

MÉTHODOLOGIE DE L'HARMONISATION DE LA SÉROLOGIE DE LA MALADIE D'AUJESZKY

B. TOMA et J.J. BENET

Ministère de l'Agriculture, Ecole Nationale Vétérinaire,
94704 Maisons-Alfort France

RÉSUMÉ

Cet article présente la méthodologie utilisée au cours des 5 études en commun entre laboratoires français ou de pays européens ayant participé de 1979 à 1982 à la mise au point d'un sérum de référence pour le diagnostic de la maladie d'Aujeszky par séroneutralisation. Ce sérum de référence préparé en France vient d'être adopté comme sérum de référence par la C.E.E.

Par ailleurs, différentes réflexions sur la méthodologie et les perspectives dans ce domaine sont évoquées.

Le point de départ des études d'harmonisation de la sérologie de la maladie d'Aujeszky (M.A.) en France a été constitué par des critiques faites au cours d'une réunion de la Société de Médecine vétérinaire porcine (30 janvier 1979) consacrée à une présentation générale du diagnostic sérologique des maladies du porc (4). Ces critiques portaient sur les divergences de résultats fournis par différents laboratoires recevant les mêmes sérums. Il a été alors décidé, sous l'autorité de l'Inspection Générale des laboratoires des Services vétérinaires, de commencer des études en commun de sérums, à l'aveugle, par les laboratoires effectuant le diagnostic sérologique de 3 maladies porcines : la maladie d'Aujeszky, la gastro-entérite transmissible et la peste porcine classique.

L'organisation de l'étude de la première a été confiée au Laboratoire des maladies contagieuses de l'Ecole vétérinaire d'Alfort, de la deuxième, à la Station de pathologie porcine de Ploufragan et de la troisième au Laboratoire central de recherches d'Alfort.

La Chaire des maladies contagieuses de l'Ecole vétérinaire d'Alfort disposait déjà d'une certaine expérience dans un tel domaine

puisqu'elle avait initié, quelques années auparavant (2) (3), une étude en commun analogue, au plan européen, pour le diagnostic sérologique de l'anémie infectieuse des Equidés par immunodiffusion en gélose et était parvenue, avec deux autres centres internationaux de référence (Ames, Etats-Unis et Tokyo, Japon) à définir un seuil de positivité pour cette technique et à préparer puis diffuser un sérum de référence international, lyophilisé, d'un titre en anticorps précipitants ajusté à ce seuil (1).

Dans les lignes qui suivent seront exposées les modalités de réalisation de l'harmonisation du diagnostic sérologique de la M.A. ainsi que des réflexions sur la méthodologie et les perspectives dans ce domaine.

I - METHODOLOGIE UTILISEE ET RESULTATS OBTENUS

De 1979 à 1982, cinq études en commun ont été réalisées, entre laboratoires français d'abord, puis avec la participation de laboratoires de divers pays européens.

La méthodologie retenue a été totalement intuitive et subjective ; elle est en passe de devenir objective et statistiquement confortée.

L'objectif de départ était double :

tenter d'harmoniser la technique de séroneutralisation de la M.A. ; pour ce faire, après un recensement des diverses techniques utilisées, il convenait de proposer d'en retenir une, le choix devant prendre en considération à la fois la commodité (en éliminant les techniques trop compliquées, trop sophistiquées, se prêtant mal à un diagnostic de routine dans un laboratoire non hautement spécialisé) et la sensibilité (suffisante pour limiter les erreurs par défaut, mais telle que permettant d'exclure les erreurs par excès) ;

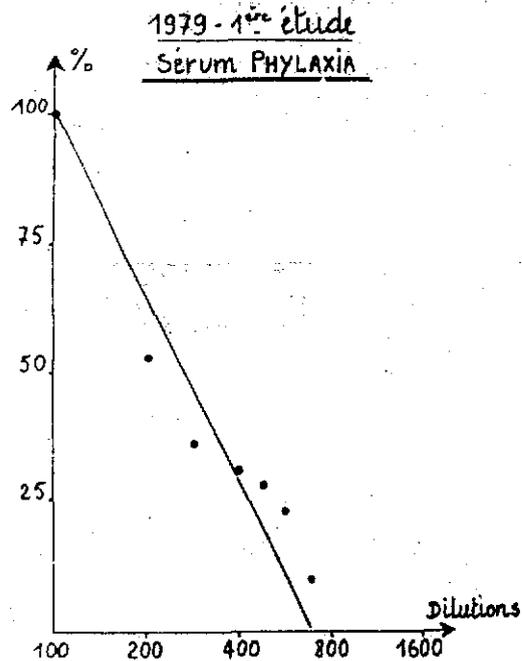
puis, fixer un seuil "raisonnable" de positivité devant être atteint par tous les laboratoires désirant effectuer ce diagnostic, et le concrétiser par la préparation d'un sérum de référence ajusté à ce seuil.

La figure 1 indique la nature des réactifs utilisés au cours des 5 études de 1979 à 1982 : 4 sérums ou types de sérums ont été retenus.

Un premier sérum positif était largement disponible puisque commercialisé sous forme de sérum hyperimmun (sérum Phylaxia) ; il a été utilisé sous forme de séries de dilutions en 1979 et 1980.

Un deuxième sérum positif a pris le relais du premier après que le niveau du seuil de positivité ait été apprécié à l'aide du sérum Phylaxia au cours des deux études de 1979 ; ce deuxième sérum est monospécifique puisque produit sur porc S.P.F. à la Station de pathologie porcine de Ploufragan, et en quantité plus limitée.

Figure 2 : Graphique représentant le pourcentage de réponses positives obtenues par les laboratoires en fonction de la dilution du sérum positif Phylaxia (première étude).



2. Deuxième étude

Elle s'est déroulée également en 1979 et a conduit à soumettre 30 échantillons de sérums à 9 laboratoires français et à 6 laboratoires de pays européens.

Les 30 échantillons portaient sur une gamme de dilutions du sérum positif Phylaxia un peu plus étendue que la fois précédente (1/100ème à 1/2000ème) et le nombre d'exemplaires de chaque dilution était variable :

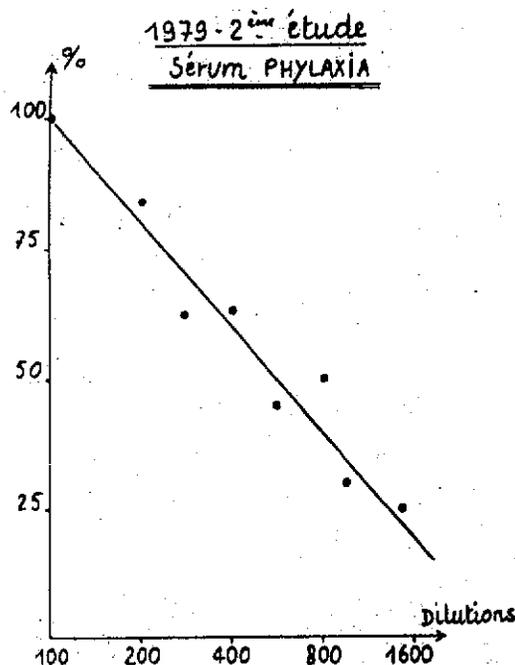
dilution au 1/100ème : 2 échantillons
1/200ème : 4 échantillons
1/300ème : 4 échantillons
1/400ème : 3 échantillons
1/600ème, 1/800ème,
1/1000ème, 1/1500ème,
1/2000ème : 2 échantillons

Par ailleurs, avaient été introduits : 4 sérums négatifs, 3 sérums d'une cinétique de réponse en anticorps.

Les laboratoires devaient fournir une réponse quantitative, ce qui a permis d'établir pour chaque laboratoire la droite de régression entre les titres obtenus et les dilutions du sérum positif Phylaxia. Les sérums négatifs ont été identifiés comme tels par tous les laboratoires.

La figure 3 montre la correspondance obtenue pour l'ensemble des laboratoires (sauf un ayant fourni des résultats révélant une absence de relation entre les titres trouvés et les dilutions du sérum positif) entre les pourcentages de réponses positives et les dilutions du sérum positif.

Figure 3 : Graphique représentant le pourcentage de réponses positives obtenues par les laboratoires en fonction de la dilution du sérum positif Phylaxia (deuxième étude).



Comme dans la première étude, 100 p. cent des laboratoires ont identifié le sérum positif dilué au 1/100ème, mais un plus grand nombre de laboratoires l'ont également repéré à la dilution du 1/200ème (86 p. cent contre 50 p. cent dans la première étude).

Au cours d'une réunion de travail destinée à étudier les résultats obtenus, il a été proposé de retenir le niveau d'anticorps reconnu par 86 p. cent des laboratoires comme seuil de positivité à atteindre par tous les laboratoires. Ceci revenait à demander aux 14 p. cent de laboratoires n'ayant pas identifié le sérum positif à la dilution du 1/200ème de faire l'effort d'améliorer un peu la sensibilité de leur technique.

La décision a été prise également de préparer un sérum de référence monospécifique, de titre en anticorps neutralisants ajusté à ce seuil de positivité et ce fut l'objectif de la troisième étude que d'établir le lien entre ces deux sérums.

Enfin, à partir de l'inventaire des techniques utilisées par les différents laboratoires et de leur comparaison en retenant les critères de commodité et de sensibilité, il a été proposé une technique de séroneutralisation utilisable en routine en microplaques et comportant :

- . un volume de sérum de 50 microlitres et un volume identique de suspension virale,
- . un nombre de 100 DECP50 de virus par cupule,
- . une incubation du mélange virus-sérum pendant 1 heure à 37°,
- . l'addition de 175 microlitres de suspension cellulaire après cette incubation,
- . l'emploi de sérum pur ; en cas de dilution, les résultats sont exprimés par le dénominateur de la dilution initiale du sérum.

3. Troisième étude

Elle a porté sur 30 échantillons soumis à 11 laboratoires français et 9 laboratoires européens en 1980.

Elle comportait :

- . des dilutions du sérum positif Phylaxia : 2 échantillons pour les dilutions 1/100ème, 1/200ème, 1/300ème, 1/500ème, 1/1000ème, 1/2000ème, 1/5000ème et un échantillon pour 1/20.000ème et 1/50.000ème,
- . des dilutions du sérum positif monospécifique : 2 échantillons pour les dilutions 1/180ème, 1/360ème, 1/720ème, 1/1440ème, 1/2880ème et 1/5960ème,
- . 2 sérums négatifs.

Les résultats obtenus avec le sérum Phylaxia étaient voisins de ceux atteints précédemment : pour la dilution du 1/100ème, 94 p. cent des réponses des laboratoires français et 100 p. cent de celles des laboratoires étrangers étaient positives, pour la dilution du 1/200ème les pourcentages étaient respectivement de 72 et 69.

Pour le sérum positif monospécifique, les pourcentages étaient respectivement :

à la dilution du 1/180ème : 89 et 87
du 1/360ème : 78 et 75

Par analogie avec la proposition émise au cours de la deuxième étude, il a été conclu que la dilution du 1/180ème du sérum positif monospécifique, reconnue par 87 à 89 p. cent des laboratoires devrait l'être par 100 p. cent et constituerait le seuil de positivité pour la séroneutralisation du virus de la M.A.

Ce sérum à la dilution du 1/180ème a alors été lyophilisé et envoyé aux laboratoires français comme sérum de référence français (seuil de positivité) pour la M.A.

Les deux études suivantes ont été destinées à vérifier, au sein de la C.E.E., si ce niveau d'anticorps neutralisants, initialement défini pour les laboratoires français, pouvait être admis pour la C.E.E.

4. Quatrième étude

Elle a eu lieu en 1981 et a consisté en l'envoi de 6 échantillons seulement, à 12 laboratoires français et à 15 laboratoires de la C.E.E. : il s'agissait du sérum positif monospécifique dilué au 1/180 (ce qui correspond au sérum de référence) et 4 autres dilutions de raison 2 ainsi que le sérum négatif diluant.

Parmi les 12 laboratoires français : 3 ont répondu au delà de 30 jours après la réception des sérums, ce qui est incompatible avec une activité de diagnostic de routine, 2 ont fourni une réponse douteuse pour le sérum négatif diluant ce qui traduit un défaut de spécificité et un n'a pas reconnu le sérum positif de référence ce qui indique un défaut de sensibilité. Les six autres laboratoires français ont eu des résultats cohérents, en moins de 30 jours.

Les laboratoires européens ont eu recours à des techniques différentes : séroneutralisation avec incubation de 1 à 2 heures à 37°C, voire de 18 à 24 heures à 37°C; addition de complément; réduction des plages. Tous ont reconnu le sérum correspondant au sérum de référence français et certains ont fait preuve d'un niveau de sensibilité supérieur, notamment ceux utilisant un temps prolongé d'incubation à 37°C et qui ont pu reconnaître le sérum de référence français jusqu'à la dilution du 1/8ème, voire du 1/16ème. Cependant, 4 des laboratoires européens n'ont reconnu le sérum de référence que non dilué (réponse négative à la dilution 1/2), ce qui confirme le bien fondé du niveau d'anticorps retenu pour le sérum de référence comme seuil de positivité.

5. Cinquième étude

La dernière étude a été réalisée en 1982 entre 11 laboratoires français et 13 laboratoires de la C.E.E. qui ont reçu 26 échantillons.

Ceux-ci comprenaient :

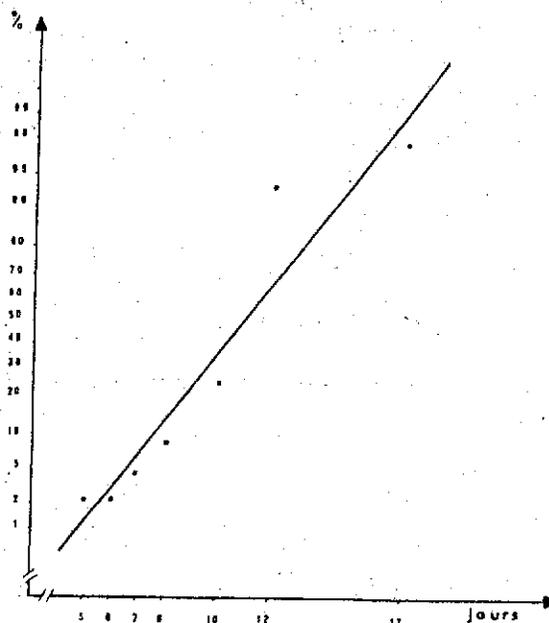
- 2 échantillons du sérum de référence français non dilué ou dilué au 1/2, 1/4 et 1/8.
- 2 échantillons du mélange de sérums prélevés sur des porcs vaccinés à J0 et saignés à J0, J3, J5, J6, J7, J8, J10, J12 et J17.

Pour la série de sérums de porcs vaccinés, des résultats positifs ont été enregistrés plus ou moins précocement en fonction des laboratoires.

La figure 4 présente la répartition du pourcentage de laboratoires en fonction du jour de cinétique à partir duquel ils ont donné une réponse positive. Les réponses fournies par les laboratoires couvrent une large période de la cinétique : 1 laboratoire a détecté des anticorps dès le 5ème jour, tandis qu'un autre n'a décelé que le sérum du 17ème jour. Il faut surtout constater l'accroissement très rapide du nombre de laboratoires pour la période du 10ème au 12ème jour : respectivement 25 p. cent et 95 p. cent ; le manque de sensibilité de ce procédé d'estimation des résultats des laboratoires découle de l'impossibilité d'affiner davantage l'obtention du sérum : il faudrait effectuer plusieurs prélèvements par jour à des heures différentes, ce qui n'est pas réaliste.

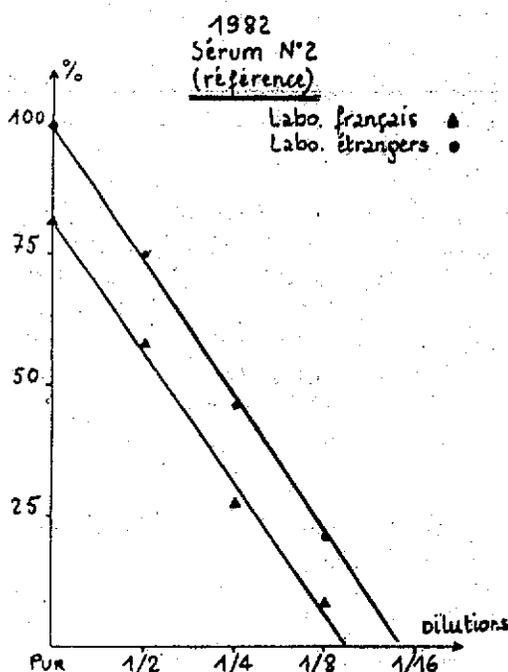
En revanche, la dilution d'un sérum étalon est beaucoup plus commode et permet de fournir le sérum au titre exact souhaité. C'est la solution qui a été retenue.

Figure 4 : Pourcentage du nombre de laboratoires ayant fourni une réponse positive en fonction du jour de prélèvement du sérum (porc inoculé à J0). Représentation linéaire : $y = 1,21 x$ dans une échelle arithmétique ; $r = 0,95 > 0,87$ pour $\alpha = 0,01$ et $ddl = 5$.



Pour le sérum de référence français, les pourcentages de réponses positives obtenues en fonction des dilutions sont indiqués sur la figure 5. On y constate que le sérum de référence français a été reconnu dans 100 p. cent des cas pour les laboratoires de la C.E.E. mais pas par les laboratoires français.

Figure 5 : Graphique représentant le pourcentage de réponses positives obtenues par les laboratoires en fonction de la dilution du sérum de référence français (cinquième étude).



Compte tenu de ces résultats, le sérum de référence français a été retenu par un groupe de travail de la C.E.E. comme sérum de référence C.E.E. représentant le seuil de positivité pour la séro-neutralisation du virus de la M.A. Provisoirement, ce même sérum va servir de seuil pour la technique ELISA et des études en cours permettront de préciser si le seuil de positivité pour le test ELISA doit être différent de celui de la séroneutralisation.

II - CONSIDERATIONS SUR LA REALISATION PRATIQUE ET LA METHODOLOGIE DE CES ETUDES

Un certain nombre de points correspondant à des aspects pratiques de la réalisation de ces études peuvent être évoqués.

- * Comme cela a été signalé plus haut, le nombre d'échantillons utilisés pour chaque étude a été en général compris entre 20 et 30, avec une seule exception pour l'étude de 1981 qui ne comprenait que 6 échantillons.

Le choix de ce nombre correspond à un compromis entre un nombre élevé, entraînant un travail important pour les laboratoires participant à l'étude, et un nombre trop faible, insuffisant pour juger, notamment, la reproductibilité des résultats grâce à l'introduction du même sérum sous plusieurs numéros.

Lors de l'étude des dilutions des sérums positifs, chaque dilution a été utilisée systématiquement sous forme de deux échantillons (études n° 1, 2, 3 et 5), parfois davantage (étude n° 2).

Si l'on admet l'intérêt de l'introduction en double ou, mieux, en triple, de chaque sérum, la nécessité de 6 ou 7 dilutions pour couvrir l'éventail possible de sensibilité des différents laboratoires et de quelques échantillons négatifs pour vérifier la spécificité des réponses, on parvient à la conclusion que le nombre d'une trentaine d'échantillons paraît optimal pour résoudre ce type de problème, à savoir la définition d'un seuil de positivité.

- * La nature du sérum positif à utiliser est importante à considérer. Il paraît souhaitable, tout d'abord, de pouvoir disposer d'un tel sérum en grande quantité afin de l'employer au cours d'études successives et d'éviter les difficultés liées à l'ajustement du titre d'un sérum par rapport à celui d'un précédent, à chaque étude.

Par ailleurs, il est préférable d'utiliser un sérum riche en IgG plutôt que riche en IgM, plus labiles, et par conséquent d'utiliser un sérum "tardif" ou résultant d'une hyperimmunisation plutôt qu'un sérum "précoce".

Enfin, il pourrait être intéressant de disposer d'emblée d'un sérum monovalent, produit sur animaux "protégés" lorsque l'on s'adresse à des espèces animales pour lesquelles les techniques d'élevage dans ces conditions sont bien maîtrisées.

L'emploi d'échantillons prélevés de manière séquentielle au cours de la réponse immunitaire d'animaux vaccinés ou infectés ne paraît pas opportun dans ce type d'étude, pour trois raisons : une raison pratique, car il est difficile de recueillir suffisamment de sérum (qui ne sera pas dilué, à l'inverse de ce qui se passe avec un sérum fortement positif), à chaque fois, sur des espèces de moyenne ou de petite taille, pour préparer une étude destinée à une cinquantaine de laboratoires ; par ailleurs, on ne connaît pas le titre exact en anticorps de chaque prélèvement et l'augmentation du titre n'est pas forcément proportionnelle de manière simple (du type $y = ax$) au temps, mais plutôt de manière exponentielle ; enfin, et compte tenu du point précédent, il est plus difficile (et plus aléatoire) de cerner le niveau souhaitable d'anticorps qu'avec une série de dilutions dont la raison peut être fixée à volonté et qui permet d'établir une relation dose-effet.

- * Les sérums utilisés ont été stérilisés par filtration puis envoyés à l'état liquide. L'envoi de réactifs stériles est indispensable à la fois lorsque la technique utilisée fait appel à des cultures

cellulaires et parce que des délais anormalement prolongés d'acheminement des colis (notamment pour un transport international) peuvent favoriser une multiplication bactérienne dans des échantillons septiques, donc une altération des anticorps de ces échantillons.

L'emploi d'échantillons lyophilisés, outre le surcroît important de travail qu'il entraîne pour le laboratoire qui organise l'étude, a l'inconvénient de s'éloigner des conditions de la pratique puisque les sérums reçus en routine le sont à l'état liquide. En revanche, bien sûr, le sérum étalon qui doit pouvoir être conservé sans altération pendant des années, ne peut être présenté que sous forme lyophilisée.

- * Dans cette étude, les sérums ont été codés mais les mêmes numéros ont été utilisés pour les groupes de sérums envoyés aux différents laboratoires.

Les chaînes d'analyse organisées par le laboratoire de référence américain (Ames) auxquelles nous participons (anémie infectieuse des Equidés et maladie d'Aujeszky) comprennent des groupes de 30 sérums dont les numéros changent pour chaque laboratoire destinataire afin de prévenir la rectification "téléphonique" des résultats.

Ce travail de codage spécifique des sérums de chaque groupe est lourd à assurer mais paraît opportun comme gage d'objectivité complète et nous l'avons déjà réalisé récemment pour l'étude en commun (1982) du diagnostic sérologique de la paratuberculose. Il sera appliqué dorénavant de façon systématique.

- * Le volume de chaque échantillon est également important à définir. Dans nos études, initialement ce volume était de l'ordre de 1 ml ce qui a l'avantage de permettre la répétition du test. Mais, l'inconvénient corollaire est que cette répétition introduit un biais en éloignant des conditions habituelles du diagnostic de routine et conduit à des réponses très tardives, dépassant parfois nettement un mois. Or, il est primordial que ces études en commun de sérums, et tout particulièrement celles destinées à fixer un seuil de positivité à atteindre systématiquement en routine, se déroulent exactement dans les conditions habituelles, sans précaution spéciale, sans attention particulière et donc sans répétition autre que celle parfois réalisée dans la pratique en cas de doute.

Pour cette raison, le volume de sérum fourni pour la cinquième étude n'a été que de 300 microlitres par échantillon. A l'avenir, les volumes de sérum seront calculés de telle manière que, compte tenu des pertes éventuelles liées à la manipulation, il ne soit possible que de recommencer une seule fois la réaction.

- * Le point le plus délicat est sans doute celui de l'analyse des résultats.

Pour la distinction entre laboratoires jugés satisfaisants et laboratoires jugés non satisfaisants, il paraît nécessaire qu'une méthodologie commune soit adoptée par les laboratoires chargés de conduire ces études, après analyse du problème en collaboration avec des statisticiens.

Pour la fixation du seuil de positivité, l'approche est un peu différente encore qu'elle puisse certainement bénéficier d'une méthodologie statistique.

En ce qui nous concerne, la méthode retenue a été la suivante : dans un premier temps, nous avons écarté les laboratoires qui, à l'évidence, fournissaient des résultats critiquables (manque de spécificité étant donné la réponse positive pour des sérums négatifs, absence totale de loi dose-effet sur la série de dilutions du sérum positif...) ; ensuite, nous avons préparé le graphique traduisant la relation entre pourcentage de réponses trouvées positives et dilutions du sérum positif. Le raisonnement appliqué alors a été de demander à une minorité de laboratoires (15 à 25 %) ayant une sensibilité faible de faire l'effort de rejoindre le niveau minimal de sensibilité de la majorité des laboratoires (75 à 85 %). Il s'agit donc de la détermination d'un niveau minimal commun de sensibilité, étant entendu que certains laboratoires peuvent continuer à avoir un seuil de sensibilité supérieur (voire nettement supérieur, en fonction de modalités techniques).

- * Le but final de ce type d'étude est de mettre à la disposition de tous les laboratoires un réactif standardisé permettant une auto-vérification régulière du bon niveau de sensibilité de la technique employée. Il peut s'agir d'un sérum de référence, lyophilisé bien sûr, qui après remise en suspension correspond directement au seuil de positivité ou qui nécessite une certaine dilution pour atteindre ce seuil. Pour notre part, afin d'éviter d'éventuelles différences liées aux dilutions, nous avons préféré choisir un sérum de référence qui, après reprise par 1 ml d'eau distillée, constitue directement le seuil de positivité.

De tels sérums de référence devraient être disponibles, dans l'avenir, pour faciliter le diagnostic sérologique de toutes les maladies animales importantes, permettre la comparaison des résultats obtenus dans différents laboratoires ou différents pays, augmenter la fiabilité des résultats et favoriser la réalisation des examens sérologiques tant pour les transports internationaux d'animaux que pour les enquêtes épidémiologiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. PEARSON J.E., TOMA B., NAKAJIMA H. and KNOWLES C.- The standardization of the Equine Infectious Anemia Immunodiffusion test and its application to the control of the disease. CR. XXI Cong. Mond. Vét. Moscou, Juillet 1979.

2. TOMA B. - Study for an international standardization of the interpretation of the immunodiffusion test in the diagnosis of equine infectious anemia. E.I.A. Workshop, 26 september 1976, Lyon.
3. TOMA B.- Approche d'une harmonisation internationale de l'interprétation de la réaction d'immunodiffusion en gélose pour le diagnostic de l'anémie infectieuse des Equidés. Journal of Biological Standardization 1977, 5, 297-306.
4. TOMA B.- Le diagnostic sérologique des maladies infectieuses du porc en France. Cahiers de Médecine Vétérinaire, 1979, 48, 23-34.
5. TOMA B. et VANNIER P.- Harmonization attempt between french laboratories involved in the research of neutralizing antibodies against pseudorabies virus or transmissible gastroenteritis virus. 2nd International symposium of veterinary laboratory Diagnosticians, Lucerne/Switzerland, 1980.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les directeurs des nombreux laboratoires français ou étrangers qui ont participé à ces études, le docteur vétérinaire P. VANNIER (Station de pathologie porcine de Ploufragan) qui a produit le sérum monospécifique antiviral de la maladie d'Aujeszky, l'IFFA Mérieux qui a effectué la lyophilisation du sérum de référence, ainsi que Mlle Martine PEZRON et Mme Micheline ADAM pour leur excellente collaboration technique.

DISCUSSION

Question

Juste une remarque technique. Pour ce contrôle de qualité, les sérums étaient dans de tout petits tubes. Nous n'avons pas de portoirs adaptés, et cela a posé des problèmes de manipulation, entre autres pour les décomplémenter.

D'autre part, alors que pour chaque sérum nous utilisons toujours 2 cupules + 1 témoin en SN, il y avait des problèmes de lecture. Le sérum étalon pur était toujours positif dans les 2 cupules. Mais dilué au demi et au quart il donnait irrégulièrement une cupule sur deux positives. Comment interpréter un sérum d'origine inconnue qui donne une cupule positive sur deux et qui peut devenir complètement négatif lors d'un deuxième essai ?

Réponse :

Il faut situer ce problème dans le cadre du diagnostic habituel qui porte sur un lot de sérums : dans un lot où tous les sérums sont négatifs, un sérum fournissant une telle réponse peut être considéré comme "non significatif" ; si, au contraire, plusieurs sérums sont positifs celui qui fournit ce type de réponse peut être considéré comme faiblement positif.

°°°