

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



*Euro*Reference

Les cahiers de la Référence

Hiver 2012

Numéro 8



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



*Euro*Reference

Les cahiers de la Référence

Numéro 8

Hiver 2012

Éditorial

Nous sommes heureux de voir paraître le Numéro 8 d'*EuroReference*. Après trois années de parution, il nous semble important de faire un bilan de la vie de cette publication. *EuroReference* compte pas moins de 3 000 abonnés et chaque numéro est consulté par près de 4 000 visiteurs, chiffres en constante augmentation depuis la création du journal.

Avec huit numéros édités depuis la première parution de l'été 2009, le rythme semestriel que nous nous étions fixé a été respecté. À partir de 2013, nous publierons trois numéros par an, ce qui permettra de toujours mieux vous informer sur les sujets d'actualité ou les rendez-vous à ne pas manquer. Le nombre de visites du site Internet du journal est intéressant à analyser. La période de parution influe sur le nombre de consultations, mais pour les numéros parus hors période estivale, les consultations dans le mois qui suit sont de 1 200 à 1 400. Chaque visiteur consulte plusieurs pages du numéro à chaque visite, avec une moyenne de 2,6 pages. Le nombre de consultations mensuelles a doublé (chiffres constatés hors « pics » lors de la sortie de chaque numéro), passant de 400 par mois en 2009, à environ 800 par mois sur le premier semestre 2012 ; chiffres supposant la fidélisation de nos lecteurs.

Le journal édité en français et en anglais a surtout reçu des contributions des équipes françaises (hors numéro spécial « sécurité et sûreté »). Après ces premières années de mise en place et de développement, nous avons l'ambition de rendre cette publication plus européenne. Pour cela, plusieurs nouveaux membres non français ont accepté de faire partie à partir de 2013, d'un comité éditorial renouvelé. Nous vous les présenterons dans le prochain éditorial.

Enfin nous pouvons annoncer pour 2013 un numéro spécial, déjà en préparation, consacré au domaine du végétal dont la sortie est prévue au printemps.

En attendant, vous trouverez dans ce numéro un article hors rubrique. Il s'agit d'un mini-glossaire sur les terminologies employées dans le domaine de la référence : fidélité, reproductibilité... tout vous sera précisé. Dans la partie Point de vue, nous revenons sur l'impact de deux crises sanitaires (la FCO et Schmallenberg) sur un laboratoire de recherche et de référence. La rubrique Actualités est l'occasion, outre vous informer des conférences à venir, de vous présenter une démarche originale de construction d'un dialogue entre des laboratoires agréés et les LNR. Nous aurons l'occasion d'y revenir dans le prochain numéro d'*EuroReference*. Dans les rubriques Réseaux et Recherche, vous pourrez découvrir un dispositif de surveillance des *Salmonella* et un protocole d'échantillonnage permettant de proposer des LMR pour les médicaments vétérinaires dans le miel. Enfin, des méthodes de sérodiagnostic de la péripneumonie contagieuse bovine par immunoblotting et de PCR quantitative pour la surveillance des avortements dus à la fièvre Q en élevages de ruminants, vous seront explicitées.

Nous vous souhaitons une bonne lecture.

Le comité de rédaction

Au sommaire



Glossaire

Glossaire de termes, issus des normes XP U 47-600-1, NF ISO 5725-1 ou Pr NF ISO 9999 (NF X 07-001), *Vocabulaire international de métrologie (VIM)* Page 2



Point de vue

Un exemple de réponse aux épidémies : impact de deux crises sanitaires (émergences des virus de la fièvre catarrhale ovine et Schmallenberg) sur un laboratoire de recherche et de référence Page 4



Actualités

10^e Conférence Internationale sur les marqueurs épidémiologiques en microbiologie, du 2 au 5 octobre 2013 Page 6

Conférence internationale I3S « *Salmonella* et salmonelloses », du 27 au 29 mai 2013, Saint-Malo, France Page 6

Un Workshop International à Paris : « *New Trends on Analytical Methods for Pesticides and Drug Residues* » Page 7

XVIII^e congrès WVPAC à Nantes du 19 au 23 août 2013 Page 7

Le guide LRUE *Listeria monocytogenes* Page 8

Construction d'un dialogue entre les LNR et les laboratoires agréés français (« laboratoires périphériques ») Page 8



Réseaux

Le Réseau *Salmonella*, un outil pour la surveillance des salmonelles de la « fourche à la fourchette ». Page 9



Recherche pour la référence

Vers l'élaboration de protocoles robustes pour l'établissement de LMR pour les médicaments vétérinaires dans le miel Page 14



Méthodes

Sérodiagnostic de la péripneumonie contagieuse bovine par immunoblotting Page 17

Adoption par un réseau de laboratoires, d'une méthode de PCR temps réel quantitative validée pour conduire une surveillance des avortements dus à la fièvre Q en élevages de ruminants Page 21



Glossaire

Glossaire de termes, issus des normes XP U 47-600-1, NF ISO 5725-1 ou Pr NF ISO 9999 (NF X 07-001), Vocabulaire international de métrologie (VIM)

Michel Laurentie, [michel.laurentie@anses.fr], Anses, Laboratoire de Fougères, Fougères, France

M. Laurentie (2012). Glossaire des termes techniques concernant la validation d'une méthode d'analyse de laboratoire dans le cadre de la démarche qualité, EuroReference, N°8, ER08-12GL01 <http://www.anses.fr/euroreference/numero8/>

Glossaire des termes techniques concernant la validation d'une méthode d'analyse de laboratoire dans le cadre de la démarche qualité.

Adoption de méthode

Préalablement à la mise en place « en routine » d'une méthode de diagnostic moléculaire dûment caractérisée et validée, l'adoption de méthode consiste pour le laboratoire, à montrer sa capacité à mettre en œuvre l'analyse concernée, en vérifiant qu'il obtient les performances annoncées dans le dossier de caractérisation et validation de la méthode, et/ou exigibles.

Biais (Norme NF ISO 5725-1)

Différence entre l'espérance mathématique des résultats d'essai et une valeur de référence acceptée.

NOTE : le biais est l'erreur systématique totale, par opposition à l'erreur aléatoire. Il peut y avoir une ou plusieurs composantes d'erreur systématique qui contribuent au biais. Une différence systématique plus importante par rapport à la valeur de référence acceptée est reflétée par une grande valeur du biais.

Condition de répétabilité (VIM 2.21)

Condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure opératoire, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps.

Conditions de reproductibilité

Conditions dans lesquelles les résultats d'analyse sont obtenus dans différents laboratoires, selon la même méthode sur une population d'échantillons identiques, par différents opérateurs utilisant des équipements différents et dans un intervalle de temps suffisamment grand pour considérer qu'il s'agit de séries d'essais différentes.

Condition de fidélité intermédiaire (VIM 2.23)

Condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure opératoire, le même lieu et des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une période de temps étendue, mais peuvent comprendre d'autres conditions que l'on fait varier.

Exactitude

Étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.

Fidélité (d'une mesure)

Étroitesse de l'accord entre les valeurs expérimentales obtenues lors de la répétition de la mesure dans les mêmes conditions
NOTE : la fidélité dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou la valeur de référence acceptée.

Fidélité, dénommée aussi chez les anglophones « précision » (d'une méthode d'analyse)

Étroitesse de l'accord entre les valeurs expérimentales obtenues au cours d'un ensemble de mesures faites dans des conditions déterminées

NOTE 1 : la fidélité dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou la valeur de référence acceptée.

NOTE 2 : la fidélité comprend la répétabilité et la reproductibilité. Une méthode d'analyse est fidèle lorsqu'elle fournit des résultats très voisins à la fois pour un même opérateur répétant les mesures dans un même endroit et pour des opérateurs l'utilisant dans des endroits différents.

Justesse

Étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée.

Limite de détection (VIM 4.18)

Valeur mesurée, obtenue par une procédure opératoire donnée, pour laquelle la probabilité de déclarer faussement l'absence d'un constituant dans un matériau est β , étant donnée la probabilité α de déclarer faussement sa présence. Cette définition pose des problèmes pratiques.

Limite de quantification

Plus petite et/ou plus grande concentration de l'analyte pouvant être quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Elle correspond à la concentration la plus petite et/ou la plus grande du domaine de validité.

Mesurage, mesure (VIM 2.1)

Processus consistant à obtenir expérimentalement une ou plusieurs valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à une grandeur.



Glossaire

Mesurande (VIM 4.3)

Grandeur que l'on veut mesurer.

Répétabilité

Etroitesse de l'accord entre les résultats des mesurages successifs du même mesurande, mesurages effectués dans la totalité des mêmes conditions de mesure

NOTE : ces conditions sont appelées conditions de répétabilité. Les conditions de répétabilité comprennent : même mode opératoire, même observateur, même instrument de mesure utilisé dans les mêmes conditions, même lieu, répétition durant une courte durée de temps. La répétabilité peut s'exprimer quantitativement à l'aide des caractéristiques de dispersion des résultats.

Reproductibilité

Etroitesse de l'accord entre les résultats de mesurage du même mesurande, mesurages effectués en faisant varier les conditions de mesure.

NOTE : pour qu'une expression de la reproductibilité soit valable, il est nécessaire de spécifier les conditions que l'on fait varier. Les conditions que l'on fait varier peuvent comprendre : méthode de mesure, observateur, instrument de mesure, étalon de référence, lieu, conditions d'utilisation, temps. La reproductibilité peut s'exprimer quantitativement à l'aide de caractéristiques de dispersion des résultats.

Spécificité analytique

Capacité à distinguer de manière univoque l'agent cible en présence d'autres agents proches génétiquement de la cible d'intérêt et/ou se trouvant dans la même niche écologique.

Spécificité diagnostique

Proportion d'animaux de référence connue comme non infectée présentant un résultat négatif lors d'une épreuve ; les animaux de référence non infectés chez lesquels le résultat est positif sont considérés comme des « faux positifs ».

Validation d'une méthode d'analyse

Confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévues ont été satisfaites.

Étape de vérification consistant à comparer les valeurs des critères de performance déterminées au cours de l'étude de caractérisation de la méthode à celles attendues ou assignées au préalable (limites d'acceptabilité, objectifs à atteindre), puis à déclarer la méthode d'analyse valide ou non valide.

Vérification

Fourniture de preuves tangibles qu'une entité donnée satisfait à des exigences spécifiées.



Point de vue

Un exemple de réponse aux épidémies : impact de deux crises sanitaires (émergences des virus de la fièvre catarrhale ovine et Schmallenberg) sur un laboratoire de recherche et de référence

S. Zientara, UMR 1161 Virologie Anses-Inra, ENVA, Maisons-Alfort, France

S. Zientara (2012). Un exemple de réponse aux épidémies : impact de deux crises sanitaires (émergences des virus de la fièvre catarrhale ovine et Schmallenberg) sur un laboratoire de recherche et de référence, EuroReference, N°8, ER08-12PV01 <http://www.anses.fr/euroreference/numero8/>

Deux virus transmis par des moucheron (virus de la fièvre catarrhale ovine et virus Schmallenberg) ont émergé dans le nord de l'Europe en 2006 et 2011 respectivement. L'UMR de virologie du laboratoire de l'Anses de Maisons Alfort (France) a été confrontée à l'émergence de ces deux virus en France. En quelques semaines, il a fallu développer et valider des outils de diagnostic sérologique et moléculaire, constituer et animer un réseau de laboratoires afin de pouvoir traiter des milliers de prélèvements et développer des projets de recherche sur les mécanismes physiopathogéniques des infections. La structure d'une UMR mêlant équipes de recherche et LNR permet de répondre à ces différentes exigences dans un laps de temps limité.

Présentation de l'UMR de virologie de Maisons Alfort

Les activités de l'Unité mixte de recherche (UMR) de virologie n°1161 de l'Anses, l'Inra et l'ENVA (qui est située sur le campus de l'École nationale vétérinaire d'Alfort - ENVA -) sont centrées sur les viroses animales à risque zoonotique et/ou d'émergence. L'effectif de l'UMR est d'environ une quarantaine de personnes. Nous développons ainsi i) des méthodes de diagnostic optimisées pour la surveillance épidémiologique et la phylogénie ; ii) l'étude de la physiopathologie de certaines inter-elles, centrée sur l'étude des risques de transmission interspécifiques, particulièrement dans le sens animal vers l'homme ; iii) de nouvelles approches de vaccination orientées vers des modes d'administration orale. Outre ces activités de recherche appliquée ou plus fondamentale, l'UMR héberge aussi des laboratoires de référence à l'échelle mondiale (laboratoire de référence de l'OIE pour la maladie épizootique hémorragique des cervidés), à l'échelle européenne (laboratoire de référence de l'Union européenne pour les maladies équine) ou nationale (laboratoires nationaux de référence – LNR – pour la fièvre catarrhale ovine, la fièvre aphteuse, la stomatite vésiculeuse, la maladie vésiculeuse des suidés, la peste équine, la fièvre de West Nile). Cette originalité d'associer des activités de référence liées à la tutelle de l'Anses et des activités de recherche permet à cette unité de faire face à des émergences comme ce fut le cas en 2006 (avec l'émergence de la fièvre catarrhale ovine) ou en 2011 (avec l'émergence du virus Schmallenberg).

Rappels sur l'émergence de deux maladies vectorielles en Europe et en France

En août 2006, la Commission européenne notifiait officiellement la présence aux Pays-Bas, en Belgique et en Allemagne, du sérotype 8 du virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) ou *Bluetongue* virus (BTV), un pathogène majeur des ruminants domestiques et sauvages. Bien que circulant dans le bassin méditerranéen depuis plusieurs années, il s'agissait de la première épizootie de FCO documentée en Europe du Nord et de la première circulation du sérotype 8 sur le continent. À la fin de l'année 2006, le Grand-Duché de Luxembourg et la France étaient également touchés (6 foyers). Contre toute attente, ce virus, qui se transmet par l'intermédiaire de petits moucheron du genre *Culicoides*, résista à la période hivernale

et se propagea rapidement à toute une partie du nord de l'Europe en 2007 et 2008. Cette épizootie se caractérisa très vite par une atteinte clinique importante des bovins et par une mortalité pouvant atteindre 30 % chez les ovins [3], et cela en l'absence du vecteur *Culicoides imicola* (responsable de la transmission du BTV dans le bassin méditerranéen), jamais rencontré dans les régions concernées. En France, plus de 50 000 foyers infectés étaient recensés entre 2007 et 2008. Les mesures prophylactiques (vaccination massive) rapidement mises en place ont toutefois permis de maîtriser l'épizootie et la plupart des pays ont retrouvé aujourd'hui leur statut indemne de FCO [5].

Cette émergence soudaine et inattendue du sérotype 8 de BTV (BTV-8) a constitué un événement majeur en santé animale en Europe. Quelques années plus tard, l'histoire semble se répéter avec l'émergence d'une nouvelle arbovirose touchant les ruminants dans le nord de l'Europe.

Au cours de l'été 2011, de nombreux cas de diarrhées fébriles associées à une perte d'appétit et une chute importante de la production de lait étaient rapportés chez des bovins adultes en Allemagne (Rhénanie du Nord et Westphalie), avec parfois des signes cliniques évocateurs de la FCO, laissant craindre une résurgence de ce virus. Ces symptômes étaient transitoires et disparaissaient en général en quelques jours. La recherche de nombreux agents pathogènes dans des prélèvements provenant de bovins malades s'est révélée négative malgré l'utilisation d'approches innovantes comme la bio-puce Epizone Biochip 5.1 qui comporte plus de 2 000 amorces de virus. Après ces multiples investigations, l'Institut Friedrich-Loeffler (FLI) a identifié en novembre 2011 par séquençage haut débit sans a priori, à partir d'échantillons de sang de bovins malades, des séquences nucléotidiques appartenant à un nouveau virus qui fut dénommé Schmallenberg virus (SBV), du nom de la ville d'où provenaient les prélèvements d'origine [1]. L'implication du SBV dans les signes cliniques observés fut confirmée quelques temps plus tard par une infection expérimentale sur des bovins âgés de neuf mois, qui permit de noter que la virémie induite par le SBV semblait être transitoire (4 jours) [1]. L'analyse de la séquence du génome viral indiquait des similitudes avec les virus Akabane, Aino et Shamonda, qui appartiennent au genre *Orthobunyavirus* au sein de la famille des *Bunyaviridae*.

Le FLI a rapidement développé un test de détection du génome du SBV par RT-PCR en temps réel dont le protocole a été partagé avec un certain nombre de partenaires européens. Dans



Point de vue

le même temps, un système de surveillance épidémiologique était mis en place au niveau européen.

Au cours du mois de décembre, les Pays-Bas signalent pour la première fois une action tératogène du SBV chez des ovins, dont les caractéristiques s'assimilent aux effets observés avec les virus Akabane et Aino [1]. Ainsi, des femelles infectées en début de gestation sont capables de transmettre le virus au(x) fœtus (ovins, caprins et bovins) qui développent alors des malformations atypiques conduisant, la plupart du temps, à une mort intra-utérine ou à un décès rapide après leur mise bas. Le 25 janvier 2012, le génome viral était détecté pour la première fois en France par notre laboratoire dans des cerveaux d'agneaux mort-nés provenant de deux élevages situés en Moselle et en Meurthe-et-Moselle (nord-est de la France).

Au 1^{er} juillet 2012, 5 234 foyers de SBV étaient recensés en Europe dont 2 865 chez les bovins, 2 491 chez les ovins et 78 chez les caprins (source: www.survepi.org).

Diagnostic initial des virus BTV et SBV

En France, que ce soit en août 2006 ou en janvier 2012, le LNR risquait de se retrouver en situation « d'embolie » si nous recevions tous les prélèvements biologiques effectués lors de suspicions cliniques de BTV ou de SBV. Par exemple, pour la FCO en 2007, les autorités vétérinaires italiennes exigeaient que les quelques 100 000 bovins (appelés broutards) exportés du centre de la France vers la plaine du Pô soient testés individuellement par RT-PCR ce qui, compte tenu des effectifs du LNR (3 personnes), était impossible. La structure en UMR, associant des activités de recherches à des activités de référence, nous a permis, tout au moins pendant les premières semaines des deux crises respectives, d'effectuer des redéploiements de personnels (des techniciens des autres équipes arrêtaient leurs projets de recherche et venaient en aide à leurs collègues).

Nous avons donc collaboré avec différentes sociétés spécialisées dans le diagnostic vétérinaire (AES-ADIAGENE, LSI, IDvet, IDEXX...) et leur avons demandé de développer des troupes de diagnostic virologique moléculaire sensibles, spécifiques, peu coûteuses et automatisables. Pour la FCO, les sociétés LSI et AES-ADIAGENE ont d'abord utilisé notre test PCR-maison [2, 4] avant de développer leurs propres méthodes. La même approche a été ensuite appliquée pour la crise SBV.

La même procédure a été mise en place pour le développement de troupes sérologiques. Ainsi, en collaboration avec la société IdVet, nous avons pu valider une trousse de diagnostic ELISA fin février 2012 [6]. Il s'agissait du premier test ELISA développé au monde pour détecter les anticorps anti-SBV.

En parallèle, avec l'appui de la Direction générale de l'alimentation du ministère français en charge de l'Agriculture, nous avons mis en place, formé et animé un réseau de 66 laboratoires départementaux vétérinaires qui ont permis de traiter plusieurs milliers de prélèvements biologiques par jour (pour la FCO et le SBV). Ce réseau a dans un premier temps utilisé les troupes de RT-PCR en temps réel de LSI et AES ADIAGENE, développées et validées en collaboration avec notre laboratoire (il est à noter qu'en conséquence tous les prélèvements positifs en RT-PCR étaient adressés à l'UMR pour isolement viral pour BTV et SBV). Pour SBV, le réseau a bénéficié du test sérologique ELISA indirect développé par IDvET permettant la détection des anticorps dirigés contre la nucléoprotéine du virus Schmallenberg.

Ainsi dans ces deux crises sanitaires a été mis en place en six semaines un dispositif de diagnostic à large échelle constitué d'un LNR et d'un réseau d'une soixantaine de laboratoires capables d'effectuer le diagnostic moléculaire par RT-PCR en temps réel d'infection par BTV ou SBV, mais aussi le sérodiagnostic pour le SBV.

Conclusion

Les relations de travail et de confiance qui se sont nouées entre les différents laboratoires nationaux de référence sur la FCO depuis 2000 (émergence du virus dans le bassin méditerranéen) ont permis un échange très rapide et efficace des protocoles et des réactifs pour la mise en œuvre de la détection de BTV et de SBV dans les différents pays européens. Lors de la crise FCO, nous avons développé et validé une méthode de RT-PCR [2] que nous avons rapidement transférée à nos collègues des autres LNR européens. Ainsi, pour ce qui concerne l'infection par le SBV en France, c'est au cours d'une réunion à Bruxelles, en novembre 2011, que nos collègues allemands nous ont fait part de l'identification de ce nouveau virus. Dès la mi-décembre 2011, la RT-PCR spécifique de la détection du SBV était alors disponible au LNR français à Maisons-Alfort. Depuis cette date, de nombreux échanges scientifiques et techniques ont eu lieu entre les laboratoires nationaux.

Ainsi, la crise « FCO » a favorisé la mise en place de liens scientifiques et relationnels entre les différents laboratoires nationaux des Etats Membres de l'Union européenne qui échangent en temps quasi-réel les informations dont ils disposent. Cet atout est considérable en cas d'émergence.

La détection du virus SBV a été réalisée par métagénomique par le laboratoire allemand du FLI. Compte tenu du coût et de la technicité que ce type de technologie nécessite, les collaborations inter-laboratoires permettent à chaque laboratoire de pouvoir bénéficier de ce type de méthode sans pour autant investir des sommes considérables pour une utilisation peut-être relativement épisodique.

Références

- Bernd Hoffmann, Matthias Scheuch¹, Dirk Höper, Et Coll. (2012). Novel Orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg infect. Dis.* 18 (3), http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/3/11-1905_article.htm
- Toussaint J.F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., De Clercq K. 2007. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods*, 140(1-2), 115-123.
- Toussaint J-F, F. Vandebussche, J. Mast, L. De Meester, N. Goris, W. Van Dessel, E. Vanopdenbosche, P. Kerkhofs, K. De Clercq, S. Zientara, C. Sailleau, G. Czaplinski, G. Depoorter, J-M. Dochy. 2006. Bluetongue in northern Europe. *The Veterinary Record*, September 2, 327.
- Zientara S, Sailleau C, Dauphin G, Roquier C, Remond Em, Lebreton F, Hammoumi S, Dubois E, Agier C, Merle G, Breard E. 2002. Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *The Veterinary Record*, 150(19), 598-601.
- Zientara Stephan, N James Maclachlan, Paolo Calistri, Jose-Manuel Sanchez-Vizcaino, Giovanni Savini. 2010. Bluetongue Vaccination in Europe. *Expert Review of Vaccines*, 9(9), 989-991.
- Zientara S, E Breard, C Sailleau. Schmallenberg virus serology - Europe (33): Serology, <http://www.promedmail.org>, Thu 5 Apr 2012.



Actualités

10^e Conférence internationale sur les marqueurs épidémiologiques en microbiologie, du 2 au 5 octobre 2013

Sylvain Brisse, Institut Pasteur, Paris, France

La capacité des microorganismes – bactéries, virus, champignons et parasites – à muter rapidement, se disséminer et s'adapter à de nouveaux hôtes et environnements, nous oblige à augmenter nos capacités de détection précoce de nouvelles souches d'agents pathogènes et à mieux comprendre les facteurs qui contribuent à leur diversité, leur évolution et leur dissémination.

IMMEM-10 abordera de nombreux sujets relatifs à l'émergence de pathogènes, la diversité à l'échelle des populations, l'évolution de la virulence et la résistance antimicrobienne, l'identification des souches, les réseaux de typage, la santé publique et la surveillance, les nouvelles approches de typage, le séquençage haut débit, la génomique, l'épidémiologie moléculaire des maladies infectieuses. La conférence se déroulera à l'Institut Pasteur, en plein cœur de Paris.

Pour plus d'informations : <http://www.immem-x.org>

Conférence internationale I3S « Salmonella et salmonelloses », du 27 au 29 mai 2013, Saint-Malo, France

G. Clément, ISPAIA - ZOOPOLE développement, Ploufragan, France

La prochaine conférence internationale « Salmonella et Salmonelloses » se déroulera du 27 au 29 mai 2013 à Saint-Malo. Organisée par l'Anses, l'InVS, l'Inra, l'Institut Pasteur et ISPAIA – Zoopole, plus de 400 participants sont attendus. Vous trouverez les informations sur www.i3s2013.com.
Contact: i3s2013@zoopole.asso.fr





Actualités

Un Workshop international à Paris : « New Trends on Analytical Methods for Pesticides and Drug Residues »

E. Verdon, Anses - Laboratoire de Fougères, Fougères, France

Faisant suite à une première manifestation organisée à Paris en Novembre 2009, un nouvel atelier scientifique de la section Europe de l'« AOAC International » (*Association of Official Analytical Chemists International*) sera co-organisé en avril 2013 par l'ASFILAB (*Association des responsables de la qualité et fiabilité analytique*). Elle se tiendra les 18 et 19 avril à l'Espace Saint-Martin au cœur de Paris tout près du Centre Pompidou. Cet atelier intitulé « *New Trends on Analytical Methods for Pesticides and Drug Residues* » aura pour objectif d'aborder certaines des dernières avancées réalisées dans le secteur de l'analyse de substances chimiques dans les aliments. Deux sessions seront dédiées l'une aux résidus de médicaments vétérinaires et l'autre aux contaminants phytosanitaires. Y seront présentés des travaux européens sur les nouvelles technologies faisant intervenir notamment les spectrométries de masse hybrides à haute résolution, les méthodologies d'analyse multi-classes, multi-contaminants et les nouvelles approches non ciblées (métabolomique, ...).

À cette occasion, le Laboratoire de l'Anses situé à Fougères interviendra dans l'animation de la session consacrée aux résidus de médicaments vétérinaires.

Un programme préliminaire peut être obtenu sur le site de l'AOAC-Europe : <http://www.aoaceurope.com> ainsi que sur le site de l'Asfilab : <http://www.asfilab.fr>.



XVIII^e congrès WVPAC à Nantes du 19 au 23 août 2013

G. Clément, ISPAIA - ZOOPOLE développement, Ploufragan, France

En août 2013, les vétérinaires avicoles et les scientifiques, spécialistes de la santé en aviculture, tiendront leur conférence mondiale à Nantes. Ce congrès WVPAC2013 est co-organisé par la branche française de l'Association mondiale vétérinaire d'aviculture et Zoopole développement - ISPAIA. La WVPA (*World Veterinary Poultry Association*) compte plus de 2 000 membres et des branches nationales dans quelques 40 pays. A Nantes, plus de 1 000 professionnels sont attendus pour faire le point sur l'avancement de la recherche et sur l'évolution des pratiques. Ce rendez-vous sera l'occasion d'enrichir ses connaissances et ses réseaux. Des experts du monde entier participeront à WVPAC2013 et le programme des conférences, très riche, couvre d'importants sujets d'actualité tels que les maladies virales, la grippe aviaire, la sécurité alimentaire, la santé digestive ou encore les mycotoxines ; il fera état à la fois des dernières recherches, des synthèses techniques et des expériences sur le terrain.

Selon Nicolas Etteradossi, président du comité d'organisation : «Les organisateurs français sont très attentifs à construire un programme scientifique riche et de bon niveau, couplé bien sûr à un programme d'activités sociales attractif, pour que

WVPAC2013, événement majeur pour nos filières avicoles soit une belle réussite. Nous sommes impatients d'accueillir toute la profession à Nantes en août 2013! ».

L'appel à communications est ouvert jusqu'au 20 décembre 2012.

Pour plus d'informations sur WVPAC2013, contactez Geneviève Clément - wvpac2013@zoopole.asso.fr et retrouvez l'appel à communications et toute l'actualité du congrès sur www.wvpac2013.org





Actualités

Le guide LRUE *Listeria monocytogenes*

B. Carpentier, L. Barre, Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Maisons-Alfort, France

Publication d'un guide sur les prélèvements sur les lieux de transformation et le matériel utilisé dans la production de denrées alimentaires en vue de détecter la présence de *Listeria monocytogenes*.

Dans le cadre des activités du LR-UE *L. monocytogenes*, un guide intitulé « Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *L. monocytogenes* » vient d'être publié. Il est disponible en ligne : <http://www.ansespro.fr/eurl-listeria/>

Ce guide a vocation à combler les lacunes de la norme internationale sur les prélèvements de surface (ISO 18593), en donnant des recommandations spécifiques à la détection de *L. monocytogenes* afin d'augmenter la probabilité de détecter la bactérie pathogène quand elle est persistante dans un atelier de fabrication. Ce guide précise notamment à quel moment et sur quelles superficies ces prélèvements devraient être réalisés. Ce guide fournit des lignes directrices pour les opérateurs du secteur des aliments prêts à être consommés qui, conformément au règlement CE 2073/2005 sur les critères microbiologiques relatifs aux aliments, ont l'obligation de réaliser de tels prélèvements.

Construction d'un dialogue entre les LNR et les laboratoires agréés français (« laboratoires périphériques »)

B. Gouget, Anses, Direction scientifique des laboratoires, Maisons-Alfort, France

En vue de mieux cerner les attentes des laboratoires agréés vis-à-vis des LNR, l'Anses et le Service commun des laboratoires (un service scientifique au cœur des missions de la direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes et de la direction générale des douanes et droits indirects) ont invité l'ensemble des laboratoires français agréés à répondre à un questionnaire de satisfaction en ligne. À cette occasion, il était demandé à chaque laboratoire agréé de compléter un questionnaire par champs d'activité dans lequel il effectue des analyses officielles. Ces champs d'activité couvrent plusieurs LNR et sont définis au sein des cinq grandes catégories de l'arrêté de nomination des LNR : (arrêté du 19/10/2011 paru au journal officiel du 28/10/2011 ; <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000024720808&dateTexte=&categorieLien=id>) : Contaminants biologiques présents dans les denrées alimentaires - Contaminants chimiques, résidus et additifs - Maladies animales - Santé des végétaux - OGM.

Le questionnaire était articulé autour de 24 questions relatives aux items suivants :

- appui scientifique et technique, méthodes et matériaux de référence ;
- organisation générale des EILA ;
- veille et alerte ;
- perception globale des relations entre le Laboratoire agréé et les LNR.

De cette approche très large, des pistes de réflexion intéressantes pour tous les LNR ont été dégagées. Le 13 novembre 2012, les représentants de tous les LNR ont analysé ensemble les facteurs clés de succès dans les relations des LNR avec les laboratoires périphériques agréés et les points sur lesquels un plan d'action (renforcement ou allègement) pouvait être proposé, avec l'organisme certificateur français et avec les tutelles.

Une sélection d'éléments issus de cette réflexion sera présentée et discutée avec les laboratoires agréés au cours d'une réunion générale qui se tiendra le 26 mars 2013 (contact : ds@anses.fr).



Réseaux

Le Réseau *Salmonella*, un outil pour la surveillance des salmonelles de la « fourche à la fourchette ».

R. Lailler [renaud.lailler@anses.fr] (1), F. Moury [frederique.moury@anses.fr] (1), S. A. Granier [sophie.granier@anses.fr] (1), A. Brisabois [anne.brisabois@anses.fr] (1)

(1) Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Unité CEB, Maisons-Alfort, France

R. Lailler, F. Moury, S. A. Granier, A. Brisabois (2012). Le Réseau *Salmonella*, un outil pour la surveillance des salmonelles de la « fourche à la fourchette », EuroReference, N°8, ER08-12RX01 <http://www.anses.fr/euroreference/numero8/>

Le Laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses est associé (LNR-associé) au Laboratoire national de référence des *Salmonella* (LNR-*Salmonella*) pour le sérotypage des *Salmonella*. Dans ce cadre, il anime le réseau d'épidémiosurveillance des *Salmonella* dans la chaîne alimentaire en France. Ce Réseau *Salmonella* regroupe environ 140 laboratoires français qui adressent volontairement au LNR-Associé soit leurs résultats de sérotypage, soit des souches pour confirmation. La centralisation de ces résultats permet de suivre, depuis plus de 10 ans, les tendances évolutives d'isolement des sérovars de *Salmonella* dans la chaîne alimentaire et de détecter l'émergence d'un sérovar particulier ou d'une souche aux caractéristiques critiques pour la santé humaine.

Contexte

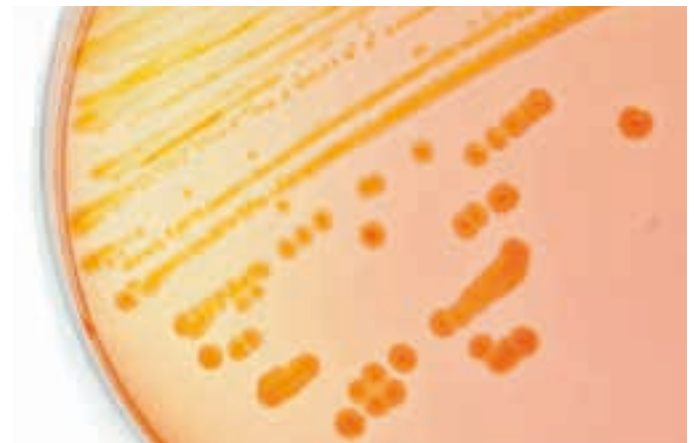
Salmonella est l'un des principaux contaminants microbiologiques responsable de toxi-infections alimentaires en Europe. L'EFSA rapporte plus de 99 000 cas humains de salmonellose en Europe pour 2010, même si la diminution du nombre de cas annuels, observée depuis plusieurs années, tend à se poursuivre (EFSA, 2012). En France, le nombre de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à *Salmonella*, en diminution constante depuis 2002, est resté stable entre 2009 et 2010 (InVS, 2012). Pour l'année 2010, cette bactérie était (ou suspectée d'être) à l'origine de 141 foyers de TIAC (soit 20% des foyers à agent confirmé ou suspecté), correspondant à 1357 cas d'infection humaine d'origine alimentaire. Les aliments majoritairement impliqués sont les œufs et produits à base d'œufs ainsi que les viandes.

L'identification et la caractérisation des *Salmonella* demeurent essentiels pour la surveillance épidémiologique des contaminations tout au long de la chaîne alimentaire et pour la maîtrise de ce pathogène.

Le dispositif de surveillance des salmonelles et salmonelloses en France

Il fait intervenir plusieurs acteurs :

- le Centre national de référence (CNR) des *Salmonella* de l'Institut Pasteur réalise le sérotypage des souches d'origine humaine, envoyées par des laboratoires d'analyses de biologie médicale et des laboratoires hospitaliers, et collecte des informations sur les souches dont le sérovar a déjà été déterminé. L'analyse de ces données permet de suivre l'évolution du nombre de souches de *Salmonella* isolées chez l'homme, et de détecter des épidémies. Parallèlement, est étudiée aussi la résistance aux antibiotiques de *Salmonella* ;
- l'Institut de veille sanitaire (InVS), dont la mission principale est la surveillance de l'état de santé de la population, analyse les signaux transmis par le CNR (cas groupés, épidémies, etc.) et lance les investigations si nécessaire pour identifier d'éventuelles sources communes aux cas humains. L'objectif est de prendre des mesures afin de limiter le nombre de cas humains (retrait et rappel d'un produit par exemple). Par ailleurs, l'InVS centralise et analyse les déclarations obligatoires des TIAC notifiées aux directions départementales de la protection des populations et agences régionales de santé ;



- le laboratoire national de référence (LNR) des *Salmonella* au Laboratoire de Ploufragan-Plouzané de l'Anses et son LNR-Associé du Laboratoire de sécurité des aliments, de Maisons-Alfort, sont concernés par les souches de *Salmonella* d'origine non humaine. Ce dernier réalise les activités de caractérisation des souches et anime un réseau de 140 laboratoires d'analyses alimentaires et vétérinaires, publics ou privés, nommé Réseau *Salmonella*, qui collecte des souches provenant de contextes d'isolement variés (autocontrôles réalisés par les industries agro-alimentaires, plans de surveillance et de contrôle officiels, enquête, alertes alimentaires) et des informations épidémiologiques attachées à ces isolats (David *et al.*, 2011).

Chaque année, en plus du sérotypage systématiquement réalisé, une partie des souches est analysée pour leur sensibilité aux antibiotiques. Les mécanismes de résistance associés à des phénotypes ayant un intérêt à l'égard de la santé publique sont étudiés. Ainsi, le Réseau *Salmonella* a identifié en 2009 pour la première fois dans un aliment, une bactérie (*Salmonella* sérovar S.I 4,12:i:- isolée de viande de poulet) possédant le gène *armA* qui confère un haut niveau de résistance aux aminosides d'intérêt clinique (Granier *et al.*, 2011).

La centralisation des données de caractérisation phénotypique et génotypique des *Salmonella* collectées dans le cadre du Réseau *Salmonella* permet de détecter des clones émergents



Réseaux

et de mettre en évidence des souches épidémiologiquement reliées lors des investigations autour d'épisodes de cas groupés humains.

Entre 2005 et 2010, le Réseau *Salmonella* a été sollicitée 47 fois par la Direction générale de l'alimentation et l'InVS pour identifier des sources potentielles de contamination et orienter les investigations épidémiologiques.

La collecte régulière des informations et des résultats de sérotypage associée à une analyse statistique des séries temporelles d'isolement des *Salmonella*, permet de détecter des signaux correspondant à une situation préoccupante nouvelle ou émergente. Le Réseau *Salmonella* a déjà montré, par le rôle d'alerte qu'il a précédemment joué, son utilité pour le gestionnaire du risque (Danan *et al.*, 2011).

Fonctionnement du réseau *Salmonella*

Ce réseau poursuit deux objectifs : (1) Apporter aux laboratoires d'analyses alimentaires et vétérinaires un appui technique pour le sérotypage des isolats de *Salmonella* ; (2) Développer une activité de vigilance dans la surveillance des *Salmonella* isolées de la chaîne agro-alimentaire («de la fourche à la fourchette») et de détection de signaux concernant l'augmentation inhabituelle d'un sérovar.

Chaque année depuis 1997, une charte d'abonnement est signée par chaque laboratoire partenaire (environ 140 par an). L'information est collectée dans trois secteurs: (i) en santé et production animales (animaux malades, porteurs sains ou environnement d'élevage) ; (ii) en hygiène des aliments (destinés à la consommation humaine ou animale, environnement d'abattoirs, ateliers de découpe et de transformation) ; (iii) dans l'écosystème naturel.

Les *Salmonella* sont isolées de prélèvements réalisés tout au long de la chaîne alimentaire, par de nombreux laboratoires qui

assurent à ce jour une bonne couverture nationale d'analyses de première intention. La quasi-totalité (97 %) des laboratoires publics départementaux sont adhérents au réseau. La méthode de sérotypage des *Salmonella* (Danan *et al.*, 2009) réalisée par le LNR-associé sur les souches reçues pour confirmation est mise en œuvre selon la norme NF EN ISO/CEI 17025, sous accréditation COFRAC (www.cofrac.fr, accréditation n°1-2246). Les laboratoires partenaires du Réseau *Salmonella* transmettent des cultures pures de souche ou des tableaux récapitulatifs de résultats de sérotypage. Pour chaque résultat, des renseignements sont collectés concernant le contexte, le type et l'origine du prélèvement (Figure 1).

Les données collectées ne peuvent pas être assimilées à des données de prévalence car le Réseau *Salmonella* ne reçoit aucune indication sur le nombre total d'analyses réalisées. La réglementation européenne sur les zoonoses, qui cible certaines filières d'élevage et certains sérovars, constitue une pression sélective qui peut avoir un impact sur la remontée des informations. Cependant la relative stabilité des données du réseau et les similitudes observées dans le passé concernant l'évolution de certains sérovars isolés à la fois chez l'Homme (CNR) et dans les aliments (LNR), soulignent l'intérêt du réseau dans le dispositif national de surveillance des *Salmonella*. Les bilans annuels sont disponibles sur <http://www.ansespro.fr/reseausalmonella>.

Tendances principales observées ces dernières années

Le Réseau *Salmonella* collecte environ 15 000 résultats de sérotypage de *Salmonella* par an (Figure 2). Entre 2005 et 2010, selon l'année, 55 % à 65 % des résultats de sérotypages ont été obtenus par les laboratoires et communiqués au Réseau *Salmonella*. Dans le reste des cas (35 % à 45 %), les souches ont été sérotypées par le LNR-Associé, lorsque le laboratoire

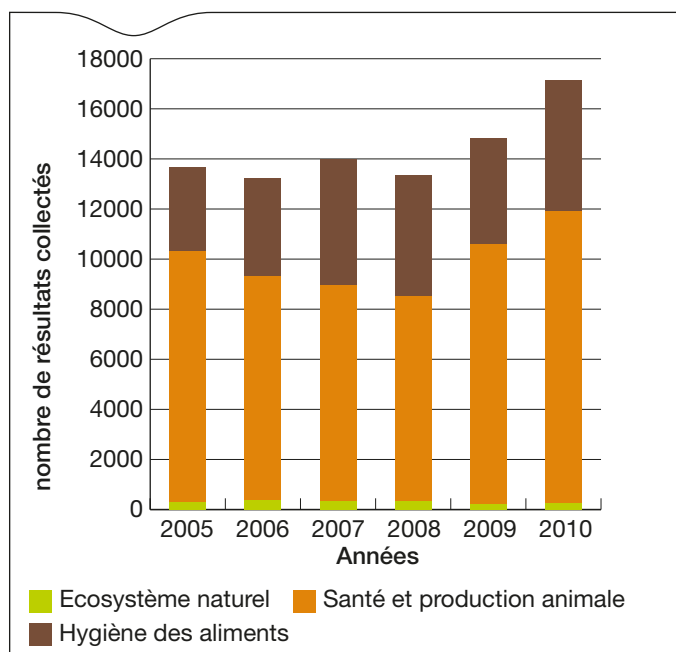


Figure 2. Nombre de résultats de sérotypage de *Salmonella* enregistrés dans le cadre du réseau *Salmonella* de l'Anses entre 2005 et 2010.

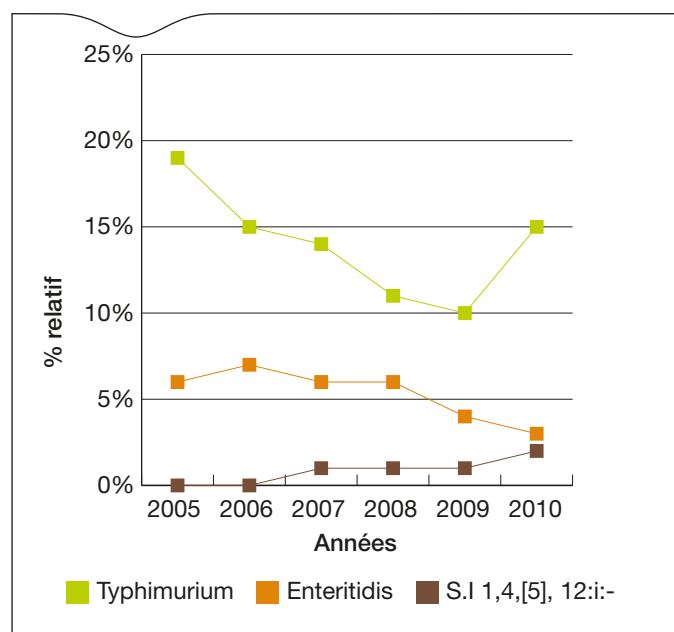


Figure 3. Tendances évolutives entre 2005 et 2010 des parts relatives des sérovars Enteritidis et Typhimurium dans le cadre du réseau *Salmonella*, émergence du variant monophasique S.I 1,4,[5],12:i:-.



Réseaux

expéditeur ne réalise pas le sérotypage complet, quand le sérotypage est plus complexe ou encore lors d'un besoin de confirmation dans le cadre des contrôles officiels.

Chaque année, deux tiers des résultats de sérotypage obtenus *in fine* proviennent du secteur « santé et production animale » (dont 80 % obtenus dans les laboratoires partenaires et 20 % par le LNR-Associé) et un tiers du secteur « hygiène des aliments » (respectivement 40 % et 60%).

La Figure 3 présente la baisse globale de la part relative annuelle des sérovars *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* observé par le Réseau *Salmonella*. Un constat similaire a été rapporté par le CNR pour les souches d'origine humaine isolées entre 2002 et 2010 (Jourdan-Da Silva et Le Hello, 2012). Cette diminution s'explique vraisemblablement par l'impact des mesures de maîtrise et de gestion appliquées ces dernières années en filière aviaire.

La fréquence d'isolement des souches S.I 1,4,[5],12:i:-, dites « variants monophasiques » de *S. Typhimurium*, est en augmentation depuis plusieurs années chez l'Homme (données CNR) et depuis 2008 dans toutes les filières animales et les secteurs de production surveillés par le Réseau *Salmonella* (Figure 3 ; Tableau 1). Ces tendances sont en cohérence avec l'augmentation observée depuis 2007 du nombre de foyers de cas groupés impliquant ces souches en France (Danan *et al.*, 2012 ; Gossner *et al.*, 2012) et en Europe (Bone *et al.*, 2010 ; Hopkins *et al.*, 2010).

Les données de surveillance annuelles, présentées dans les inventaires des *Salmonella* d'origine non humaine (années 2005 à 2010), disponibles sur le site du réseau, soulignent une association spécifique de certains sérovars à certaines filières animales ou types d'aliments (Tableau 1), comme par exemple Dublin dans les produits laitiers, Indiana dans la volaille ou *Enteritidis* dans les ovoproduits.

En hygiène des aliments

Parmi les salmonelles isolées de viandes de porc, la proportion relative du sérovar *Typhimurium* est stable depuis 2005 (30

à 35 % du panel) alors que celle des sérovars Derby et S.I 4,[5],12:i:- a progressé respectivement de 20% environ à 40%, et de 0 à 5.5%. Pour les produits de charcuterie, *Typhimurium* et Derby demeurent les sérovars les plus fréquemment identifiés, mais l'importance relative croissante du sérovar S.I 4,[5],12:i:- entre 2008 (3.4%) et 2010 (10%) est à noter.

La part relative de *S. Typhimurium* dans les produits laitiers est en diminution (12% en 2005 contre 6% en 2010). Concernant les ovoproduits, le faible nombre d'isolats recensés dans cette catégorie d'aliments permet de souligner uniquement une stabilité relative des sérovars *Typhimurium* et *Enteritidis* entre 2005 et 2010. Concernant l'hygiène des carcasses, viandes et abats de canards, les sérovars Indiana, *Typhimurium* et Kottbus sont les plus fréquemment isolés et selon une relative stabilité depuis 2005. La répartition des sérovars est beaucoup plus variable pour les filières « dinde » et « *Gallus gallus* », même si depuis 2005 les principaux sérovars demeurent respectivement, d'une part, Agona, Bredeney, Derby, Hadar, Indiana et *Typhimurium* et d'autre part, *Enteritidis*, Indiana et *Typhimurium* et plus récemment Paratyphi B. Le sérotype S.I 4,[5],12:i:- émerge également depuis 2009 dans les filières « dindes » et « *Gallus gallus* ».

En santé et production animale

Depuis 2005, le sérovar Senftenberg est le plus fréquemment isolé de l'environnement d'élevage *Gallus gallus* et de dindes alors qu'il s'agit du sérovar Indiana pour la filière « canard ». En filière bovine, *Typhimurium*, Montevideo et Dublin sont principalement isolés avec une relative stabilité depuis 2005, à la fois à partir des prélèvements d'environnement d'élevage et dans le cadre d'une pathologie animale. En filière porcine, chaque année depuis 2005, les deux principaux sérovars (*Typhimurium* et Derby) représentent entre 60% et 80% de l'ensemble des *Salmonella* isolées.

Tableau 1. Fréquence relative (%) des principaux sérovars détectés dans le cadre du réseau *Salmonella*, par catégorie d'aliment, en 2010 (N = Nombre total d'isolats)

| SEROVARS | Volaille (N = 629) | Ovo produits (N = 35) | Porc (N = 1155) | Produits de charcuterie (N = 523) | Bovin (N = 154) | Produits laitiers (N = 815) | Aliments pour animaux (N = 1113) |
|---|-----------------------|--------------------------|--------------------|---|--------------------|-----------------------------------|--|
| TYPHIMURIUM | 14,2 | 5,7 | 30,6 | 32,5 | 37,7 | 5,8 | 2,9 |
| DERBY | 3,2 | 0 | 37,4 | 17,9 | 5,8 | 5,4 | 1 |
| HADAR | 1,9 | 0 | 0 | 0,2 | 0 | 0 | 0,1 |
| MONTEVIDEO | 1,4 | 0 | 0 | 0,2 | 2,6 | 2,9 | 19,9 |
| INDIANA | 25,6 | 0 | 0 | 1,3 | 0,6 | 0 | 0,4 |
| AGONA | 2,7 | 0 | 0,5 | 3 | 1,3 | 4 | 0,9 |
| DUBLIN | 0 | 0 | 0 | 0,2 | 10,4 | 57,6 | 0 |
| ENTERITIDIS | 4,7 | 22,9 | 0,3 | 0 | 0,7 | 0,3 | 0,3 |
| MBANDAKA | 1,7 | 22,9 | 0,3 | 0,2 | 13 | 2,5 | 6,3 |
| RISSEN | 0,5 | 0 | 2,2 | 9,8 | 0 | 0,4 | 3 |
| S.I 1,4,[5],12:i:- | 3,5 | 0 | 5,5 | 10 | 11 | 1,3 | 0,5 |
| S.IIIb 61:[k]:1,5,7 | 0 | 0 | 0 | 0,2 | 0,7 | 5,6 | 0 |
| TOTAL % | 59,4 | 51,5 | 76,8 | 75,5 | 83,8 | 85,8 | 35,3 |
| Nbre total de Sérovars identifiés (100%/catégorie) | 51 | 11 | 44 | 50 | 30 | 37 | 109 |



Réseaux

Conclusion

Le Réseau *Salmonella*, bien que ne fournissant pas de données consolidées de prévalence, permet d'apprécier la diversité et l'évolution spatio-temporelle des sérovars isolés, sur l'ensemble de la chaîne alimentaire. Il constitue en particulier une source d'information vis-à-vis des sérovars rares ou non couverts par la réglementation et peut jouer un rôle d'alerte vers les autorités sanitaires.

La mobilisation volontaire des laboratoires partenaires du réseau *Salmonella* et l'étroite collaboration entre les laboratoires de référence (CNR et LNR) sont des prérequis indispensables pour une bonne efficacité du dispositif de surveillance national des *Salmonella*. L'animation et l'évaluation régulière du fonctionnement du Réseau *Salmonella*, l'harmonisation des méthodes analytiques et des référentiels de données à échanger, les moyens et les outils de communication mis en œuvre sont des points critiques pour atteindre les objectifs de surveillance fixés.

Remerciements à l'ensemble des laboratoires partenaires qui transmettent régulièrement souches et informations épidémiologiques au Réseau Salmonella.

Références bibliographiques

Bone A., Noel H., Le Hello S., Pihier N., Danan C., Raguenaud M.E., Salah S., Bellali H., Vaillant V., Weill F.X., Jourdan-da Silva N. (2010). Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010, *Euro Surveill.* 15(24). pii: 19592.

Danan C., Fremy S., Moury F., Bohnert M.L., Brisabois A. (2009). Détermination du sérovar de souches de *Salmonella* isolées dans le secteur vétérinaire par la méthode d'agglutination rapide sur lame. *EuroReference*, No.2, CR2-09M01. <http://www.afssa.fr/euroreference/Documents/CR2-Meth-SeroSalmo.pdf>

Danan C., Baroukh T., Moury F., Jourdan-Da Silva N., Brisabois A. and Le Strat Y. (2011). Automated early warning system for the surveillance of *Salmonella* isolated in the agro-food chain in France. *Epidemiol. Infect.* 139(5): 736-741.

Danan C., Agbessi A., Cabassut G., Moury F., Guyot M., Talleu L., Salah S., Chemaly M. (2012). Surveillance des salmonelles isolées de la chaîne alimentaire en France. *Bulletin épidémiologique, santé animale - alimentation* n° 50: 37-41.

David J., Danan C., Chauvin C., Chazel M., Souillard R., Brisabois A., Weill FX., Jourdan-Da Silva N., Picherot M., Guillemot D., Sanders P. (2011). Structure of the French farm-to-table surveillance system for *Salmonella*. *Revue Méd. Vét.*, 162(10): 489-500.

EFSA, European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010, *EFSA Journal* 2012, 10(3):2597 [442pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2597. www.efsa.europa.eu/efsajournal

Gossner C.M., van Cauteren D., Le Hello S., Weill F.X., Terrien E., Tessier S., Janin C., Brisabois A., Dusch V., Jourdan-da Silva N. (2012). Nationwide outbreak of *Salmonella enteritica* serotype 4,[5],12:i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Euro Surveill.*, 17(5). pii=20071.

Granier S.A., Hidalgo L., San Millan A., Escudero J.A., Gutierrez B., Brisabois A. and Gonzalez-Zorn B. (2011). ArmA Methyltransferase in a monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11): 5262-5266.

Hopkins K.L., Kirchner M., Guerra B., Granier S.A., Lucarelli C., Porrero M.C., Jakubczak A., Threlfall E.J., Mevius D.J. (2010). Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill.* 15 (22). pii=19580.

InVS (2012), Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives, données de la déclaration obligatoire, 2010. Consulté en ligne le

1^{er} juillet 2012, <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Toxi-infections-alimentaires-collectives/Donnees-epidemiologiques>

Jourdan-Da Silva N., Le Hello S. (2012). Salmonelloses en France, 2002-2010 : tendances en épidémiologie humaine, émergence de la souche monophasique, principaux aliments impliqués dans les dernières épidémies. *BEH hors série*, 9 mai 2012 : 25-28.



Réseaux

ANSES LABORATOIRE DE SECURITE DES ALIMENTS - Unité CEB - 23, av. du Général de Gaulle - 94706 Maisons-Alfort Cedex
Livraison colis / souches : Pôle HQSA - Unité CEB - 22, rue Pierre Curie - 94700 Maisons-Alfort

FICHE DE RENSEIGNEMENTS SALMONELLA

Ne rien inscrire dans ce cadre

N° Collis HQSA : Souche n°:

Adresse du laboratoire :

Abonné Non Abonné

Code laboratoire :

(remplir une fiche par souche envoyée)

Sérotypage Typage moléculaire

Votre réf de souche :
Autres réf : n° alerte DGAL : n° alerte DDPF :

Date du prélèvement :/...../.....
Code postal (ou département) du prélèvement :

► **Contexte du prélèvement**

Contrôle "Exploitants" (Autocontrôle) Contrôle "Autorités" (Contrôle officiel)
 Plan de Surveillance/Plan de contrôle DGAL/DGCCRF* ; Note de service N°
 Enquête, étude Autre :

Le prélèvement a-t-il été réalisé dans un contexte de toxi-infection alimentaire? Oui Non
Si oui, nombre de malades :

► **Caractéristiques du prélèvement** Merci d'être précis en remplissant le cadre ci-dessous

ALIMENTS DESTINES A L'HOMME
(de l'abattoir à la consommation)

| | |
|--|---|
| <p>Type du prélèvement</p> <p><input type="checkbox"/> Produit alimentaire <input type="checkbox"/> Environnement</p> <p>Préciser le site du prélèvement :</p> <p><input type="checkbox"/> Abattoir <input type="checkbox"/> Atelier de fabrication <input type="checkbox"/> Distribution</p> <p>Catégorie d'aliment</p> <p><input type="checkbox"/> Viande <input type="checkbox"/> Produit de charcuterie <input type="checkbox"/> Lait et produit laitier <input type="checkbox"/> Œuf et gyroproduit <input type="checkbox"/> Produit de la pêche <input type="checkbox"/> Eau <input type="checkbox"/> Produit végétal <input type="checkbox"/> Autre produit</p> <p>Nature du prélèvement :</p> <p>Le produit est-il <input type="checkbox"/> cuit ou <input type="checkbox"/> cru ?</p> | <p>Filière :</p> <p><input type="checkbox"/> Bovine <input type="checkbox"/> Porcine <input type="checkbox"/> Caprine <input type="checkbox"/> Equine <input type="checkbox"/> Ovine</p> <p><input type="checkbox"/> Aviaire* : poulet de chair, poulet sous label, dinde, canard, pintade, Autre (préciser) :</p> <p><input type="checkbox"/> Autre filière :</p> |
|--|---|

ECOSYSTEME NATUREL

Nature : (pour les eaux, préciser : eau de mer, de rivière, ...)

► **Caractères sérologiques de la souche**

OMA OMB O: 4,5 O: 3,10,15 O: 9 O: 6,7,8
 H: j H: E H: h H: l H: 2 Autres :

Sérotype présumé : |

* Entourer la mention qui convient.

Figure 1. Exemple de fiche du Réseau *Salmonella* pour la collecte d'informations associées à un isolat provenant d'un aliment destiné à l'Homme ou issu de l'écosystème.



Recherche

Vers l'élaboration de protocoles robustes pour l'établissement de LMR pour les médicaments vétérinaires dans le miel

Richard J. Fussell [Richard.Fussell@fera.gsi.gov.uk] (1), Jack F. Kay (2), Eric Verdon [eric.verdon@anses.fr] (3), et Matthew Sharman (1)

(1) Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York, North Yorkshire, Royaume-Uni

(2) Veterinary Medicines Directorate, Woodham Lane, New Haw, Addlestone, Surrey, Royaume-Uni

(3) Anses, Laboratoire de Fougères, La Haute Marche, Javené, Fougères, France

R. J. Fussell, J. F. Kay, E. Verdon, M. Sharman (2012). Vers l'élaboration de protocoles robustes pour l'établissement de LMR pour les médicaments vétérinaires dans le miel, EuroReference, N°8, ER08-12RE01 <http://www.anses.fr/euroreference/numero8/>

Malgré les préoccupations très répandues concernant l'affaiblissement de la santé des colonies d'abeilles en Europe et dans le reste du monde, les apiculteurs n'ont à leur disposition que relativement peu de médicaments vétérinaires pour traiter les maladies des abeilles. Cette situation a peu de chance de s'améliorer tant qu'il n'y aura pas de protocole reconnu au niveau international en vue de l'établissement de limites maximales de résidus (LMR) pour ces médicaments dans le miel. Un projet de recherche a donc été lancé pour développer un protocole d'échantillonnage harmonisé et statistiquement valable afin de fournir les données scientifiques fiables, indispensables pour aider les autorités de régulation à proposer des LMR pour les médicaments vétérinaires dans le miel.

Introduction

S'il existe des lignes directrices strictes sur le calcul des temps d'attente pour les médicaments vétérinaires chez la plupart des espèces productrices de denrées alimentaires, celles-ci ne sont pas bien définies pour les abeilles/le miel. Il n'existe pas encore de protocole robuste pour conduire des études qui fourniraient les données nécessaires à l'appui d'une demande d'autorisation d'un traitement et d'établissement d'une limite maximale de résidu. Autre aspect défavorable, les abeilles sont considérées comme une espèce mineure de sorte qu'il existe peu d'incitations financières encourageant les entreprises pharmaceutiques à investir dans le développement de nouveaux traitements.

Le document de la Commission européenne «*Notice to applicants and Guideline - Veterinary medicinal products - Establishment of maximum residue limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin (Volume 8)*» [Avis aux demandeurs et lignes directrices-Médicaments vétérinaires: Fixation des limites maximales de résidu (LMR) de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale (Volume 8)] indique que pour le miel, une étude de déplétion (destinée à déterminer le délai d'attente) devrait inclure cinq échantillons prélevés respectivement dans chacune de cinq ruches, à des échéances précises définies en fonction de la période d'administration du traitement et de la production du miel. Malgré leur utilité, ces lignes directrices peuvent donner lieu à différentes interprétations.

En dehors de l'Union européenne, il n'existe pas d'accords internationaux sur l'établissement des LMR dans le miel. Cet aspect a été souligné lorsque le *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) a récemment informé le Comité du Codex sur les résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments (CCRVDF) qu'il n'y avait aucune recommandation et/ou procédure que le JECFA pourrait suivre pour fixer des LMR dans le miel (FAO 2011). Suite à ce constat, le Comité du Codex sur les résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments (CCRVDF) a instauré un groupe de travail en vue de :

- recueillir des données sur les traitements autorisés à travers le monde ;
- identifier des paramètres communs ou apparentés utilisés lors de l'autorisation des traitements ;



- proposer une politique d'évaluation des risques pour établir des limites appropriées dans le miel (Codex 2011).
Le groupe de travail a indiqué que les substances envisagées pour traiter les abeilles devraient être classées par catégorie sur la base des caractéristiques connues concernant la toxicité, le devenir et le comportement. Pour les substances considérées comme sûres, il a été proposé d'écarter la nécessité d'une étude des résidus (par exemple, pour le thymol). S'agissant des substances avec une dose journalière admissible (DJA) et/ou une LMR établie chez un

Recherche

animal producteur d'aliments ou dans une denrée alimentaire (par exemple pour la tétracycline), l'extrapolation aux abeilles pourrait se faire, sous réserve d'une étude de déplétion qui permettrait de déterminer un marqueur de résidu adéquat. Enfin, les substances dont l'utilisation n'est pas approuvée pour les animaux destinés à l'alimentation, ou qui sont de nouveaux médicaments, auraient besoin d'une étude complète de déplétion des résidus, laquelle risque de ne pas être financièrement viable pour le demandeur d'autorisation de mise sur le marché dans le cas d'une espèce mineure telle que les abeilles.

La réalisation de ces études de résidus représentera un défi complexe compte tenu de la nécessité de prendre en compte de nombreuses variables. Des études antérieures ont permis d'identifier un grand nombre de facteurs, notamment la variabilité des concentrations de résidus entre ruches et au sein d'une même ruche, les effets liés aux modalités de l'administration du traitement, les propriétés de la substance utilisée pour le traitement ainsi que les facteurs saisonniers et climatiques. Une étude récente (Fussell *et al.* 2012) conclut que la taille de l'échantillon prélevé et le nombre de ruches étudiées devraient être suffisamment importants pour limiter la variabilité des mesures de concentrations de résidus, y compris l'échantillonnage, afin d'obtenir des valeurs acceptables.

Après avoir examiné les éléments probants de l'étude de Fussell *et al.* 2012 et de précédentes études, le groupe de travail du CCRVDF propose un projet de protocole pour conduire des études de résidus sur le miel. Le CCRVDF recommande de collecter tout le miel dans les hausses d'au moins cinq ruches traitées, et à au moins huit différentes échéances. L'intervalle entre les prélèvements devrait être fixé de façon à permettre la caractérisation des profils de déplétion types observés dans les précédentes études (voir Figure 1). Au moins cinq « ruches témoins » devraient être exclues du traitement et tenues à une distance suffisante pour éviter tout risque de contamination croisée par des abeilles provenant des ruches traitées.

Le VMD « Veterinary Medicines Directorate », agence nationale britannique, finance actuellement une nouvelle étude destinée à évaluer ce projet de protocole du CCRVDF. Conduite par le FERA « Food and Environment Research Agency » au Royaume-

Uni, cette étude se concentrera sur le développement de méthodes statistiques pour le prélèvement des échantillons de miel. L'étude se déroulera sur au moins trois ans afin de prendre en compte les variations saisonnières et climatiques. Cet aspect est important parce que les modalités de stockage et de déplacement du miel par les abeilles entre ruches et à l'intérieur des ruches pourraient influencer la distribution des médicaments. La première phase du projet, une étude de terrain impliquant cinq ruches témoins et 45 ruches traitées, a démarré en mai 2012. Les ruches ont été traitées à la fin du printemps avec une « molécule type », la ciprofloxacine (antimicrobien de la famille des fluoroquinolones) dissoute dans une solution sirupeuse qui a été appliquée à chaque nourrisseur. La ciprofloxacine a été choisie parce qu'elle est stable et qu'elle produit des résidus qui sont mesurables par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Le miel sera extrait de chaque cadre des hausses⁽¹⁾, réuni et mélangé pour former un échantillon global représentant une hausse particulière. La concentration moyenne en résidus de chacune des hausses sera calculée à partir des résultats des analyses successives. Les résultats de chaque hausse individuelle donneront lieu à une moyenne pour calculer ensuite la concentration moyenne de chaque ruche. La plus petite unité aux fins de l'analyse statistique sera par conséquent une hausse individuelle. Si les résultats de 2012 montrent que des données satisfaisantes peuvent être obtenues en utilisant moins de ruches, il en sera tenu compte dans le protocole pour la seconde phase du projet qui doit débuter en 2013. La diminution du nombre de ruches dans les phases suivantes (années 2 et 3 du projet) devrait inciter des collaborateurs des différentes régions du monde à participer. Cela permettrait d'évaluer les effets d'un plus grand nombre de facteurs (tels que les différentes souches d'abeilles, les diverses pratiques d'élevage, les pratiques thérapeutiques et les facteurs géographiques), et de générer un ensemble de données encore plus complet.

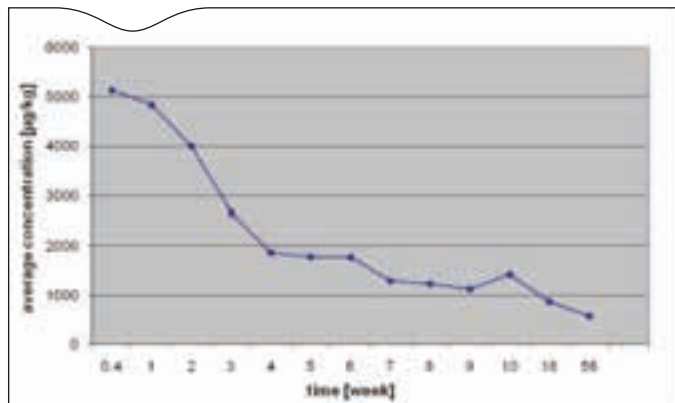


Figure 1. Déplétion de la ciprofloxacine du miel prélevé au niveau des hausses jusqu'à 56 semaines après le traitement (sur la base de la moyenne des résultats calculée à partir de neuf ruches individuelles)



Application par pulvérisation du médicament sous forme de solution sirupeuse

(1) La hausse est un compartiment individuel qui est placé au-dessus du corps de la ruche et dans lequel le miel est stocké avant sa collecte aux fins de la consommation humaine.



Recherche

Le Laboratoire de Fougères de l'Anses, laboratoire national de référence pour les résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées d'origine animale, a manifesté un intérêt particulier à l'égard de cette étude. Suite à la récente signature d'un Protocole d'accord entre Fera-York et le Laboratoire de Fougères de l'Anses portant sur une possible collaboration scientifique à l'avenir concernant les résidus de médicaments vétérinaires, le laboratoire de Fougères apportera sa contribution en matière d'expertise analytique pour la détermination des résidus antimicrobiens dans le miel, et participera à l'évaluation statistique des nouvelles données obtenues.

Ce projet de recherche ne vise pas à soutenir l'autorisation d'un quelconque produit spécifique, mais ambitionne plutôt de mettre au point un protocole qui pourra être utilisé pour générer des données fiables sur la déplétion des résidus.

Les données de ces expériences fourniront des informations statistiques qui pourraient être utilisées pour mieux définir les exigences expérimentales d'une bonne étude de déplétion, et donc susceptibles d'aider au calcul de temps d'attente adaptés.

Conclusion

Cette étude devrait déboucher sur un protocole valide sur le plan statistique qui pourra être utilisé par le Royaume-Uni et d'autres pays pour aider à l'établissement des LMR dans le miel.

L'étude servira directement aux initiatives internationales au sein de l'UE, au Comité du *Codex Alimentarius* en charge des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments (CCRVDF) et au JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives).

Références

Codex (2011) Discussion Paper on the Policy for the Establishment of MRLS or other limits in honey, *Codex Alimentarius* Commission, CX/RVDF 12/20/14, December 2011

Commission européenne (2005) http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-8/pdf/vol8_10-2005_en.pdf

FAO (2011). <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0659e/i0659e01.pdf>

Fussell RJ, Heinrich K, Dickinson M, Wilkins S, Roelofs V, Murray A, Kay JF, Sharman M. (2012) Investigation into the Experimental Protocols Required to Determine Maximum Residue Limits (MRLs) in Honey. Drug Testing and Analysis, *submitted*

Remerciements

Le VMD (Veterinary Medicines Directorate) du ministère britannique de l'environnement, de l'alimentation et des affaires rurales est chaleureusement remerciée pour son soutien financier.

Autres publications

Adams S, Heinrich K, Hetmanski M, Fussell RJ, Wilkins S, Thompson HM, Sharman M. (2007) Study of the depletion of tylosin residues in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and the effect of the shook swarm procedure. *Apidologie*, 38, 315-322

Adams S, Heinrich K, Fussell RJ, Wilkins S, Thompson HM, Ashwin H, Sharman M. (2008) Study of the distribution and depletion of chloramphenicol residues in bee products extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie*, 39, 537-546.

Adams S, Fussell RJ, Dickinson M, Wilkins S, Sharman M. (2009) Study of the depletion of lincomycin residues in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and the effect of the shook swarm procedure. *Analytical Chimica Acta*, 637, 315-320



Méthodes

Sérodiagnostic de la péripneumonie contagieuse bovine par immunoblotting

Patrice Gaurivaud (patrice.gaurivaud@anses.fr), François Poumarat (francois.poumarat@anses.fr)

Anses, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des ruminants, Lyon, France

P. Gaurivaud, F. Poumarat (2012). Sérodiagnostic de la Péripneumonie contagieuse bovine par immunoblotting, N°8, ER08-12ME01 <http://www.anses.fr/euroreference/numero8/>

La péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) est une maladie bactérienne des bovinés causée par *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony (MmmSC). Cette maladie est inscrite sur la liste de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), sa déclaration est obligatoire sur le territoire national avec comme conséquences des contraintes sanitaires importantes : dépeuplement, restrictions de circulation et d'exportation.

Autrefois fléau mondial de l'élevage, la PPCB aujourd'hui ne persiste plus qu'en Afrique et localement en Asie. L'Europe est considérée indemne depuis 1900, malgré plusieurs résurgences localisées depuis. La dernière résurgence fut de grande ampleur, elle affecta tout le sud-ouest de l'Europe entre 1980 et 1999. Elle résultait de la propagation insidieuse d'un nouveau variant de MmmSC moins virulent (Nicholas *et al.*, 1996).

Les formes frustes et chroniques de PPCB sont difficiles à dépister. Elles sont la principale source de dissémination et ne sont souvent détectables que par la mise en place d'un dépistage sérologique systématique. Cette évolution subclinique est de règle lors d'infection par le variant européen contemporain de la PPCB. La fixation du complément et l'ELISA-compétition sont les tests sérologiques préconisés par l'OIE, mais leurs manques de sensibilité font qu'ils sont peu efficaces dans un contexte de prévalence faible et pour la forme de PPCB européenne dont la souche est moins immunogène. Seule la mise en place systématique du test d'immunoblotting (TIB) en Europe a permis d'éliminer la maladie dans les dernières zones infectées en 1999 au Portugal alors que toutes les autres stratégies avaient échouées (Nicholas *et al.*, 2008). Ce test très sensible et très spécifique (Schubert *et al.*, 2011) est préconisé par l'OIE comme test d'expertise. Cependant la technique telle qu'elle est décrite dans le manuel de l'OIE (2008) manque de reproductibilité et de robustesse, en effet une grande hétérogénéité de résultats entre laboratoires a été constatée lors de l'unique essai d'aptitude inter-laboratoire international intégrant ce test en 2009. Dans le présent document sont proposés des aménagements permettant de standardiser la fabrication des réactifs et la réalisation du sérodiagnostic afin d'en améliorer la reproductibilité et d'assurer une démarche qualité.

Fabrication des réactifs : choix de la souche, préparation de l'antigène et contrôles préalables

Le choix de la souche est un point extrêmement critique, l'utilisation de la souche B103, souche de référence utilisée pour la mise au point de la méthode par Regalla *et al.* en 1999 est fortement recommandée et devrait être utilisée pour une harmonisation des résultats entre les laboratoires. L'antigène est alors préparé à partir d'une culture en milieu liquide spécifique pour mycoplasmes (Poumarat *et al.*, 1991) concentrée pour atteindre 10^{11} - 10^{12} cfu/mL (tableau 1). Il est impératif au préalable de s'assurer que la culture de MmmSC exprime correctement les 5 protéines spécifiques ciblées dans le TIB, respectivement de 110, 98, 95, 60-62 et 48 kDa, telles que définies par Gonçalves *et al.* (1998). En effet selon la souche de MmmSC utilisée mais également selon le clone sélectionné, ces protéines peuvent être plus ou moins exprimées. Ainsi chaque lot d'antigène devra être évalué avant toute utilisation avec des sérums de référence positifs et négatifs (tableau 1). Il convient de s'assurer de l'absence d'une contamination de la culture par d'autres mycoplasmes. La détection de contamination faible se faisant par « colonies blotting » sur gélose (Gaurivaud *et al.*, 2004) à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique de MmmSC (Brocchi *et al.*, 1993). Le concentré protéique obtenu à partir de mycoplasmes se conserve sous forme d'aliquotes un an à -20°C.



Production des bandelettes antigéniques

Le manuel de l'OIE préconise une séparation des protéines de l'extrait préparé en gradient de polyacrylamide 5-15 % sur la base des travaux de Gonçalves *et al.* (1998). Ce gradient permet la séparation optimale de l'ensemble des protéines de MmmSC et a permis à Gonçalves et collaborateurs d'identifier le consensus des protéines antigéniques spécifiques à



Méthodes

MmmSC. Cependant la séparation est optimale uniquement si ces protéines se trouvent dans la zone du gradient adéquate pour leur masse moléculaire, et, en pratique on est confronté à un problème récurrent de reproductibilité difficile à maîtriser, principalement pour les deux protéines de 95 et 98 kDa. L'utilisation de gel à 7% d'acrylamide (Schubert *et al.*, 2011) permet un compromis, une bonne séparation de ces protéines

et une meilleure reproductibilité entre les lots de bandelettes. Afin de réduire le temps de préparation, des gels commerciaux prêts à l'emploi tel que les gels NUPAGE Tris-Acétate 7% d'Invitrogen et Mini-Protean TGX Any kD de Bio-Rad (figure 1 A) sont utilisables. Les gels Mini-Protean TGX Any kD ont été choisis en raison de l'homogénéité d'intensité des bandes de 95 et 98 kDa lors du TIB avec un sérum positif. À noter que

Tableau 1. Description des étapes du sérodiagnostic de la PPCB par le test d'immunoblotting (TIB)

| Étapes | Méthodes | Notes techniques | Contrôles qualité |
|--|---|---|--|
| Préparation de l'antigène | Préculture en milieu mycoplasme liquide (Poumarat <i>et al.</i> , 1991) de la souche B103 (isolée au Portugal en 1986 à partir de poumon de bovin, Gonçalves <i>et al.</i> , 1998) | La souche B103 est disponible au LNIV (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa, Portugal) et à l'Anses, Laboratoire de Lyon (UMR Mycoplasmoses des Ruminants, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon cedex 07) | |
| | Ensemencement au 1/100 de 150 ml de milieu mycoplasme liquide. Incubation à 37°C, 5% CO ₂ , 48 à 66 h | | Absence de contamination mycoplasmatique vérifiée par « colonies blotting » avec un anticorps spécifique de MmmSC |
| | Centrifugation à 12 000g, 30 min à 4°C. Les culots de mycoplasmes sont lavés trois fois en tampon PBS (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH7,4) | | |
| | Le culot est remis en suspension avec 1 ml de tampon PBS. L'homogénéisation est assurée par passages à travers une aiguille fine. Le concentré de mycoplasmes est conservé un an à -20°C sous forme d'aliquotes de 50 µl | | La présence des protéines de 110, 98, 95, 60-62 et 48 kDa est contrôlée par TIB avec les sérums de référence positifs et négatifs ⁽¹⁾ |
| Production des bandelettes antigéniques | Un volume de l'antigène dilué au 1/2 en eau purifiée est mélangé à 1 volume de tampon Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% glycérol, 2% SDS, 0,01% bleu de bromophénol, 5% β-mercaptoéthanol) puis porté à ébullition 5 mn | Le tampon de dénaturation a une influence sur la qualité de séparation des protéines. Tout tampon autre que le Laemmli devra être validé par TIB | |
| | Séparation par électrophorèse, en gel Mini-Protean TGX Any kD de Bio-Rad (tampon tris 2,5 mM, glycine 19,2 mM, SDS 0,01% pH 8,3) ou en gel NUPAGE Tris-acétate 7% (tampon NUPAGE tris acétate SDS) d'Invitrogen, selon les recommandations des fournisseurs | L'électrophorèse est arrêtée lorsque la protéine de 40 kDa du marqueur « NOVEX Sharp protein standard » d'Invitrogen est en bas du gel | |
| | Equilibre du gel, de la membrane de nitrocellulose (0,45 µm) et des papiers buvards (« extra thick blot paper » Bio-Rad référence 170-3969) en tampon Towbin (25 mM Tris, 192 mM glycine) pendant 5 mn à température ambiante | | |
| | Transfert semi sec en tampon Towbin 30 à 45 mn à 25 V avec le Transblot SD ou le Transblot Turbo de Bio-Rad | | La qualité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane avec le R-RPOB de Sigma-Aldrich (selon les instructions du fournisseur). La membrane est décolorée avec de l'EDTA 10 mM pH 8,0 et rincée deux fois à l'eau purifiée |
| | Saturation de la membrane avec 40 ml de solution de saturation par membrane, 2 heures à température ambiante | | Contrôle des lots de solution de saturation par TIB avec les sérums de référence positifs et négatifs |
| | Solution de saturation : lait écrémé en poudre 50 g/l, glycine 75 g/l, ovalbumine 10 g/l, conservée six mois à -20°C | | |
| | Lavage de la membrane à température ambiante trois fois 15 mn avec 40 ml de tampon TBS 0,1% tween 20 et une fois 15 mn avec 40 ml de tampon TBS | L'omission du lavage après saturation de la membrane réduit l'intensité de la réaction | |
| | TBS : 20 mM Tris, 500 mM NaCl pH 7,4 | | |
| Découpe de la membrane en bandelettes antigéniques constituant un lot unique. Elles sont séchées à température ambiante puis conservées en tube hermétique à -20°C pendant un an | | Deux bandelettes par lot sont contrôlées en TIB avec les sérums de référence positifs et négatifs | |

(1) Les sérums de référence positifs employés sont les sérums 511-49 et 511-56 provenant de l'étude d'Abdo *et al.* en 1998. Les sérums de référence négatifs proviennent de bovins français sains et testés négatifs pour la PPCB par ELISA-compétition et TIB



Méthodes

Tableau 1. Description des étapes du sérodiagnostic de la PPCB par le test d'immunoblotting (TIB) (suite)

| Étapes | Méthodes | Notes techniques | Contrôles qualité |
|------------------------|--|--|--|
| Sérodiagnostic par TIB | Pour chaque sérum une bandelette antigénique est immergée dans 1 ml de solution de dilution et 200 µl de sérum puis incubée 2 heures à température ambiante sous agitation douce. La solution de dilution : 0,1% lait écrémé en poudre (Bio-Rad « blotting-grade blocker » référence 170-6404), 0,1% ovalbumine, conservée 6 mois à -20°C | | Les lots de solution de dilution sont contrôlés par TIB avec les sérums de référence positifs et négatifs. Un sérum de référence positif et un négatif sont utilisés comme témoins pour chaque lot de bandelettes |
| | Lavage des bandelettes à température ambiante trois fois 15 mn en tampon TBS 0,1% tween 20 et une fois 15 mn en tampon TBS | | |
| | Dilution de l'anticorps secondaire en solution de dilution. Un ml est rajouté à chaque bandelette puis incubée 2 heures à température ambiante sous agitation douce. L'anticorps secondaire : anti-IgG de bovin couplé à la peroxydase, purifié par immuno-affinité (Sigma-Aldrich référence A5295) | | La dilution de l'anticorps secondaire est déterminée au cours d'un contrôle à réception réalisé pour chaque nouveau lot par TIB avec les sérums de référence positifs et négatifs |
| | Lavage des bandelettes à température ambiante trois fois 15 mn en tampon TBS 0,1% tween 20 et une fois 15 mn en tampon TBS | | |
| | Lors du dernier lavage la solution de révélation est préparée (30 mg de 4-chloro-1-naphthol dissous dans 10 ml de méthanol, additionnés de 50 ml de PBS et 30µl de peroxyde d'hydrogène 30%) | | Test des lots de 4-chloro-1-naphthol en dot blot avec des dilutions de l'anticorps secondaire pour évaluer la réaction et la présence de dépôt non spécifique |
| | Incubation des bandelettes avec 2 ml de la solution de révélation jusqu'à développement de la coloration. La réaction est arrêtée par lavage des bandelettes à l'eau purifiée | Le temps de développement de la réaction est basé sur les témoins positifs et négatifs | |
| | Interprétation des résultats par comparaison avec les témoins positifs et négatifs | | |

tous les gels commerciaux n'assurent pas la séparation des protéines de 95 et 98 kDa (exemple : gels Mini-Protean TGX 7,5% de Bio-RAD).

Après électrophorèse, le transfert des protéines du gel sur membrane de nitrocellulose par électro-transfert semi-sec (Gravel, 2002) offre plusieurs avantages par rapport au transfert par immersion : un gain de temps, le transfert de plusieurs gels simultanément et l'utilisation d'un générateur classique car il nécessite moins de puissance (Kurien et Scofield, 2006 ; MacPhee, 2010). Le transfert des protéines allant de 48 kDa à 110 kDa, est obtenu avec 30 à 45 min à 25 V en tampon Towbin, avec le transblot SD ou le transblot turbo (Bio-Rad) (tableau 1). Lors de l'assemblage des papiers buvards, gels et membranes, une bulle ou un débris de gel peuvent gêner le transfert. Une ou plusieurs protéines sont alors absentes sur une piste la membrane (correspondant à une bandelette antigénique). Comme le contrôle des lots se fait sur deux bandelettes présent au hasard, un problème de transfert sur une piste peut passer inaperçu et engendrer un faux négatif ou un résultat ininterprétable retardant l'analyse. Il est donc impératif de contrôler l'homogénéité et la qualité du transfert par l'utilisation d'un système de coloration réversible qui n'interfère pas avec le TIB tel que le réactif R-PROB de Sigma-Aldrich (MacPhee, 2010). Cette étape permet aussi le marquage des pistes afin de préparer la découpe de la membrane en bandelettes et aussi de tracer les fronts de migration pour pouvoir aligner et comparer les bandelettes entre elles et ainsi minimiser les effets des bords. Les membranes sont ensuite saturées (tableau 1) et découpées en bandelettes antigéniques. En utilisant les gels pré-coulés et l'électrotransfert semi-

sec, cinq heures sont suffisantes en partant de l'antigène congelé pour la préparation des bandelettes antigéniques. Le nombre produit va dépendre du système choisi allant de 20 à 50 bandelettes. Les bandelettes sont séchées (il est donc préférable d'utiliser les membranes de nitrocellulose, plus facile à réhydrater par rapport aux membranes de polyvinylidène fluorure) et conservées à -20°C pour une période d'un an dans un flacon hermétique. Les réactifs ainsi préparés permettent de réaliser le sérodiagnostic par TIB en 6 heures.

Le sérodiagnostic par TIB

Chaque sérum à tester est dilué au 1/6 dans une solution de dilution dont la composition (tableau 1) influence l'intensité de la réaction et le bruit de fond. Le lait écrémé en poudre du commerce, couramment utilisé en western blotting (MacPhee, 2010), est déconseillé en raison d'une part d'une trop grande variabilité suivant les lots et les fournisseurs, et d'autre part de la présence d'un bruit de fond important avec certains sérums perturbant l'interprétation (figure 1B). Le lait écrémé commercialisé par Bio-Rad permet de contenir ce bruit de fond (figure 1C). Tout nouveau lot de lait écrémé doit être pré-évalué par des essais en TIB avec des sérums de référence positifs et négatifs.

Les anticorps secondaires préconisés sont des anti-IgG de bovin purifiés par immuno-affinité (Sigma-Aldrich) assurant ainsi la spécificité de détection. Un contrôle à réception de chaque nouveau lot permet de déterminer la dilution appropriée afin de garder une sensibilité similaire entre les lots d'anticorps.



Méthodes

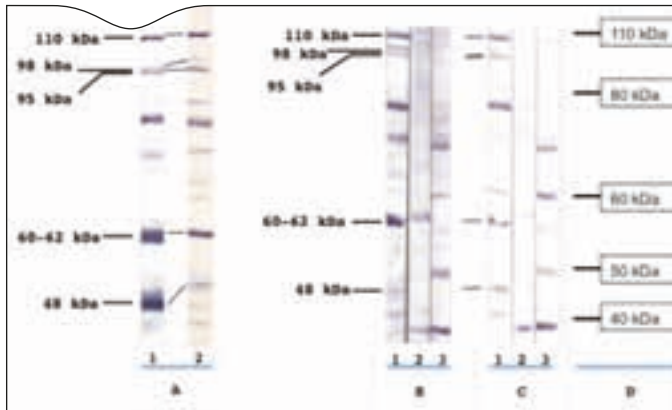


Figure 1. Test d'immunoblotting pour le sérodiagnostic de la PPCB, influence du type de gel et de la solution de dilution des sérums sur les profils obtenus.

A : profil d'un sérum positif ; avec les gels Mini-Protean TGX Any kD de Bio-Rad (piste 1) ou avec les gels NUPAGE 7% Tris-acétate d'Invitrogen (piste 2),

B et C : les sérums d'essai ont été dilués dans la solution de dilution réalisée avec du lait écrémé en poudre du commerce (B) ou avec le lait écrémé de Bio-Rad (C). La piste 1 correspond à un sérum positif et les pistes 2 et 3 à deux sérums négatifs,

D : représentation schématique de la position des protéines du marqueur de masses moléculaires (Novex sharp protein standard d'Invitrogen)

Pour la lecture des résultats, il est essentiel de bien identifier la position des bandes de 110, 98, 95, 60-62 et 48 kDa par l'utilisation systématique d'un sérum témoin positif dont le profil en TIB est bien caractérisé (sérum de référence, tableau 1). L'identification des bandes d'intérêts est aussi facilitée par l'emploi de plusieurs marqueurs de masses moléculaires différents (Sagedi *et al.*, 2003) et d'un sérum témoin négatif. Alors, l'interprétation des résultats se fait par comparaison des profils des témoins à ceux obtenus avec les sérums à tester. L'interprétation du TIB peut parfois s'avérer délicate lorsque des bandes apparaissent à proximité des bandes définies comme spécifiques, un effet de bord pouvant entraîner un léger décalage. En cas extrême, une bandelette sera découpée en deux dans le sens de la longueur, une partie sera révélée par le sérum positif et l'autre par le sérum ambiguë. La réunion des deux parties de la bandelette permet alors la comparaison précise du profil donné par un sérum par rapport à celui du témoin positif.

En conclusion, la définition des consommables et étapes critiques du TIB permet d'améliorer significativement la répétabilité du TIB et devrait pouvoir assurer une bonne reproductibilité, le point faible apparent du TIB constaté lors de l'EILA de 2009. En pratique courante, le TIB est régulièrement mis en œuvre dans nos laboratoires pour statuer sur des sérums trouvés douteux ou positifs, phénomène fréquent pour la fixation du complément et occasionnel en ELISA-compétition.

Références

Abdo el-M, Nicolet J, Miserez R, Gonçalves R, Regalla J, Griot C, Bensaïde A, Krampe M, Frey J. 1998. Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Veterinary microbiology*, 59:109-122.

Brocchi E, Gamba D, Poumarat F, Martel JL, De Simone F. 1993. Improvements in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia

through the use of monoclonal antibodies. *Revue scientifique et technique (International office of epizootics)*, 12(2): 559-570

Gaurivaud P, Persson A, Le Grand D, Westberg J, Solsona M, Johansson KE, Poumarat F. 2004. Variability of a glucose phosphotransferase system permease in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony. *Microbiology*, 150(12): 4009-4022

Gonçalves R, Regalla J, Nicolet J, Frey J, Nicholas R, Bashiruddin J, de Santis P, Gonçalves AP. 1998. Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. *Veterinary Microbiology*, 63: 13-28

Gravel, P. 2002. Protein blotting by semidry method. *In: The Protein Protocols Handbook*, 2nd edition. Humana Press Inc., Totowa, NJ: 321-334

Kurien B T, Scofield R H. 2006. Western blotting. *Methods*, 38: 283-293

MacPhee D J. 2010. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61: 171-177

Nicholas R, Santini FG, Clark KM, Palmer NM, De Santis P, Bashiruddin JB. 1996. A comparison of serological tests and gross lung pathology for detecting contagious bovine pleuropneumonia in two groups of Italian cattle. *The Veterinary record*, 139:89-93.

Nicholas R, Ayling R, McAuliffe L. 2008. Antigenic analysis of *Mycoplasmas*. *In: Mycoplasma Diseases of Ruminants*. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom: 53-57

OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2008. Chapter 2.4.9. Contagious bovine PleuroPneumonia. [consulté le 27 mars 2012] http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.09_CBPP.pdf

Poumarat F, Perrin B, Longchambon D. 1991. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Veterinary microbiology*, 29:329-338

Regalla J, Gonçalves R, Niza Ribeiro J, Duarte L, Nicholas R, Bashiruddin JB, De Santis P, Garrido Abellan F, Penha Gonçalves A. 1999. Development of immunoblotting as a diagnostic tool for contagious bovine pleuropneumonia. *International Symposium – COST Action 826: Mycoplasma of Ruminants: pathology, diagnostic, epidemiology and molecular genetics. Joint Workshops of E.U. projects*, Toulouse, France, 109-112.

Sagedi M., Hajivandi M., Bogoev R, Amshey J. 2003. Molecular weight estimation of proteins by gel electrophoresis revisited. *Focus (Invitrogen)*, 25.3:35-39.

Schubert E, Sachse K, Jores J, Heller M. 2011. Serological testing of cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony using four different tests reveals a variety of seroconversion patterns. *BMC Veterinary research*, 7:72



Méthodes

Adoption par un réseau de laboratoires, d'une méthode de PCR temps réel quantitative validée pour conduire une surveillance des avortements dus à la fièvre Q en élevages de ruminants

É. Rousset (elodie.rousset@anses.fr) (1), M. Prigent (myriam.prigent@anses.fr) (1), G. Ameziane (biomol@aveyron-labo.fr) (2), R. Brugidou (brugidou@aveyron-labo.fr) (2), I. Martel (isabelle.martel@cg13.fr) (3), A. Grob (anne.grob@cg13.fr) (3), G. Le Gall (ghislaine.le-gall@idhesa.fr) (4), S. Kerninon (sandrine.kerninon@idhesa.fr) (4), J. Delaval (jdelaval@cg37.fr) (5), A. Chassin (achassin@cg37.fr) (5), B. Vassiloglou (barbara.vassiloglou@cg42.fr) (6), S. Aulagnon (stephane.aulagnon@cg42.fr) (6), A. Valogne (aurele.valognes@cg53.fr) (7), M. Ogier (myriam.ogierdebaulny@cg53.fr) (7), C. Audeval (chantal.audeval@cg58.fr) (8), F. Colocci (francoise.colocci@cg58.fr) (8), S. Perennes (s.perennes@labos-pyrenees.com) (9), L. Cazalis (l.cazalis@labos-pyrenees.com) (9), P. Nicollet (philippe.nicollet@vendee.fr) (10), C. Maingourt (cyril.maingourd@lasat.fr) (10), Karim Sidi-Boumedine (karim.sidi-boumedine@anses.fr) (1)

(1) Anses Laboratoire de Sophia-Antipolis, Laboratoire national de référence – Fièvre Q, Sophia-Antipolis, France

(2) Laboratoire SEML AVEYRON LABO, Rodez, France

(3) Laboratoire départemental d'analyses des Bouches-du-Rhône, Marseille, France

(4) GIP IDHESA Bretagne Océane, Quimper, France

(5) Laboratoire de Touraine, Parçay-Meslay, France

(6) Laboratoire vétérinaire départemental de la Loire, Montbrison, France

(7) Laboratoire vétérinaire départemental de la Mayenne, Laval, France

(8) Laboratoire vétérinaire départemental de la Nièvre, Nevers, France

(9) Laboratoire des Pyrénées, Lagor, France

(10) Laboratoire d'analyses Sèvres Atlantique (LASAT), Niort, France

E. Rousset, M. Prigent, G. Ameziane, R. Brugidou, I. Martel, A. GROB, G. Le Gall, S. Kerninon, José Delaval, A. Chassin, B. Vassiloglou, S. Aulagnon, A. Valogne, M. Ogier, C. Audeval, F. Colocci, S. Perennes, L. Cazalis, P. Nicollet, C. Maingourt, K. Sidi-Boumedine (2012). Adoption par un réseau de laboratoires d'une méthode de PCR temps réel quantitative validée pour conduire une surveillance des avortements dus à la fièvre Q en élevages de ruminants, N°8, ER08-12ME02 <http://www.anses.fr/euroreference/numero8/>

En France, la fièvre Q est une maladie d'intérêt pour l'état, tant d'un point de vue de la santé animale que de la santé publique. Cependant, les connaissances sur les situations épidémiologiques et sur les risques d'exposition restent ténues. Afin de permettre à la fois une évaluation des risques et une gestion des risques pertinentes, il est apparu essentiel de mettre en œuvre un dispositif de surveillance des avortements en série dus à la fièvre Q en élevages de ruminants.

Une des clés du dispositif est la production de données fiables et comparables par le réseau des laboratoires vétérinaires d'analyses impliqués. Pour cela, les méthodes de PCR à utiliser pour ce dispositif ont été validées conformément aux nouvelles normes françaises XP-U47-600-1 et XP-U47-600-2. Dans ce même cadre normatif, le laboratoire national de référence (LNR) pour la fièvre Q a organisé l'étape d'adoption des méthodes de PCR par les laboratoires. Les essais d'adoption de méthode consistent à vérifier que les laboratoires obtiennent les performances attendues, celles qui ont été déterminées au cours de l'étape de validation en matière de limite de détection et d'exactitude de quantification.

Les adoptions ont été concluantes pour tous les laboratoires. L'analyse globale de ces résultats d'adoption est présentée afin d'observer pour la première fois la cohérence des résultats PCR du réseau de laboratoires

Introduction

La fièvre Q, causée par la bactérie *Coxiella burnetii*, est répandue à la fois sur la planète et chez la plupart des espèces animales (Rousset *et al.*, OIE 2010). Elle se manifeste chez les ruminants par des avortements, et peut entraîner des pertes économiques importantes (Touratier *et al.*, 2012). De plus, *C. burnetii* est un agent zoonotique, dont la transmission à l'homme a lieu principalement par voie aérienne. Les animaux infectés peuvent excréter la bactérie et contaminer l'environnement. Les bactéries peuvent persister dans l'environnement, sous forme de pseudospores, et être alors disséminées. La survenue de cas ou d'épidémies dans la population apparaît dépendre

d'une combinaison de facteurs favorisant la diffusion aérienne, tels que la topographie des lieux et les conditions météorologiques (Forland *et al.*, 2012). Néanmoins, le risque maximal de contamination de l'environnement semble associé aux épisodes d'avortements dans un élevage, cumulant à la fois un nombre important d'animaux excréteurs et des charges individuelles excrétées élevées (De Bruin *et al.*, 2012 ; De Crémoux *et al.*, 2012). Une surveillance des élevages atteints de fièvre Q clinique a été envisagée pour mieux connaître la situation et l'évolution sur le territoire de cette maladie et ainsi permettre d'objectiver les moyens de contrôle. La coordination de cette surveillance sera assurée par la Plateforme nationale de



Méthodes

surveillance épidémiologique en santé animale, nouvellement créée en réponse aux orientations prises en 2010 lors des Etats généraux du sanitaire organisés par le ministre en charge de l'agriculture.

Le système de surveillance impliquera dix départements pilotes durant trois années pour permettre les optimisations les plus rationnelles en visant une standardisation des méthodes (échantillonnages en élevages, analyses de laboratoire et interprétations des résultats). Ainsi, un protocole est proposé pour la mise en évidence d'un épisode de fièvre Q en élevage (Note de Service DGAL/SDSPA/N2012-8188 du 11 septembre 2012). Ce protocole est notamment inspiré des conclusions émises en 2007 par un groupe de travail national sur la fièvre Q. Il a d'ailleurs été repris au niveau européen en tant que proposition d'une surveillance fondée sur un système passif (Sidi-Boumedine *et al.*, 2010). Dans cette démarche diagnostique, l'analyse par PCR réalisée au laboratoire est capitale. Elle permet la détection et la quantification des bactéries dans les prélèvements vaginaux (ovin, caprin), endocervicaux (bovin) ou placentaires (toute espèce de ruminant) des femelles prélevées. Le résultat obtenu est ensuite interprété par rapport à une charge bactérienne seuil, admise à dire d'experts. Les distributions des données quantitatives issues du protocole de surveillance seront étudiées afin d'éventuellement ajuster ce seuil clinique en fonction de l'espèce animale mais aussi du type de prélèvement.

Ainsi, sur la base des besoins et objectifs de la surveillance à mettre en place, les travaux d'harmonisation et de validation de la PCR Temps Réel Quantitative (PCR-TR-Q) à utiliser pour le diagnostic moléculaire de la fièvre Q abortive ont été entrepris. Deux fabricants (Adiagene et LSI) ont soumis leurs kits de PCR-TR-Q à la validation selon un mode opératoire standard proposé par le LNR, et, en respectant les recommandations de la nouvelle norme XP U 47-600-2, publiée en juin 2011 par l'AFNOR, relative à la PCR en santé animale. Les dossiers des



fournisseurs ont été examinés et validés par le LNR en décembre 2011 en fonction de critères de performances préétablis. Parallèlement, une attestation de validation a aussi été délivrée à un laboratoire du réseau ayant développé sa propre méthode. Puis ces méthodes validées ont été approuvées par le ministère de l'agriculture lors de l'agrément des laboratoires.

Préalablement à la mise en place en routine de la méthode, la norme préconise de mener les essais d'adoption permettant de vérifier que l'utilisateur atteint les performances annoncées par le fournisseur. Le processus d'adoption d'une méthode de diagnostic moléculaire comprend la confirmation des performances de l'étape PCR d'une part (recommandations du chapitre 11 de la norme XP U47-600-1, pages 30-32) et de la méthode d'analyse complète d'autre part (pages 32-33) en matière de limite de détection et d'exactitude de quantification. Cette étape d'adoption n'était pas requise pour un des laboratoires du réseau qui a validé une méthode interne. Tous les autres laboratoires participant au réseau ont retourné des résultats conformes aux critères exigés pour les essais d'adoption.

Tableau 1. Distribution des réactifs commerciaux, matrices et appareillages en fonction des 11 séries de données obtenues

| Code série | Fabricant du kit PCR | Matrice biologique négative | Thermocycleur en temps réel | Kit extraction d'ADN |
|------------|----------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| j | ADIAGENE | Mucus vaginal bovin | Stratagène MxPro 115108 | Macherey Nagel Nucleospin Tissue |
| d | ADIAGENE | Mucus vaginal caprin | Applied Biosystems Abiprism 7500 SDS | Qiagen QIAamp DNA Mini kit |
| a | ADIAGENE | Mucus vaginal bovin | Applied Biosystems Abiprism 7500 | Qiagen QIAamp DNA Mini kit |
| c | ADIAGENE | Cotylédons de placenta bovin | Applied Biosystems Abiprism (2*) | Qiagen QIAamp DNA Mini kit |
| b | LSI | Mucus vaginal bovin | Applied Biosystems Abiprism 7500 | Macherey Nagel Nucleospin Tissue |
| e | LSI | Mucus vaginal bovin | Stratagène MxPro 115108 | Macherey Nagel Nucleospin Tissue |
| k | LSI | Mucus vaginal bovin | Applied Biosystems Abiprism (2*) | Qiagen QIAamp DNA Mini kit |
| f | LSI | Mucus vaginal bovin | Biorad CFX96 et Biorad CHROMO4 (2*) | Macherey Nagel Nucleospin Tissue |
| h | LSI | Mucus vaginal bovin | Roche Light Cyclers 480 | Qiagen QIAamp DNA Mini kit |
| i | LSI | Mucus vaginal bovin | Applied Biosystems Abiprism 7500 (2*) | Qiagen QIAamp DNA Mini kit |
| g | LSI | Mucus vaginal bovin | Applied Biosystems Abiprism 7500 (2*) | Qiagen QIAamp DNA Mini kit |

*2 thermocycleurs différents testés



Méthodes

L'objet est ici d'exploiter l'ensemble des résultats pour permettre une première évaluation de la méthode PCR du dispositif de surveillance pratiquée au sein même des laboratoires du réseau. De plus, cet exercice pionnier réalisé en condition réelle est décrit afin de faciliter l'assimilation des exigences de la norme à respecter par les futurs adopteurs.

Matériel, méthode et résultats

Description des méthodes par PCR Temps Réel Quantitative (PCR-TR-Q)

Deux méthodes commerciales de PCR ont été évaluées dans cet essai interlaboratoire d'adoption : le Kit ADIAVET® COX REALTIME, # ADI143 (Adiagene, France) et le Kit TaqVet™ *Coxiella burnetii* - Absolute Quantification, # FQPAQ (LSI, France). Les exigences de la norme française XP U47-600-2, ainsi que les critères de performances prédéfinis par le LNR, ont été appliquées pour caractériser et valider les méthodes souhaitées pour le diagnostic des avortements. Chaque kit PCR-TR-Q a été associé à deux méthodes définies d'extraction et purification des ADN totaux utilisant des réactifs sur colonnes de silice (Nucleospin Tissue, Macherey-Nagel, et, QIAamp DNA mini kit, Qiagen, France). La validation a porté sur les matrices endocervicale, vaginale ou placentaire. *A minima*, l'une des trois matrices biologiques de l'une des trois espèces animales devait être évaluée, l'effet inhibiteur de PCR étant considéré équivalent dans ces prélèvements. Les deux producteurs de kits ont conduit les expériences de validation sur le même modèle de thermocycleur : Abiprism 7500® d'Applied Biosystem.

Les deux méthodes ont été validées pour permettre une quantification absolue de *C. burnetii* entre au moins 1.10^3 et 1.10^6 copies génome équivalent (GE) par mL de l'échantillon. La cible est une séquence d'insertion IS1111 spécifique du génome de *C. burnetii* (Berri *et al.*, 2003). Le standard plasmidique de chaque kit, qui permet de construire une droite d'étalonnage, a été vérifié et raccordé par rapport au standard d'ADN génomique du LNR fièvre Q. Le résultat est rendu en copies de génome équivalent de la souche de référence Nine Mile. Le génome de cette souche de référence contient 20 copies d'IS1111. Ainsi,

le résultat est relativisé en considérant que chaque bactérie comprend en moyenne 20 copies d'IS1111. Chacun des deux kits détecte simultanément une seconde cible spécifique du génome des cellules bovines, ovines et caprines afin de renseigner sur la validité de l'extraction des ADN totaux et de vérifier d'éventuels effets inhibiteurs de l'échantillon sur la PCR. La notice du fabricant a été élaborée en concertation avec le LNR de façon à spécifier le mode opératoire détaillé et les caractéristiques de performance validées de la PCR et de la méthode complète. Elle fait office de protocole standard et officiel.

Nombre et répartition des séries de données

« adoption de méthode »

Au total, onze séries de données ont été obtenues : sept avec le kit LSI et quatre avec le kit Adiagène (Tableau 1). Sur les neuf laboratoires départementaux du réseau amenés à conduire l'adoption des méthodes commerciales, deux laboratoires ont réalisé l'exercice sur les deux kits proposés. Les laboratoires ont employé les kits PCR-TR-Q en combinaison avec l'une ou l'autre des deux méthodes d'extraction (sept séries avec le kit Qiagen et quatre séries avec le kit Macherey Nagel).

Au total, 16 appareils thermocycleurs différents ont été utilisés (représentant 5 modèles), la majorité des laboratoires étant équipé d'un appareil de modèle Abiprism 7500®. Cinq laboratoires équipés de plusieurs thermocycleur ont réalisé les vérifications sur deux modèles différents en vue de leur utilisation en routine.

Limite de détection de la PCR (LD_{PCR})

Les limites de détection, respectivement pour les kits A et B, ont été définies à 1,5 et 1,0 copie de GE par réaction PCR. Ces valeurs correspondent à 300 et 200 copies GE par mL pouvant être détecté dans 95% des cas.

Un matériau de référence d'ADN dosé a été fourni par le LNR. Chaque laboratoire a réalisé deux essais indépendants de trois répétitions d'un niveau d'ADN de trois fois la LD_{PCR} . La détection de l'ensemble des six tests a permis la vérification

Tableau 2. Plans des expériences réalisés pour l'adoption d'une méthode de PCR validée pour diagnostiquer la fièvre Q dans le cadre de la surveillance des maladies abortives chez les ruminants

A. Limite de détection de la PCR et de la méthode complète (en présence de matériau de référence dosé)

| Etape d'adoption | Niveaux testés | Nombre d'essais indépendants* | Nombre d'opérateur minimal | Nombre de répliques | Nombre de mesures | Acceptabilité |
|------------------|--------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|
| PCR | 3 x LD_{PCR} | 2 | 1 | 3 | 6 | 100% des résultats positifs |
| Méthode complète | 5 x $LD_{Méthode}$ | 2 | 1 | 2 | 4 | 100% des résultats positifs |

B. Domaine et limite de quantification de la PCR et de la méthode complète (en présence de matériau de référence dosé)

| Etape d'adoption | Niveaux testés | Nombre d'essais indépendants* | Nombre d'opérateur minimal | Nombre de répliques | Nombre de mesures | Acceptabilité |
|------------------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--|-------------------------|---|
| PCR | Gamme (5 points dont LQ_{PCR}) | 1 | 1 | 5 points de gamme et 5 répliques de LQ_{PCR} | 10 (dont 6 LQ_{PCR}) | Biais inférieur à $0,5 \log_{10}$ copies GE/mL pour chaque niveau |
| Méthode complète | 5 x $LQ_{Méthode}$ | 2 | 1 | 2 (avec 2 gammes à 5 points) | 14 | 100% des résultats positifs et quantifiés avec biais inférieur à $0,7 \log_{10}$ copies GE/mL |

*1 pour chaque thermocycleur
LD, limite de détection ; LQ, limite de quantification



Méthodes

des performances escomptées de LD_{PCR} (Tableau 2 A). Le terme de fidélité, qui est employé par la suite, renseigne sur la répétabilité et sur la reproductibilité intra-laboratoire (ou fidélité intermédiaire).

Les opérateurs ont obtenu les moyennes des valeurs de Ct de 33,41 et 34,23, avec les kits A et B, respectivement (Tableau 3). Les écart-types de fidélité n'ont pas dépassé 0,50 Ct, et, les écart-types de reproductibilité ont été de 1,32 Ct pour les quatre laboratoires ayant employé le kit A (24 mesures sur le niveau de 900 GE/mL) et de 0,87 Ct pour les sept essais avec le kit B (42 mesures sur le niveau de 600 GE/mL). Les coefficients de variation (CV) de fidélité ont été inférieurs à 1,47%. La méthode a présenté des CV de reproductibilité de 3,96% avec le kit A et de 2,54% avec le kit B.

Limite de détection de la méthode complète ($LD_{Méthode}$)

La réalisation de la méthode complète comprend deux phases distinctes ; elle consiste à extraire les ADNn en amont de l'amplification de la séquence cible par PCR sur ces ADNn extraits à partir de l'échantillon biologique. À ce jour, les performances de la méthode ont été validées pour deux méthodes courantes d'extraction d'ADN total sur colonnes de silice (Nucleospin Tissue de Macherey Nagel, QIAamp DNA Mini kit de Qiagen) selon les consignes de la norme XP U47-600-2 (chapitre 7.3). Il est intéressant de noter que les limites de détection étaient similaires pour la PCR et la méthode avec chacun des kits : 300 copies GE par mL avec le kit A et 200 avec le kit B.

Un autre matériau de référence fourni par le LNR, constitué cette fois de bactéries quantifiées, a été utilisé. Les échantillons représentatifs à tester ont été préparés par ajout d'un nombre connu de bactéries de *C. burnetii* dans l'une des matrices biologiques concernées (Tableau 1). Pour ces dernières, les laboratoires ont été chargés de l'obtention des matrices négatives en quantité nécessaire pour les essais d'adoption : des suspensions de cellules préparées à partir d'écouvillons soit vaginaux chez les petit-ruminants, endocervicaux chez les

bovins, ou de cotylédons de placenta quelque soit l'espèce de ruminant (1 écouvillon étant repris dans 1 ml de PBS pH7,4). A minima, l'une des trois matrices biologiques de l'une des trois espèces animales devait être soumise à l'adoption.

Selon un principe similaire à l'étape d'adoption de la LD_{PCR} , la confirmation de la $LD_{Méthode}$ a été effectuée sur un niveau de concentration correspondant à cinq fois la $LD_{Méthode}$ analysé en double dans des conditions de fidélité intermédiaire sur l'ensemble du processus d'extraction d'ADN et d'amplification PCR de la cible (Tableau 2 A).

Les valeurs de Ct obtenues par les laboratoires ont été étendues de 31,09 à 34,49 pour le niveau de 1500 copies GE par mL (écart de 3,4 Ct sur 16 mesures) avec le kit A et de 31,71 à 36,20 (écart de 4,49 Ct sur 28 mesures) pour le niveau de 1000 copies GE par mL avec le kit B (Tableau 3). La dispersion des résultats détaillés de chaque laboratoire a atteint un écart de 2,23 Ct mais a été le plus souvent comprise entre 0,80 et 1,50 Ct (résultats non montrés). Les moyennes globales étaient respectivement de 32,71 et 34,30 avec les kits A et B. Les CV de fidélité comme de reproductibilité ont été relativement proches de ceux calculés pour la LD_{PCR} pour le kit A et légèrement plus élevés pour le kit B. L'ensemble des résultats a montré un CV de reproductibilité inférieur à 4%.

Quantification et limites de quantification LQ_{PCR} et $LQ_{Méthode}$

En PCR, les limites LQ_{PCR} ont été déterminées à 400 et 300 copies GE par mL avec respectivement le kit A et le kit B. Quelque soit le kit PCR, la limite de quantification validée est de 2,70 \log_{10} copies GE/mL pour la méthode complète, soit 500 copies GE/mL, sachant que le seuil diagnostique est actuellement fixé à d'expert à 4 \log_{10} copies GE/mL (Note de Service DGAL/SDSPA/N2012-8188 du 11 septembre 2012). De plus, les méthodes ont été validées pour assurer une quantification linéaire sur 5 logs d'amplitude jusqu'à au moins 1.10⁶ copies GE par mL (ou bactéries par écouvillon). La confirmation des performances de quantification a été jugée, à l'aide des matériaux de référence dosés, par le calcul du biais

Tableau 3. Valeurs de Ct obtenues lors des essais de vérification des limites de détection

| Niveaux vérifiés | A | | | | B | | | |
|---|---------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| | Limite de détection | | Limite de quantification | | Limite de détection | | Limite de quantification | |
| | 3LD _{PCR} | 5LD _{Méthode} | LQ _{PCR} | 5LQ _{Méthode} | 3LD _{PCR} | 5LD _{Méthode} | LQ _{PCR} | 5LQ _{Méthode} |
| Nombre de copies GE en \log_{10} / mL | 2,95 | 3,18 | 2,60 | 3,40 | 2,78 | 3,00 | 2,48 | 3,40 |
| Nombre de copies GE / mL | 900 | 1500 | 400 | 2500 | 600 | 1000 | 300 | 2500 |
| Nombre de laboratoires | 4 | 4 | 4 | 4 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| Nombre de répétitions | 6 | 4 | 8 | 4 | 6 | 4 | 8 | 4 |
| Nombre de mesures | 24 | 16 | 32 | 16 | 42 | 28 | 56 | 28 |
| Valeur moyenne obtenue | 33,41 | 32,71 | 33,72 | 32,01 | 34,23 | 34,30 | 35,06 | 32,93 |
| Valeur minimale/ maximale | 32,03 / 35,90 | 31,09 / 34,49 | 32,09 / 36,54 | 29,60 / 33,66 | 32,67 / 36,10 | 31,71 / 36,20 | 33,65 / 36,66 | 30,81 / 34,50 |
| Ecart-type de fidélité | 0,46 | 0,55 | 0,54 | 0,40 | 0,50 | 0,80 | 0,50 | 0,65 |
| Ecart-type de reproductibilité | 1,32 | 1,00 | 1,37 | 1,44 | 0,87 | 1,34 | 0,85 | 1,15 |
| CV fidélité (%) | 1,38 | 1,67 | 1,61 | 1,25 | 1,47 | 2,34 | 1,43 | 1,98 |
| CV reproductibilité (%) | 3,96 | 3,49 | 4,05 | 4,49 | 2,54 | 3,92 | 2,43 | 3,50 |

CV, coefficient de variation ; LD, limite de détection ; LQ, limite de quantification



Méthodes

entre la valeur quantifiée attendue et celle obtenue, que ce soit pour l'étape d'amplification génique seule ou pour la méthode complète. Le biais maximal accepté a été fixé à $0,5 \log_{10}$ pour la PCR et à $0,7 \log_{10}$ pour la méthode (Tableau 2 B). Les calculs doivent être réalisés sur les données exprimées en logarithme décimal.

Au niveau PCR, le plan d'expérience suivi a été de réaliser un essai pour les cinq niveaux de dilution sérielle au dixième, constituant la gamme d'étalonnage, dont six exemplaires du dernier niveau représentant la LQ_{PCR} . Le biais devait être calculé pour chaque niveau et pour les cinq répliques de LQ_{PCR} .

Au niveau de la méthode complète, deux essais ont été réalisés pour la quantification d'un échantillon en duplicat. Au total, quatre résultats positifs et quantifiés ont été obtenus pour le niveau de cinq fois la $LQ_{Méthode}$, soit de $3,40 \log_{10}$ copies GE par mL quelque soit le kit (2500 bactéries/écouvillon).

Les droites d'étalonnage ont été évaluées à l'issue de chaque essai en examinant visuellement l'alignement et la répartition homogène des points ainsi que l'absence de point aberrant. De plus, deux critères consignés dans la notice du kit ont été vérifiés : la valeur coefficient de corrélation R^2 supérieure à 0,90 et l'efficacité de PCR comprise entre 85 et 115%. Les droites d'étalonnage de 33 essais PCR différents montrent une bonne reproductibilité des valeurs de Ct obtenues en fonction des concentrations (Figure 1). Les écart-types de reproductibilité ont varié de 0,42 à 1,31 Ct. Les CV correspondants se situaient entre 3,63 et 4,52% avec le kit A et entre 1,91 et 3,00% avec le kit B. Les moyennes générales des 33 gammes (11 séries) trouvées pour la pente, l'ordonnée à l'origine et l'efficacité étaient respectivement de -3,41, de 43,33 et de 97%. Le réseau de laboratoires impliqués dans la surveillance apparaît donc être en capacité de fournir des résultats avec un niveau de cohérence encourageant. Les critères d'acceptation des droites de quantification à respecter, mais aussi le nombre de

point élevé (5 points) de la gamme, contribuent à assurer cette reproductibilité.

Les écart-type de fidélité, comme de reproductibilité, des mesures des concentrations de la LQ_{PCR} comme de la $LQ_{Méthode}$ ont été parfaitement similaires quel que soit le kit (Tableau 4). Les CV de fidélité et de reproductibilité sont plus élevés sur les mesures de concentration obtenues avec la méthode complète qu'avec la PCR seulement. L'étape d'extraction d'ADN constitue effectivement une addition de facteurs de variations sur le résultat.

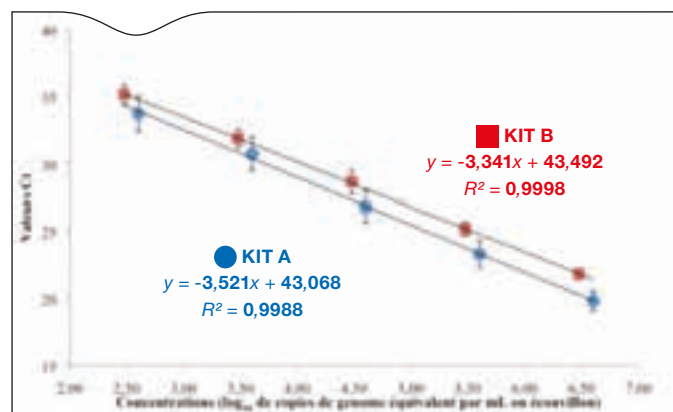


Figure 1. Droites d'étalonnages, entre les valeurs Ct et les concentrations introduites, obtenues avec les standards de quantification de concentration en ADN connus, fournis avec chacun des kits PCR.

Les moyennes et écart-types de reproductibilité interlaboratoire ont été calculés à partir des valeurs de Ct obtenus sur 12 gammes avec le kit Adiaagène (4 séries de données) et 21 gammes avec le kit LSI (7 séries de données).

Tableau 4. Concentrations mesurées (en \log_{10} / mL)

| Niveaux attendus | A | | B | |
|---|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
| | LQ_{PCR} | $5LQ_{Méthode}$ | LQ_{PCR} | $5LQ_{Méthode}$ |
| Nombre de copies GE en \log_{10} / mL | 2,60 | 3,40 | 2,48 | 3,40 |
| Nombre de copies GE / mL | 400 | 2500 | 300 | 2500 |
| Nombre de laboratoires | 4 | 4 | 7 | 7 |
| Nombre de répétitions | 8 | 4 | 8 | 4 |
| Nombre de mesures | 32 | 16 | 56 | 28 |
| Fidélité | | | | |
| Concentration moyenne retrouvée | 2,62 | 3,16 | 2,48 | 3,18 |
| Concentration minimale / maximale | 2,16 / 2,94 | 2,72 / 3,93 | 2,05 / 2,77 | 2,73 / 3,84 |
| Écart-type de fidélité | 0,15 | 0,24 | 0,15 | 0,21 |
| Écart-type de reproductibilité | 0,16 | 0,34 | 0,15 | 0,31 |
| CV fidélité (%) | 5,85 | 7,49 | 6,02 | 6,52 |
| CV reproductibilité (%) | 6,23 | 10,79 | 6,17 | 9,63 |
| Justesse | | | | |
| Moyenne des biais en valeur absolue | 0,13 | 0,35 | 0,12 | 0,31 |
| Valeur absolue du biais minimal | 0,01 | 0,03 | 0,00 | 0,02 |
| Valeur absolue du biais maximal | 0,44 | 0,67 | 0,42 | 0,66 |

CV, coefficient de variation ; LD, limite de détection ; LQ, limite de quantification



Méthodes

Les laboratoires ont fourni des mesures de concentrations respectant les limites préétablies de biais. La PCR seule a évidemment offert une meilleure justesse que de la méthode complète (Tableau 4). La limite d'acceptabilité maximale fixée à $0,7 \log_{10}$ pour la méthode globale signifie qu'il est possible de détecter des variations jusqu'à un facteur 5 par rapport au niveau cible. Autrement dit, on autorise un écart de 2,33 Ct. Sur l'ensemble, le biais maximal des neuf laboratoires a été de 0,67 (résultats non montrés). Une majorité des mesures (96/132, soit 73%) a présenté un biais inférieur à 0,25. Néanmoins avec la méthode complète, une proportion plus faible de 41% (18/44) des biais a été inférieure à 0,25. Un biais inférieur à $0,25 \log_{10}$ indique que les mesures présentent une variation maximale d'un facteur de 1,78 par rapport à la concentration attendue, soit moins de 1 Ct. La comparaison des mesures du niveau de $5 \times \text{LQ}_{\text{Méthode}}$ (2500 bactéries/écouvillon) de laboratoire à laboratoire a montré que les quantités mesurées minimales et maximales étaient de 2,73 à 3,84 (7 séries) avec B et de 2,72 à 3,93 (4 séries) avec A (Tableau 4). La justesse des concentrations mesurées représentée en Box-Plots apparaît similaire entre les deux kits (Figure 2).

Conclusions et perspectives

La surveillance des maladies abortives chez les ruminants constitue un des enjeux actuels prioritaires de santé animale en France. Cependant, un état des lieux récent a mis en exergue l'hétérogénéité des démarches diagnostiques utilisées pour les avortements (Touratier *et al.*, 2012). Des protocoles homogènes de diagnostics différentiels sont en cours de proposition en collaboration avec les organisations professionnelles. Pour la fièvre Q, une surveillance a été conçue en lien avec celle de la brucellose, maladie désormais éradiquée et qui requiert donc une surveillance permettant d'assurer une réaction rapide. Grâce à sa dimension pilote, ce dispositif devrait permettre une souplesse suffisante aux adaptations nécessaires en termes de faisabilité et de coût. Les développements réalisés devraient contribuer à améliorer les démarches pour d'autres pathologies abortives.

L'outil PCR pour le diagnostic de la fièvre Q étant fondamental dans la surveillance, une méthode standardisée validée était nécessaire. En effet, pour permettre l'exploitation des données issues de la surveillance, il est important de garantir l'obtention de résultats comparables. Les caractéristiques

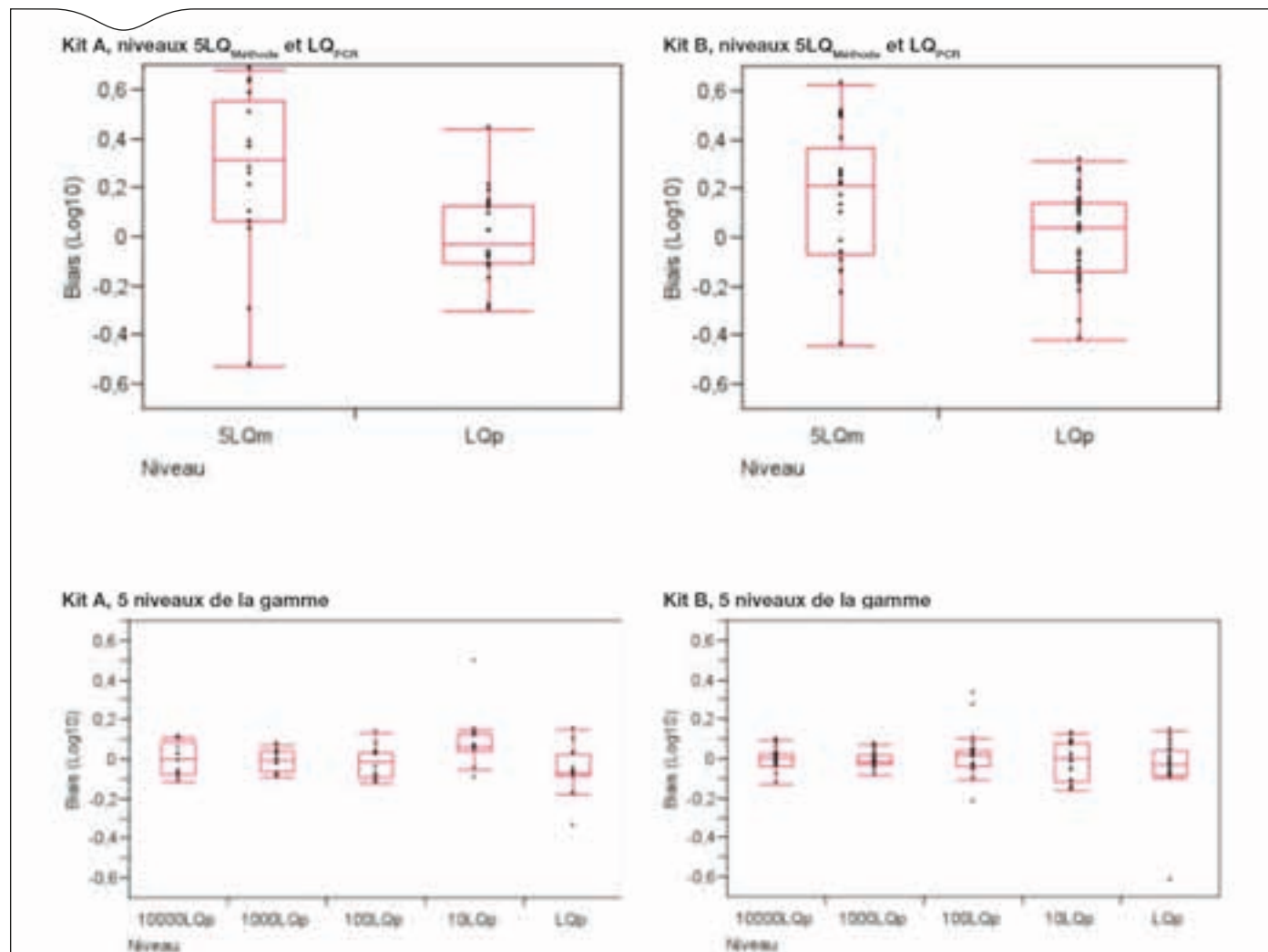


Figure 2. Représentation par Box-Plot de la justesse des concentrations mesurées (biais en \log_{10} / mL)



Méthodes

de performance de la méthode sont des composantes clés pour le laboratoire d'analyse mais aussi pour le statisticien qui exploite les données de la surveillance (Laurentie et Delmas, 2011). Une norme française relative à la PCR en santé animale a été récemment élaborée afin d'aider à fiabiliser les données (Normes XP U47-600-1 et -2). En accord avec cette norme, les travaux ont été conduits pour offrir une méthode standard et en déterminer les caractéristiques les performances. L'étape requise suivante a été de vérifier que les laboratoires du réseau étaient en capacité d'assurer les performances définies dans les conditions opératoires des analyses de routine. À notre connaissance, c'est le premier essai interlaboratoire d'adoption d'une méthode PCR impliquant des laboratoires périphériques et des producteurs de kits. Les résultats de l'étape d'adoption de la méthode PCR ont permis d'avoir une première vision du niveau de performance au sein des laboratoires et de vérifier l'homogénéité des résultats.

Dans une précédente étude visant à évaluer des PCR en Temps Réel Qualitative ciblant le gène IS1111, par un essai interlaboratoire, la concordance globale des résultats en valeurs de Ct avait été jugée acceptable. Les écarts de Ct obtenus par les sept laboratoires participants variaient de 4,0 à 7,2 selon les sept échantillons d'ADN positifs testés (Jones *et al.*, 2011). Dans notre exercice d'adoption présenté ici, regroupant neuf laboratoires, l'ensemble des résultats quantitatifs fournis avec la méthode PCR validée et adoptée permet d'observer des résultats nettement plus comparables. Les écarts de Ct interlaboratoires ont varié de 2,57 à 4,49 sur des niveaux faibles et moyens allant de 300 à 2500 copies GE/mL (Tableau 3). Le CV de reproductibilité maximal a été de 4,49%. Les écart-types de fidélité des valeurs de Ct ont été globalement compris entre 0,40 et 0,80 Ct (CV entre 1,25 et 2,34%).

Cet essai d'adoption a montré que pour les mesures de concentrations attendues, le niveau d'exactitude (fidélité en combinaison de la justesse) obtenu a été similaire quelque soit le kit. À titre d'exemple pour la justesse de méthode complète, les mesures trouvées pour le niveau testé de 2500 bactéries par mL ($5xLQ_{Méthode}$) ont varié de $2,72 \log_{10}$ (525) à $3,93 \log_{10}$ (8511) bactéries par mL (Tableau 4). La moyenne du biais absolu a été de $0,3 \log_{10}$, soit un facteur 2 entre la concentration attendue et celle mesurée. En matière de dispersion de mesure, les laboratoires ont présenté des CV de fidélité inférieurs à 8% et des CV de reproductibilité inférieurs à 11%.

Par ailleurs, les valeurs de biais comme de coefficients de variation peuvent servir de données de référence initiales pour cette méthode officiellement définie, validée et partagée par un réseau de laboratoires. Une reproductibilité interlaboratoire plus étayée devra être estimée par la participation à des essais interlaboratoires réguliers. Il est tout particulièrement important de bien délimiter le niveau correspondant au seuil diagnostique. Il est aussi essentiel au laboratoire de réaliser une carte de contrôle sur le point critique constitué par le seuil. Il s'agit d'employer un témoin dosé à $4 \log_{10}$ bactéries par mL intégré à chaque série d'extraction. Ce matériau de référence interne sert ainsi de témoin de méthode. Il permet aussi d'établir un suivi sous la forme de carte de contrôle intra-laboratoire (limite d'acceptabilité du biais fixée à moins de $0,7 \log_{10}$). L'incertitude de mesure devra être prise en compte dans l'interprétation du résultat. Une mesure à 2000 bactéries/écouvillon sera interprétée comme résultat fort positif car elle correspond à la limite inférieure du niveau seuil à 10 000 bactéries/écouvillon. Enfin, les informations sur les capacités d'exactitude des

résultats autour du seuil devraient contribuer à évoluer vers une future méthode simplifiée moins coûteuse (i.e. utilisation d'un standard de seuil au lieu d'une gamme de cinq standards de quantification).

Remerciements

L'équipe du LNR fièvre Q tient à remercier Maëlle Leborgne et Béatrice Blanchard de la société Adiaçène, ainsi que Sandrine Moine-Bouley et Eric Sellal de la société LSI pour leur collaboration constructive dans l'accomplissement des validations et préparations des adoptions. Elle souhaite également exprimer sa gratitude à Claire Pelletier du LDA Saône-et-Loire pour les échanges pertinents au cours de la phase de validation de leur méthode interne.

Références bibliographiques

- Berri M, Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. 2003. PCR-based detection of *Coxiella burnetii* from clinical samples. *In: Methods in Molecular Biology. PCR Detection of Microbial Pathogens*, 216:153-161.
- de Bruin A, van der Plaats RQJ, de Heer L, Paauwe R, Schimmer B, Vellema P, van Rotterdam BJ, van Duynhoven YTHP. 2012. Detection of *Coxiella burnetii* DNA on small-ruminants farms during Q fever outbreak in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:1652-1657.
- De Cremoux R, Rousset E, Touratier A, Audusseau G, Nicollet P, Ribaud D, David V, Le Pape M. 2012. *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 64 :120-122.
- Forland F, de Carvalho Gomes H, Nokleby H, Escriva A, Coulombier D, Giesecke J, Jansen A. 2012. Applicability of evidence-based practice in public health: risk assessment on Q fever under an ongoing outbreak. *Eurosurveillance*, 17 (3). <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V17N03/art20060.pdf>
- Jones RM, Hertwig S, Pitman J, Vipond R, Aspán A, Bölske G, McCaughey C, McKenna JP, van Rotterdam BJ, de Bruin A, Ruuls R, Buijs R, Roest HJ, Sawyer J. 2011. Interlaboratory comparison of real-time polymerase chain reaction methods to detect *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 23(1):108-11.
- Laurentie M, Delmas JM. 2010. Le profil d'exactitude, un outil pour décider et diagnostiquer la validité d'une méthode analytique. *EuroReference*, 3 :9-11. <http://www.afssa.fr/euroreference/Documents/ER03-Rech-ProfilExa.pdf>
- Norme NF XP-U47-600-1. Juin 2011. Exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale. *AFNOR*, 49 pp.
- Norme NF XP-U47-600-2. Juin 2011. Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en biologie vétérinaire. *AFNOR*, 40 pp.
- Rousset E, Sidi-Boumedine K, Thiéry R. 2010. Chapter 2.1.12. Q fever. *In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). 7th ed., O.I.E.*, 13 pp. <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Sidi-Boumedine K, Rousset E, Henning K, Ziller M, Niemczuck K, Roest H-J, Thiéry R. 2010. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-Fever in animals in the European Union. *EFSA Scientific report*, 48 pp. <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/48e.htm>
- Touratier A, De Cremoux R, Bronner A. 2012. Diagnostic différentiel des avortements infectieux chez les ruminants : état des lieux des actions conduites en France. *Bulletin GTV*, 63 :99-104.

Réalisation graphique et éditoriale

Directeur de la publication: Marc Mortureux

Rédacteur en chef: Paul Martin (France, Anses)

Rédacteur en chef adjoint: Barbara Gouget (France, Anses)

Comité de rédaction: Maria Laura Boschiroli (France, Anses),

Didier Calavas (France, Anses), Sabine Delannoy (France, Anses),
Bertrand Lombard (France, Anses), Jean-Yves Madec (France,
Anses), Elisabeth Repérant (France, Anses), Christian Tricard
(France, SCL), Eric Verdon (France, Anses)

Création/réalisation: Lucie Lelyon, Céline Leterq, Parimage
ISSN 2110-5294



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
27-31 avenue du général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr