

HARMONISATION DES TECHNIQUES SEROLOGIQUES  
POUR LA RHINOTRACHEITE BOVINE INFECTIEUSE

M. FEDIDA\*, G. DANNACHER\*, M. COUDERT\*, Myriam PERRIN\*, B. PERRIN\*  
A. MOUSSA\*, J. ESPINASSE\*\* et M. VISO\*\*

\* Laboratoire National de Pathologie Bovine, Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, 69342 Lyon cédex 07

\*\* Chaire de Pathologie du Bétail, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94704 Maisons Alfort

RESUME :

L'harmonisation des techniques sérologiques pour la rhinotrachéite bovine infectieuse (= RBI = IBR) passe d'abord par une comparaison, dans les Laboratoires de référence, des résultats obtenus avec celles qui sont le plus utilisées, savoir la séro-neutralisation, l'hémagglutination passive et le test immuno-enzymatique ELISA : selon qu'il s'agit de caractériser ou de titrer les anticorps et selon la nature des animaux (infectés naturellement ou expérimentalement, vaccinés), on doit préconiser une technique ou une autre. La mise en place de chaînes d'analyses auprès des Laboratoires Départementaux des Services Vétérinaires et des Laboratoires privés a permis de préciser de nombreux points pratiques et méthodologiques.

INTRODUCTION :

Depuis une dizaine d'années, la sérologie de la rhinotrachéite bovine infectieuse (= RBI = IBR) est pratiquée par un nombre de plus en plus grand de laboratoires, nationaux, départementaux ou privés : de 3 à 4 au début, ce nombre est actuellement de l'ordre de 30 à 40. La mise en place dans certains départements d'un billet de garantie conventionnelle pour cette affection lors d'achat de bovins a donné un essor important à cette sérologie. C'est pourquoi à la technique initiale de séro-neutralisation en culture cellulaire ou SN, toujours considérée comme technique de référence mais difficilement décentralisable et peu performante pour l'examen de grands nombres de sérums, il a été nécessaire d'adjoindre d'autres techniques, non dépourvues, certes, de quelques inconvénients mais, par ailleurs, réalisables dans beaucoup de laboratoires, savoir l'hémagglutination passive ou HAP et la méthode immuno-enzymatique dite ELISA (= enzyme linked immunosorbent assay) : dès lors que, même si une seule technique est utilisée pour la sérologie d'une affection, se pose le problème de l'harmonisation des éléments de la réaction, a fortiori ce problème devient-il d'une particulière complexité lorsque plusieurs techniques sont mises en oeuvre et qu'aucun argument technique, scientifique ou économique ne permet d'exclure ou de préconiser l'une ou l'autre.

Néanmoins, un essai d'harmonisation des techniques a été tenté en ce domaine par le Laboratoire National de Pathologie Bovine (= LNPNB), à Lyon et la Chaire de Pathologie du Bétail de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, essai rendu d'autant

plus nécessaire qu'à la demande de la Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, une chaîne d'analyses -ou contrôle de qualité- a été mise en place auprès des laboratoires départementaux et privés pour cette affection, les Laboratoires de référence étant justement les deux Laboratoires précités.

## 1 LES ETAPES PRELIMINAIRES :

### 1.1 PREAMBULE :

Il a été mentionné qu'il existe trois techniques de détection des anticorps anti-RBI : en fait, la question est beaucoup plus complexe, car :

- d'une part, d'autres techniques ont été utilisées pour cette même recherche ; elles ont noms : immunofluorescence indirecte, fixation du complément, immunodiffusion en gélose ;
- et, d'autre part, pour deux des trois techniques (SN et Elisa) retenues, il existe plusieurs modalités, cependant que pour la troisième de nombreux petits détails de réalisation ont pu être modifiés :
  - pour la SN, la réaction peut être pratiquée en présence ou non de complément (= C') et, dans ce dernier cas, peuvent varier :
    - la nature des cellules,
    - les temps et température d'incubation,
    - la nature des supports (tubes ou microplaques) ;
  - pour l'ELISA, trois nécessaires ou "kits" sont commercialisés: Dynatech, Flow et Mériex et pour chacun des deux derniers, deux modalités de lecture sont possibles : à l'oeil nu ou au spectrophotomètre.

### 1.2 COMPARAISON DE TECHNIQUES :

Devant cette multiplicité des techniques ou modalités, il s'est vite avéré nécessaire de comparer les résultats obtenus d'abord avec deux techniques et ultérieurement de façon globale.

#### 1.21 COMPARAISON DE TECHNIQUES OU DE MODALITES 2 A 2 :

##### 1.211 SN et HAP :

De telles comparaisons ont été menées depuis plusieurs années par le LNPNB (1, 2), avec différentes modalités de séro-neutralisation : il en ressort que les titres sériques sont, selon le cas, plus élevés ou moins élevés que ceux obtenus en HAP. Néanmoins, si la comparaison porte sur le nombre de concordances (positifs dans les deux techniques et négatifs, également dans les deux techniques) on arrive au pourcentage fort satisfaisant de 95 p.100.

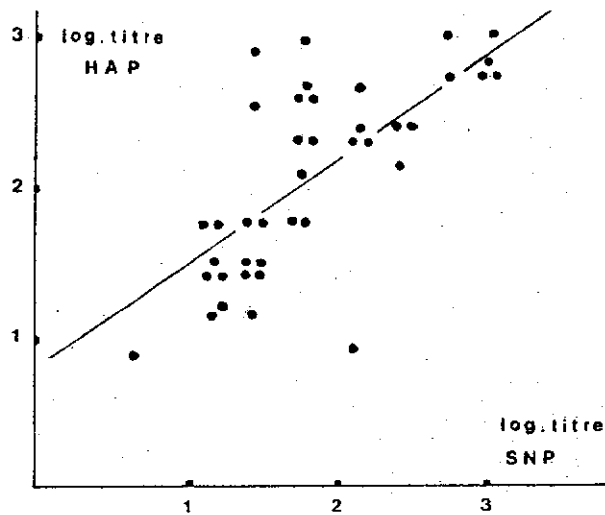


Figure 1 : Corrélation entre HAP et SNP24 (Séroneutralisation sur microplaques)

1.212 Comparaison de deux modalités de SN :

Par ailleurs, une comparaison entre deux modalités de séro-neutralisation -avec et sans complément- montre que l'adjonction de complément à la réaction a, pour effet, d'augmenter la sensibilité de la méthode qui détecte plus de positifs que celle sans complément (3).

1.213 Comparaison ELISA-HAP :

La technique de l'HAP a fait figure, a priori, plus par sa simplicité que pour des raisons scientifiques de technique de référence car elle a été la première à être décentralisée. Une modalité de test ELISA a alors été comparée à celle-ci (4), ce qui a donné les résultats suivants (figure 2):

- comme l'HAP, la technique ELISA est d'exécution rapide et permet de traiter un grand nombre de sérums à la fois ;
- la technique ELISA montre une sensibilité supérieure à celle de l'HAP : elle pourrait donc être utilisée lorsque l'HAP donne des réactions douteuses, sans, pour autant, résoudre le délicat problème du dépistage des porteurs latents.

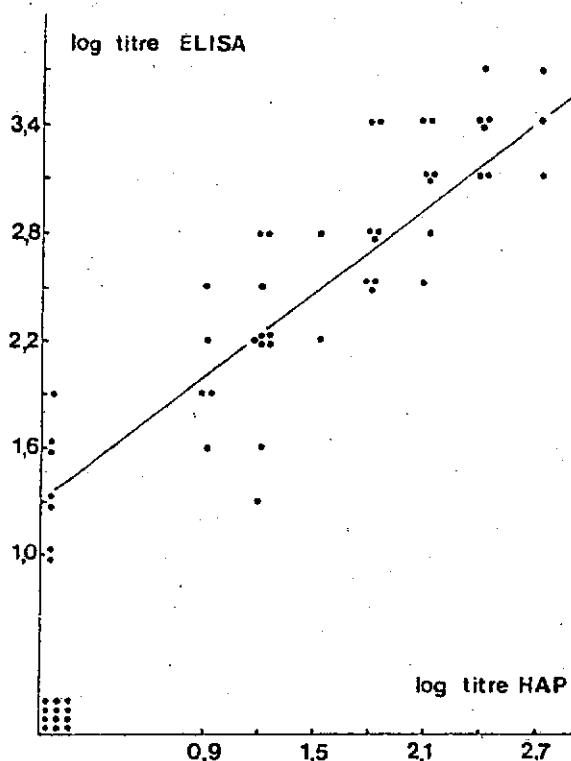


Figure 2 : Corrélation entre les titres obtenus par la méthode d'hémagglutination passive (HAP) et la méthode Elisa

1.214 Comparaison ELISA sur le sérum et ELISA sur le lait (d'un même animal) :

D'un essai, encore actuellement en cours, peuvent se dégager déjà plusieurs conclusions :

- le lait de vaches à sérologie positive en RBI contient également des anticorps décelables par la méthode ELISA : la corrélation est très bonne entre les titres sériques et ceux du lait (coefficient de corrélation  $r = 0,94 **$ ) ;
- la teneur du lait en anticorps est moins élevée que la teneur du sérum : à un titre sérique de 32 correspond un titre du lait de 4 environ, soit 8 fois moins (= 0,9 unité logarithmique).
- lorsqu'on opère sur des laits de mélange :
  - s'il se trouve parmi les vaches, un animal à sérologie fortement positive, on le détecte même si le lait est dilué dans 40 à 50 laits d'animaux négatifs ;
  - si, par contre, le titre sérique est faible -cas le plus fréquent- on ne détecte les anticorps dans le lait que dans la mesure où celui-ci n'est pas dilué au-delà de 4 ou 5 fois (= lait de petit mélange).

### 1.22 COMPARAISON DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES OU MODALITÉS ENTRE ELLES :

Les comparaisons précédentes réalisées en plusieurs temps ont été établies, chacune, sur un groupe particulier d'animaux : il est donc impossible, à partir de ces essais, de vouloir comparer entre eux les résultats obtenus avec des différentes techniques.

C'est pourquoi deux comparaisons faisant appel aux mêmes animaux ont été effectuées :

- l'une comportant quelque 200 sérums d'animaux appartenant à diverses catégories (infectés naturellement ou expérimentalement, vaccinés) : 8 modalités ou techniques sérologiques ont été mises en oeuvre ;
- l'autre, encore actuellement en cours, qui a permis de suivre l'évolution, dans le temps, des anticorps de différents types sur un groupe d'animaux infectés expérimentalement (expérimentation "DGRST").

#### 1.221 Comparaison de 8 techniques ou modalités sur 200 sérums :

Cette comparaison a été faite sur 200 bovins environ appartenant à 4 groupes d'animaux :

- bovins négatifs (pas de signes cliniques, pas d'excrétion de virus, sérologie négative);
- veaux soumis à une infection expérimentale (avec symptômes);
- bovins en contact naturel avec le virus (vaches Holstein): pas de signes cliniques;
- bovins vaccinés avec un vaccin inactivé à adjuvant huileux (vaccination effectuée 11 mois avant la prise de sang);

l'ensemble des sérums ayant été soumis simultanément à 8 techniques ou modalités :

- séroneutralisation en microplaques :
  - sans complément, ①
  - avec complément, ②
- l'hémagglutination passive ③
- technique ELISA :
  - avec le nécessaire (= "Kit") Dynatech, ④
  - avec le nécessaire Flow, (⑤ et ⑥),
  - avec le nécessaire IFFA-Mérieux, (⑦ et ⑧) chacun de ces "kits" faisant l'objet d'une lecture
    - à l'oeil nu (⑤ et ⑦),
    - au spectrophotomètre (⑥ et ⑧).

Deux types de résultats ont été ainsi obtenus :

- soit un résultat de type "positif" ou "négatif"
- soit un résultat quantitatif pour les techniques permettant un titrage sérologique.

De la comparaison des résultats qualitatifs (+ ou -), on peut tirer les conclusions suivantes avec leur signification statistique :

- Pourcentages des sérums trouvés positifs pour chacune des 8 techniques.

La technique Elisa Dynatech fournit des résultats significativement différents des autres ; il n'y a pas de différence significative entre les techniques Elisa Flow, Elisa Mérieux, HAP et SN sans complément ; la séro-neutralisation avec complément est plus sensible que le test Elisa Mérieux avec lecture au spectrophotomètre mais n'est pas plus sensible que les autres techniques (tableau I).

Tableau I : Classement des 8 modalités de recherche des anticorps de la R.B.I. par ordre décroissant de pourcentage de positivité pour l'ensemble des sérums étudiés.

Technique	Positifs	Négatifs	Pourcentages positifs
Elisa Dynatech lecture oeil	134	52	72,0
Séro-neutralisation avec complément	108	74	59,5
Elisa Flow lecture oeil	101	85	54,3
Mérieux lecture oeil	101	85	54,3
Elisa Flow lecture spectro	98	88	52,7
Séro-neutralisation sans complément	94	88	51,3
HAP	85	97	46,7
Mérieux lecture spectro	83	103	44,6

- Pourcentages de sérums trouvés positifs chez les bovins adultes non infectés.

La technique Elisa Dynatech fournit des résultats différents de ceux des 7 autres techniques et conduit à de nombreuses erreurs par excès ; les 7 autres techniques ne sont pas différentes les unes des autres.

Tableau II : Classement des 8 modalités de recherche des anticorps de la R.B.I. par ordre décroissant de pourcentage de positivité chez les bovins adultes non infectés (erreurs par excès ?).

Technique	Positifs	Négatifs	Pourcentages positifs
Elisa Dynatech	19	23	45,2
Séro-neutralisation avec complément	4	38	9,5
Elisa Flow lecture oeil	3	39	7,1
Séro-neutralisation sans complément	3	39	7,1
Elisa Flow lecture spectro	2	40	4,8
Elisa Mérieux lecture oeil	2	40	4,8
Elisa Mérieux lecture spectro	1	41	2,4
HAP	1	41	2,4

- pourcentages de sérums trouvés positifs chez les veaux infectés expérimentalement :

Le test Elisa Dynatech comme précédemment, conduit à des résultats différents de ceux des 7 autres techniques ; celles-ci ne sont pas différentes les unes des autres.

Tableau III : Classement des 8 modalités de recherche des anticorps de la RBI par ordre décroissant de pourcentage de positivité chez les veaux infectés expérimentalement.

Technique	Positifs	Négatifs	Pourcentages positifs
Elisa Dynatech	30	10	75,0
Séro-neutralisation avec complément	11	29	27,5
Elisa Mérieux lecture oeil	10	30	25,0
Elisa Flow lecture spectro	9	31	22,5
Elisa Flow lecture oeil	9	31	22,5
Séro-neutralisation sans complément	9	31	22,5
Elisa Mérieux lecture spectro	4	36	10,0
HAP	4	36	10,0

- pourcentages de sérums trouvés positifs chez les bovins adultes Holstein infectés.

Il n'y a aucune différence entre les 8 techniques.

Tableau IV : Pourcentages de réponses positives chez les bovins adultes Holstein infectés.

Technique	Positifs	Négatifs	Pourcentages positifs
Séro-neutralisation avec complément	45	0	100
Elisa Mérieux lecture oeil	45	0	100
Séro-neutralisation sans complément	44	1	97,8
Elisa Flow lecture oeil	44	1	97,8
Elisa Dynatech	44	1	97,8
HAP	44	1	97,8
Elisa Mérieux lecture spectro	44	1	97,8
Elisa Flow lecture spectro	44	1	97,8

- pourcentages de sérums trouvés positifs chez les bovins vaccinés depuis 11 mois.

Les résultats obtenus par séro-neutralisation avec complément sont significativement supérieurs à ceux que l'on obtient par la technique HAP.

Tableau V : Classement des 8 modalités de recherche des anticorps de la RBI par ordre décroissant de positivité chez des bovins, vaccinés depuis 11 mois.

Technique	Positifs	Négatifs	Pourcentages positifs
Séro-neutralisation avec complément	23	9	71,9
Elisa Flow lecture oeil	19	13	59,4
Elisa Mérieux lecture oeil	18	14	56,3
Elisa Flow lecture spectro	17	15	53,1
Elisa Dynatech	15	17	46,9
Séro-neutralisation sans complément	15	17	46,9
Elisa Mérieux lecture spectro	13	19	40,6
HAP	11	21	34,4



Si on fait le bilan global on constate que :

- 35 sérums ont été trouvés négatifs dans toutes les techniques,
- 67 sérums sont positifs dans toutes les techniques
- et 86 sont positifs ou négatifs selon la technique employée : il s'agit, en général, de sérums faiblement positifs, voire à la limite de positivité ; l'analyse de variance et le test F effectués sur ces résultats montrent que les variations dues aux sérums sont à la limite de la significativité alors que les variations dues aux techniques sont plus importantes.

En appliquant, aux données relatives aux titres sériques obtenus avec les 86 sérums trouvés "positifs" ou "négatifs" selon la technique, le test de corrélation de rang et en calculant le coefficient de corrélation de Kendall (rappelons que ce coefficient dont la valeur est comprise entre 0 et 1 permet de mesurer le degré de concordance entre plusieurs séries de mesures d'un échantillon, sa valeur étant d'autant plus proche de 1 que la concordance est grande), on peut noter qu'il existe :

- une concordance très forte entre les techniques :
  - Elisa Mérieux/Elisa Flow :  $c = 0,78$
  - séro-neutralisation avec complément/Elisa Flow :  $c = 0,74$
  - séro-neutralisation avec complément/séro-neutralisation sans complément :  $c = 0,67$
  - séro-neutralisation avec complément/Elisa Mérieux :  $c = 0,67$
- une concordance moins parfaite entre :
  - séro-neutralisation sans complément/Elisa Flow :  $c = 0,59$
  - Elisa Mérieux/HAP :  $c = 0,55$
  - séro-neutralisation sans complément/Elisa Mérieux :  $c = 0,55$
  - Elisa Flow/HAP :  $c = 0,54$
  - séro-neutralisation avec complément/HAP :  $c = 0,52$
  - séro-neutralisation sans complément/HAP :  $c = 0,48$

Les conclusions générales de cet essai comparatif (200 sérums environ, 8 techniques) peuvent être formulées ainsi :

- il paraît judicieux d'éliminer la technique Elisa Dynatech car :
  - le nombre de sérums trouvés positifs est anormalement élevé ;
  - la technique trouve positifs des sérums qui sont négatifs dans toutes les autres techniques ;
  - d'après les utilisateurs les résultats obtenus ne sont pas toujours reproductibles ;

- cette exclusion étant effectuée, toutes les techniques donnent des résultats identiques pour caractériser les anticorps, sauf s'il s'agit de détecter des anticorps chez des animaux vaccinés depuis longtemps : dans ce cas, les techniques HAP et SN sans complément sont moins sensibles que les autres ;
- pour le titrage des anticorps, trois éventualités se présentent :
  - sérums négatifs ou à la limite de positivité : les techniques Elisa sont très bien appropriées ;
  - sérums faiblement positifs : trois techniques sont les plus sensibles : Elisa Flow, Elisa Mérieux, SN avec complément ;
  - sérums fortement positifs : toutes les techniques sont utilisables,

#### 1.222 Expérimentation DGRST :

La Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (DGRST) a demandé à divers organismes d'étudier certaines méthodologies en vue d'harmoniser des techniques utilisables en épidémiologie animale : à cet effet, une expérimentation est actuellement menée conjointement par le LNPNB, la Chaire de Pathologie du Bétail de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (Pr ESPINASSE) et l'IFFA-Mérieux. Elle consiste à réaliser un suivi clinique, sérologique et virologique de bovins inoculés expérimentalement et recevant ou non des corticoïdes, ceci afin de suivre l'apparition des anticorps selon la technique sérologique appliquée et de déterminer, si possible, une "unité sérologique" hémagglutinante, séro-neutralisante, ou Elisa.

## 2 INFORMATIONS PRATIQUES :

### 2.1 LES SERUMS :

Tous les sérums sont obtenus sur bovins.

Les sérums positifs proviennent :

- soit d' animaux infectés naturellement,
- soit d' animaux inoculés expérimentalement,
- soit d' bovins vaccinés.

Quant aux animaux négatifs, ils doivent répondre à l'ensemble des critères suivants :

- ne présenter, au cours d'une période d'observation prolongée (plusieurs mois), aucun signe clinique pouvant être rapporté à la rhinotrachéite bovine infectieuse,

- avoir une sérologie négative, quelle que soit la technique mise en oeuvre,
- ne jamais excréter de virus, même après injections répétées de corticoïdes.

## 2.2 LE TRAITEMENT DES SERUMS :

Les sérums recueillis après centrifugation sont chauffés à 56°C. Ils ne subissent aucune filtration et aucun antiseptique ne leur est ajouté. Actuellement, les sérums ne sont pas lyophilisés mais conservés tels quels à -25°C. Pour l'expédition aux Laboratoires désirant participer aux chaînes d'analyses, les sérums sont maintenus à basse température grâce à de la glace carbonique.

Il est important de noter que les sérums ainsi envoyés ont toujours été des sérums non dilués, ceci afin qu'ils ressemblent le plus possible aux sérums obtenus sur le terrain.

## 2.3 CODAGE DES SERUMS :

Il a été procédé, lors de la première chaîne d'analyses, à un codage des sérums, chaque sérum étant affecté d'un numéro.

Ultérieurement, il est vraisemblable qu'un même sérum sera utilisé plusieurs fois -sous différents numéros- au cours d'une même chaîne d'analyses et il n'est pas impensable que pour ces sérums, il soit demandé un deuxième examen à effectuer 1 ou 2 semaines après la premier, ceci afin de calculer les variations :

- à l'intérieur d'un même titrage,
- d'un titrage à l'autre.

Quant à la question de savoir s'il est nécessaire de changer, pour un même sérum, le numéro d'un Laboratoire à l'autre, nous estimons que les risques d'erreur d'étiquetage sont supérieurs à ceux d'une communication, entre Laboratoires, du résultat d'examen : c'est pourquoi nous avons proscrit un tel procédé.

## 2.4 TECHNIQUES SEROLOGIQUES PROPOSEES :

Ainsi que cela a été mentionné plus haut, il ne paraît pas judicieux d'imposer l'utilisation d'une seule technique à l'ensemble des Laboratoires pratiquant la sérologie de la RBI.

En pratique, la séro-neutralisation reste l'apanage de Laboratoires -ils sont très peu nombreux- pratiquant, de façon courante, les cultures cellulaires. Le choix entre HAP et Elisa se fait sur des critères techniques ou économiques.

En tout état de cause, les deux techniques sont proposées aux Directeurs de Laboratoire après des stages organisés au LNPNB.

## 2.5 DIFFICULTES RENCONTREES :

S'il n'y a aucune difficulté à obtenir des sérums fortement positifs, il n'en va pas de même pour les sérums faiblement positifs et pour les sérums négatifs :

- les sérums faiblement positifs ne sont pas détectés par toutes les techniques : le seuil de positivité risque donc de varier selon la technique retenue ;
- quant aux sérums négatifs, ils doivent provenir d'animaux vérifiés simultanément sur trois plans, clinique, sérologique et virologique, d'où un travail lourd d'investigation.

## 2.6 AMELIORATIONS :

Lors des chaînes ultérieures d'analyses, il est vraisemblable que les résultats des Laboratoires seront plus groupés par rapport à la liste-type, car il aura été procédé à un choix encore plus rigoureux des sérums soumis à examen.

Par ailleurs, les modalités pratiques de conditionnement et d'expédition des sérums auront été modifiées, compte tenu de l'expérience acquise lors d'envoi de sérums en vue d'autres chaînes d'analyses.

## 3 METHODOLOGIE :

### 3.1 CHOIX DES SERUMS :

#### 3.11 NOMBRE DE SERUMS :

Lors de la première chaîne d'analyses, il a été envoyé à chaque Laboratoire 20 sérums parmi lesquels se trouvaient :

- 4 négatifs,
- 4 faiblement positifs,
- 4 moyennement positifs,
- 8 très positifs.

Ultérieurement seront joints à chaque envoi, un sérum négatif et un sérum faiblement positif : ces deux sérums seront marqués spécialement, décodés, et il sera indiqué avec quelle technique ce résultat a été obtenu et, pour le sérum positif, son titre.

#### 3.12 VOLUME :

Chaque flacon de sérum contient 1 ml, quantité convenable pour les examens à effectuer.

#### 3.13 SERUMS PARTICULIERS :

Lors de la première chaîne d'analyses, aucun sérum de ce type n'avait été introduit intentionnellement parmi les sérums à tester : néanmoins, grande fut la surprise,

au dépouillement des résultats, de constater que pour un sérum, la dispersion des titres obtenus par les différents Laboratoires couvrait la quasi-totalité de la gamme des valeurs : 16 à 1024 ; les sérums étant dilués de 2 en 2, c'est, en fait, 7 valeurs possibles qui ont été obtenues dans les Laboratoires, avec, en outre, un histogramme de répartition très aplati. Ce phénomène, initialement non prévisible, n'a reçu, à ce jour, aucune explication.

3.2 ANALYSE DES RESULTATS :

Lors de la première chaîne d'analyses mise en place en 1981, les Laboratoires qui s'y sont soumis ont utilisé l'une des trois techniques suivantes :

- la séro-neutralisation (SN),
- l'hémagglutination passive (HAP),
- le test ELISA,

certains ayant même réalisé les examens avec deux techniques.

Lors de réception des résultats au LNPP, il a été attribué un numéro à chaque Laboratoire, numéro différent du numéro minéralogique des départements : il est alors possible d'envoyer, à tous les participants à la chaîne d'analyses, tous les résultats, chaque Laboratoire ayant un numéro de code connu de lui seul.

3.21 TRAITEMENT DES RESULTATS :

Dans un premier temps on a dressé pour chacune des techniques employées, un tableau des résultats obtenus dans les différents Laboratoires : le tableau 6 est un extrait de celui établi pour l'HAP, les numéros 4, 6, 12, 17... 128 représentant les numéros des sérums, les Laboratoires étant codés par les nombres 1 à 14. On a alors :

- 1 colonne = 1 sérum
- 1 ligne = 1 Laboratoire

Laboratoire	Numéros des sérums									
	4	6	12	16	17	25		95	101	128
1	16	16	64	16	AC*	16		1024	1024	512
2	0	0	32	0	16	16		1024	512	128
	:	:	:	:	:	:		:	:	:
14	32	8	?	0	8	8		256	256	256

Tableau 6 : Extrait du tableau établi pour les Laboratoires pratiquant l'HAP

AC\* = sérum à pouvoir anticomplémentaire

La masse des résultats recueillis impose un recours au traitement statistique par l'informatique qui avait déjà été mis en oeuvre dans l'étude comparée des techniques (voir § 1.22). Dans le cadre de la prochaine chaîne d'analyses, un tel recours sera d'autant plus nécessaire qu'il est prévu que :

- des sérums figurent sous plusieurs numéros dans une même chaîne d'analyses,
  - il soit demandé deux examens à 1-2 semaines d'intervalle, ceci afin de pouvoir calculer les variations :
  - pour le premier cas : au cours d'un même titrage,
  - pour le second cas : d'un titrage à l'autre,  
= variations intra-laboratoire
- pendant que seront établies, avec ces éléments les variations :
- inter-laboratoires,
  - par rapport à la liste-type (voir § 3.22)

### 3.22 LISTE-TYPE ET LISTE DU LABORATOIRE DE REFERENCE :

Pour chaque sérum -et pour une technique donnée- deux valeurs peuvent servir d'éléments de référence :

- celle obtenue au Laboratoire de référence qui, par principe, doit fournir un résultat incontestable,
- celle de la "moyenne" : les valeurs obtenues par tous les Laboratoires ayant participé à la chaîne d'analyses, y compris le Laboratoire de référence et ce pour chaque sérum ; cette moyenne est obtenue directement à partir du tableau précédent.

Nous estimons que ce deuxième mode d'établissement de la valeur du titre à retenir pour un sérum est à préconiser. En effet, le Laboratoire de référence peut ne pas être infaillible : l'erreur n'est pas toujours du côté des "autres"... En outre, si on trace pour un sérum l'histogramme des fréquences des valeurs obtenues dans les différents laboratoires (figures 3 et 4 ), il est aisé de se rendre compte si la valeur du Laboratoire de référence (triangle noir arrondi) correspond à la valeur la plus fréquemment donnée par les Laboratoires participant à la chaîne d'analyses. Dans la totalité des cas, il en est ainsi : c'est une bonne confirmation du poids des résultats obtenus au Laboratoire de référence.

### 3.23 CRITERES D'APPRECIATION DES LABORATOIRES :

A partir de ces éléments il est possible d'établir une liste-type : pour ce faire, les sérums sont répartis en 3 groupes :

- les positifs,
- les négatifs,
- les valeurs à la limite de positivité.

Figure 3 : Histogramme des fréquences de titres pour le sérum 34.

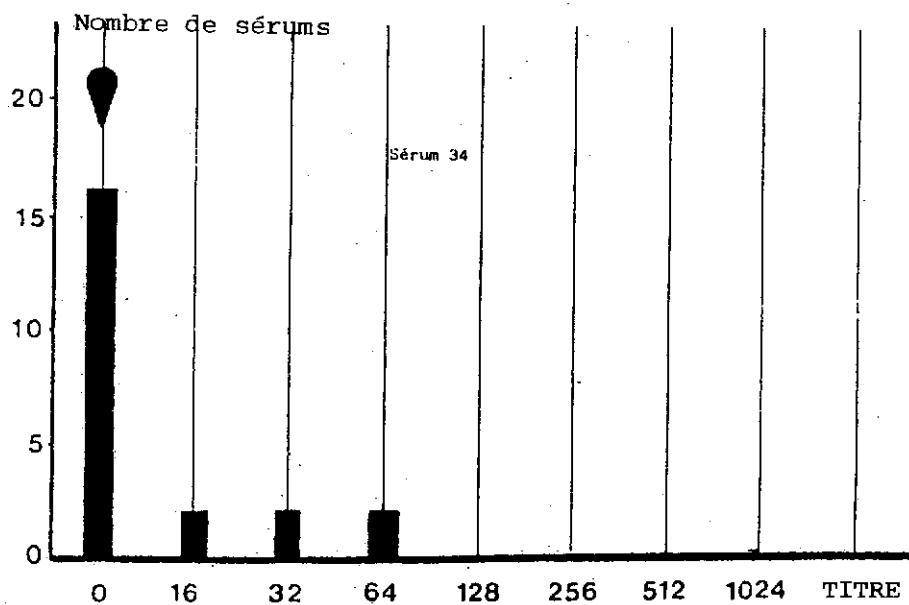
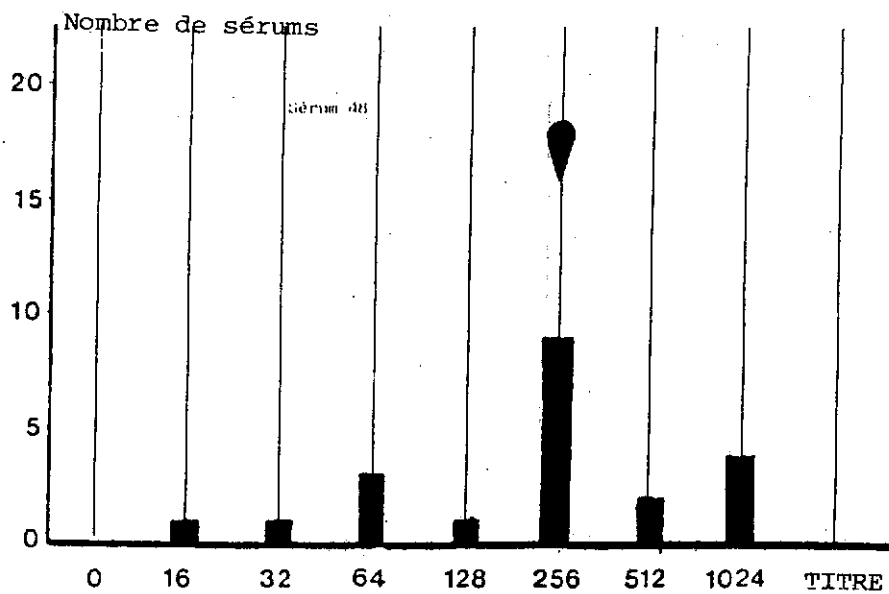


Figure 4 : Histogramme des fréquences de titres pour le sérum 48.



Un sérum sera classé positif, négatif ou limite selon le nombre de laboratoires l'ayant trouvé ainsi. On peut alors écrire schématiquement, avec P, N et L désignant le nombre de laboratoires ayant trouvé ce sérum respectivement positif, négatif, à la limite :

- sérum classé "positif", si  $P > N + L$
- sérum classé "négatif", si  $N > P + L$
- sérum classé "limite", si  $P \approx N + L$   
 $N = P + L$   
 $N \approx L \approx P$

A partir de la liste-type on peut ranger les Laboratoires en plusieurs catégories :

- 1 - les Laboratoires dont les résultats sont conformes, ou tout au moins très apparentés, à ceux de la liste-type : la tolérance peut être du type suivant :
  - un sérum moyennement positif (liste-type) trouvé faiblement positif ;
  - un sérum négatif trouvé faiblement positif ou à la limite ;
  - un sérum faiblement positif trouvé négatif ;
- 2 - les Laboratoires pour lesquels un résultat nettement aberrant a été trouvé, tel que, par exemple, un sérum très fortement positif trouvé négatif ou inversement un sérum négatif donné comme fortement positif : contact est pris entre le Laboratoire de référence et le Laboratoire et on s'aperçoit alors qu'il s'agit, le plus souvent, d'une erreur grossière de manipulation qui n'entache en rien la fiabilité qu'on peut accorder à ce Laboratoire ;
- 3 - les Laboratoires dont plusieurs résultats diffèrent nettement de la liste-type : cela signifie, en général, que ces laboratoires n'ont pas une maîtrise parfaite de la technique et il est important alors que le Laboratoire de référence étudie avec chacun d'eux toutes les étapes de la réalisation pratique de la réaction pour détecter l'origine des anomalies ;
- 4 - les Laboratoires qui ont fourni des résultats ininterprétables : cela s'est rencontré, en particulier, avec les Laboratoires pratiquant la séro-neutralisation ; dans un premier temps, ils ne peuvent être ni pénalisés ni considérés comme valables et il leur est proposé une seconde série de sérums pour qu'ils effectuent un nouveau contrôle : cette proposition est, en général, acceptée et aboutit à un résultat correct.

### 3.24 SEUIL DE POSITIVITE :

La détermination du seuil de positivité en matière de RBI pose quelques problèmes liés au fait qu'au moins trois techniques sérologiques sont mises en oeuvre, chacune ayant sa sensibilité propre. L'étude DGRST mentionnée plus haut (voir § 1.222 ) devrait apporter, en partie du moins, des éléments de réponse.



3.25 SERUM DE REFERENCE :

Un sérum de référence est en cours d'élaboration au LNPB. Son titre devra être situé légèrement au-dessus du seuil de positivité. La question de son emploi -pur ou dilué dans un sérum certainement négatif- devra être étudiée en détail.

3.26 COMMUNICATION DES RESULTATS AUX LABORATOIRES AYANT PARTICIPE A LA CHAINE D'ANALYSES :

Chaque Laboratoire participant à la chaîne d'analyses reçoit :

- 1 - le tableau global des résultats (voir tableau 6 ), il lui est indiqué alors son numéro de code,
- 2 - de ce tableau est extraite la ligne de résultats le concernant auxquels sont ajoutés les résultats de la liste-type et un commentaire personnalisé (voir tableaux 9 et 10),
- 3 - une représentation graphique de ces résultats sur laquelle les sérums sont rangés en valeur croissante (de négatif à 1024, pour l'HAP), selon la liste-type égale à la liste de référence : ce sont les carrés noirs ; les valeurs trouvées par le Laboratoire sont indiquées par des ronds et le trait épais entre le carré et le rond matérialise l'intensité de la différence entre les deux résultats ; si le résultat du Laboratoire est identique à celui du Laboratoire de référence, seul figure la carré noir (figure 5 )

CONCLUSION :

Le présent travail montre que l'harmonisation des techniques sérologiques en matière de rhinotrachéite bovine infectieuse fait l'objet de travaux déjà bien avancés. Néanmoins en raison de la multiplicité des techniques et modalités mises en oeuvre, de nombreux problèmes restent à résoudre, liés aux sensibilités différentes de ces techniques, à leur réalisation plus ou moins aisée et à leur coût très variable d'exécution. En outre, aucune des techniques utilisables ne permet de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés naturellement et surtout de dépister sans erreur des infectés inapparents. La mise en place des chaînes d'analyse est actuellement effective. Un nombre important de Laboratoires y participe : si, pour la première de ces chaînes, la technique la plus utilisée a été l'hémagglutination passive, il n'est pas interdit de penser qu'ultérieurement le nombre de Laboratoires ayant recours à la technique immunoenzymatique ELISA aille en augmentant. Si de nombreux problèmes pratiques et méthodologiques sont d'ores et déjà résolus, deux éléments demandent encore à trouver une solution, la détermination du seuil de positivité chez les animaux porteurs latents et inapparents et l'élaboration d'un sérum de référence.

LABORATOIRE : ██████████

Numéro des sérums	33	16	39	34	6	4	40	25	28	17	57	12	58	101	45
Résultats de la liste-type	N	N	N	N	FP	FP	FP	FP	FP	MP	MP	MP	TP	TP	TP
Vos résultats	0	4	0	0	16	16	16	32	32	16	32	32	64	128	128

N = négatif  
 FP = faiblement positif  
 MP = moyennement positif  
 TP = très positif

HAP : très bons résultats, notamment pour la détection des faiblement positifs.

CONCLUSION : peut figurer sur une liste de Laboratoires "agrés" en sérologie IBR.

TABLEAU 9 : Exemple d'un laboratoire ayant donné de "bons" résultats

LABORATOIRE : ██████████

Numéro des sérums	33	16	39	34	6	4	40	25	28	17	57	12	58	101	45
Résultats de la liste-type	N	N	N	N	FP	FP	FP	FP	FP	MP	MP	MP	TP	TP	TP
Vos résultats	16	8	16	64	0	8	8	0	0	0	16	0	32	1024	64

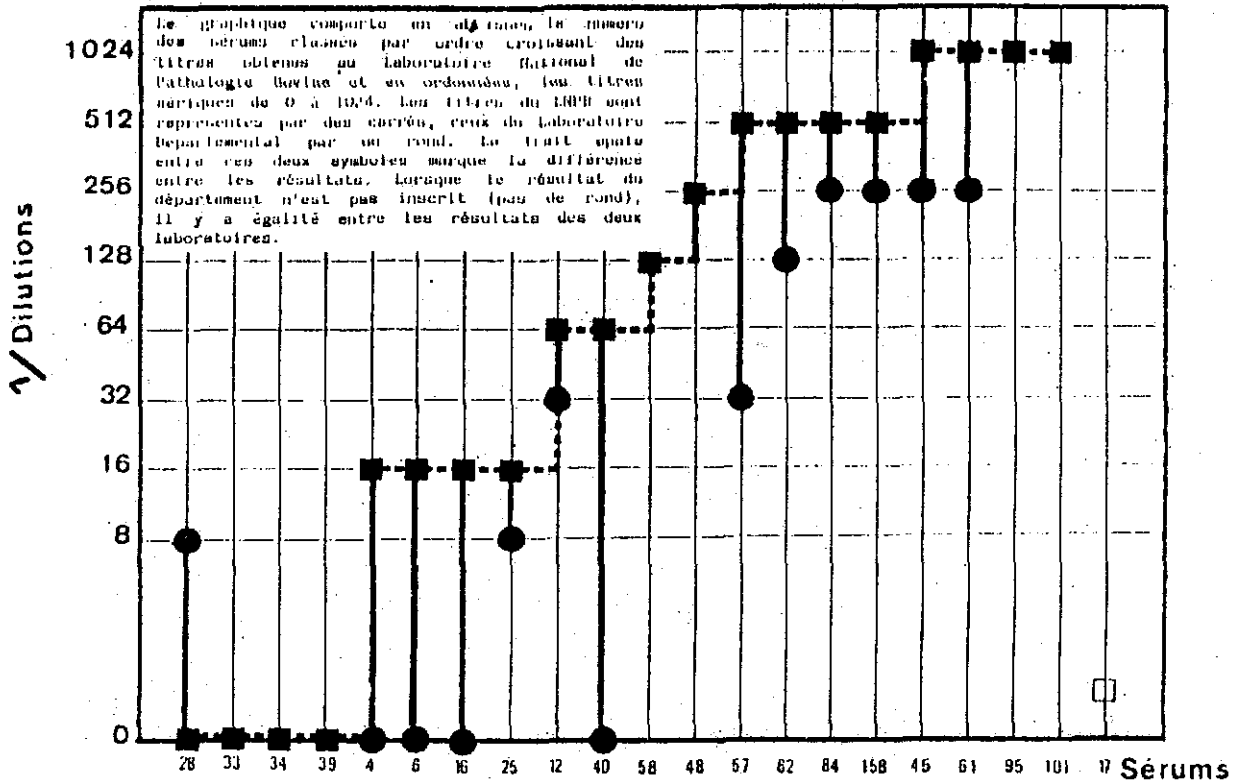
N = négatif  
 FP : faiblement positif  
 MP : moyennement positif  
 TP : très positif

HAP résultats assez aberrants, 3 négatifs sont trouvés positifs et aucun faiblement positif n'est détecté. (rappelons que le titre de 8 en HAP n'est pas considéré comme positif).

CONCLUSION : ne peut pas, pour le moment, figurer sur une liste de Laboratoires "agrés" en sérologie IBR. Voulez-vous tenter un nouvel essai ?

TABLEAU 10 : Exemple d'un laboratoire ayant fourni des résultats "aberrants".

Figure 5 : Résultats de la chaîne d'analyses par un laboratoire.



BIBLIOGRAPHIE :

- 1 - DANNACHER G., FEDIDA M., COUDERT M. et PEILLON Myriam : Enquête sérologique sur la présence de la rhinotrachéite bovine infectieuse (IBR-IPV) en France. Bull. Off. inter. Epiz., 1975, 84, 35-42.
- 2 - DANNACHER G., PERRIN Myriam et PERRIN B. : Utilisation d'une technique d'hémagglutination passive pour la détection des anticorps contre le virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse. Rec. Méd. vét., 1979, 155, (7-8), 633-637.
- 3 - MOUSSA A. : Titrage des anticorps contre le virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse par une microméthode de séroneutralisation en présence de complément (sous presse).
- 4 - SOLSONA M., PERRIN B., PERRIN Myriam et MOUSSA A. : Recherche des anticorps contre le virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse par la méthode ELISA. Bull. Acad. Vét. de France, 1980, 53, 215-225.

## DISCUSSION

Question. Cet exposé pose plus de questions qu'il n'apporte de réponses ! Quel genre de sérum de référence envisagez-vous de définir ? Comment choisir la meilleure technique ?

Réponse. IL faudra un sérum faiblement positif pour chacune des grandes techniques.

Q. Est-ce possible ?

R. Quand une technique aura été choisie, ce problème sera résolu. Parmi les trois techniques (SN, HAP, ELISA) il semble que l'on s'oriente vers le choix de la méthode Elisa. Ce choix élimine les autres méthodes. Le critère de sélection est celui de la spécificité.

Q. En Bretagne, tous ces problèmes sont bien connus car la sérologie IBR se fait depuis plusieurs années, dans le Finistère. Nous avons eu des résultats différents sur un même sérum, à quelques jours d'intervalle. Nous avons envisagé la méthode Elisa grâce à un financement du G.D.S. qui a permis d'engager une laborantine. Nous avons testé 500 sérums, en dehors du contrôle de qualité qui est venu plus tard. Les résultats ont été publiés dans le bulletin de la Société Vétérinaire Pratique. Les méthodes utilisées ont été HAP, SN/C', Elisa Flow et Elisa Mérieux (Elisa Dynatech est vraiment trop mauvais). HAP laisse passer 15 à 20 % des sérums positifs ! Par contre, SNC' et Elisa concordent à 99 %. Depuis janvier 1982, nous effectuons Elisa en routine (30.000 sérums) mais tous les problèmes ne sont pas résolus. Les lots de plaques sont de qualité variable (ce que les constructeurs finissent par admettre de temps en temps). L'utilisation systématique d'un témoin faiblement positif permet d'éviter cet écueil en recommandant les séries ratées. Une précaution de ce genre utilisée pour HAP aurait certainement permis d'éviter beaucoup d'erreurs car la méthode n'est pas mauvaise en soi et reste simple. Enfin, Elisa pose des problèmes d'équipement : si le lecteur automatique, bien que cher, est indispensable, l'achat des laveurs automatiques actuellement sur le marché ne s'impose absolument pas. Ils coutent cher et sont peu efficaces. Il existe des méthodes simples, économiques et meilleures.

L'avenir est certainement vers Elisa, mais il faudra plus d'expérience pour mieux contrôler ces paramètres.

Q. Diluez-vous les sérums ?

R. Non, jamais, pour nous rapprocher le plus des conditions de terrain. Les sérums négatifs sont ceux récoltés sans manipulation.

Q. Il faudra bien venir à la recherche d'un seuil de positivité en diluant un sérum positif. Dans notre Service, ce fut notre point de départ : obtenir une loi dose-effet en diluant un sérum positif dans un sérum négatif et en répétant plusieurs fois l'expérience. C'est fondamental. On ne peut rien faire sans.

- R. Bien sûr. C'est la prochaine étape.
- Q. La situation est moins confuse que Mr FEDIDA ne l'a exposée. Dans le Morbihan, nous traitons 30.000 sérums par an depuis 4 ans. En HAP le taux de positivité est passé de 4 % à 0,2 % pendant ce délai. La méthode est peu coûteuse. En fait, voici comment nous procédons : tous les sérums sont passés en HAP. Ceux qui sont positifs sont faits en Elisa et ceux qui restent douteux sont refaits en SNC'.
- Q. Je confirme ce que vient de dire ROSE. Dans l'Ille-et-Vilaine, nous utilisons HAP depuis plusieurs années et les cas cliniques sont beaucoup plus rares qu'il y a 4 ans. Cette technique a certainement contribué à abaisser le taux de cette maladie.
- Q. Bien sûr, la plupart des sérums sont négatifs ou de réponse aisée. Mais il reste toujours quelques cas litigieux. Comment les traiter ? Et comment expliquer ces variations de réponses entre deux laboratoires sur un même sérum ? il y a aussi le problème d'investissement. Faire de l'Elisa juste pour contrôler des sérums positifs en HAP, ce n'est pas rentable.
- Q. A Saint-Brieuc, sur 1.000 sérums (génisses pleines commercialisées) traités en parallèle par Elisa et HAP, HAP a donné 3 % de sérums positifs, Elisa, 23 % !
- Q. Aucune méthode n'est fiable à 100 %. Rappelons-nous que nous avons débuté les prophylaxies avec des méthodes encore moins fiables (tuberculine !). Il faut définir une méthode pour l'IBR et s'y tenir.
- Q. Il faut une méthode qui permette déjà de séparer les sérums positifs des négatifs. En cas de sérums douteux, on utilise une deuxième méthode pour répondre. Si le critère le plus important est la sensibilité, il faut commencer par un "screening" avec Elisa ou SN.
- Q. Que choisir ? C'est difficile. Je n'ai pas de réponse. Nous utilisons la S.N. à Rennes. Cette méthode n'est pas décentralisable facilement.
- Q. N'oublions pas que les G.D.S. sont les payeurs. Le pouvoir de décision leur appartient.
- Q. Quelle est votre prochaine étape ?
- R. Faire un sérum étalon.