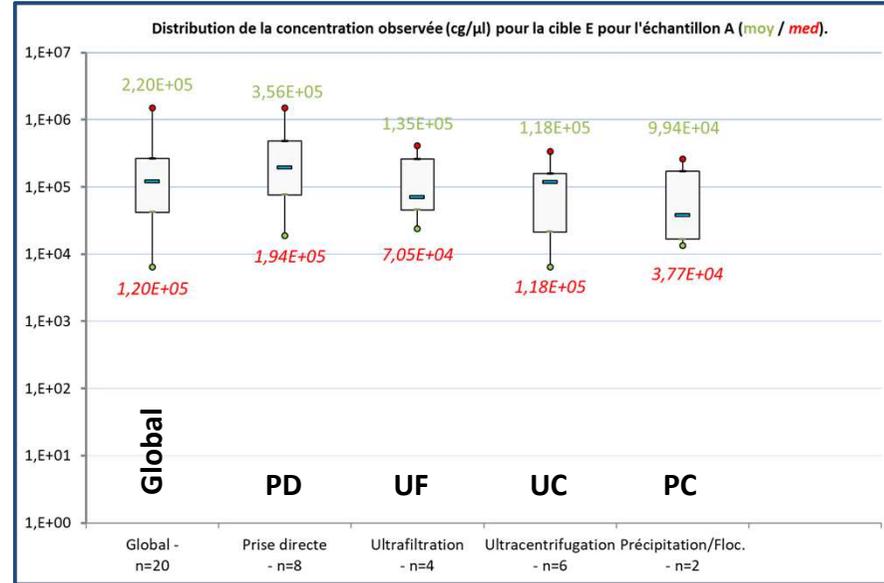
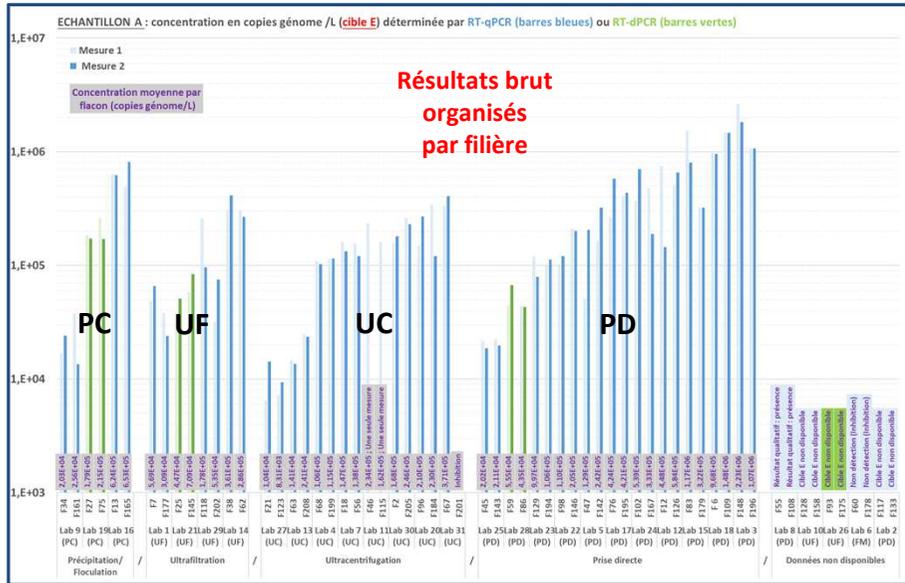
En copies génome /μl ( <b>cible E</b> )	Méth.	Effectif	Moy.	Méd.
Participants : n=18 (données validées)	RT-qPCR	17	397	282
LHN : n=12 (données validées)	RT-dPCR	12	88	90
Participants : n=3 (données validées)	RT-dPCR	3	121	109
LHN : n=11 (données validées)	RT-dPCR	11	94	95

(i) Variabilité interlaboratoire plus importante des concentrations mesurées en RT-qPCR (à pondérer au regard du faible nombre de laboratoires participants en RT-dPCR).

(ii) **Niveau de quantification globalement plus élevé en RT-qPCR** par rapport aux quantifications observées en RT-dPCR : probable difficulté à calibrer les gammes standard de manière homogène entre les laboratoires.

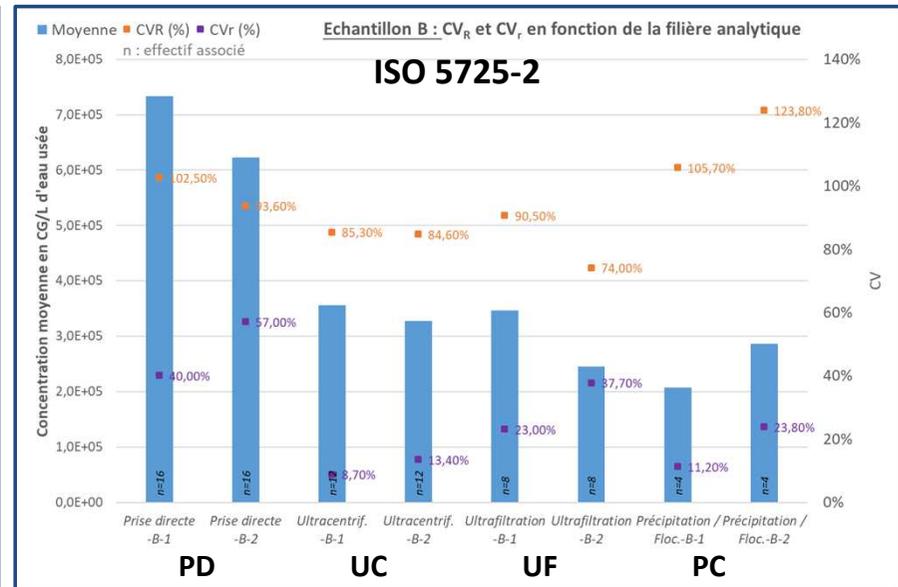
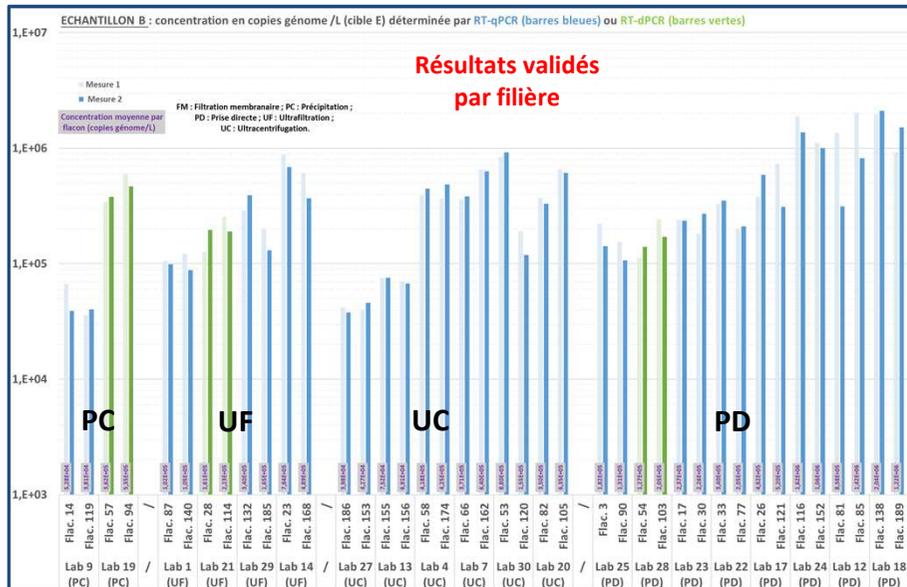
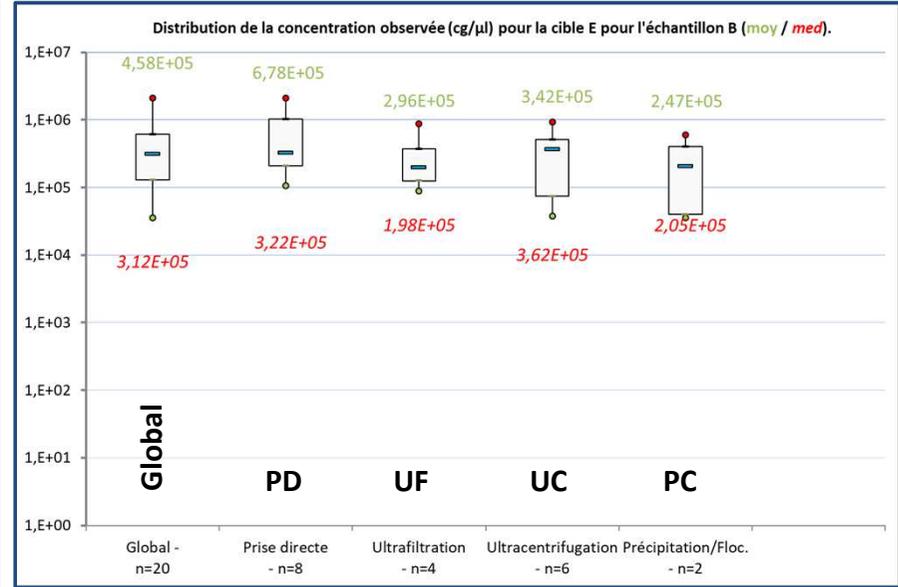
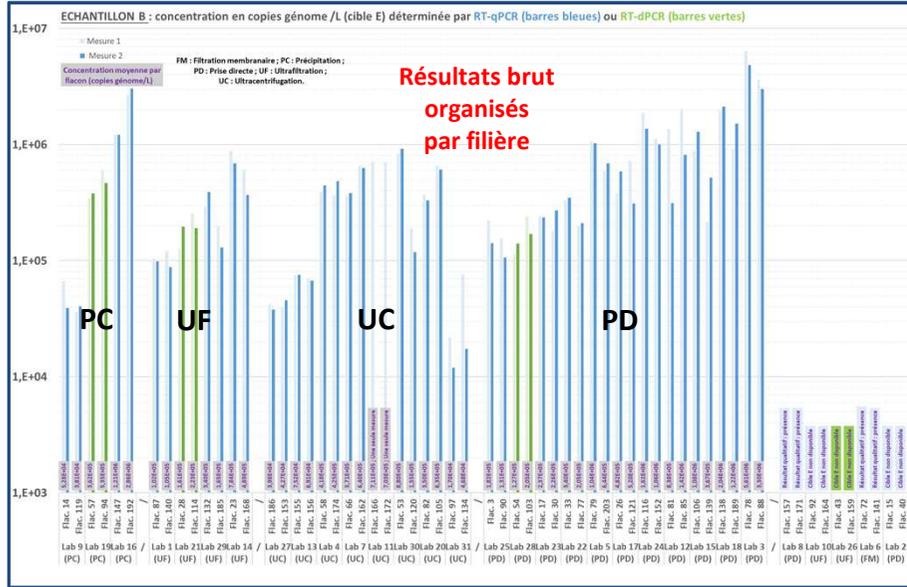
# ANALYSE DES DONNEES RELATIVES A L'ECHANTILLON A

ECHANTILLON A

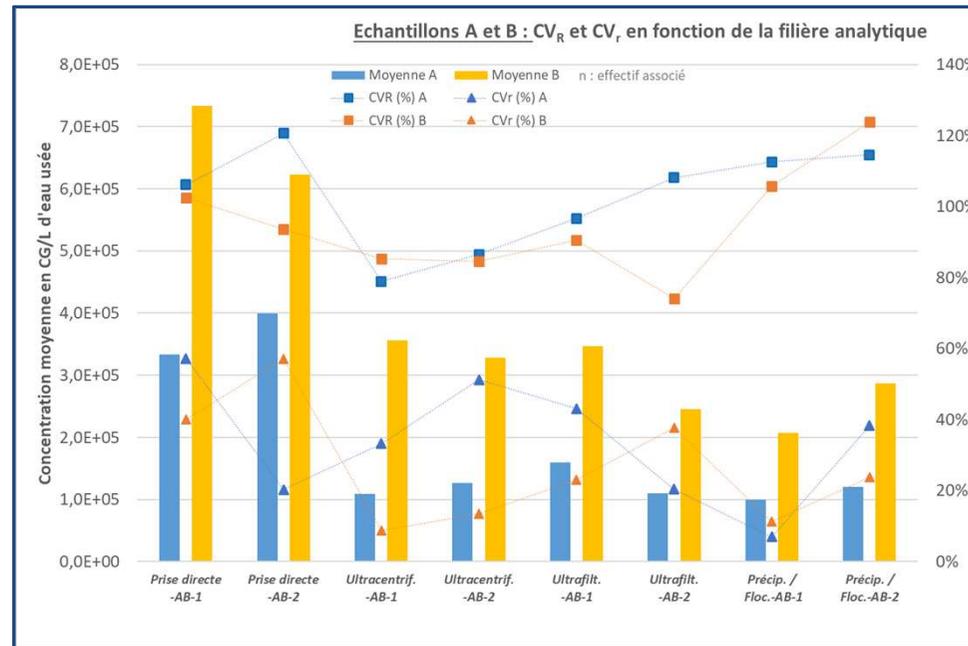


# ANALYSE DES DONNEES RELATIVES A L'ECHANTILLON B

ECHANTILLON B



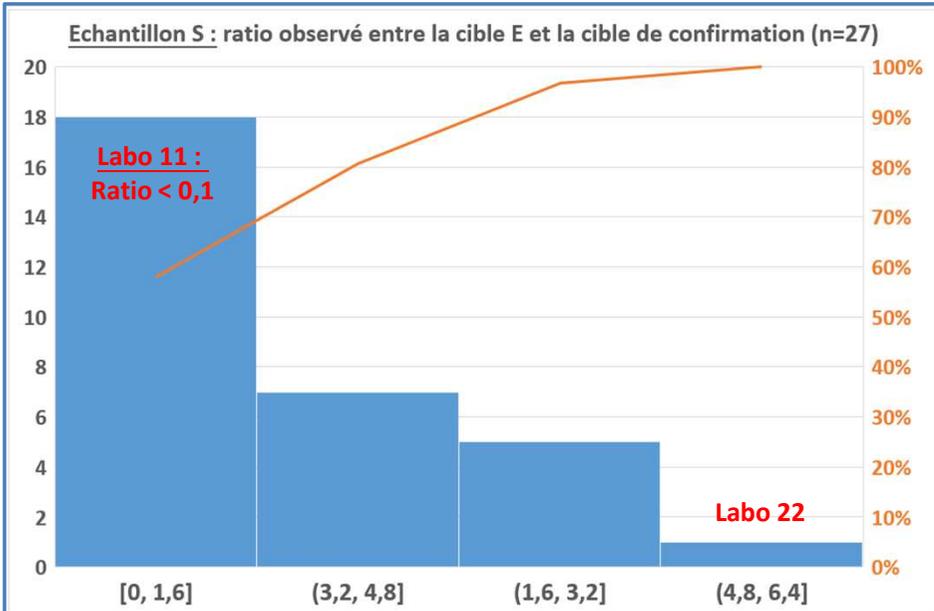
## ISO 5725-2 : CV DE REPRODUCTIBILITE ET DE REPETABILITE (ECHANT. A ET B)



- **CV<sub>R</sub> et CV<sub>r</sub>** : les niveaux observés sont globalement similaires et ne semblent pas réduits pour l'échantillon B (le plus concentré).
- **Origine de la variabilité** : Potentiellement des effets laboratoires, méthodes sont à prendre en compte mais la complexité de la matrice « eau usée » doit également être considérée.
- **Conséquence sur la stratégie d'analyse des données** :
  - le niveau de variabilité ne permet pas une exploitation satisfaisante des performances individuelles des laboratoires selon une approche Z-score qui serait basée sur une valeur consensus établie sur la base des résultats obtenus par les participants.
  - Le nombre de données disponibles est insuffisant pour statuer sur une équivalence des données en fonction des différentes filières analytiques.

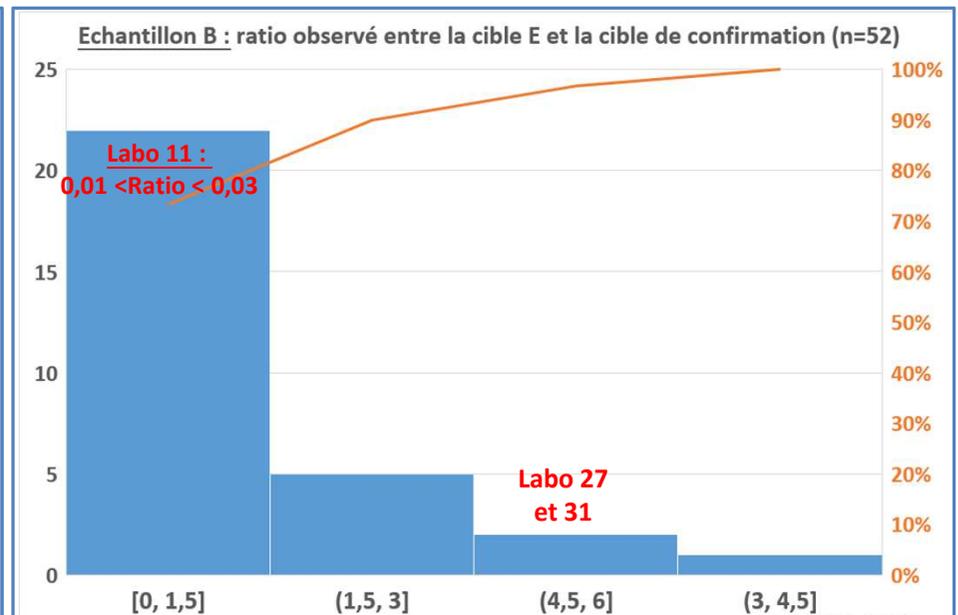
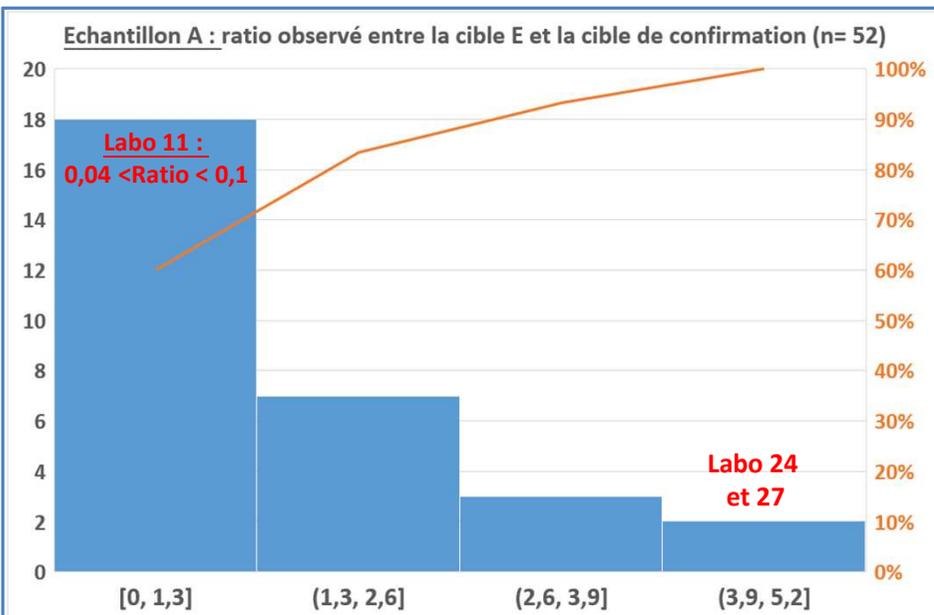
# SUIVI DES RATIOS ENTRE LA CIBLE E ET LA CIBLE DE CONFIRMATION

RATIO INTERCIBLES



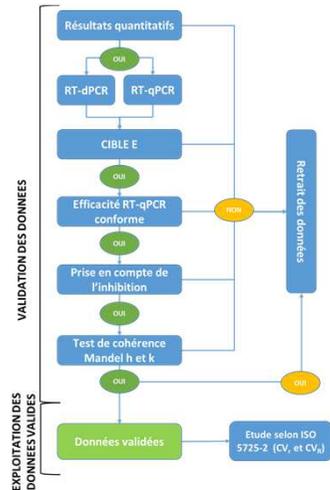
## Recherche des ratios « atypiques » :

**Approche préliminaire** qui montre l’intérêt de vérifier la cohérence des ratios entre la cible principale et la cible de confirmation.



## ENSEIGNEMENTS POUR LE PROCHAIN EILA

PROCHAIN EILA



Sentinelle + Echantillon(s)  
naturellement contaminé(s)

Introduction d'une matrice moins complexe et  
maintien d'une eau usée pour prendre en compte  
l'effet matrice.

**Cible E imposée /**  
cible de confirmation en libre choix

Maintien d'une cible commune  
de quantification

Recueil des critères de validité de la  
gamme de quantification

A minima **efficacité** et **linéarité** de la RT-qPCR  
(critères **ISO/TS 16 099** et **ISO 20 395**  
 $90\% < E < 110\%$  ;  $R^2 > 0,990$  / **5 niveaux de**  
**concentration en duplicat**)

Cohérence des données fournies :

- prise en compte de l'inhibition
- cohérence intra et interlaboratoires
  - au niveau de la sentinelle,
  - au niveau des échantillons

- Dilution extrait vs inhibition
- Test de cohérence des données (ex : Mandel)

Exploitation des données à partir des  
mesures obtenues par le LHN

- Z-score pour la Sentinelle et les échantillons
- A minima un classement qualitatif sur la base des ratios cible E vs sde cible

Méthode analytique LHN (méthode de référence) :

- Précipitation (5 ml < Prise d'essai < 40 ml)
- Amplification par **RT-dPCR**