



Pêches et Océans  
Canada

Fisheries and Oceans  
Canada

Sciences des écosystèmes  
et des océans

Ecosystems and  
Oceans Science

## **Secrétariat canadien de consultation scientifique (SCCS)**

---

**Compte rendu 2015/039**

**Région de la capitale nationale**

**Compte rendu de l'examen national par les pairs de la plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm® : évaluation visant à déterminer son adéquation pour la surveillance microbienne**

**Du 2 au 4 décembre 2014  
Nanaimo, Colombie-Britannique**

**Président : Gilles Olivier and Roger Wysocki  
Rapporteur : Ivan Stefanov**

Pêches et Océans Canada  
Sciences des stratégies et régulations  
200, rue Kent  
Ottawa (Ontario) K1A 0E6

---

## Avant-propos

Le présent compte rendu a pour but de consigner les principales activités et discussions qui ont eu lieu au cours de la réunion. Il peut contenir des recommandations sur les recherches à effectuer, des incertitudes et les justifications des décisions prises pendant la réunion. Le compte rendu peut aussi faire l'état de données, d'analyses ou d'interprétations passées en revue et rejetées pour des raisons scientifiques, en donnant la raison du rejet. Bien que les interprétations et les opinions contenues dans le présent rapport puissent être inexactes ou propres à induire en erreur, elles sont quand même reproduites aussi fidèlement que possible afin de refléter les échanges tenus au cours de la réunion. Ainsi, aucune partie de ce rapport ne doit être considérée en tant que reflet des conclusions de la réunion, à moins d'une indication précise en ce sens. De plus, un examen ultérieur de la question pourrait entraîner des changements aux conclusions, notamment si des renseignements supplémentaires pertinents, non disponibles au moment de la réunion, sont fournis par la suite. Finalement, dans les rares cas où des opinions divergentes sont exprimées officiellement, celles-ci sont également consignées dans les annexes du compte rendu.

### Publié par :

Pêches et Océans Canada  
Secrétariat canadien de consultation scientifique  
200, rue Kent  
Ottawa (Ontario) K1A 0E6

[http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/  
csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca](http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca)

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, 2015  
ISSN 2292-4264

### La présente publication doit être citée comme suit :

MPO. 2015. Compte rendu de l'examen national par les pairs de la plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm® : évaluation visant à déterminer son adéquation pour la surveillance microbienne, du 2 au 4 décembre 2014. Secr. can. de consult. sci. du MPO, Compte rendu 2015/039.

### **Also available in English:**

DFO. 2015. *Proceedings of the national peer review of the Fluidigm® BioMark™ platform: Evaluation to assess fitness for purpose in microbial monitoring; December 2-4, 2014.* DFO Can. Sci. Advis. Sec. Proceed. Ser. 2015/039.

---

---

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE .....	v
SUMMARY .....	vi
INTRODUCTION .....	1
Mot de bienvenue, mot d'ouverture et contexte .....	2
Exposé d'introduction 1 : Vue d'ensemble du processus de consultation du SCCS.....	2
EXPOSÉS ET DISCUSSIONS (JOUR 1) .....	2
Exposé 1 – 1 : Vue d'ensemble du projet .....	2
Exposé 1 – 2 : Le projet dans le contexte de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) .....	3
Exposé 1 – 3 : La limite de détection.....	4
Exposé 1 – 4 : Vue d'ensemble des analyses statistiques concernant les expériences d'évaluation des essais et l'analyse statistique concernant la sensibilité analytique .....	6
Exposé 1 – 5 : Spécificité analytique .....	7
Exposé 1 – 6 : Spécificité analytique – les parasites .....	9
Exposé 1 – 7 : Analyse statistique de la spécificité analytique et résumé de la spécificité analytique.....	9
Exposé 1 – 8 : Répétabilité – Vue d'ensemble .....	11
Exposé 1 – 9 : Analyse statistique de la répétabilité.....	12
Récapitulation et levée de la séance du jour 1 .....	13
EXPOSÉS ET DISCUSSIONS (JOUR 2).....	14
Mot de bienvenue et récapitulation des résultats du jour 1 .....	14
Exposé 2 – 1 : Comparabilité .....	14
Exposé 2 – 2 : Analyse statistique de la comparabilité .....	15
Exposé 2 – 3 : Amplification de cibles spécifiques et évaluation de l'amplification de cibles spécifiques sur la sensibilité analytique .....	16
Exposé 2 – 4 : Analyse statistique des effets de l'amplification de cibles spécifiques sur la sensibilité, la spécificité et la répétabilité analytiques des essais microbiens.....	17
Exposé 2 – 5 : Points forts et points faibles de la plateforme BioMark <sup>MC</sup> pour la surveillance microbienne .....	18
Récapitulation et levée de la séance du jour 2 .....	20
EXPOSÉS ET DISCUSSIONS (JOUR 3).....	21
Mot de bienvenue et récapitulation des résultats des jours 1 et 2.....	21
Exposé 3 – 1 : Le principe de consensus dans le cadre du processus d'examen par les pairs du SCCS .....	21
Discussion générale et dernière étape .....	21
Conclusion et levée de la séance .....	22
ANNEXES.....	23
Annexe 1 : Liste des participants.....	23
Annexe 2 : Cadre de référence .....	25

---

### Liste des figures

Figure 1 : Détermination de la limite de détection qui serait détectée dans 95 % des réplicats ..	5
Figure 2 : Schéma général des analyses statistiques effectuées en appui à la phase 2a du projet.....	6
Figure 3 : Vue d'ensemble du cadre expérimental de détermination de la spécificité analytique.	8
Figure 4 : Diagramme des trois parties de l'étude de répétabilité. ....	12
Figure 5 : Schéma du plan de l'étude de comparabilité. ....	15
Figure 6 : Schéma du plan de l'étude visant à évaluer l'effet de l'amplification de cibles spécifiques sur la sensibilité analytique.....	17

---

## SOMMAIRE

Un processus d'examen national par les pairs s'est tenu sous l'égide du Secrétariat canadien de consultation scientifique (SCCS) de Pêches et Océans Canada (MPO) à Nanaimo, en Colombie-Britannique, du 2 au 4 décembre 2014. L'objectif du processus consistait à fournir un avis scientifique sur l'adéquation des essais effectués à partir de la plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm®. Celle-ci utilise la préamplification aux fins de recherches à grande échelle visant la surveillance des microbes chez les saumons du Pacifique sauvages et chez les saumons de l'Atlantique d'élevage.

L'examen a plus particulièrement porté sur les éléments suivants :

- la sensibilité, la spécificité, la comparabilité et la répétabilité analytiques de chaque essai microbien, tel que cela a été établi dans le document de travail et présenté à la réunion;
- la mesure dans laquelle les résultats des essais de la plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm® sont comparables à ceux de la plateforme ABI 7900 (comme elle est utilisée au laboratoire de génétique moléculaire de la station biologique du Pacifique);
- les effets de l'étape de préamplification menée pour de nombreuses espèces cibles indépendantes sur la sensibilité, la spécificité et la répétabilité analytiques des essais. Plus précisément :
  - déterminer si l'étape de préamplification introduit des biais dans l'abondance relative des cibles;
  - déterminer si l'étape de préamplification génère des cibles fausses;
- les avantages, restrictions, incertitudes et utilisations proposées de cette méthodologie (ce qui comprend les concepts et les analyses statistiques) pour les besoins de recherche définis.

Parmi les participants à cette réunion se trouvaient des experts en la matière canadiens et étrangers provenant du milieu universitaire, de l'industrie de l'aquaculture et du secteur scientifique fédéral, notamment le MPO et l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA). Un avis scientifique, un document de recherche et le présent compte rendu ont découlé de ce processus.

N.B. : Le présent compte rendu présente les grandes lignes des discussions qui se sont tenues au cours de ce processus de consultation scientifique. Le lecteur qui souhaite obtenir des renseignements plus détaillés et précis est invité à consulter l'avis scientifique publié qui présente formellement les avis formulés au cours de ce processus, y compris toutes les recommandations officielles. En ce qui concerne les diverses techniques scientifiques et méthodologies d'évaluation, le lecteur est invité à consulter le document de recherche connexe à l'appui de l'avis scientifique.

---

## SUMMARY

A national peer review process under the auspices of Fisheries and Oceans Canada's (DFO) Canadian Science Advisory Secretariat (CSAS) was held in Nanaimo, British Columbia on December 2 -4, 2014. The objective of the process was to provide scientific advice about the suitability of assays based on the Fluidigm® BioMark™ platform, which uses pre-amplification, for large scale research monitoring for microbes in wild Pacific and farmed Atlantic salmon.

Specifically the review assessed:

- The analytical sensitivity, specificity, comparability and repeatability of each microbe assay, as determined in the draft Research Document and presented at the meeting.
- To what level the assay results are comparable across the Fluidigm® BioMark™ and ABI 7900 platforms (as used at the Molecular Genetics Laboratory at the Pacific Biological Station).
- The effect of the pre-amplification step of multiple independent target species on the analytical sensitivity, specificity, and repeatability of the assays. Specifically:
  - Whether the pre-amplification step introduces biases in the relative abundance of targets, *and*
  - Whether it generates spurious (false) targets.
- The benefits, limitations, uncertainties and proposed uses of this methodology (including the design and the statistical analyses) for the identified research purposes.

Participants at this meeting included Canadian and international subject matter experts from academia, the aquaculture industry, and government science, including DFO and the Canadian Food Inspection Agency (CFIA). Publications resulting from this process include a Science Advisory Report (SAR), a Research Document and these proceedings.

NB: This Proceedings document captures at a high-level the discussions which transpired during this science advisory process. For more detailed and precise information, the reader is advised to consult the published SAR which formally conveys the advice provided from this process, including all formal recommendations. In respect of the various scientific techniques and assessment methodologies, the reader is encouraged to consult the associated Research Document, which supports the SAR.

---

## INTRODUCTION

Pêches et Océans Canada collabore avec la Fondation du saumon du Pacifique (Pacific Salmon Foundation) et Genome BC à un projet quinquennal en plusieurs étapes (le « projet ») qui prévoit fusionner les technologies sur le génome et la santé du poisson afin de déterminer quels microbes sont portés par les salmonidés sauvages et d'élevage de la Colombie-Britannique, l'origine possible de ces microbes ainsi que les conséquences que ces microbes peuvent avoir sur la santé du saumon.

Le but stratégique énoncé dans le cadre du projet consiste à « recenser les microbes et les maladies potentielles qui pourraient nuire à la productivité et au rendement du saumon (sauvage) de la Colombie-Britannique et cerner les échanges pouvant s'effectuer entre le saumon sauvage et le saumon d'élevage durant l'évolution de ces microbes ». Le projet sera réalisé en quatre *phases* (étapes) séquentielles.

La **phase 1** (de 2012 à 2013) prévoit l'établissement d'un programme d'échantillonnage à grande échelle, échelonné sur douze mois, pour le saumon sauvage, le saumon d'écloserie et le saumon d'aquaculture. L'échantillonnage a été réalisé en 2012 et au début de 2013.

La **phase 2** (de 2013 à 2015) prévoit la conception, la mise à l'essai et l'évaluation d'une technologie génomique originale visant à déterminer quels microbes associés à des maladies touchant les saumons du monde entier sont portés par le saumon sauvage et le saumon d'élevage de la Colombie-Britannique.

La **phase 3** (de 2014 à 2016) sera axée sur les microbes recensés pendant la phase 2, plus particulièrement ceux n'ayant pas fait l'objet de recherches approfondies en Colombie-Britannique et présentant le plus grand risque de maladie pour le saumon sauvage. Des études de provocation en laboratoire seront menées dans le but d'évaluer quelles sont les conditions propices à l'apparition de maladies causées par des microbes spécifiques chez le saumon du Pacifique. Seront aussi menées des études supplémentaires visant à évaluer les dynamiques de transmission de microbes particuliers.

La **phase 4** (de 2016 à 2017) prévoit la présentation aux organismes de gestion de rapports de recherche et d'exposés portant sur l'utilité potentielle des méthodes mises au point pendant le projet et l'application des résultats obtenus à des activités de surveillance ultérieures.

Le projet en est actuellement à la phase 2a, dont l'objectif principal énoncé consiste à élaborer, à mettre à l'essai et à évaluer la sensibilité, la spécificité et la répétabilité des essais au moyen d'une plateforme microfluidique à haut rendement (plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm®) conçue pour évaluer quantitativement la présence de microbes et le degré de contamination microbienne dans de multiples échantillons testés simultanément. Cette technologie fait appel à une étape de préamplification dont les effets n'ont pas encore été évalués.

L'élaboration du cadre de référence pour l'examen scientifique fait suite à une demande d'avis formulée par la Direction des Sciences du MPO de la région du Pacifique, dans le but d'évaluer le rendement analytique des essais élaborés aux fins de la plateforme microfluidique à haut rendement et d'étayer la décision de procéder à la phase 2b de l'étude.

L'ordre du jour de la réunion correspondait aux objectifs du processus d'examen par les pairs décrit dans le cadre de référence.

Les participants à la réunion d'examen scientifique ont été choisis pour leurs connaissances et leur expertise, et à titre de personnes objectives, impartiales et professionnelles, aptes ensemble à fournir aux décideurs des avis scientifiques de grande qualité, défendables et impartiaux.

---

Un document de travail (l'ébauche du document de recherche), auquel s'ajoutent des documents justificatifs, a été préparé et mis à la disposition des examinateurs et des participants à la réunion préalablement à celle-ci.

## **MOT DE BIENVENUE, MOT D'OUVERTURE ET CONTEXTE**

Les présidents de la réunion, Gilles Olivier et Roger Wysocki, accueillent les participants et les remercient d'être présents à cette réunion d'examen par les pairs. Les participants se présentent (la liste des participants se trouve à l'annexe 1).

## **EXPOSÉ D'INTRODUCTION 1 : VUE D'ENSEMBLE DU PROCESSUS DE CONSULTATION DU SCCS**

*Présenté par Gilles Olivier*

L'exposé explique les pratiques et principes qui constituent le processus d'examen par les pairs du SCCS et les procédures qui seront suivies aux fins de la formulation d'avis scientifiques au cours de ce processus de consultation.

### **Discussion**

Des questions sont posées au sujet du calendrier de publication des documents afférents à la réunion et du principe de consensus. Le présentateur y répond.

Le cadre de référence est examiné, débattu puis avalisé par tous les participants. Le texte du cadre de référence peut être consulté à l'annexe 2 ainsi que sur la [page Web du SCCS](#).

De plus, on présente aux participants des explications de l'objet, de la structure et du contenu de l'avis scientifique.

## **EXPOSÉS ET DISCUSSIONS (JOUR 1)**

### **EXPOSÉ 1 – 1 : VUE D'ENSEMBLE DU PROJET**

*Présenté par Kristi Miller*

La présentatrice explique les défis que représentent pour la recherche les maladies affectant la population de poissons sauvages; elle présente l'initiative stratégique visant la santé du saumon; elle expose le plan de recherche pour le projet; elle présente ensuite la plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm®; enfin, elle donne un aperçu des études entreprises à ce jour pour évaluer le rendement des essais et de la plateforme.

### **Discussion**

Il en résulte une longue discussion au sujet de la démarche scientifique générale, du séquençage des étapes du projet, de la sélection des microbes à surveiller et du contenu des prochaines étapes du projet.

Après délibération, les participants se mettent d'accord pour limiter les discussions aux enjeux formulés dans le cadre de référence de ce processus d'examen par les pairs.

On reconnaît le fait que bon nombre des réponses seront apportées au fil du processus d'examen par les pairs dans les prochains jours.

---

## EXPOSÉ 1 – 2 : LE PROJET DANS LE CONTEXTE DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (OIE)

*Présenté par Ian Gardner*

Le présentateur explique que les auteurs ont décidé d'évaluer le rendement des essais en respectant le schéma de validation de l'OIE, comme il est présenté au chapitre 1.1.2. (« Principes et méthodes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses ») du manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques 2014 de l'OIE ([Manuel aquatique de l'OIE](#)). La principale raison ayant motivé cette décision est le fait que quatre microbes sont répertoriés par l'Organisation mondiale de la santé animale (Office international des épizooties – OIE) en tant qu'agents pathogènes (le virus de la septicémie hémorragique virale – VSHV, le virus de l'anémie infectieuse du saumon – VAIS, le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse – VNHI, et l'alphavirus du saumon).

Le présentateur explique que l'adéquation des tests de dépistage des maladies répertoriées par l'OIE à leurs fins prévues représente un facteur très important de leur validation. Le manuel de l'OIE répertorie les objectifs suivants :

1. démontrer l'absence d'infection (prévalence nulle);
2. démontrer l'absence d'infection ou d'un agent pathogène chez un animal individuel ou dans les produits aux fins commerciales;
3. éradiquer l'infection;
4. confirmer le diagnostic de cas cliniques;
5. estimer la prévalence de l'infection afin de faciliter une analyse de risques;
6. déterminer le statut immunitaire d'animaux individuels ou de populations.

Le manuel aquatique de l'OIE ne mentionne pas explicitement les objectifs de recherche dans ce contexte.

Les auteurs ont toutefois estimé raisonnable, à tout le moins, que les caractéristiques analytiques des essais soient évaluées.

Le présentateur explique qu'à ce jour, aucun critère minimal n'a été adopté pour évaluer les caractéristiques analytiques du rendement (ni de la part de l'OIE, ni par la voie d'un consensus au sein de la communauté des experts dans son ensemble) et que l'OIE n'a pas explicitement fourni de lignes directrices au sujet de la validation des essais multiplexes ou de nouvelles technologies telles que la plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm®.

Il souligne également que, à la lumière d'expériences antérieures, si l'évaluation analytique n'est pas rigoureuse, le rendement de diagnostic peut être inférieur à son objectif désigné et qu'un bon rendement analytique ne garantit pas automatiquement un bon rendement de diagnostic.

Il ajoute aussi que, dans le cas de nombreuses maladies des animaux aquatiques, de tels tests ne sont pas convenablement validés. C'est encore pire dans le cas des tests sur les mollusques et crustacés que dans celui des tests sur les poissons.

### **Discussion**

Les participants débattent du processus de l'OIE, particulièrement le schéma de validation, des facteurs ayant une incidence sur la sélection des tests en général, de la justification du besoin de valider le test, de la production de lignes directrices concernant les études sur la réaction en chaîne de la polymérase quantitative (PCR quantitative) et de la fourniture de preuves selon

---

lesquelles peu de tests sur des espèces animales aquatiques ont été validés au-delà de l'étape 1 du schéma de l'OIE.

On convient toutefois que la fin prévue du projet est la recherche universitaire et que l'adéquation aux fins prévues doit être évaluée en fonction de ce contexte de recherche et non en fonction d'objectifs de diagnostic.

## **EXPOSÉ 1 – 3 : LA LIMITE DE DÉTECTION**

*Présenté par Shaorong Li*

La présentatrice se sert d'un exemple pour expliquer les concepts de limite de détection et de témoin positif artificiel qui ont été utilisés comme échantillons de remplacement afin de conduire les expériences de limite de détection. Elle utilise des schémas pour expliquer le plan de l'expérience : préparation d'échantillons avec un ensemble de 15 dilutions en série, enrichissement par amplification de cibles spécifiques des 15 dilutions en série dans 6 réplicats, test de chaque échantillon de réplicats d'amplification de cibles spécifiques et d'amplification de cibles non spécifiques 3 ou 4 fois sur un total de 4 séries dynamiques.

À la lumière des expériences rapportées, les auteurs ont conclu qu'en général :

- la limite de détection par chambre était semblable dans les échantillons d'amplification de cibles spécifiques et d'amplification de cibles non spécifiques (de 4 à 7 copies);
- la limite de détection par échantillon de départ était approximativement 1 000 fois plus élevée dans les échantillons d'amplification de cibles non spécifiques en raison du très faible volume dans chaque chambre. Par conséquent, l'amplification de cibles spécifiques enrichit les séquences ciblées environ 1 000 fois;
- aucune différence relative au cycle seuil (Ct – l'intersection d'une courbe d'amplification et d'une ligne de base) n'était associée à la limite de détection pour les échantillons d'amplification de cibles spécifiques et d'amplification de cibles non spécifiques (Ct = 27–29).

Enfin, on fait référence à la question de l'interprétation statistique des résultats (exposés 1 à 4).

# Limite de détection

- Elle se définit comme la concentration la plus faible d'une cible qui peut être mesurée de manière reproductible
- Elle est rapportée dans les nombres de copies les plus faibles ou dans la valeur Ct la plus élevée
- La limite de détection doit être déterminée individuellement pour chaque essai
- Elle est déterminée par 15 dilutions en série de témoins positifs artificielles effectuées sur 40 réplicats sur 4 séries dynamiques sur 96,96

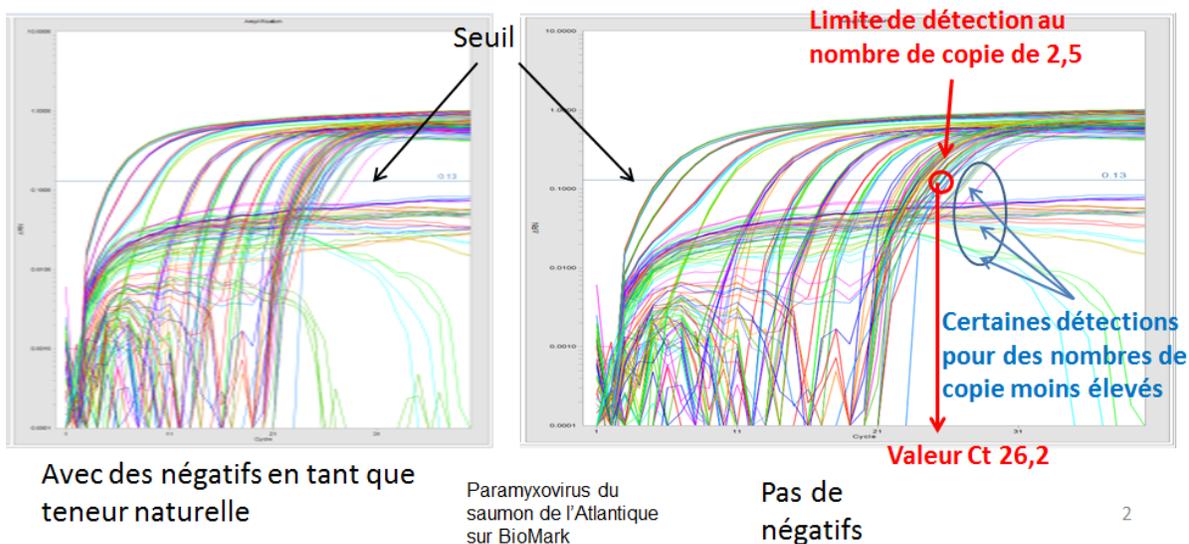


Figure 1 : Détermination de la limite de détection qui serait détectée dans 95 % des réplicats. L'image dans le coin supérieur droit représente des courbes idéales d'amplification de la réaction en temps réel téléchargées sur Internet. Les images du bas représentent des exemples d'essais réalisés sur la plateforme BioMarkMC. Dans ce cas précis, il s'agit du paramyxovirus du saumon de l'Atlantique. L'axe des abscisses représente le nombre de cycles. L'axe des ordonnées désigne l'intensité de la fluorescence. Le seuil est défini dans la phase linéaire du graphique d'amplification. La valeur du Ct augmente à mesure que la quantité de modèles diminue. Les signaux situés sous le seuil représentent un très faible nombre de copies.

## Discussion

Les discussions tournent autour de la crainte que la procédure unique de dilution en série utilisée pour établir la limite de détection ait entraîné une grande variation et ait provoqué un déplacement de la limite de détection. Une préoccupation est soulevée au sujet du fait que si le travail sur la limite de détection et la sensibilité analytique entraîne des variations et incertitudes évitables, des répercussions sur le travail expérimental ultérieur sont probables. Parmi les autres sujets techniques débattus, on compte la sélection du seuil, l'entreposage des échantillons et l'utilisation des essais aux fins de la limite de détection et de la linéarité.

# EXPOSÉ 1 – 4 : VUE D'ENSEMBLE DES ANALYSES STATISTIQUES CONCERNANT LES EXPÉRIENCES D'ÉVALUATION DES ESSAIS ET L'ANALYSE STATISTIQUE CONCERNANT LA SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

Présenté par Raphael Vanderstichel

Le présentateur décrit le cadre global et le plan des analyses statistiques utilisés tout au long du projet (Figure 2) ainsi que les méthodes statistiques d'évaluation de la sensibilité analytique des essais et des résultats obtenus.

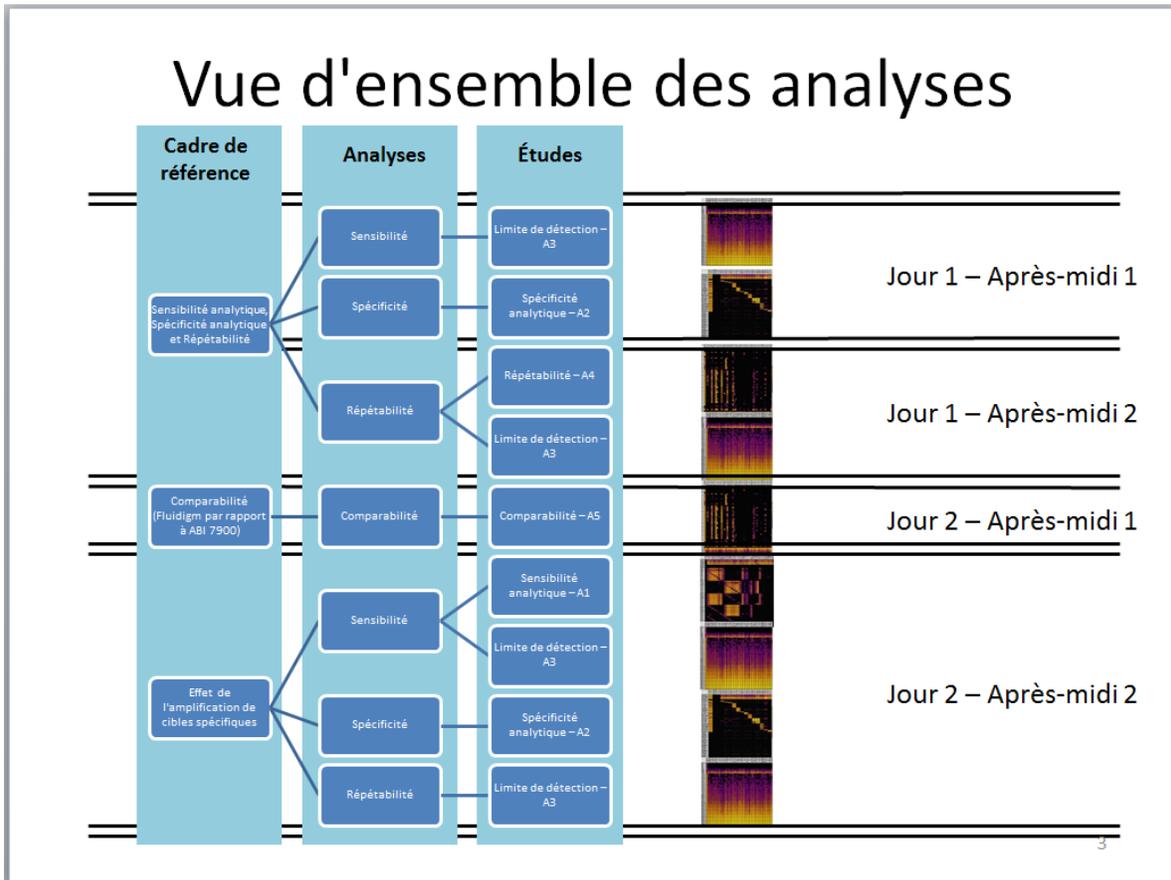


Figure 2 : Schéma général des analyses statistiques effectuées en appui à la phase 2a du projet.

Après son introduction, le présentateur décrit les méthodes analytiques utilisées afin de déterminer la limite de détection dans les 46 essais de la plateforme BioMark<sup>MC</sup>. Il utilise un schéma pour montrer comment les échantillons et les témoins ont été dilués en série et appliqués aux essais.

De plus, il utilise des graphiques et des calculs pour expliquer les diverses méthodes utilisées dans le calcul des estimations (telles que le domaine linéaire, les efficacités, le coefficient de détermination ( $R^2$ ) et la probabilité de détection ( $Pr$  (détection)) au seuil de 95 %) pour décrire la limite de détection.

Il signale qu'en général le domaine linéaire de l'ensemble des essais se trouvait entre  $10^1$  et  $10^6$  (la plupart des essais se situant à  $10^7$ ), ce qui a été tenu comme étant la fourchette type de la plupart des plateformes de PCR quantitative.

---

Les efficacités de trente-huit (38) des 47 essais se situaient entre 0,9 et 1. Les auteurs ont conclu qu'en général ces résultats laissaient croire que les essais fonctionnaient bien.

La probabilité de détection (Pr (détection)) au seuil de 95 % a été estimée comme s'étendant entre des valeurs de Ct de 23,3 à 30,7 (26,4 en moyenne sur l'ensemble des essais), ce qui a été calculé afin de représenter des nombres de copies au départ entre 1 et 31 (moyenne de 4,3 sur l'ensemble des essais).

Les auteurs ont conclu sur la base de ces résultats que la plateforme BioMark<sup>MC</sup> affichait des sensibilités analytiques équivalentes ou supérieures à celles des plateformes d'essai unique habituelles.

## Discussion

Les questions des examinateurs et des participants portent notamment sur ce qui suit : les résultats concernant la sensibilité analytique sont-ils ou non comparables sur l'ensemble des essais; l'utilisation d'une dilution unique analysée 47 fois ne constitue pas la meilleure méthode d'un point de vue statistique; la variabilité qui en découle doit être prise en compte.

Les recommandations suivantes sont formulées :

- dans le document de recherche, des termes objectifs, neutres et quantitatifs doivent être utilisés pour décrire les résultats des expériences;
- le texte du document de recherche et de l'avis scientifique doit refléter le fait qu'un seul appareil BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm® a été utilisé lors de l'évaluation. Cela signifie que l'objet de l'évaluation n'a pas été la « plateforme », mais plutôt cet instrument spécifique;
- les auteurs doivent travailler avec Fluidigm et d'autres laboratoires aux fins de l'évaluation croisée du rendement des essais.

## EXPOSÉ 1 – 5 : SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE

*Présenté par Angela Schulze*

Cet exposé présente une vue d'ensemble des concepts définissant la spécificité analytique, des objectifs visés et des raisons possibles de fausses détections. La présentatrice démontre également les différents microbes testés (bactéries, virus et parasites), le nombre de puces de BioMark<sup>MC</sup> utilisées et le nombre total de comparaisons PCR quantitative avec et sans témoins (Figure 3).

Elle montre aussi les échantillons témoins positifs utilisés, ainsi que la proportion de ceux qui provenaient de tissus, d'échantillons purs ou de fragments de gène synthétique gBlocks<sup>MC</sup> (constructions d'ADN hybride synthétique de 1 000 paires de bases produites pour l'analyse de la spécificité analytique de souches ou d'espèces pour lesquelles de « vrais » témoins sous la forme d'échantillons de tissu, de lignées cellulaires ou de cultures bactériennes n'étaient pas disponibles). Elle souligne également que les tissus constituent de potentiels porteurs de coinfections et qu'ils comportent deux fois plus d'échantillons témoins positifs représentant les parasites que d'échantillons représentant les bactéries ou les virus.

Elle utilise un schéma pour illustrer les échantillons témoins positifs viraux (classés par génogroupe) et leurs essais respectifs. Elle montre une carte des points chauds (représentation graphique des données qui utilise une matrice de couleurs) affichant les résultats de la PCR quantitative sur les échantillons témoins positifs viraux par rapport à l'ensemble des essais viraux (répétés six fois).

Elle utilise un schéma pour illustrer les échantillons bactériens témoins positifs (classés par groupe) et leurs essais respectifs. Les résultats ont démontré que la corrélation au sein des groupes d'espèces était plus élevée dans l'étude des bactéries que dans l'étude des virus.

Enfin, la présentatrice montre une carte des points chauds représentant les résultats de la PCR quantitative sur les échantillons témoins bactériens positifs par rapport à l'ensemble des essais bactériens (répété six fois).

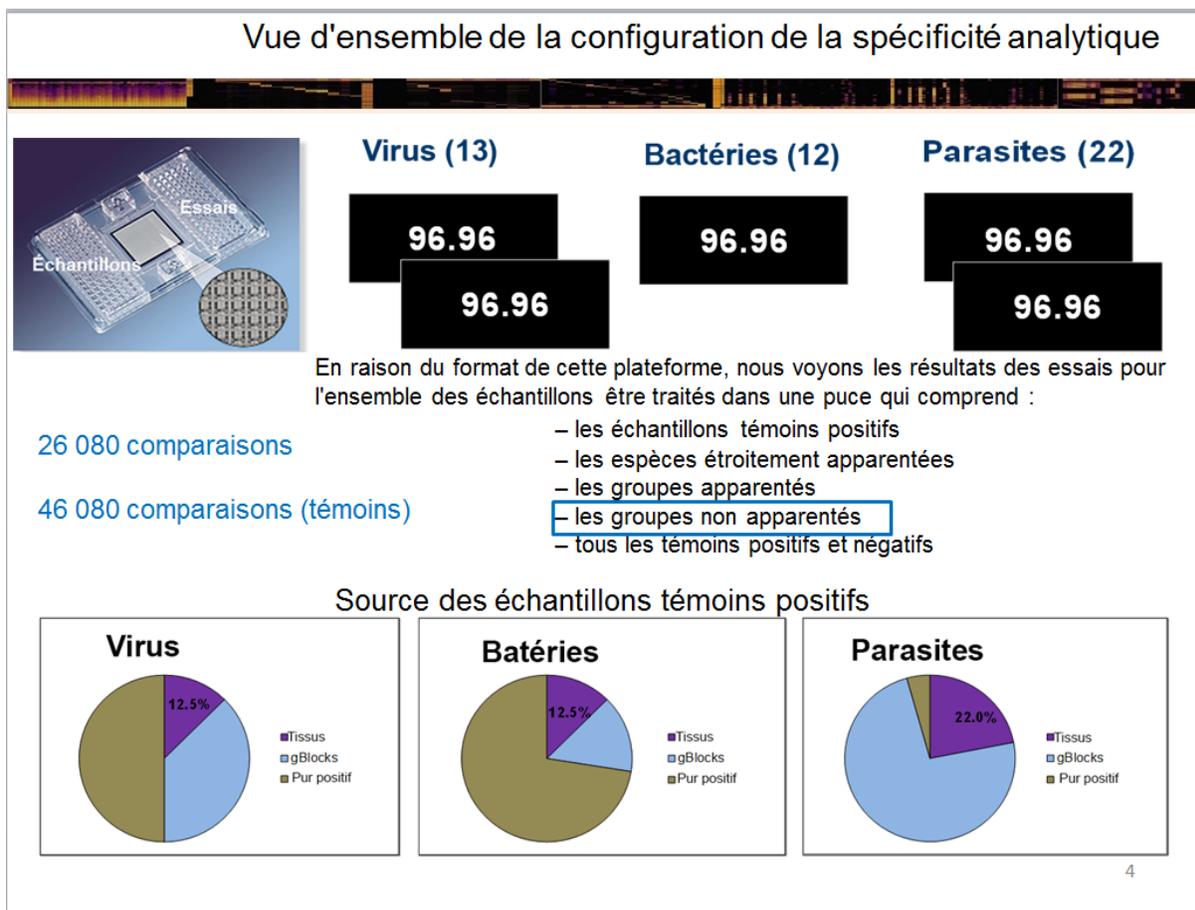


Figure 3 : Vue d'ensemble du cadre expérimental de détermination de la spécificité analytique.

## Discussion

Les discussions tournent autour de la possibilité de réactions croisées entre les essais, de coinfection par des microbes multiples, du risque d'amplification fallacieuse et de la possibilité d'entraîner des biais en sélectionnant des points de seuil afin d'éliminer les fausses détections.

Une attention spéciale est accordée à l'utilisation des gBlocks<sup>MC</sup> pour les tests de spécificité. En raison de la taille relativement réduite des gBlocks<sup>MC</sup>, qui représentent habituellement une petite portion du génome complet du microbe cible, il peut être peu pertinent de rapporter un pourcentage élevé de spécificité. De plus, puisque certains des microbes ont coexisté les uns avec les autres et avec leurs hôtes pendant longtemps et qu'il existe plusieurs exemples d'échange de gènes entre groupes au cours de l'évolution, les résultats doivent être interprétés avec beaucoup de prudence.

---

On convient toutefois que des témoins et échantillons positifs naturels ne sont pas toujours disponibles et qu'en l'absence de tels témoins « véritables », les gBlocks<sup>MC</sup> offrent une solution de remplacement possible pourvu que l'interprétation des résultats soit faite avec prudence.

## **EXPOSÉ 1 – 6 : SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE – LES PARASITES**

*Présenté par Shaorong Li*

La présentatrice décrit les défis qui se sont présentés au moment de la conception de l'expérience sur la spécificité analytique des parasites. Les parasites sont classés dans de grands ensembles de taxons; ils comportent moins de séquences de données disponibles et contiennent plus d'espèces étroitement apparentées. Il est non seulement difficile de concevoir ou d'élaborer de tels essais, mais il est aussi difficile d'obtenir des échantillons positifs purs. Les auteurs ont par conséquent dû synthétiser un grand nombre de gBlocks<sup>MC</sup> et utiliser de nombreux échantillons de tissu comme témoins positifs. Ainsi, cela entraîné certaines incertitudes dans les analyses.

Les gBlocks<sup>MC</sup> ne comportent habituellement qu'une faible portion des génomes des espèces parasites. Par conséquent, des sites éventuels d'amplification croisée d'autres parties du génome peuvent être ratés. Les échantillons de tissu comportent un risque de coinfection qui peut interférer avec l'interprétation des résultats de la spécificité analytique.

### **Discussion**

Comme dans le cas des exposés précédents, les discussions portent sur la contamination croisée, la détection et la prévalence de la coinfection dans les échantillons, la spécificité des gBlocks<sup>MC</sup>, et la variabilité du gène utilisé en tant que témoin interne de la qualité de l'acide ribonucléique (ARN) (« gène domestique »).

On débat du fait que les conclusions des données de la spécificité analytique peuvent se révéler problématiques dans le cas de certains essais dans lesquels peu de parents proches ont été testés par cible, car l'ébauche du document de recherche n'a pas traité des défis associés à la détection de cibles utilisant un marqueur évoluant relativement lentement dans un contexte de diversité mal caractérisée.

Une approche plus classique pourrait impliquer une phase de découverte métagénomique initiale afin d'identifier les microbes d'intérêt qui se trouvent chez le saumon du Pacifique et de caractériser simultanément les communautés microbiennes d'arrière-plan par rapport auxquelles ces cibles d'intérêt devraient être repérées.

Il est cependant avancé que le coût de cette approche serait prohibitif à moins qu'elle ne soit appliquée de manière ciblée (c'est-à-dire aux poissons malades). Cette analyse a plutôt été axée sur les microbes déjà décrits chez le saumon qui sont soupçonnés de provoquer des maladies ou connus pour cela.

## **EXPOSÉ 1 – 7 : ANALYSE STATISTIQUE DE LA SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE ET RÉSUMÉ DE LA SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE**

*Présenté par Raphael Vanderstichel et Kristi Miller*

Les présentateurs décrivent en détail les méthodes utilisées dans les analyses des données. En somme, des estimations du caractère inclusif (la sensibilité) et du caractère exclusif (la spécificité) ont été faites pour chaque essai à la lumière de l'échec ou de la réussite attribués aux microbes cibles prévus. Des tableaux 2 x 2 sont utilisés pour décrire la manière d'obtenir de telles estimations.

---

Les présentateurs signalent qu'en règle générale, les échantillons de tissu ont présenté le nombre le plus élevé de fausses détections. Il y a eu très peu de fausses détections dans les essais viraux. La plupart des essais démontraient une sensibilité de 100 %. Hormis trois essais bactériens, deux essais viraux et huit essais parasitaires, la spécificité s'est élevée à 100 % dans l'ensemble des essais.

## Discussion

Les discussions tournent principalement autour de la détermination des points de seuil, des compromis à faire entre la sensibilité et la spécificité, des techniques possibles pour confirmer la détection du microbe suspecté – séquençage, histologie, histoire biologique des échantillons – et de la nécessité de prendre en compte les diverses valeurs Ct des différents agents pathogènes.

On recommande d'utiliser des amorces approuvées par l'OIE lorsque cela est possible. Cette approche serait plus sécuritaire compte tenu du contexte international.

Il est également recommandé de séquencer tous les échantillons dans lesquels les acides nucléiques du microbe ciblé ont été repérés afin de distinguer la réaction croisée de la coinfection. On fait aussi remarquer que le séquençage de la prochaine génération pourrait fournir davantage de renseignements et contribuer à la conception de nouveaux essais plus précis.

D'après un commentaire, ces dernières années, la science est de plus en plus animée par la collecte et l'analyse de « données volumineuses » plutôt que par l'approche classique axée sur les hypothèses. À ce titre, certains participants ont le sentiment que la communauté scientifique se voit confrontée au casse-tête de tenter de rapprocher la démarche axée sur les « données volumineuses » des normes traditionnelles pour garantir un examen scientifique minutieux et approprié à chacune des étapes de la recherche expérimentale.

Quinze (15) des 47 essais évalués sur la plateforme BioMark<sup>MC</sup> étaient nouvellement conçus. Le reste provenait de documents examinés par les pairs. Une crainte est exprimée quant au risque que les essais élaborés ou adoptés dans cette évaluation n'aient pas été examinés d'assez près. Les participants admettent que ce serait impossible à gérer compte tenu des échéanciers de ce projet en particulier. On souligne le fait que dans ce genre de situation, il est très important de documenter toutes les hypothèses et les motifs de chaque décision.

Il est proposé de concevoir et de mettre en œuvre une méthode de détection axée sur l'évolution au sein d'un contexte évolutif. Ce contexte comprendrait de préférence une évaluation (i) de la meilleure phylogénie disponible de la cible et de l'interprétation de sa spécificité, (ii) des taux d'évolution du marqueur génétique et de l'interprétation de sa sensibilité et de sa spécificité, (iii) de l'examen du degré auquel la diversité des espèces est bien caractérisée et représentée dans les bases de données.

D'autres participants ont le sentiment que ces renseignements ont aidé à la conception et la sélection ainsi qu'à l'interprétation des données, et que les données présentées étaient insuffisantes pour évaluer l'exhaustivité de ces analyses. On fait remarquer que l'évaluation des taux d'évolution du marqueur génétique (point ii, ci-dessus) n'est pas réalisable à l'heure actuelle pour la plupart des espèces dans la mesure où les taux d'évolution ne sont pas connus et risquent de n'être pas fiables entre les taxons et les conditions environnementales (p. ex., on sait que les taux d'évolution augmentent chez de nombreux agents pathogènes au sein d'un cadre de culture; ils ne peuvent donc pas être transposés des organismes de culture à des organismes sauvages).

---

## EXPOSÉ 1 – 8 : RÉPÉTABILITÉ – VUE D'ENSEMBLE

*Présenté par Amy Tabata*

La présentatrice décrit le plan de l'étude de répétabilité et les résultats obtenus.

Deux études ont été utilisées pour définir la répétabilité des essais microbiens : l'étude de répétabilité – A4 et l'étude de la limite de détection – A3. Puisque l'étude de répétabilité – A4 est présentée aux participants pour la première fois, la présentatrice décrit les méthodes de laboratoire et explique, à l'aide d'un organigramme, la manière dont on a traité chaque échantillon et chaque témoin.

Afin d'aborder précisément les multiples facteurs pouvant affecter la répétabilité, l'étude (répétabilité – A4) a été décomposée en trois parties, résumée chacune dans un diagramme qui en fait également ressortir les différences (Figure 4).

L'étude comprenait les composantes suivantes :

- variation de l'extraction de l'ARN (partie 1);
- variation technique (partie 2);
- variation de la notation entre techniciens et entre différents épisodes de notation menés par un même technicien (partie 3);
- variation de la plateforme (toutes les parties).

L'identification, la mise en place et la préparation initiales de l'échantillon ont été effectuées par une personne écartée des étapes ultérieures de l'évaluation afin de garantir une véritable notation « à l'aveugle ». La présentatrice invite les participants intéressés à examiner les résultats détaillés résumés dans l'ébauche du document de recherche.

# Répétabilité – Conception

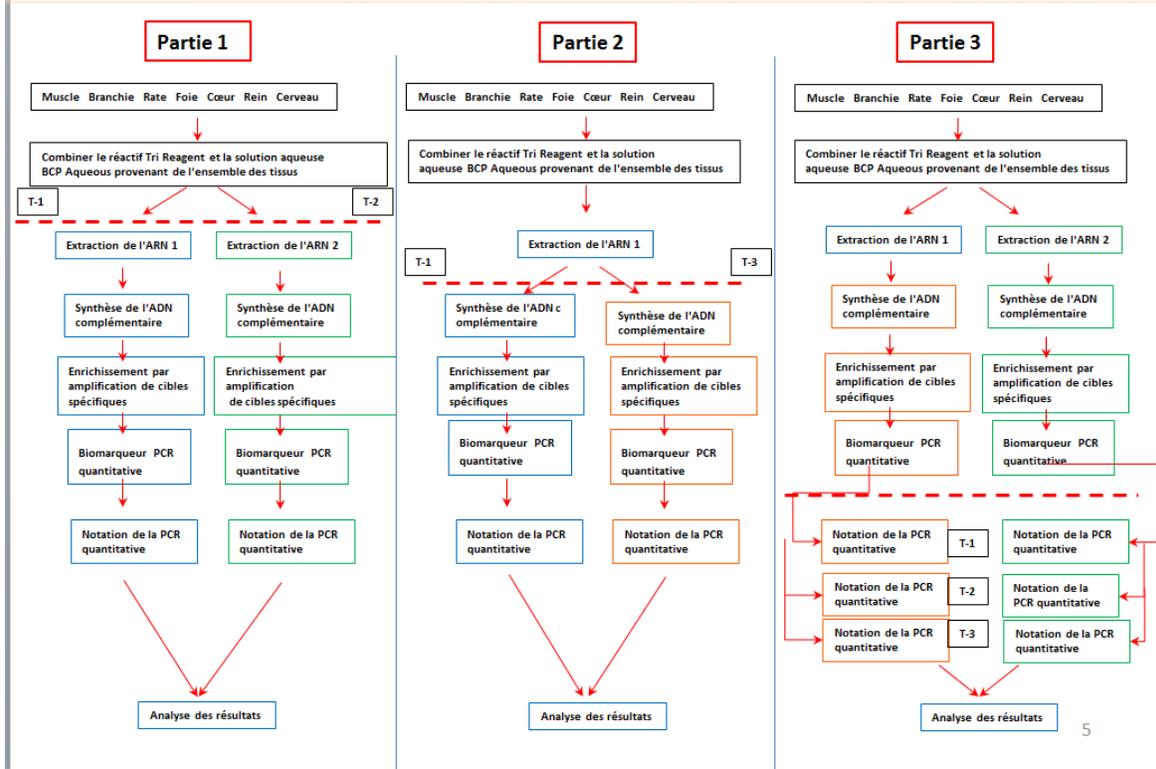


Figure 4 : Diagramme des trois parties de l'étude de répétabilité.

## Discussion

Les discussions portent sur les problèmes possibles liés aux algorithmes du logiciel qui pourraient compromettre la répétabilité de la notation et de l'extraction d'ARN ainsi que l'utilisation de tissus hors de l'échantillon afin d'évaluer la répétabilité.

Les participants sont informés que les auteurs travaillent en collaboration avec le fabricant du logiciel dans le but d'améliorer l'algorithme utilisé par la machine.

## EXPOSÉ 1 – 9 : ANALYSE STATISTIQUE DE LA RÉPÉTABILITÉ

Présenté par Raphael Vanderstichel et résumé par Kristi Miller

Cet exposé fournit une explication détaillée des méthodes statistiques utilisées dans l'étude de répétabilité et décrit la manière dont l'équipe de recherche a établi la répétabilité ( $r$ ), la reproductibilité ( $R$ ), les coefficients de corrélation de concordance (CCC), le test du khi-carré de McNemar, le coefficient kappa de Cohen ainsi que le niveau de désaccord dichotomique –  $\Pr(\text{désaccord})$  dérivé des régressions logistiques. Le présentateur décrit également la manière suivant laquelle chacune des valeurs estimées pour cette section été interprétée.

Les auteurs ont constaté que dans l'ensemble, les différences moyennes des Ct répétés représentaient : dans la partie 1 de l'étude de répétabilité, moins de 0,91 entre deux résultats et moins de 2,96 entre deux jeux ordonnés; dans la partie 2, moins de 1,52 au sein d'un jeu ordonné et moins de 2,95 entre les jeux ordonnés. Les CCC s'élevaient à plus de 0,8 (accord presque parfait) dans 19 des 24 essais, à la fois dans les parties 1 et 2 de l'étude.

---

La répétabilité entre les épisodes de notation et entre les notations des techniciens a été évaluée dans la partie 3. Les auteurs ont constaté que les différences moyennes des Ct répétés étaient inférieures à 0,75 parmi les techniciens et inférieures à 4,01 entre les techniciens, 19 fois sur 20. Pour l'ensemble des résultats de cette étude, la répétabilité, la reproductibilité et le CCC ne s'améliorent que lorsque de fortes concentrations de microbes (Ct supérieur à 20) étaient présentes dans les analyses.

Les auteurs ont utilisé une partie des données générées lors de l'étude de la limite de détection (limite de détection – A3) pour évaluer la répétabilité des essais microbiens au sein des essais et entre les jeux ordonnés. Seuls les résultats sont présentés aux participants puisque les méthodes ont été préalablement expliquées. En somme, les auteurs ont constaté que les différences moyennes des Ct répétés s'élevaient à moins de 1,25 au sein d'un jeu ordonné et à moins de 2,82 entre les jeux ordonnés, 19 fois sur 20. Les estimations de la répétabilité s'amélioraient lorsque les analyses comprenaient uniquement de fortes concentrations microbiennes (Ct supérieurs à 20).

## **Discussion**

La prudence est suggérée lors de l'interprétation des équations de McNemar en raison de la facilité avec laquelle on obtient de bons résultats de répétition pour tous les échantillons positifs et négatifs. Il est suggéré de fournir les coefficients kappa uniquement en l'absence de différences significatives.

Un participant fait un commentaire selon lequel l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN) peuvent être sensibles à l'absorption par le plastique, et que la mesure d'acide nucléique devait par conséquent être effectuée aux différentes étapes. Aux fins de l'évaluation de la répétabilité, diverses marques de tubes doivent être testées avec et sans traitement d'ADN et les mesures doivent être prises par différents techniciens.

On fait les recommandations suivantes aux auteurs :

- indiquer, dans le document de recherche, combien d'échantillons positifs ont été notés;
- documenter le protocole utilisé dans l'interprétation de la courbe;
- répartir les évaluations de la répétabilité dans le temps afin d'expliquer les différences temporelles au sein des facteurs humains et environnementaux (température, humidité, pression atmosphérique, divers lots de produits chimiques, etc.).

Les recommandations ci-dessus pourraient faire partie du programme d'assurance de la qualité du laboratoire.

## **RÉCAPITULATION ET LEVÉE DE LA SÉANCE DU JOUR 1**

Kristi Miller présente un résumé des exposés et constatations de la journée. Les présidents remercient tous les participants pour leur travail et invitent chacun à indiquer ce qu'il considère comme les points les plus importants de la journée.

La séance est levée pour la journée.

---

## EXPOSÉS ET DISCUSSIONS (JOUR 2)

### MOT DE BIENVENUE ET RÉCAPITULATION DES RÉSULTATS DU JOUR 1

Les présidents de la séance accueillent les participants et le coprésident Roger Wysocki récapitule le travail accompli la veille.

Les participants discutent de certaines questions liées aux exposés de la veille qui n'ont pas été suffisamment débattues à ce moment, notamment : la température utilisée durant les cycles de PCR; le entre chaque essai et la température optimale; la concentration optimale d'amorces dans les différents essais; la décision d'utiliser une concentration uniforme de sondes pour l'ensemble des jeux ordonnés.

Un participant fait remarquer que comme la microfaune et la méiofaune sont mal caractérisées dans le milieu marin, la prudence est de rigueur pour ne pas surinterpréter les résultats.

On suggère qu'étant donné que tous les essais de répétabilité ont été effectués avec un lot de produits chimiques d'un fabricant, il conviendrait, dans le cadre du programme d'assurance de la qualité, de réaliser des évaluations entre les lots et entre les fabricants afin de comparer les caractéristiques de rendement.

### EXPOSÉ 2 – 1 : COMPARABILITÉ

*Présenté par Amy Tabata*

La présentatrice offre une vue d'ensemble des expériences comparant le rendement des essais microbiens effectués sur les plateformes BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm® et ABI 7900. Les chercheurs ont utilisé à cette fin la méthodologie suivante :

- Ils ont utilisé les mêmes échantillons ou la même extraction ou le même ADN complémentaire (l'ADNc qui est produit à partir d'un modèle d'ARN messager (ARNm) en utilisant la transcriptase inverse d'une enzyme) pour les deux plateformes.
- Ils ont évalué 21 essais microbiens en utilisant 80 échantillons de l'étude de répétabilité.
  - BioMark<sup>MC</sup> – Analyse de chaque essai deux fois
  - ABI 7900 – Analyse de chaque échantillon ou essai deux fois
- Ils ont comparé l'écart des Ct entre les deux plateformes.
- Ils ont comparé la linéarité, l'efficacité et la sensibilité de chaque essai sur les deux plateformes

La Figure 5 montre le plan de l'étude de comparabilité.

En se fondant sur les résultats obtenus, les auteurs ont constaté que les essais qui obtenaient un bon rendement sur une plateforme obtenaient habituellement un bon rendement sur l'autre plateforme (p. ex., l'essai sur le parasite *Kudoa thyrsites* – ku\_thy). La plateforme BioMark<sup>MC</sup> présentait souvent une teneur naturelle plus élevée en raison, d'après les auteurs, des particularités des algorithmes du logiciel.

Dans au moins un cas (celui de l'essai pour *Parvicapsula pseudobranchicola* – pa\_pse) la plateforme BioMark<sup>TM</sup> a indiqué que les échantillons étaient de faible qualité alors que la plateforme ABI 7900 les déclarait positifs.

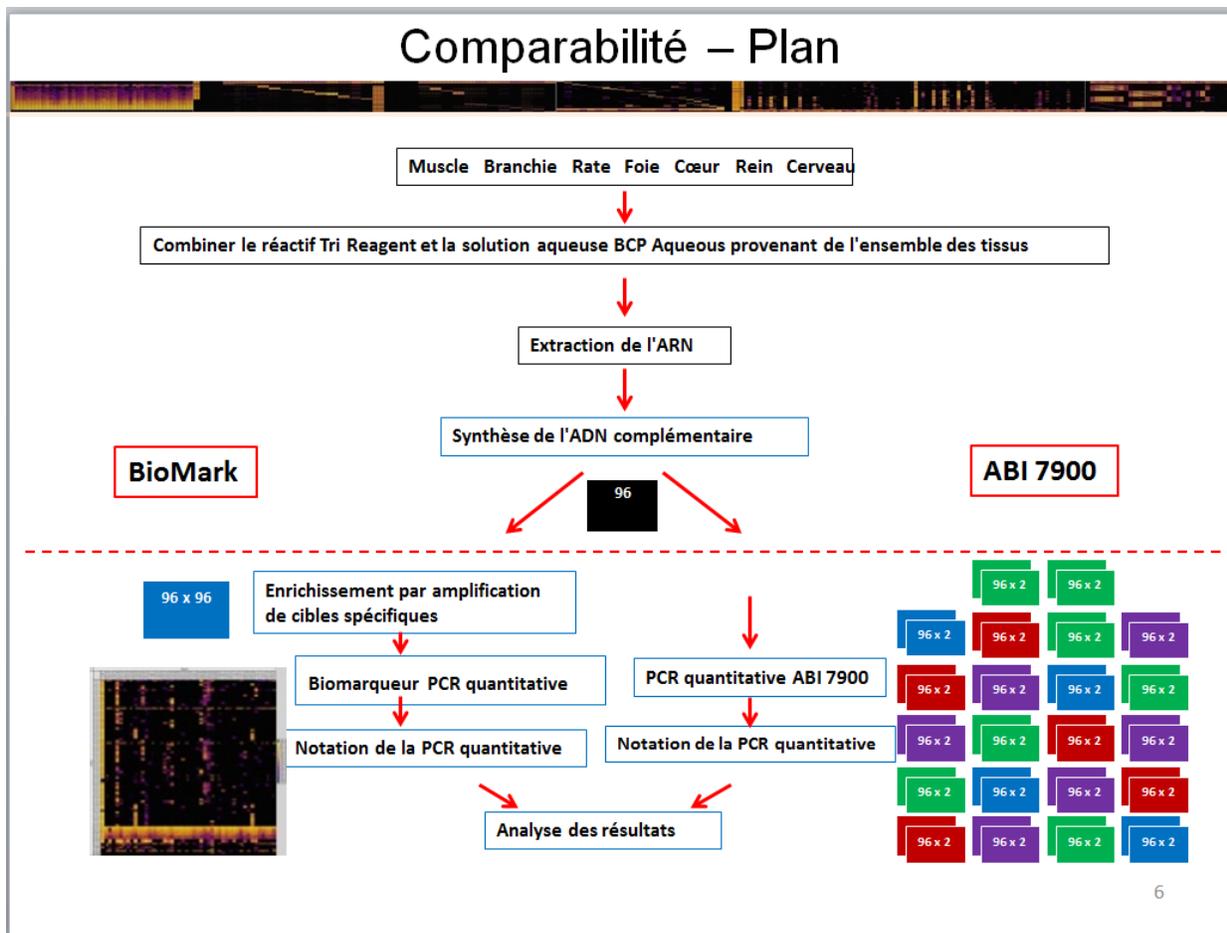


Figure 5 : Schéma du plan de l'étude de comparabilité.

## Discussion

Pendant la discussion, on confirme que la même concentration d'échantillons et de sondes a été utilisée dans les deux plateformes comparées et que les réactions ont été effectuées à des températures identiques. L'efficacité de la fluorescence s'est élevée à environ 80 % et une teneur naturelle élevée a été observée.

Un participant demande si les caractéristiques de rendement (les temps de réponse, les temps d'attente) ont été comparées entre les plateformes. Cela a par la suite été défini comme une source d'incertitude.

La présentatrice explique également que l'interprétation des algorithmes différerait sensiblement entre les deux machines et que la plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm® ne permet pas l'ajustement de la situation de départ.

## EXPOSÉ 2 – 2 : ANALYSE STATISTIQUE DE LA COMPARABILITÉ

*Présenté par Raphael Vanderstichel et résumé par Kristi Miller*

Les CCC et les régressions linéaires ont été utilisés afin de comparer les valeurs Ct entre les plateformes BioMark<sup>MC</sup> et ABI 7900. En raison de la différence inhérente d'environ 10 Ct, les auteurs ont prévu des CCC plus bas. Ils ont par conséquent évalué divers ajustements afin d'améliorer l'accord. L'application d'ajustements à tous les essais ou à des essais en particulier

---

a amélioré l'accord Ct entre les deux plateformes. Une analyse de la fonction d'efficacité du récepteur a fait ressortir quelles étaient les combinaisons de points de seuil de Ct (pour attribuer le statut de réussite ou d'échec) qui amélioreraient également l'accord entre les deux plateformes. Le présentateur signale que la sensibilité et la spécificité pourraient être très élevées (p. ex., être supérieures à 0,99) avec des valeurs des points de seuil Ct soigneusement sélectionnées et l'utilisation de notes doubles.

## **Discussion**

On fait remarquer que des résultats différents ont été obtenus lorsqu'une faible concentration de microbes était utilisée, et que dans des conditions optimales, un niveau similaire de détection doit être atteint lorsque les plateformes sont utilisées. On explique que les échantillons amplifiés ont été utilisés avec la plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm® alors que les échantillons utilisés dans la plateforme ABI 7900 n'ont pas été amplifiés; cela pourrait expliquer les différences.

On informe les participants que l'« ajout » d'une quantité connue d'ADN aux tissus a été envisagé. Les analyses des résultats ne sont toutefois pas terminées et seront présentées ultérieurement.

Une préoccupation est soulevée selon laquelle non seulement le Ct devait être comparé, mais aussi qu'il faudrait rechercher la concordance du nombre de copies et optimiser les conditions. Les avantages ou inconvénients de l'utilisation du Ct et des nombres de copies font l'objet d'une discussion, et on conclut que ce choix peut varier en fonction de l'objet des analyses.

On s'entend sur le fait que les résultats rapportés montrent en règle générale une forte ressemblance entre les essais sur les deux plateformes, bien que la comparabilité des échantillons à forte concentration diffère de la comparabilité des échantillons à faible concentration et que la qualité ait été affectée par la qualité des images d'amplification.

## **EXPOSÉ 2 – 3 : AMPLIFICATION DE CIBLES SPÉCIFIQUES ET ÉVALUATION DE L'AMPLIFICATION DE CIBLES SPÉCIFIQUES SUR LA SENSIBILITÉ ANALYTIQUE**

*Présenté par Shaorong Li et Angela Schulze*

Les présentatrices décrivent l'amplification de cibles spécifiques et les approches utilisées pour évaluer l'effet de l'étape de l'amplification de cibles spécifiques sur la sensibilité analytique, désignée comme l'étude du groupe ASe (Figure 6).

Cette étude avait pour but d'évaluer et de quantifier l'effet de l'étape d'amplification de cibles spécifiques sur la faible contamination microbienne lorsqu'elle est testée dans un mélange avec des concentrations microbiennes élevées, moyennes et faibles. Elle visait également à déceler toute concurrence inhibitrice entre les microbes des mélanges d'échantillons et de déterminer le taux de faux positifs dans chaque essai.

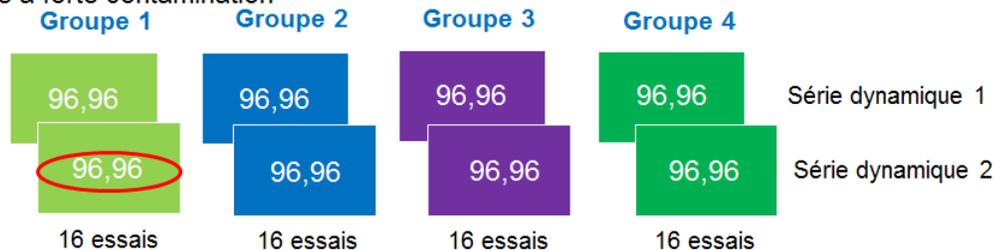
On souligne des complications dans la configuration et dans l'analyse expérimentales, y compris de possibles coinfections avec les échantillons de témoins positifs provenant d'échantillons de tissu, ainsi que le volume et les limitations de contamination microbienne d'après les échantillons témoins positifs fournis.

## **Discussion**

Après l'exposé, les présentatrices répondent à des questions portant sur l'uniformité des résultats et les techniques particulières utilisées dans l'étude.

## Sensibilité analytique – Vue d'ensemble du groupe Ase

Évaluer l'effet de l'étape de l'amplification de cibles spécifiques sur les contaminations relatives des microbes à faible contamination lorsqu'elles sont mélangées à d'autres microbes à forte contamination



64 tests microbiens (4 groupes x 16 essais microbiens)

- 17 microbes ont été testés deux fois
- 30 microbes ont été testés une fois

Chaque groupe comprend 42 mélanges contenant jusqu'à huit microbes à contamination élevée, moyenne ou faible

Au total, 168 (4 x 42) mélanges ont été évalués sur  
4 amplifications de cibles spécifiques x 3 réplicats d'essais x 2 séries dynamiques chacun.

L'analyse complète comprend 73 728 réactions PCR quantitative (60 984 réactions à l'exception des témoins)

7

Figure 6 : Schéma du plan de l'étude visant à évaluer l'effet de l'amplification de cibles spécifiques sur la sensibilité analytique.

### EXPOSÉ 2 – 4 : ANALYSE STATISTIQUE DES EFFETS DE L'AMPLIFICATION DE CIBLES SPÉCIFIQUES SUR LA SENSIBILITÉ, LA SPÉCIFICITÉ ET LA RÉPÉTABILITÉ ANALYTIQUES DES ESSAIS MICROBIENS

Présenté par Raphael Vanderstichel et Kristi Miller

Les présentateurs expliquent que les analyses des données ont consisté à : déterminer les valeurs Ct attendues d'après la dilution théorique et les efficacités connues des essais; définir des valeurs Ct pour de fortes concentrations microbiennes (sans dilutions).

Des comparaisons ont été réalisées entre les Ct attendus et observés au moyen de CCC. Des statuts de réussite ou d'échec ont été attribués à des Ct prédéterminés à la lumière de la limite de détection de chaque essai. Les probabilités de faux négatif et de détection ( $Pr(\text{faux négatif})$  et  $Pr(\text{détection})$ ) ont été calculées et utilisées afin de résumer l'effet de l'amplification de cibles spécifiques sur la sensibilité analytique. Quelques essais aberrants ont été repérés visuellement (*Facilispora margolisi* – fa\_mar, VNHI, *Spironucleus salmonicida* – sp\_sal, VSHV, et *Yersinia ruckeri* – ye\_ruc). Le CCC entre les Ct attendus et observés a affiché un accord élevé dans l'ensemble (0,819).

En utilisant les données de limite de détection – A3, les auteurs ont déterminé qu'il n'existait aucune différence d'efficacité entre les groupes d'essais particuliers d'amplification de cibles

---

spécifiques et d'amplification de cibles non spécifiques, et qu'il n'existait aucune différence quant au nombre minimal de copies dans la chambre pour atteindre un niveau de détection de 95 %. Il existait cependant des différences quant au nombre minimal de copies dans le matériel de départ pour atteindre un niveau de détection de 95 %. Les auteurs ont également constaté que la répétabilité propre aux essais d'amplification de cibles spécifiques et d'amplification de cibles non spécifiques (au sein des jeux ordonnés d'échantillons) était différente, alors que la reproductibilité des essais d'amplification de cibles spécifiques et d'amplification de cibles non spécifiques (entre jeux ordonnés d'échantillons) était similaire.

## **Discussion**

La discussion tourne autour des enjeux techniques et des biais qui pourraient être introduits par l'amplification de cibles spécifiques, le nettoyage ultérieur des échantillons, la conduite d'un test avec des amorces de virus par rapport à d'autres échantillons de microbes avec et sans amplification de cibles spécifiques, et l'interprétation des résultats. On affirme que des biais peuvent être introduits lors du nettoyage postérieur à la préamplification selon l'amorce utilisée et que la mesure du rendement à ce stade constitue un point de contrôle critique, en partie car les fournisseurs peuvent modifier les spécifications.

On recommande de mesurer l'efficacité du nettoyage de l'amorce. On recommande également de conduire les tests sans amorce afin de détecter d'éventuels amorces ou fragments restants.

Il est dit qu'une façon de faire face aux incertitudes concernant la spécificité et la sensibilité des essais pourrait consister à utiliser plus d'un essai par microbe cible; cela aiderait lors de l'interprétation des résultats. Cela exigerait toutefois que le même niveau de test soit appliqué à chaque essai. Sur la plateforme BioMark<sup>MC</sup>, cela pourrait nécessiter plus d'une réaction d'amplification de cibles spécifiques par échantillon dans la mesure où deux essais proches ne peuvent pas être utilisés dans la même réaction d'amplification de cibles spécifiques. On suggère donc de mener une validation de séquence pour faire face à cette incertitude.

## **EXPOSÉ 2 – 5 : POINTS FORTS ET POINTS FAIBLES DE LA PLATEFORME BIOMARK<sup>MC</sup> POUR LA SURVEILLANCE MICROBIENNE**

*Présenté par Kristi Miller*

L'auteure insiste sur le fait que les approches, les résultats et les conclusions de l'étude correspondent à trois études publiées (voir le document de recherche associé) et sont aussi appuyés par des personnes ayant déjà adopté la technologie, qui ont conclu que le rendement des essais sur la plateforme BioMark<sup>MC</sup> était excellent. Aucune répercussion négative de l'amplification de cibles spécifiques sur le rendement des essais n'a été décelée.

La présentatrice compare également le rendement de quatre essais (VSHV, VNHI, virus de l'AIS8 et virus de la nécrose pancréatique infectieuse (NPI)) effectués avec la plateforme BioMark<sup>MC</sup> aux résultats existants, obtenus en utilisant des échantillons indépendants et des plateformes de PCR quantitative dans les laboratoires du Programme national sur la santé des animaux aquatiques. La présentatrice a conclu que les résultats étaient largement comparables.

La présentatrice affirme que dans l'ensemble, la plateforme BioMark<sup>MC</sup> affiche les points forts et les points faibles ci-dessous :

### **Points forts**

- Profondeur de la couverture
- Coinfections
- Coût

- 
- Économies de temps
  - Efficience
  - Souplesse
  - Capacité d'expansion
  - Raffinement de l'usage
  - Sensibilité analytique
  - Interchangeabilité
  - Exigences limitées sur le plan des tissus
  - Capacité d'être mise à jour pour faciliter le séquençage PCR
  - Évaluations simultanées de la qualité de l'ARN
  - Détection d'une deuxième sonde

### **Points faibles**

- Mauvaise qualité des courbes dans certains essais
- Évaluation de la présence et de la contamination, pas de la maladie
- Exigences accrues de formation
- Ajout, en raison de l'amplification de cibles spécifiques, d'un certain écart dans le Ct
- Coût initial de l'instrument

La présentatrice a conclu que les points forts étaient plus nombreux que les points faibles aux fins de la mise en œuvre de la plateforme de surveillance microbienne BioMark<sup>MC</sup> et qu'avec des validations appropriées, cette plateforme pourrait également être utile pour les diagnostics.

### **Discussion**

En général, les examinateurs et participants sont d'accord avec les points forts et faiblesses présentés de la plateforme BioMark<sup>MC</sup>. Ils font également les commentaires ci-dessous :

- Des défis se posent à l'évaluation de la plateforme et des essais aux fins prévues. Il ne s'agit pas d'une faiblesse intrinsèque, mais d'un défi.
- Certaines nouvelles technologies être très puissantes, mais la manière d'effectuer des recherches a changé. Traditionnellement, on décelait un problème, puis on recherchait des manières de l'expliquer et de le résoudre. Dans l'approche suivie pour cette étude, de nouveaux agents sont détectés, puis on tente de cerner les problèmes qu'ils pourraient causer (p. ex. la maladie du poisson).
- Il s'agit d'une nouvelle technologie, élaborée pour des recherches générales sans norme à suivre à l'heure actuelle. On s'attend toutefois à ce que son application aux connaissances et aux normes soit plus solide à l'avenir. La définition d'un cadre pour l'interprétation des résultats de recherche obtenus constituerait un pas dans cette direction.
- L'utilisation de l'instrument dans le cadre de projets de grande envergure crée des ensembles de données volumineuses qui ne sont pas soumises à un examen aussi minutieux que les ensembles de données plus petits. Cela produit de l'incertitude. Il est difficile de détecter et d'identifier ces sources d'incertitude. Les sources d'incertitude doivent être documentées. On reconnaît que cette incertitude est en partie attribuable à une expérience limitée de la plateforme à l'échelle mondiale et que cela s'améliorera avec le temps.

- 
- L'importante quantité de données générées soulève des défis quant à la manipulation, à la logistique, à l'analyse statistique et à l'interprétation des résultats.
  - Le fait que seuls de très petits échantillons soient nécessaires, ce qui facilite l'élaboration d'un échantillonnage non légal, constitue un point fort de la plateforme.
  - En tant qu'outil de « découverte », la plateforme peut être polyvalente tout en réduisant les redondances au sein de chaque essai microbien.
  - L'utilisation généralisée de la robotique pour la manipulation des liquides de l'échantillon et d'autres liquides réduit au minimum les risques d'erreur.
  - La plateforme convient le mieux aux études ou épisodes d'échantillonnage à grande échelle. Elle convient moins bien à des ensembles de données plus petits.
  - Les procédures normalisées d'exploitation (PNE) ne sont pas aussi poussées que pour d'autres combinaisons de plateformes ou d'essais. Cette question doit être abordée.
  - Le manque de comparaison entre laboratoires constitue un point faible dont il faut s'occuper à l'avenir.
  - Les essais complexes et les ensembles volumineux de données nécessitent un programme d'assurance et de contrôle de la qualité (AQ/CQ) étendu fondé sur des mesures de rendement, particulièrement aux points de contrôle critique.
  - Le calcul des coûts réels d'exploitation et du temps réel de traitement doivent comprendre l'entretien, le personnel, l'AQ et le CQ, l'amortissement des instruments ainsi que le temps consacré et les frais afférents aux activités connexes.

De nombreux commentaires sont formulés quant aux points suivants : la distinction entre l'évaluation de la plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm® et de l'unique appareil utilisé dans cette série d'évaluations; le groupe d'essais utilisés dans cette évaluation et l'interprétation des résultats obtenus; le fait que les essais ne sont pas effectués indépendamment, mais sont au contraire liés par les conditions des essais et d'autres facteurs communs.

D'autres discussions portent sur l'utilisation de la plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm® et les essais connexes afin de déterminer la présence ou l'absence, la prévalence et la contamination relative de microbes ainsi que des limites éventuelles, ainsi que l'importance d'employer la terminologie juste lorsque l'on circonscrit les enjeux.

## **RÉCAPITULATION ET LEVÉE DE LA SÉANCE DU JOUR 2**

Les présidents remercient tous les participants pour leur travail et invitent chacun à indiquer ce qu'il considère comme les points les plus importants de la journée.

La séance est levée pour la journée.

---

## EXPOSÉS ET DISCUSSIONS (JOUR 3)

### MOT DE BIENVENUE ET RÉCAPITULATION DES RÉSULTATS DES JOURS 1 ET 2

Les présidents accueillent les participants. Le coprésident Roger Wysocki récapitule le travail accompli le jour précédent et expose les grandes lignes de ce qui reste à accomplir.

### EXPOSÉ 3 – 1 : LE PRINCIPE DE CONSENSUS DANS LE CADRE DU PROCESSUS D'EXAMEN PAR LES PAIRS DU SCCS

*Présenté par Gilles Olivier*

Le coprésident fournit de l'information détaillée quant à l'application du principe de consensus à ce processus spécifique d'examen par les pairs du SCCS.

### DISCUSSION GÉNÉRALE ET DERNIÈRE ÉTAPE

Le coprésident présente une ébauche du sommaire de l'avis scientifique et lance une discussion générale.

Des préoccupations sont soulevées au sujet du caractère adéquat de la description des mesures de contrôle de la qualité des évaluations, du programme général d'assurance de la qualité du laboratoire ainsi que de l'exactitude de la formulation utilisée dans le texte de l'ébauche du document de recherche et de l'ébauche du sommaire de l'avis scientifique.

La formulation est présentée, débattue et modifiée à mesure que la discussion progresse sur les sujets suivants :

- L'examen par les pairs constate que la plateforme BioMark<sup>MC</sup> fonctionne aussi bien que n'importe quelle autre plateforme de PCR quantitative, et il n'a relevé aucune lacune de l'instrument en tant que tel aux fins de la phase 2b du projet.
- La méthodologie de recherche actuelle est très différente d'une démarche s'appuyant sur des hypothèses aux fins de l'enquête sur la santé des poissons.
- L'interprétation de la signification de niveaux éventuellement bas d'agents pathogènes sur l'état de santé du poisson constitue une nouvelle manière d'évaluer l'incidence potentielle des agents pathogènes sur les populations de poissons.
- Plusieurs avertissements et mises en garde existent quant aux limites de l'extrapolation de tels résultats de recherche.
- La méthode de détection moléculaire PCR quantitative intègre des renseignements *a priori* très précis au sujet de la séquence de la cible à détecter. Il ne s'agit par conséquent pas d'une technique nécessairement bien adaptée à la découverte de microbes.
- Une approche à l'aveugle qui ne repose pas sur le savoir existant au sujet de la diversité serait plus adéquate pour la recherche à des fins de découverte dans la mesure où elle accroît au maximum la probabilité de saisir des cibles autant *inconnues* que *connues*.
- Une approche métagénomique pourrait accomplir cela en ce que les fragments amplifiés de tous les organismes au sein d'un échantillon complexe (p. ex., un homogénat de tissus de saumon) sont séquencés en parallèle en utilisant la prochaine génération de séquençage. À la différence de la PCR quantitative, les amorces utilisées conviennent « universellement » à de vastes groupes taxonomiques d'intérêt.
- Une procédure de signalement d'agents pathogènes réglementés à l'ACIA est débattue et approuvée.

- 
- En ce qui concerne les maladies et agents pathogènes réglementés par l'ACIA ou inscrits par l'OIE, il convient d'utiliser les essais recommandés par l'OIE lors que cela est possible.
  - Il est recommandé que le laboratoire de recherche de M<sup>me</sup> Miller adhère à un programme d'assurance de la qualité qui procéderait à des vérifications des méthodes et du processus, à la vérification des réactifs critiques, à la calibration des pipettes, etc. afin de garantir des résultats défendables et reproductibles.
  - Chaque aspect du processus de test, y compris l'interprétation des résultats, doit être pris en compte afin d'atténuer les risques. Ces processus doivent être inscrits dans les procédures normalisées d'exploitation et au sein d'un manuel général de la qualité.

On conclut que la plateforme BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm® représente une nouvelle technologie puissante qui offre un excellent potentiel pour la détection et la surveillance des microbes.

On s'entend pour affirmer que l'instrument évalué, BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm®, a fait la preuve de son adéquation pour ce projet de recherche.

Plusieurs *points forts*, *points faibles* et *incertitudes* potentielles quant aux résultats obtenus en utilisant l'instrument BioMark<sup>MC</sup> de Fluidigm® sont débattus et des recommandations pour les aborder sont formulées.

L'ébauche du document de recherche est approuvée moyennant quelques modifications. Elle devra être révisée d'après les commentaires formulés à l'examen par les pairs et les conclusions tirées dans le cadre du processus consultatif. Ces commentaires seront transmis aux auteurs afin qu'ils revoient l'ébauche du document de recherche et que cette dernière soit révisée et arrêtée définitivement à l'appui de l'avis fourni. Deux comités de rédaction sont formés : un pour aider à la rédaction définitive de l'avis scientifique, et l'autre, pour évaluer et recommander les changements à apporter en vue de la rédaction définitive du document de recherche.

## **CONCLUSION ET LEVÉE DE LA SÉANCE**

Les présidents terminent la réunion en remerciant les auteurs pour leur excellent travail malgré un échéancier serré. Ils remercient également les participants pour leurs commentaires constructifs et leur précieuse contribution au processus. Ils lèvent ensuite la séance.

Peu de temps après la réunion, les présidents recevront tous les commentaires écrits par les participants et les feront parvenir aux auteurs.

## ANNEXES

### ANNEXE 1 : LISTE DES PARTICIPANTS

Nom du participant	Organisme d'appartenance
Ahmed Siah	BC Centre for Aquatic Health Science Campbell River (Colombie-Britannique)
Alf Bungay	Pêches et Océans Canada – Division des sciences de l'aquaculture, de la biotechnologie et de la santé des animaux aquatiques (DSABSAA) Ottawa (Ontario)
Amy Tabata	Pêches et Océans Canada – Station biologique du Pacifique Nanaimo (Colombie-Britannique)
Angela Schulze	Pêches et Océans Canada – Station biologique du Pacifique Nanaimo (Colombie-Britannique)
Anne Veniot	Pêches et Océans Canada – Centre des pêches du Golfe Moncton (Nouveau-Brunswick)
Benjamin Forward	Conseil de la recherche et de la productivité du Nouveau-Brunswick – Division des aliments, de la pêche et de l'aquaculture Fredericton (Nouveau-Brunswick)
Brian Riddell	Fondation du saumon du Pacifique Vancouver (Colombie-Britannique)
Cathryn Abbott	Pêches et Océans Canada – Station biologique du Pacifique Nanaimo (Colombie-Britannique)
Diana Trager	Pêches et Océans Canada – Gestion de l'aquaculture, région du Pacifique Vancouver (Colombie-Britannique)
Diane Morrison	Marine Harvest Canada Campbell River (Colombie-Britannique)
Gilles Olivier	Pêches et Océans Canada – Division des sciences de l'aquaculture, de la biotechnologie et de la santé des animaux aquatiques (DSABSAA) Ottawa (Ontario)
Ian Gardner	Centre for Veterinary Epidemiological Research Université de l'Île-du-Prince-Édouard Charlottetown (Île-du-Prince-Édouard)
Yvan Stefanov	Pêches et Océans Canada – Division des sciences de l'aquaculture, de la biotechnologie et de la santé des animaux aquatiques (DSABSAA) Ottawa (Ontario)
Jay Parsons	Pêches et Océans Canada – Division des sciences de l'aquaculture, de la biotechnologie et de la santé des animaux aquatiques (DSABSAA) Ottawa (Ontario)
Joe Banoub	Pêches et Océans Canada – Centre des pêches de l'Atlantique Nord-Ouest St. John's (Terre-Neuve-et-Labrador)

<b>Nom du participant</b>	<b>Organisme d'appartenance</b>
Knut Falk	Norwegian Veterinary Institute Oslo, Norvège
Kristi Miller-Saunders	Pêches et Océans Canada – Station biologique du Pacifique Nanaimo (Colombie-Britannique)
Mark Higgins	Pêches et Océans Canada – Station biologique du Pacifique Nanaimo (Colombie-Britannique)
Mark Saunders	Pêches et Océans Canada – Station biologique du Pacifique Nanaimo (Colombie-Britannique)
Michio Yasunami	Department of Clinical Medicine, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University Nagasaki, Japon
Nathalie Bruneau	Agence canadienne d'inspection des aliments – Direction des sciences de la santé des animaux Ottawa (Ontario)
Nellie Gagné	Pêches et Océans Canada – Centre des pêches du Golfe Moncton (Nouveau-Brunswick)
Raphael Vanderstichel	Centre for Veterinary Epidemiological Research Université de l'Île-du-Prince-Édouard Charlottetown (Île-du-Prince-Édouard)
Roger Wysocki	Pêches et Océans Canada – Division des sciences de l'aquaculture, de la biotechnologie et de la santé des animaux aquatiques (DSABSAA) Ottawa (Ontario)
Sara Moutailler	ANSES – Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort Maisons-Alfort, France
Shaorong Li	Pêches et Océans Canada – Station biologique du Pacifique Nanaimo (Colombie-Britannique)
Sharon Clouthier	Pêches et Océans Canada Institut des eaux douces (Manitoba)
Sonja Saksida	Indépendante
Stewart Johnson	Pêches et Océans Canada – Station biologique du Pacifique Nanaimo (Colombie-Britannique)

---

## ANNEXE 2 : CADRE DE RÉFÉRENCE

### Examen de l'évaluation de la plateforme BioMark de Fluidigm pour déterminer son adéquation pour la surveillance microbienne

#### Examen national par des pairs – région de la capitale nationale

Du 2 au 4 décembre 2014

Nanaimo, Colombie Britannique

Présidents : Roger Wysocki et Gilles Olivier

#### Contexte

Pêches et Océans Canada collabore avec la Fondation du saumon du Pacifique (Pacific Salmon Foundation) et Genome BC à un projet quinquennal en plusieurs étapes (Le Projet) qui prévoit fusionner les technologies sur le génome et la santé du poisson afin de déterminer quels microbes sont portés par les salmonidés sauvages et d'élevage de la Colombie-Britannique, l'origine possible de ces microbes ainsi que les conséquences que ces microbes peuvent avoir sur la santé du saumon.

Le but stratégique défini dans le cadre du Projet consiste à « recenser les microbes et les maladies potentielles qui pourraient nuire à la productivité et au rendement du saumon (sauvage) de la Colombie-Britannique et déterminer quels échanges peuvent s'effectuer entre le saumon sauvage et le saumon d'élevage pendant l'évolution de ces microbes ». Le projet sera réalisé en quatre *phases* (étapes) séquentielles.

La **phase 1** (de 2012 à 2013) prévoit l'établissement d'un programme d'échantillonnage à grande échelle, échelonné sur douze mois, pour le saumon sauvage, le saumon d'écloserie et le saumon d'aquaculture. L'échantillonnage a été réalisé en 2012 et au début de 2013.

La **phase 2** (de 2013 à 2015) prévoit la conception, la mise à l'essai et l'évaluation d'une technologie génomique originale visant à déterminer quels microbes associés à des maladies touchant les saumons du monde entier sont portés par le saumon sauvage et le saumon d'élevage de la Colombie-Britannique.

La **phase 3** (de 2014 à 2016) sera axée sur les microbes identifiés pendant la phase 2, plus particulièrement ceux n'ayant pas fait l'objet de recherches approfondies en Colombie-Britannique et posant le plus grand risque de maladie pour le saumon sauvage. Des études de provocation en laboratoire seront menées dans le but d'évaluer quelles sont les conditions associées à l'apparition de maladies chez le saumon du Pacifique, causé par des microbes spécifiques. Des études additionnelles visant à évaluer les dynamiques de transmission de microbes particuliers seront aussi menées.

La **phase 4** (de 2016 à 2017) prévoit la présentation aux organismes de gestion de rapports de recherche et d'exposés portant sur l'utilité potentielle des méthodes mises au point pendant le projet et l'application des résultats obtenus à des activités de surveillance ultérieures.

Le projet en est actuellement à la Phase 2a, dont l'objectif principal défini consiste à déterminer, à mettre à l'essai et à évaluer la sensibilité, la spécificité et la répétabilité des essais au moyen d'une plateforme microfluidique à haut rendement (**plateforme BioMark de Fluidigm**), conçue pour évaluer quantitativement la présence de microbes et le degré de contamination microbienne dans de multiples échantillons testés simultanément. Cette technologie fait appel à une étape de pré-amplification originale dont les effets n'ont pas encore été évalués. La phase 2a ne prévoit pas l'élaboration d'une approche ou d'un outil visant à diagnostiquer la

---

maladie chez le saumon sauvage ou d'élevage. L'évaluation de la sensibilité et de la spécificité diagnostique sera réalisée pendant la phase 2b du projet.

La décision de procéder à la phase 2b du projet sera prise en fonction du rendement analytique de la plateforme microfluidique à haut rendement, lequel fait actuellement l'objet d'une évaluation. Il importe de s'assurer du rendement de tout outil mis au point afin d'évaluer la présence de microbes et les risques de maladie associés, étant donné la quantité considérable de répercussions possibles sur les ressources aquatiques du Canada. Par conséquent, les outils de diagnostic doivent être fiables. Par exemple, la sensibilité et la spécificité des essais microbiens effectués par la plateforme doivent limiter les risques de résultats faux-négatifs ou faux-positifs.

Afin d'étayer les décisions liées à l'avancement du projet à la phase 2b, et finalement celles à savoir si la plateforme BioMark de Fluidigm et les essais effectués à l'aide de celle-ci peuvent être utilisés aux fins de recherche de surveillance à grande échelle de microbe présent chez les saumons du Pacifique sauvages et les saumons de l'Atlantique d'élevage le Comité directeur de la gestion du projet du MPO a demandé la tenue d'un processus d'examen national par des pairs sous les auspices du Secrétariat canadien de consultation scientifique (SCCS). Ce processus visera l'évaluation du rendement **de la plateforme BioMark de Fluidigm** relativement à la détection microbienne, et portera une attention particulière, le cas échéant, aux effets de l'étape de pré-amplification.

### **Objectifs**

L'objectif de l'examen national par des pairs, sous le SCCS, est de fournir un avis sur l'adéquation des essais effectués à partir de la plateforme BioMark de Fluidigm, utilisant la pré-amplification, aux fins de recherche à grande échelle visant la surveillance des microbes présents chez les saumons du Pacifique sauvages et les saumons de l'Atlantique d'élevage. Un document de travail, qui fournira la base de l'avis, sera examiné.

Plus particulièrement, cet examen portera sur ce qui suit :

1. la sensibilité, la spécificité, la comparabilité et la répétabilité analytiques de chaque essai microbien, tel qu'établi dans le document de travail;
2. la mesure dans laquelle les résultats des essais de la plateforme BioMark de Fluidigm sont comparables à ceux de la plateforme ABI 7900 (au laboratoire de génétique moléculaire de la Station biologique du Pacifique);
3. les effets de l'étape de pré-amplification menée sur de nombreuses cibles indépendantes sur la sensibilité, la spécificité et la répétabilité analytiques des essais. Plus précisément :
  - déterminer si l'étape de pré-amplification introduit des biais dans l'abondance relative des cibles,
  - déterminer si l'étape de pré-amplification génère des cibles fausses;
4. les avantages, les restrictions, les incertitudes et les utilisations proposées en lien avec cette méthodologie (y compris les concepts et les analyses statistiques) pour les besoins de recherche définis précédemment.

### **Publications prévues**

- Avis scientifique
- Compte rendu

- 
- Document de recherche

**Participation**

- Secteur des sciences du MPO
- Gestion des pêches et de l'aquaculture du MPO
- Agence canadienne d'inspection des aliments
- Universités
- Représentants de l'industrie de l'aquaculture
- Province de la Colombie-Britannique
- Organisations non gouvernementales