



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 (sandriner.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 Cycler 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 thermocycleurs 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 log₁₀ pour la PCR et à 0,7 log₁₀ 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 log₁₀ 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 R² 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.

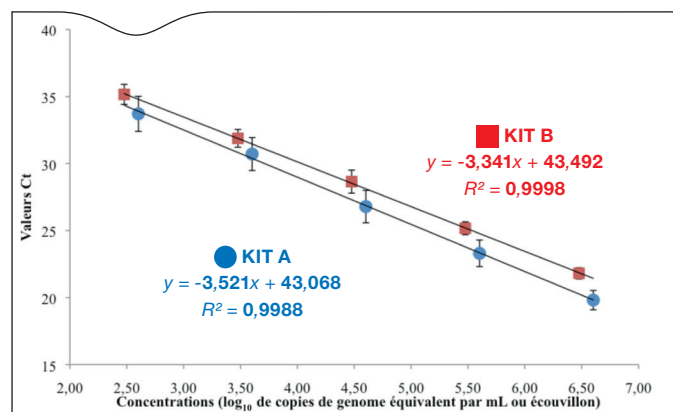


Figure 1. Droites d'étalonnages, entre les valeurs Ct et les concentrations introduites, obtenues avec les standards de quantification de concentration en ADN connus, fournis avec chacun des kits PCR.

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

Tableau 4. Concentrations mesurées (en log₁₀ / 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 $5xLQ_{Méthode}$ (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

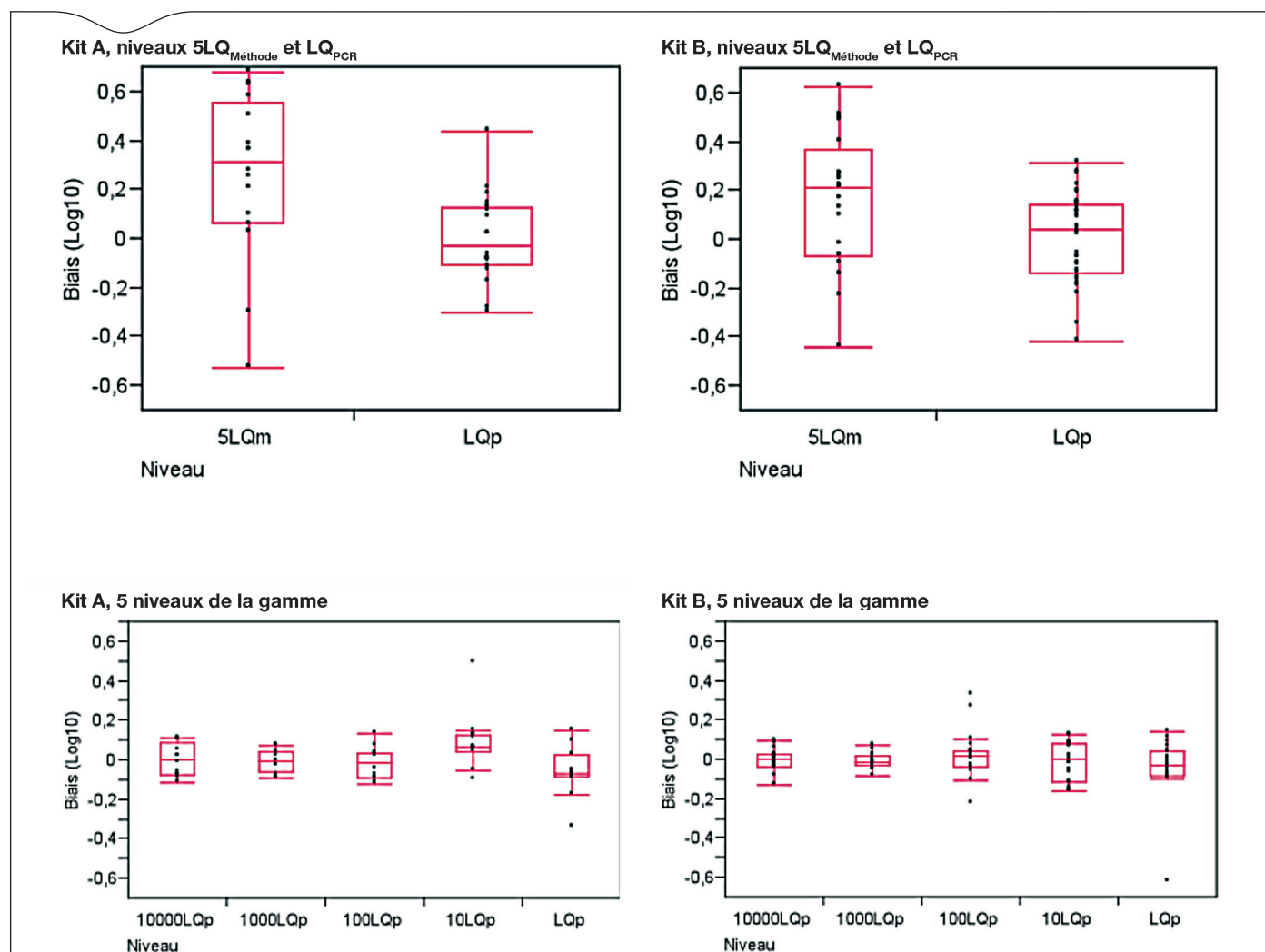


Figure 2. Représentation par Box-Plot de la justesse des concentrations mesurées (biais en \log_{10} / mL)



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