



**HAL**  
open science

## Performances des méthodes diagnostiques de la fièvre Q chez les ruminants domestiques : état de l'art et intérêt de l'activité de référence du LNR

T. Lurier, Elsa Jourdain, Florence Ayrat, Aurélie Couesnon, Elodie Rousset

### ► To cite this version:

T. Lurier, Elsa Jourdain, Florence Ayrat, Aurélie Couesnon, Elodie Rousset. Performances des méthodes diagnostiques de la fièvre Q chez les ruminants domestiques : état de l'art et intérêt de l'activité de référence du LNR. Journées Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires, SNGTV, May 2022, Nantes, France. pp.615-632. hal-03771047v1

**HAL Id: hal-03771047**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03771047v1>**

Submitted on 7 Sep 2022 (v1), last revised 3 Oct 2022 (v2)

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

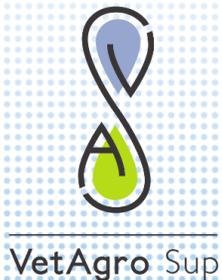


Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives | 4.0 International License

# Performances des méthodes diagnostiques de la fièvre Q chez les ruminants domestiques

## Etat de l'art et intérêt de l'activité de référence du LNR

Thibaut Lurier, Elsa Jourdain, Florence Ayrat, Aurélie Couesnon, Elodie Rousset



**sngtv**  
SOCIÉTÉ NATIONALE DES  
GROUPEMENTS TECHNIQUES  
VÉTÉRINAIRES



# Plan

- Contribution du LNR pour améliorer la fiabilité des résultats
  - Bases sur le processus de mise en place d'une méthode de laboratoire
  - Fiabilité sur l'interprétation des résultats en positifs et négatifs : ex. ELISA
  - Comparabilité des résultats : ex. PCR
- Bilan actualisé sur les méthodes et leurs performances
  - Performances des méthodes PCR
  - Performances des méthodes ELISA
  - A l'échelle de l'élevage?
- Application
  - Dans un contexte abortif
  - Dépistage à l'introduction



# Processus d'une mise en place d'une méthode d'analyse pour le diagnostic

## Cahier des charges (CdC)



Traduction des **BESOINS** en exigences techniques

**CdC pour PCRq FQ**  
Diagnostic d'avortements des ruminants

- ◆ Matrices biologiques : Mucus vaginal ou endocervical et placenta (3 copy)
  - ◆ Seuils : De  $10^4$  bact/mL (individuel) et de  $10^3$  (mélange de 3)
  - ◆ Quantification : Incluant les seuils et un maximum à  $10^6$  bact/mL
- Gamme de 5 points et limites de  $\pm 0,7 \log_{10}$  bact/mL

## Développement et caractérisation

Optimisations d'un protocole pour disposer d'un **protocole** « **STANDARD** » ou figé (Test « **calibré** »)

**Validation** des performances pour **CONNAITRE** les performances requises (Limite de détection, ...)

## Maintien des performances lors des analyses en routine

**En laboratoire**

Moyens « LNR-FQ »

- ◆ Matériaux de référence MR<sub>LNR</sub> et MR<sub>INTERNE</sub> dérivé
- ◆ Adoption ou vérifications initiales des performances
- ◆ Carte de contrôle (moniter chaque série d'analyses)

**A l'échelle**

**Inter-Laboratoire**

Moyens « LNR-FQ »

- ◆ EILA pour les laboratoires
- ◆ MR calibrant pour les fabricants

**Harmonisation analytique**

(plan de dépistage, surveillance des avortements, ...)



# Performances d'une méthode: ≠ paramètres pour définir la qualité des résultats

**Spécificité analytique**  
=  
Capacité à ne pas donner de résultat positif en absence de la cible  
(interférents matrice, réactions croisées, « variants » considérés)

**Spécificité diagnostique**  
=  
Capacité à donner un résultat négatif (par rapport à un seuil) chez les individus réellement négatifs

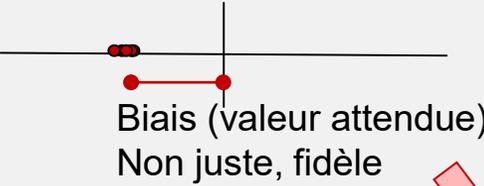
**Sensibilité diagnostique**  
=  
Capacité à donner un résultat positif (par rapport à un seuil) chez les individus réellement positifs

**Sensibilité analytique ou limite de détection**  
=  

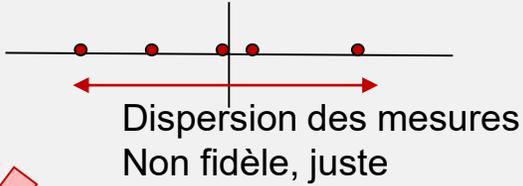
- Limite en dessous de laquelle la cible (dosée) est considérée non détectée
- LD à 95 % en PCR Santé Animale

**! Diversités de définitions (normes)**

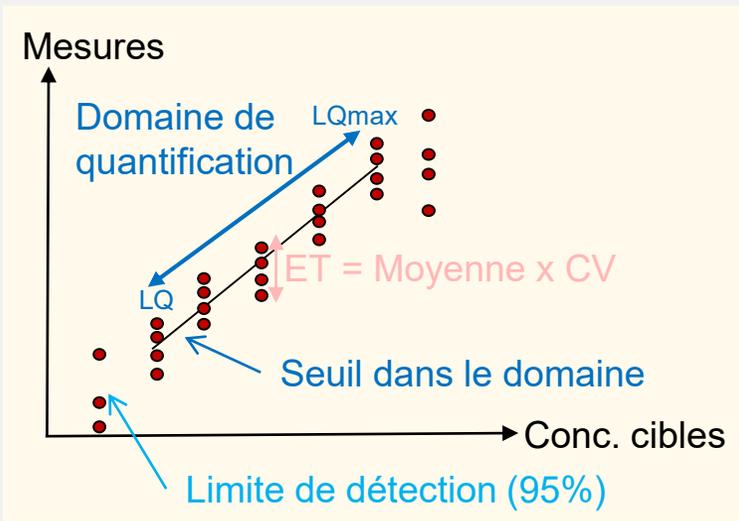
**Fidélité**  
(répétabilité, reproductibilité)



**Justesse**



**Exactitude**



# Exemple d'impact:

## Changement du statut **positif** et **néгатif** du résultat en ELISA

Pour **un même sérum** analysé avec **≠ lots d'un kit ELISA**, distribués au cours des années :

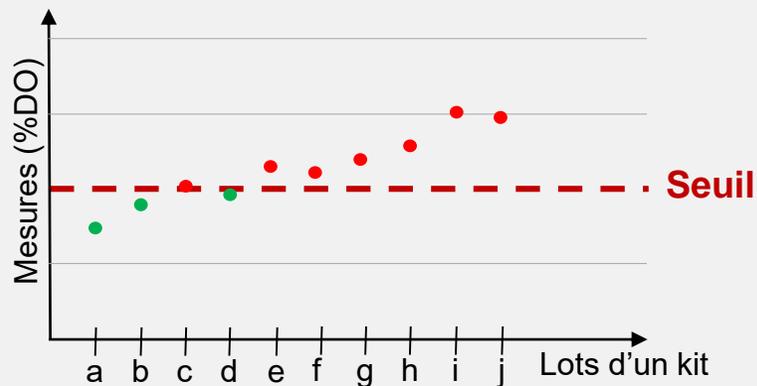
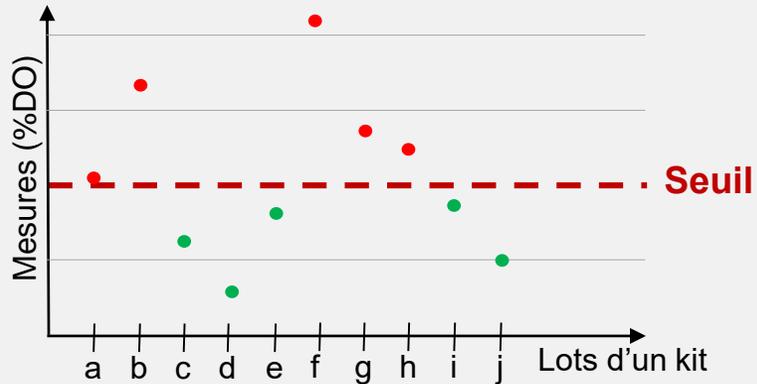
Une forte variabilité d'un lot à l'autre

On ne maîtrise pas la reproductibilité inter-lots

Une dérive progressive d'augmentation

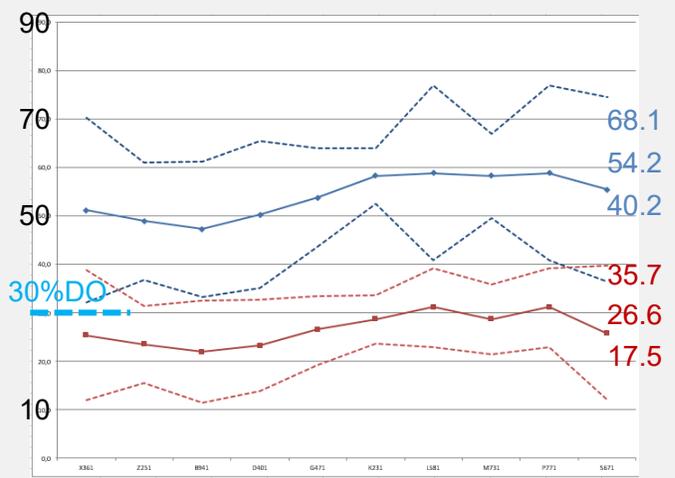
On ne maîtrise pas la justesse inter-lots

**=> Garantir l'exactitude du résultat**, interprété par rapport à un seuil, est important (même pour un ELISA « qualitatif »)

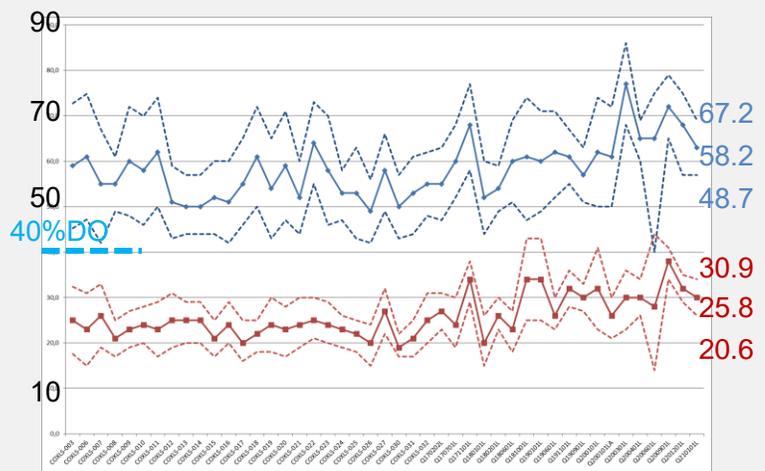


# Observation de la calibration des lots: Dans la zone critique du Seuil pour chaque kit ELISA

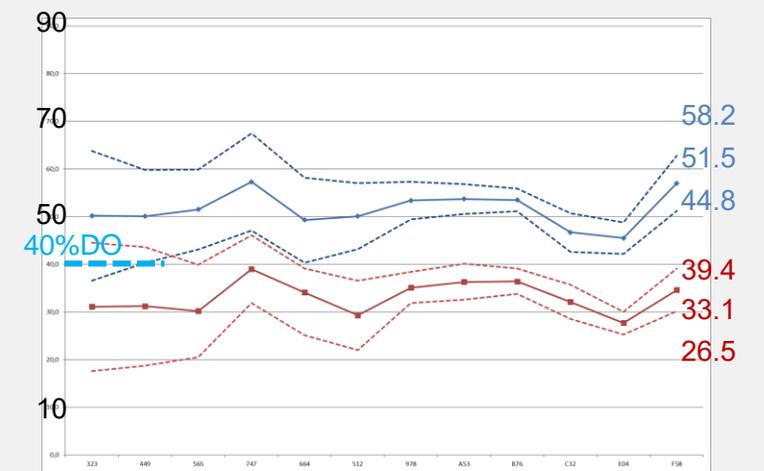
↪ Essais communs aux 3 kits et données reportées sur les certificats de lots (since 2012)



ELISA 1 (27 lots)  
Seuil à 30%DO  
MR à 1:1 & 1:2  
U = 14.0 & 9.1  
CV% = 11.4 & 10.4



ELISA 2 (45 lots)  
Seuil à 40%DO  
RM at 1:2 & 1:4  
U = 9.0 & 5.2  
CV% = 7.6 & 6.2



ELISA 3 (12 lots)  
Seuil à 40%DO  
RM at 1:4 & 1:8  
U = 6.7 & 6.3  
CV% = 7.2 & 10.8

+ 2 ET  
mRef>  
- 2 ET  
  
+ 2 ET  
mRef<  
- 2 ET

**Données fabricant**

↪ Définir les limites maximales et une valeur attendue



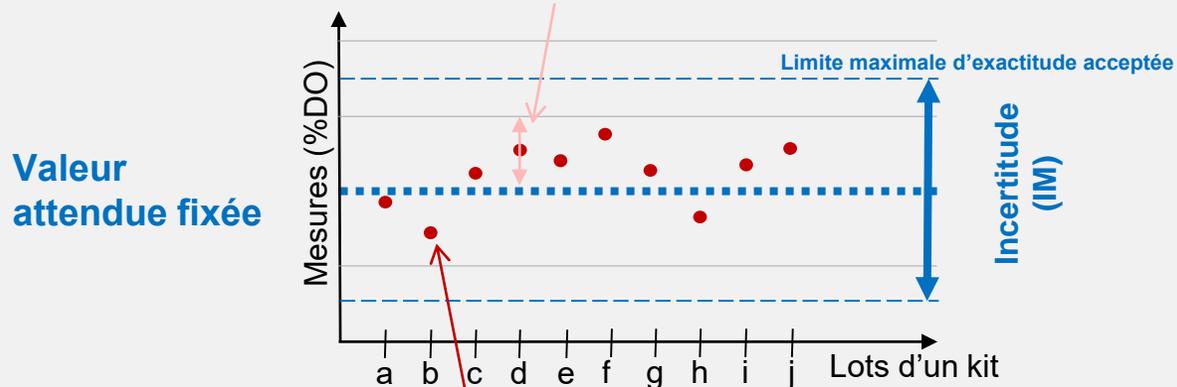
# Proposition de mieux calibrer les lots: Dans la zone critique du Seuil pour chaque kit ELISA

Dispositions supplémentaires pour l'acceptation d'un **nouveau lot** :

Analyse d'un **sérum « Calibrant – Proche du Seuil »**  
(30 répliques x 3 essais indépendants = 90 mesures)

*En cours  
avec les 3  
fabricants*

Dispersion vérifiée avec un CV% < 10% (Fidélité ou reproductibilité)

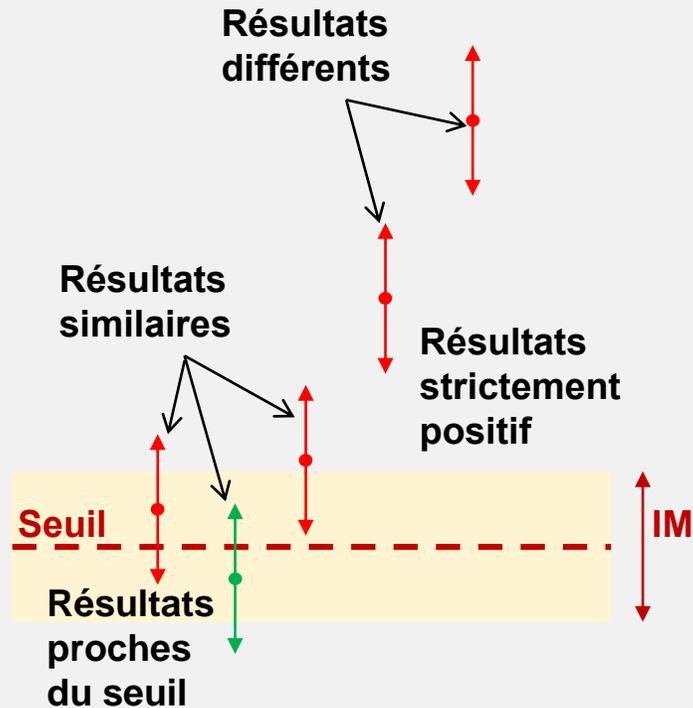


Moyenne des 90 mesures comprise  
entre les limites (Justesse)

**=> On vérifie les résultats  
(l'exactitude) :**  
La **moyenne** par rapport à une  
valeur attendue et des limites fixées  
Le **coefficient de variation (CV)** qui  
ne doit pas dépasser 10%



# Exemple d'impact: Difficulté à comparer des résultats en PCRq



Pour des échantillons analysés dans un laboratoire ou ≠ laboratoires :

Tel résultat est strictement positif / négatif ou proche du seuil ?

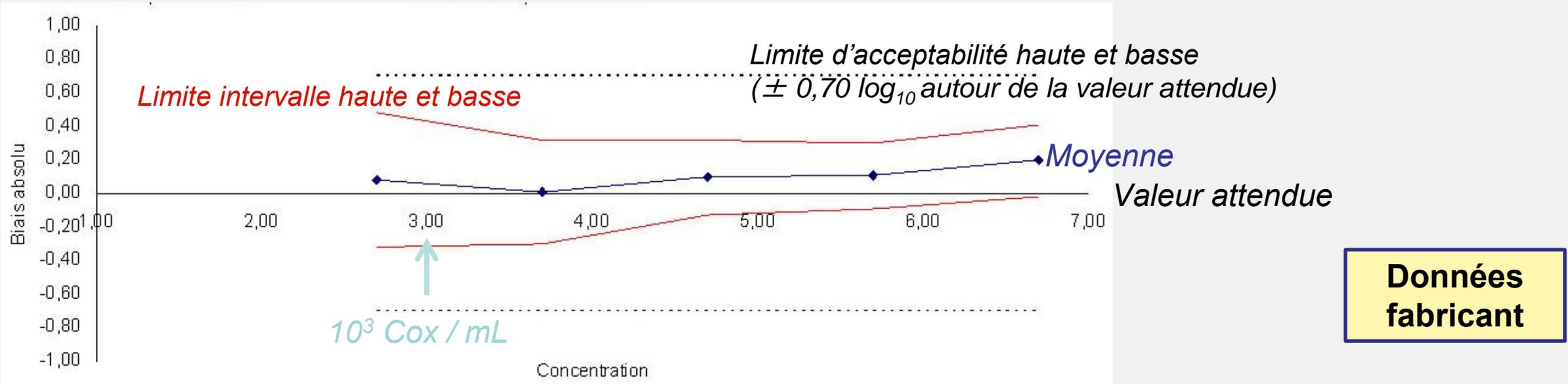
Deux concentrations sont différentes statistiquement ?

**=> Connaitre et exploiter l'incertitude de mesure (IM) au seuil et aux différents niveaux du domaine de quantification**



# Proposition de valider et éprouver en labo: Les méthodes PCR (Diagnostic au Seuil $10^4$ sur écouv. vaginal)

↪ Essais réalisés sur différents niveaux de cibles en matrice de suspensions d'écouv. vaginaux



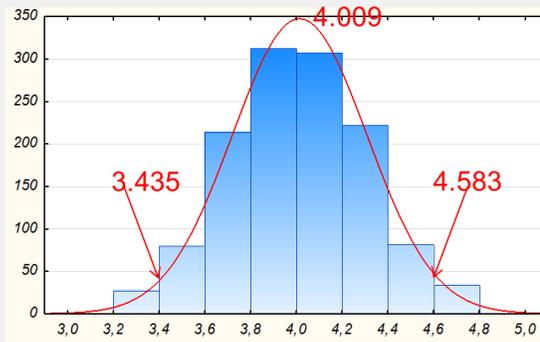
⇒ On connaît l'**exactitude des résultats**  
sur l'ensemble du domaine



# Proposition de valider et éprouver en labo: Les méthodes PCR (Diagnostic au Seuil $10^4$ sur écouv. vaginal)

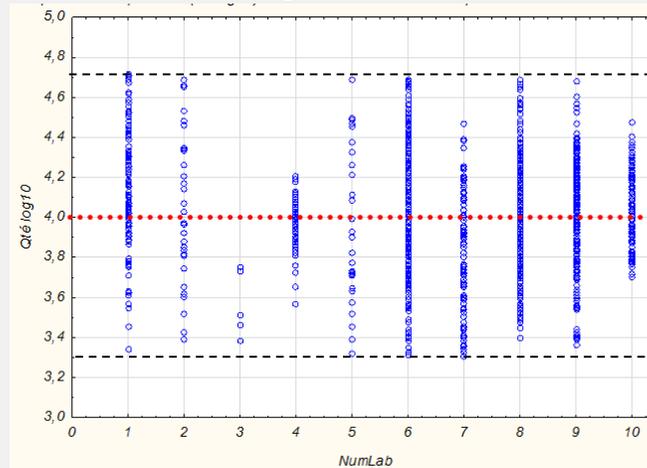
Vérification en continu dans 10 labos durant 3 années grâce aux Cartes de Contrôle : 1274 mesures du traceur (au seuil)

### Distribution globale



Moyenne : 4,009  $\log_{10}$  GE / ml  
IC95 : 3,435 – 4,583  
Incertitude U : 1,148 ( $\pm 0,574$ )

### Variabilité par laboratoire



Reproductibilité et justesse des mesures de quantification dans les 10 laboratoires

Limites maximales  $\pm 0,70 \log_{10}$  bact/mL  
+0,70 = 4,70  $\log_{10}$  (50 119 bact/mL)

Valeur attendue  
= 4,00  $\log_{10}$  (10 000 bact/mL)

-0,70 = 3,30  $\log_{10}$  (1 995 bact/mL)

↪ 23 méthodes équivalentes sur le marché (4 fabricants)

↪ + Faisabilité d'une PCR relative au seuil d'interprétation, moins couteuse



# Méthodes disponibles pour le diagnostic et leur performances

Mise en évidence directe/indirecte  
À l'échelle individuelle ou du troupeau?



# Diagnostic direct ou indirect?

- **Diagnostic direct** : Excrétion transitoire et/ou intermittente et/ou hétérogénéité dans organes dans le lait, les sécrétions vaginales et les fèces
  - Culture : obligatoirement dans un laboratoire P3, long, cher et peu sensible
  - Coloration sur empreinte (placenta/organe) peu sensible/ peu spécifique
  - **PCR** : rapide et sensible, mais uniquement pour les animaux excréteurs
- **Diagnostic indirect** : Mise en évidence d'anticorps dirigés contre *C. burnetii*
  - Tests de fixation du complément : peu sensible
  - Tests d'immunofluorescence (IFA) :
    - Méthode de référence en médecine humaine
    - Opérateurs et laboratoires dépendants
  - **Tests ELISA** :
    - Aussi performants que IFA
    - Plus facilement standardisables et automatisables que IFA



# Méthode et matrice utilisable en PCR

- qPCR > PCR
  - **Portage sain possible**
  - Seuil de décision clinique ( $>10^4$  eqGE/mL)
    - Seuil controversé chez les bovins
- 5 fabricants de kits qPCR commercialisés et validés par le LNR  
Fièvre Q (norme AFNOR U47-600 + critères LNR FQ)
- **Matrice validée** pour le diagnostic des avortements  
Mucus vaginal/endocervical, cotylédons (3/placenta)
- **Autres matrices utilisables**, mais non validées (= performances mal connues sur ces matrices)
  - contenues stomacal avorton, lait, fèces, poussière



# Performance des méthodes de qPCR

- Performance **analytique**
  - Seuil de détection de 200 à 300 eqGE/mL
  - Marge d'erreur en quantification = +/- 0,7 log
    - NB :  $10^4 = 10\ 000$  eqGE/mL  $\Leftrightarrow$  1 995 à 50 119

⚠ *Dégradation ADN et inhibition de PCR possible dans certaines matrices*

- Performances **diagnostiques**
  - Objectifs détection individu infecté :
    - **Sp proche de 100%**
    - **Se mal-connue** (probablement basse en dehors post-partum immédiat)
  - Objectifs imputation avortement ou trouble clinique
    - **Se et Sp mal-connues**
    - Variable en fonction des seuils de décision utilisés



# Sérologie des infections par *C. burnetii* par ELISA

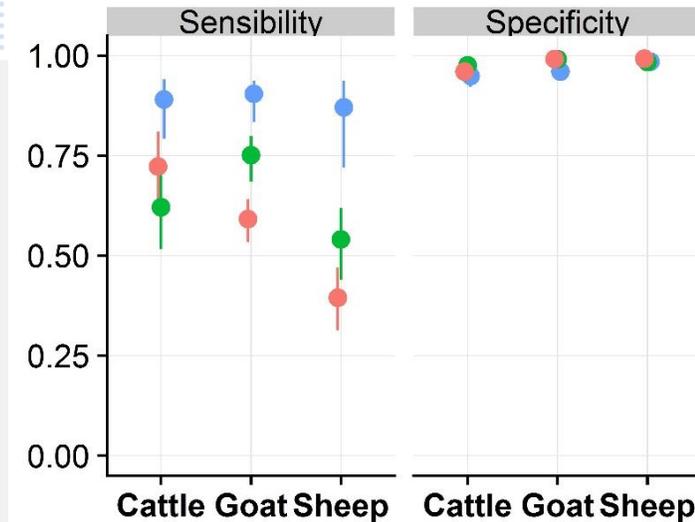
- 3 kits ELISA semi-quantitatifs commercialisés, mais **non harmonisés** en France
    - **Pas de méthode de référence parfaite**
    - Complexité pour définir une limite exigible de détection
    - **Seuil de positivité variable** en fonction des constructeurs
  - Utilisable sur Lait et Sérum
    - **Bonne corrélation qualitative entre résultats Lait/Sérum** à l'échelle individuelle (Paul et al. 2013, Joulié et al. 2015)
- ⚠ Les kits sont uniquement calibrés par le LNR FQ sur la matrice sérum.
- ⚠ Les RDO sont moins élevés dans le lait et les seuils de positivité sont différents entre les deux matrices



# Performance des méthodes ELISA

- Pour **détecter un individu séropositif** (Lurier et al. 2021)
  - Sensibilité : 62% [52-72] à 89% [78-94]
  - Spécificité : 95% [92-98] à 97,5% [96-99]

⚠ Pas de données sur les Se et Sp dans contexte abortif



- Pour détecter un **individu excréteur**?
  - Absence de lien entre séropositivité et infection en cours
    - Persistance d'AC au moins 2 ans après l'infection
  - Nombreux individus positifs en PCR et négatifs en sérologie (Guatteo 2007, Natale 2012)

⇒ La seule information apportée par la sérologie est que l'individu est, ou **a été infecté un jour**



# Diagnostic à l'échelle du troupeau

- Quels statuts recherchés?
  - **Non indemne**, à forte prévalence, fortement excrétrice?
- **PCR ou ELISA sur lait de tank** (*Guatteo et al. 2007, Taurel et al. 2012, Muskens et al. 2011*)
  - Corrélation modérée entre niveaux positivité lait de tank et prévalence troupeau
  - A priori **spécifique**, mais **peu sensible** pour les troupeaux à faible prévalence
- **PCR sur prélèvements environnementaux** (*Carrié et al. 2019, Abeykoon et al 2021*)
  - Piste intéressante, mais **interprétation épidémiologique complexe**
- **Plan de dépistage sérologique** (*Lurier et al. 2021*)
  - **Se et Sp connues** mais variables en fonction du kit, du nombre d'individus testés, de la règle de décision...



# Focus dans un contexte abortif

Imputer l'avortement ou la série abortive  
à *Coxiella burnetii*



# Pré-analytique : PCR

- Matrice
    - écouvillon vaginal/cervical /*contenu stomacal* / >> houppe cotylédon
  - Durée post-avortement => < 7j
    - Excrétion vaginale maximale au moment de la mise bas
    - Forte diminution dans les jours qui suivent!
-  => **Ne pas différer le prélèvement**
- Durée de conservation avant analyse

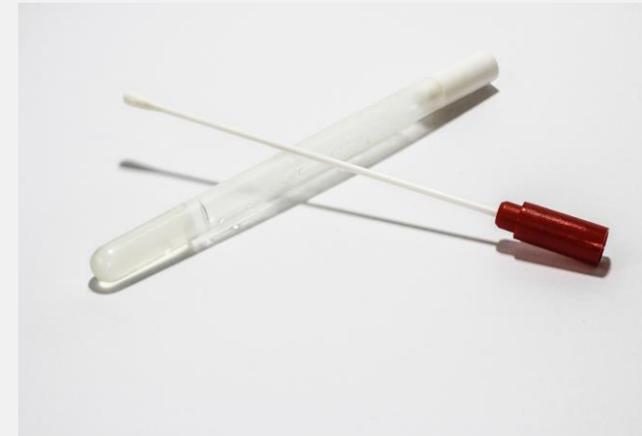


# Intérêt pratique de l'écouvillon cervical

- ⇒ recherche de plusieurs pathogènes sur le même prélèvement (PCR multiplex)
- ⇒ Sécurité biologique (transport/traitement labo)

## Mode opératoire :

- Type d'écouvillon : Sec, coton
- Protection contamination:
  - Nettoyer la vulve
  - Couper la tige de l'écouvillon pour protéger le bouchon
  - Protection de l'écouvillon avec la paume de la main
- Imprégner en frottant le col pendant 20-30s pour récupérer cellules



# Interprétation de la PCR

- Il existe des femelles excrétrices en dehors de l'avortement
  - Le seuil de  $10^4$  permet de garantir une Spécificité élevée mais diminue la Sensibilité diagnostic
  - PCR négative = test négatif
    - Se modérée => risque important de Faux négatifs
  - PCR positive = vache infectée
    - Avortement imputable à *C. burnetii* ?
- ⇒ Si un seul résultat : interprétation douteuse (donnée insuffisante)
- ⇒ Si plusieurs résultats concordants : conclusion réalisable



# Problématique de la sérologie

Diagnostic indirect par sérologie : plusieurs problèmes

- séroprévalence importante en France (environ 65% El.lait et 20% El.viande) (*Gache et al. 2017*)
- Persistance Ac marqueurs > 2 ans
- Tests Se moyenne pour diag individuel
  - obligation de prélever plusieurs animaux
  - recours à la cinétique



# Pré-analytique : Sérologie



**Sensibilité** des tests ELISA **modérée**

**Séroprévalences variables** dans les élevages séropositifs

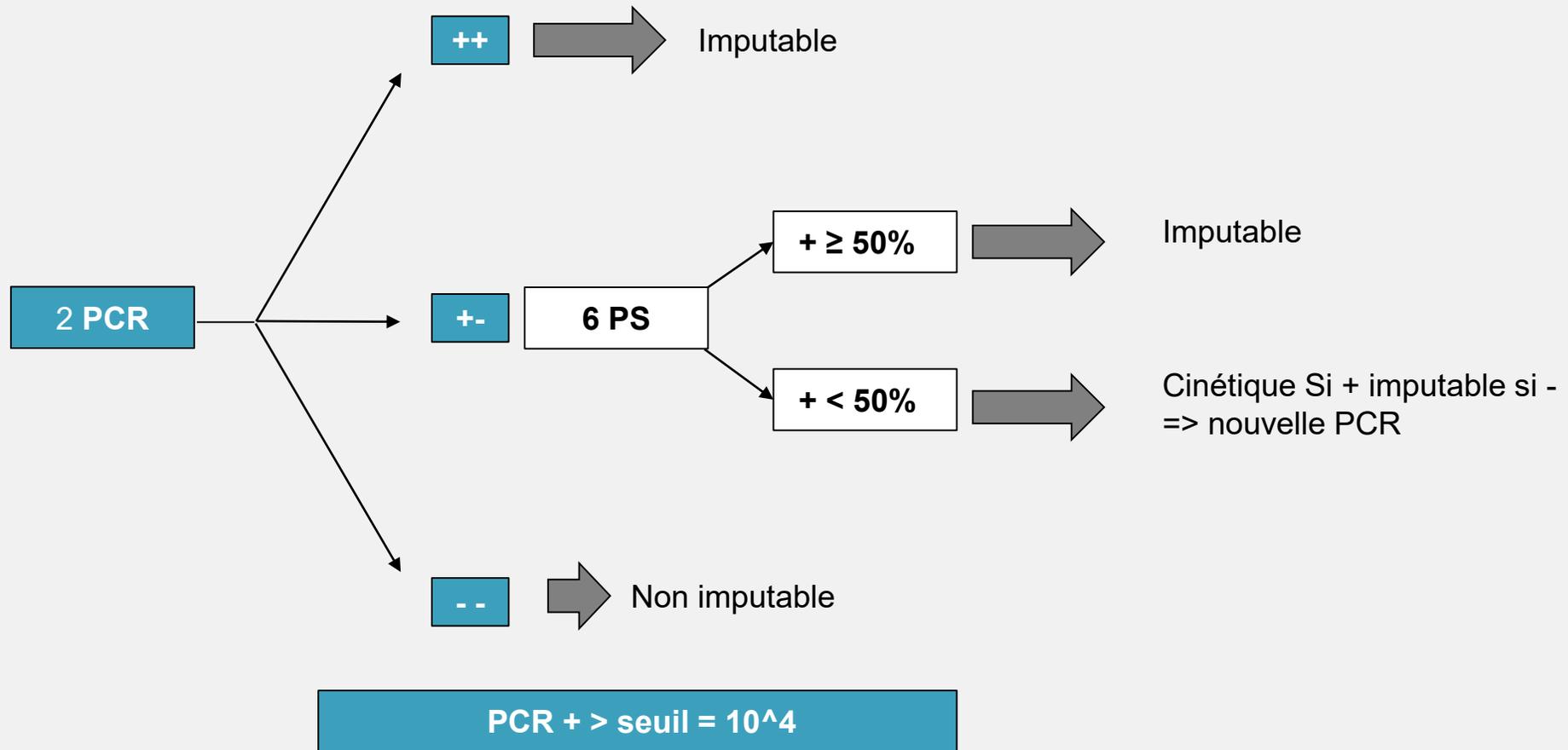
⇒ Maximisation de la probabilité de prélever des animaux préalablement infectés

⇒ **Prélever des animaux d'intérêt épidémiologiques :**

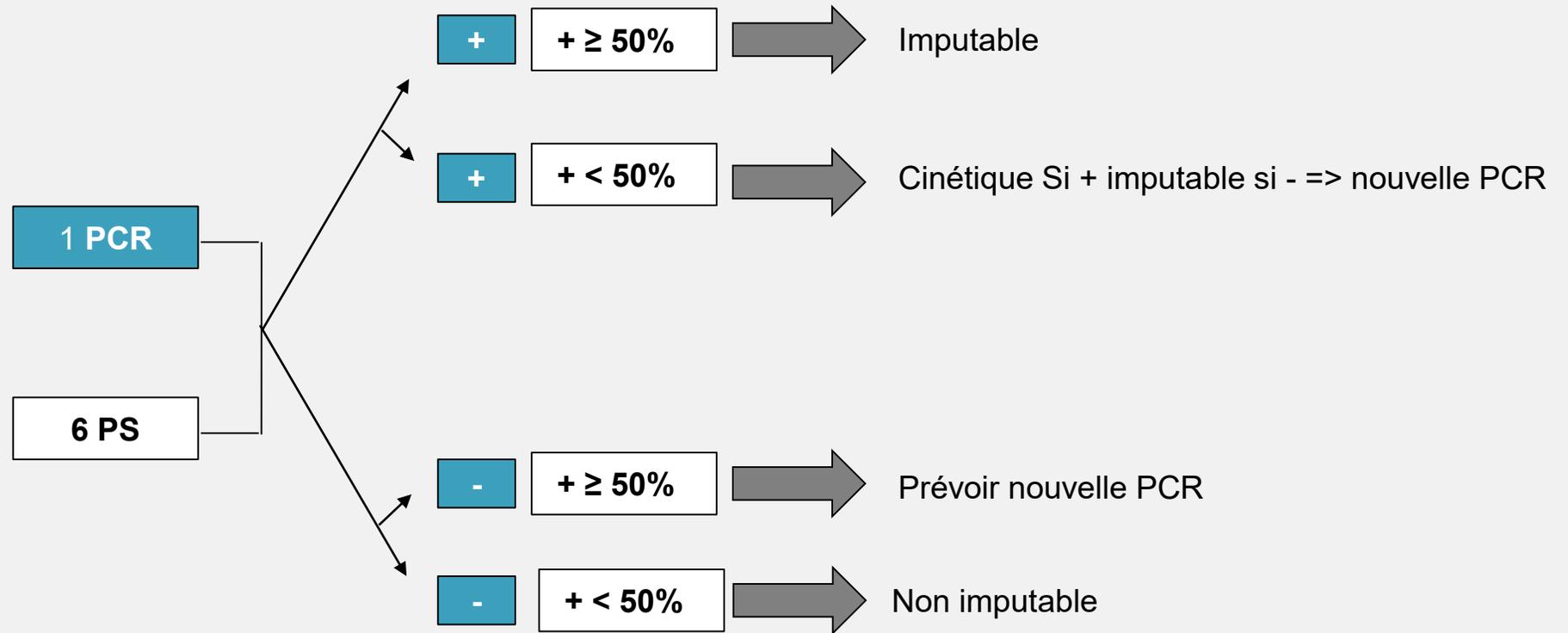
- Contact femelles avortées
- Problèmes repro compatibles



# Dispositif OSCAR => Recommandations de l'EFSA



# Dispositif OSCAR => Recommandations de l'EFSA



# Résultats OSCAR

≈ 1/3 des avortements investigués **non conclusifs** pour *C. burnetii* (non-respect du protocole, cinétique - sur PCR +, etc.)

*Bilan 2020 du dispositif Oscar => 802 séries abortives*

Imputabilité / pourcentage des dossiers				
Forte	Probable	Peu Probable	Non Conclusif	Non Conforme
4,9	5,4	51,5	<b>32,5</b>	5,7



# Focus avant introduction

Notion de risque à l'introduction  
Moyen de dépistage à l'échelle du troupeau



# Risques liés à l'introduction d'un bovin infecté par *C. burnetii*

- Introduction de *C. burnetii* dans un élevage indemne
  - Survenue d'une vague d'infection chez des animaux naïfs
- ⇒ **Risques probablement plus limités si l'élevage est non indemne** et qu'une majorité des animaux sont séropositifs

⚠ En France 65% des élevages laitiers et 20% des allaitants présentaient au moins un individu séropositif (*Gache et al. 2017*)

**Intérêt de contrôler le statut de l'acheteur et du vendeur**



# Limite des tests de dépistage utilisables à l'échelle individuelle

- **Sensibilité inconnue des méthodes PCR** en dehors du post-partum immédiat (et probablement faible)
- **Sensibilité modérée des kits ELISA** (+ interprétation d'un statut séropositif)

**Valeur prédictive négative  
basse**

 **Peu ou pas d'intérêt d'un dépistage de l'animal introduit**



# Echelle troupeau : Dépistage sur le lait de tank

## PCR sur le lait de tank

- Absence d'évaluation précise des Se et Sp à l'échelle du troupeau pour détecter un élevage "infecté"
- A priori (*Guatteo et al. 2007, Muskens et al. 2011*)
  - Sp élevée
  - Se élevée uniquement si la prévalence est supérieure à 10% de vaches excrétrices

**HVPP élevée**  
**HVPN variable**

## ELISA sur le lait de tank (*Taurel et al. 2012, Muskens et al. 2011*)

- Lien entre séroprévalence et RDO lait de tank similaire
- Quelques réserves sur l'interprétation d'une séropositivité sur lait de tank
  - Persistance des anticorps et ancienneté de l'infection

**HVPP**  
**modérée/haute**  
**HVPN variable**



# Echelle troupeau : Protocole sérologique pour évaluer statut sérologique

- ⚠ Les 3 kits ELISA commercialisés ne sont **pas harmonisés** et ont des Se et Sp variables...
- ⚠ **Spécificité imparfaite des kits ELISA** chez les bovins et risque de faux positifs si beaucoup d'individus sont testés
- ⇒ Un **compromis à trouver** entre tester peu et beaucoup d'individus
- ⇒ Des **résultats à interpréter** en fonction du test utilisé et du nombre d'individus testés



# Conclusion générale



# Conclusion

Performances analytiques bien caractérisées (*+calibration lots ELISA en cours*)

Performances **diagnostiques** mal connues

Avec :

- Des **sensibilités basses à modérées** à échelle individuelle
- Des **spécificités élevées à basse** en fonction des objectifs (infection vs imputation)
- ⇒ Importance de l'utilisation de **plans de dépistage consensuels** à **l'échelle du troupeau** (ex : OSCAR)
- ⇒ Dans tous les cas, nécessite une **interprétation des résultats** obtenus (*valeurs, prévalences, contexte*)



# Perspectives

- PCR
  - Caractérisation des performances diagnostiques de la PCR pour imputer un avortement à *C. burnetii*
- ELISA
  - Harmonisation des trois kits dans chaque espèce
    - Modification des seuils de positivité
    - Travaux sur les antigènes des Kits ELISA
- A l'échelle du troupeau
  - Caractérisation des performances des méthodes de diagnostic
    - ELISA et PCR sur lait de tank
    - PCR sur prélèvements environnementaux (poussière ou fécès)
  - Mise à disposition d'outils d'aide à l'interprétation des tests ELISA à l'échelle du troupeau



# Remerciement

- ▶ Ensemble des acteurs impliqués dans l'amélioration et le maintien des performances des tests
- ▶ Vétérinaires praticiens



