Journée nationale technique du 11 janvier 2013

Le protocole national de diagnostic différentiel des avortements chez les bovins

Le diagnostic de la fièvre Q: utilisation en priorité du diagnostic direct

Importance des outils calibrés

Élodie Rousset - chargée de recherches à l'Anses Sophia-Antipolis, responsable LNR-Fièvre Q

Fondements et démarche du diagnostic

- **En FQ, les animaux peuvent excréter des bactéries *Coxiella burnetii* :**
  - Sans manifestation clinique (portage asymptomatique ou infection subclinique)
  - Après un avortement FQ, y compris sur plusieurs mise-bas consécutives à terme (convalescence)

➲ **Identification des positifs fortement chargés**

-signant une Colonisation Extrême (Pathologique, Lésions caractéristiques)

-au Moment et au niveau du Site de l'avortement (mucus vaginal <8jours, placenta et non lait ou fèces)

Fondements et démarche du diagnostic

- **La PCR est une méthode très sensible dont les résultats sont à analyser par rapport à la signification clinique :**

➲ QUANTIFICATION (et non uniquement DETECTION)

➲ ➲ Etablissement d'un SEUIL d'une charge SIGNIFICATIVE

➲ ➲ ➲ **SPECIFICITE** 👍 de la méthode pour une APPLICATION PRECISE (Diagnostic clinique ≠ Dépistage)

=Diminuer le nombre de résultats incertains, *cf*. les multi-infections avec charges non significatives de *Coxiella* seront exclues.

Interprétation des résultats

Interprétation de la PCR Temps Réel quantitative

Seuil Positif Fort à :

10 000 *Coxiella* par écouvillon en analyse individuelle

1000 *Coxiella* par écouvillon en mélange strictement de 3

Expression du résultat	**aucun signal caractéristique***	**< LQ**	**[LQ – LQmax]**	**> LQmax**
Expression du résultat	ADN non détecté	ADN détecté en quantité inférieure à la limite de quantification ($LQ_{méthode}$ à indiquer par le laboratoire)	Nombre de bactéries par écouvillon	ADN détecté en quantité supérieure à la LQmax (LQmax à indiquer par le laboratoire)
Avis ou interprétation	**NEGATIF**	**POSITIF faible**	Si quantité comprise entre LQ et 10^4 : **POSITIF** Si quantité supérieure ou égale à 10^4 : **POSITIF FORT**	**POSITIF FORT**

Interprétation des résultats

➲ **La sérologie est un outil complémentaire :**

– Si Résultats insuffisants en PCR pour conclure (+ -)

– Uniquement sur plusieurs animaux (analyse de groupe)

Interprétation des résultats ELISA :

ELISA au seuil de positivité du fabriquant

Résultat positif = Séroprévalence ≥ 50%

soit au moins **5** / 10 brebis-chèvre ou au moins **3** / 6 vaches

Interprétation des résultats

Résultats PCR par rapport au seuil d'interprétation diagnostique

Seuil Positif Fort à : 10 000 *Coxiella* par écouvillon En analyse individuelle
1000 *Coxiella* par écouvillon En mélange de 3

La fièvre Q est la cause abortive

≥ 50%

Sérologies réalisées en cas où :
- un seul résultat PCRq est ≥ Seuil
- le nombre de PCR est de 1

La fièvre Q n'est pas la cause

≤ 50%

On conseille de surveiller l'évolution de la clinique à partir du 1er Av
(9 mois en bovin, 3 mois en petit-ru)

La fièvre Q n'est pas exclue

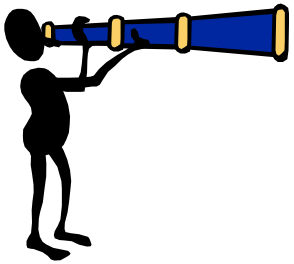
Importance des outils calibrés

pour assurer

la qualité et l'uniformité

des résultats

Intra- et inter- laboratoires



Le LNR est chargé de contribuer à améliorer et harmoniser les méthodes d'analyse

Pour la qualité et l'uniformité des résultats

- **Moyens**
  - **MRE:**

matériau de référence externe partagé (labo utilisateurs, fabricants/développeurs) pour la validation de méthodes, l'étalonnage des méthodes ou le contrôle qualité des résultats.

  - **EILA:**

essai inter-laboratoire d'aptitude permet d'évaluer la capacité de chaque laboratoire à obtenir les résultats corrects (méthode standardisée/validée, conditions de routine ″ISO17025″)

  - **Validation des méthodes d'analyse:**

détermination des performances pour une utilisation précise d'un mode opératoire standard figé.

Importance de disposer d'outils calibrés

⚠ Impacts :

– **Reproductibilité mauvaise** ➲ impossibilité de comparer les données (intra-labo dans le temps, inter-labo pour les données de surveillance)

>Ex. des lots hétérogènes d'un Kit: problème intra- inter-labo de standardisation de la méthode utilisée

>Ex. d'un mauvais/non étalonnage par rapport au MRE: problème de biais différent d'un labo à l'autre

>Ex. d'une dérive des performances initiales (cartes de contrôle requises pour surveillance)

Importance de disposer d'outils calibrés

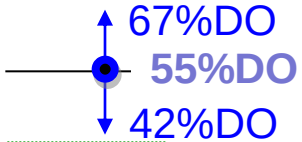
⚠ Impacts :

– **Seuil mal fixé ou zone de variabilité autour du seuil mal ou non estimée ➲** erreur de diagnostic dans la distinction des positifs

Ex. de calibration

Ex. ELISA

Seuil à 40%DO

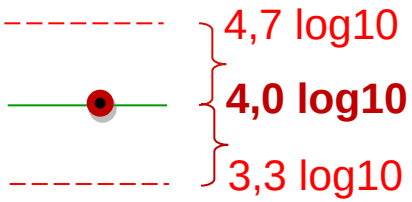


Douteux = positifs proches du seuil

Intervalle de confiance 95%
(contrôle de lot avec MRE)

Ex. PCR

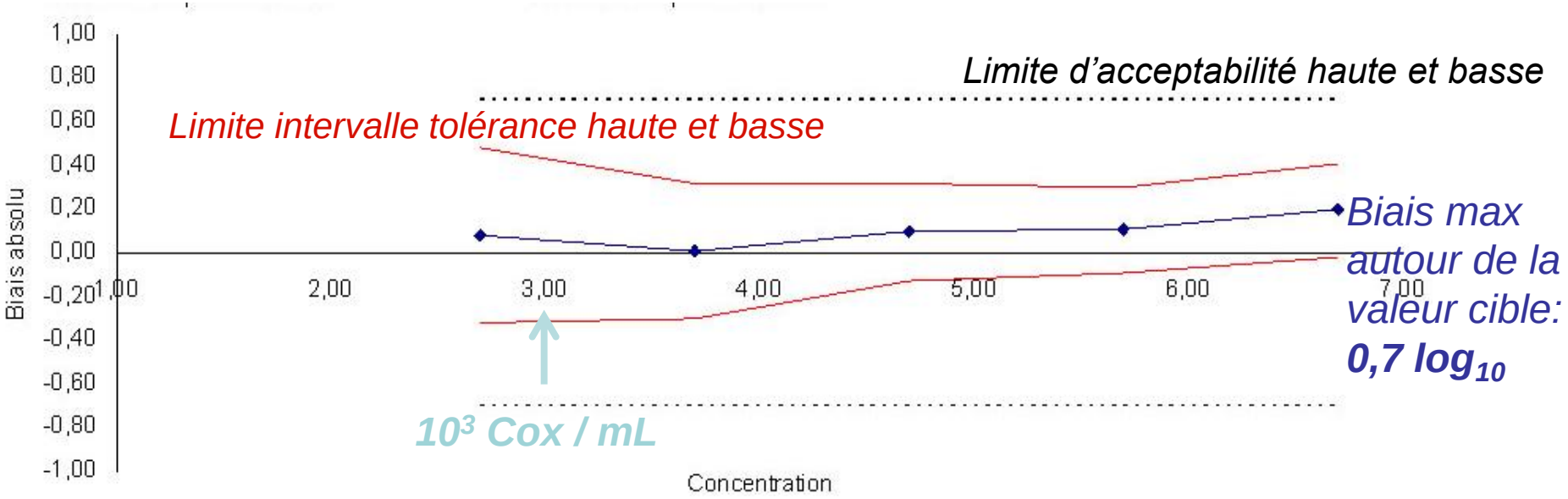
Seuil à 4 log10



Incertitude limitée à 0,7 log10 *vs* valeur attendue
(exigence validée et maintenue)

Ex. Détermination des performances PCR-TR-Q

- **Validation du profil d'exactitude:**



Validation du

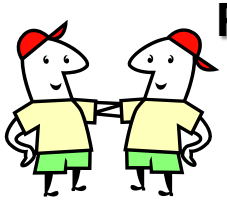
Profil d'exactitude de la méthode :

Fidélité (dispersions) + Justesse (biais)

Domaine de validation et LQ

Suivi Maintien des perf avec Carte De Contrôle sur Traceur méthode au seuil 10^4 Cox / mL

Récapitulatif des Actions pour Assurer la Fiabilité des Résultats



Juin 2011 — LNR
Analyse EILA Sérologie ELISA ->
Préparation sérum MRE calibrant (par kit ELISA)

Juil-Dec 2011 — LNR et fabricants
Définition d'un mode opératoire standard (**CC du gt DGAL avec représentants concernés par Diag-Surv.**)
Validation des méthodes (examens des dossiers, relectures des notices)

Février 2012 — LNR et labo
Adoption des méthodes (examen et attestations)

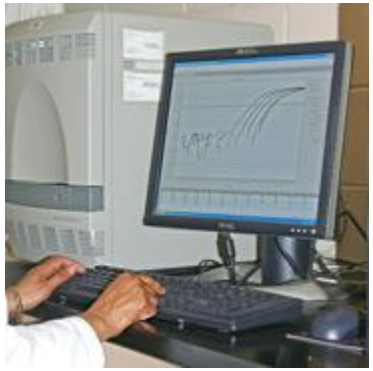
Mars 2012 — DGAl et LNR
Agrément des laboratoires pour le réseau pilote de surveillance de la FQ (Liste)

Sept. 2012 avec Mise en route-> Assurer le maintien des performances (CDC, EIL) — LNR, Labo et Fab. (GDS Francs, DGAL)

Juin 2011 — LNR
Projet PCR quantitative pour Diag
Préparation MREs pour PCR (ADN & Bact.)

Janvier 2012 — LNR (et fabricants)
Organisation de l'adoption des méthodes
Atelier de Formation des laboratoires (20 janvier)

Mars 2012 — LNR
Fourniture serum MRE calibrant (labo et fabricants)

Août 2012 — LNR et fabricants
Auto-contrôle des lots avec MRE en place (Certificat de lot incluant données de répéta et repro autour du seuil)

Merci de votre attention