

CHAPITRE 2.2.2.

MISE AU POINT ET OPTIMISATION DES METHODES DE DETECTION DES ANTIGENES

INTRODUCTION

Les Recommandations de l'OMSA pour la validation fournissent des informations détaillées et des exemples à l'appui de la Norme de validation publiée au Chapitre 1.1.6 Validation des épreuves diagnostiques pour les maladies infectieuses des animaux terrestres du présent Manuel terrestre. L'expression « Norme de validation de l'OMSA » dans le présent chapitre doit être comprise comme renvoyant à ce chapitre.

La détection et l'identification d'un agent constituent la preuve confirmant soit l'infection par un agent pathogène donné, soit la maladie causée par celui-ci. Il existe de nombreuses méthodes de test différentes, directes ou indirectes. Les méthodes de détection directes¹ classiques d'un agent comprennent la microscopie électronique, la microscopie optique (observation de caractéristiques histopathologiques ou pathognomoniques, identification des parasites in situ, etc.), l'isolement viral, la culture bactérienne et les techniques de digestion des parasites. De nombreuses techniques directes nécessitent des

procédures secondaires pour aider à caractériser et à identifier ces agents (tests d'inhibition de l'hémagglutination ou de neutralisation virale, colorations spéciales des bactéries ou des champignons, etc.). Parmi les tests de détection indirecte des agents, dont les tests de détection des

Aspects pratiques du choix d'un format d'essai

- Un débit élevé est-il essentiel ? Le test sera-t-il automatisé ?
- Le test sera-t-il utilisé pour tester des troupeaux ou des individus ?
- Quel est le temps d'exécution attendu ? Est-ce adapté ?
- Quel est le niveau de sophistication requis pour exécuter l'essai ?
- Quelles sont les compétences requises pour interpréter les résultats du test ?
- L'essai sera-t-il faisable dans mon laboratoire ?
- Sera-t-il facilement transférable à d'autres laboratoires ?

antigènes (Ag), figurent les dosages immuno-enzymatiques (ELISA), les essais par immunofluorescence ou par immunopéroxydase, les techniques d'immunoblot, les biopuces, le tri cellulaire par fluorescence (cytométrie en flux ou technique FACS) et les biocapteurs. Souvent, les méthodes directes et indirectes sont utilisées en tandem ; une technique directe peut, par exemple, être utilisée initialement pour isoler, enrichir et/ou extraire le microorganisme, puis suivie de techniques indirectes pour caractériser et identifier l'agent.

Les exemples donnés ci-dessus varient beaucoup en matière d'exigences pour le laboratoire. Parmi les tests rapides de terrain (dont les dispositifs de flux latéral), certains sont des tests de détection d'antigènes. Ils sont faciles à utiliser et ont été développés pour tester les animaux sur le terrain, mais peuvent aussi trouver des applications dans les laboratoires. Le coût, l'infrastructure du laboratoire, le bioconfinement/la biosûreté, la sophistication technique, les compétences d'interprétation, le temps d'exécution, la capacité de débit, les caractéristiques de performance diagnostique, la répétabilité et la reproductibilité sont des paramètres importants qui doivent être

1 Définitions: dans le cadre de la détection directe ou indirecte d'un analyte, le terme « direct » s'applique au microorganisme ou à ses antigènes (à savoir leur détection directe par microscopie). Le terme « indirect » s'applique à la réponse de l'hôte au microorganisme (à savoir la détection indirecte déduite de la détection d'anticorps contre le microorganisme). Dans le cadre des méthodes diagnostiques utilisées pour détecter une infection, la microscopie est un moyen d'observation directe du microorganisme, alors que l'utilisation d'un réactif permettant de déduire la présence de l'agent (par exemple une enzyme conjuguée à un anticorps purifié spécifique à l'agent) est une méthode indirecte.

pris en compte lors du choix du test le plus approprié. Leur adéquation aux différentes applications diagnostiques varie également.

Contrairement aux tests sérologiques ou aux titrages d'anticorps, les tests de détection des antigènes dépendent grandement du moment de l'apparition des symptômes, de la pathogénie de la maladie et de la concentration de l'agent pathogène dans certains tissus et/ou fluides. L'établissement du bon diagnostic dépend du moment et du site de prélèvement choisis (tissus touchés/lésions, raclages, écouvillons, sang ou autres liquides corporels), des conditions de stockage et de l'intégrité de l'échantillon durant le transport. Pour certaines utilisations, l'analyse d'animaux et/ou d'échantillons individuels peut être appropriée (p. ex. tests de confirmation), tandis que pour d'autres (p. ex. dépistage), le regroupement d'animaux peut s'avérer efficace et efficace. Le choix de l'échantillon approprié nécessite une bonne compréhension de la maladie et de l'effet de la matrice de l'échantillon sur l'agent pathogène (p. ex. écouvillons cloacaux ou trachéaux pour l'influenza aviaire).

Les tests de détection de l'acide nucléique remplacent de plus en plus les systèmes classiques de détection des antigènes. Pour la mise au point et l'optimisation de ces tests, se référer au Chapitre 2.2.3. Même si les tests de détection de l'acide nucléique semblent être les tests à privilégier pour de nombreuses applications, ils ne sont pas toujours les plus pratiques ou les plus efficaces. Dans la plupart des cas, il reste nécessaire et prudent, au moins pour le cas index, de cultiver l'agent sur des milieux sélectifs, dans des lignées de cellules sensibles ou sur des œufs pour permettre sa caractérisation et son identification ultérieures. Même si le génotypage est un élément important, notamment en épidémiologie moléculaire, d'autres méthodes de caractérisation de l'agent comme le sérotypage, le pathotypage ou le biotypage sont également importantes. Les agents cultivés et conservés ont une valeur historique immense et constituent une source importante de matériel de référence.

En raison de leur utilisation à l'échelle planétaire, les tests ELISA sont pris comme exemple dans le présent chapitre pour illustrer les bonnes pratiques en matière d'essais de détection d'antigènes. La plupart des procédés de base utilisés pour valider d'autres types d'essais de détection d'antigènes pourront bien sûr être extrapolés à partir de ceux utilisés pour valider les tests ELISA. En raison des nombreuses similitudes de conception entre les essais de détection des antigènes et des anticorps, le présent chapitre fera souvent référence au Chapitre 2.2.1 sur la détection des anticorps.

A. PROCESSUS DE MISE AU POINT D'UN ESSAI DE DETECTION DES ANTIGENES

1. Objectif(s) prévu(s) de l'essai de détection des antigènes

L'objectif prévu pour le test est le facteur essentiel guidant les décisions lors du choix et des premiers stades de la mise au point de l'essai candidat. Compte tenu des catégories d'« adéquation à l'objectif » définies par l'OMSA dans le Tableau 1, les systèmes de détection des antigènes peuvent être appropriés à certaines utilisations. L'appui à l'éradication des maladies ou aux programmes de surveillance nécessite généralement d'analyser un nombre élevé d'échantillons et de mettre l'accent sur la sensibilité diagnostique et la capacité de débit. Au contraire, la confirmation des cas cliniques ne nécessite pas un nombre élevé d'analyses, mais la spécificité diagnostique et le temps d'exécution sont très importants. D'entrée de jeu, les questions posées dans l'encadré ci-dessus doivent être soigneusement examinées.

Tableau 1. Facteurs déterminants de l'adéquation d'une épreuve de détection d'antigènes aux objectifs prévus

Caractéristiques de l'essai	Facteurs déterminants de l'adéquation aux objectifs prévus						
	1*		2*	3*	4*	5*	6*
	a	b					
Sensibilité diagnostique (SeD)		+++	+++	+++	+++		
Spécificité diagnostique (SpD)		+	+	+	+++		

Caractéristiques de l'essai	Facteurs déterminants de l'adéquation aux objectifs prévus						
	1*		2*	3*	4*	5*	6*
	a	b					
Valeur prédictive positive (VPP)		+	+	+	+++		
Valeur prédictive négative (VPN)		+++	+++	+++	+++		
Capacité de débit		+++	++	+	-		
Temps d'exécution du test		+	+	+	+++		
Aptitudes d'AQ		+++	+++	+++	+++		
Reproductibilité		+++	+++	+++	+++		
Répétabilité		+++	+++	+++	+++		

D'autres caractéristiques comme la sophistication technique de l'essai ou les compétences requises pour son interprétation dépendent de la maladie ou de l'infection faisant l'objet de l'investigation.

N. B. Les tests de détection de l'acide nucléique peuvent également être utilisés pour la détection d'agents infectieux et sont traités au Chapitre 2.2.3.

Symboles: +++ = essentiel ; + = de moindre importance ; - = sans importance.

AQ : Assurance de la qualité

*Objectifs fondamentaux pour lesquels un essai peut être jugé adapté : 1. Contribuer à la démonstration de l'absence d'infection dans une population donnée. 2. Certifier l'absence d'infection ou la présence de l'agent infectieux chez des animaux à titre individuel ou dans des produits à des fins de commerce/déplacement. 3 Contribuer à l'éradication d'une maladie ou à l'élimination d'une infection au sein de populations données. 4. Confirmer le diagnostic de cas cliniques (incluant la confirmation des tests de dépistage positifs). 5. Estimer la prévalence d'une infection ou d'une exposition pour permettre l'analyse du risque. 6. Déterminer le statut immunitaire d'animaux à titre individuel ou de populations (après vaccination).

1.1. Objectif 1

Pour les catégories d'absence de maladie telles que décrites dans cet objectif (Tableau 1), les tests de dépistage des anticorps d'une sensibilité diagnostique élevée (SeD) sont les tests de prédilection, à condition qu'une réponse immunitaire détectable soit un indicateur significatif d'une infection. Il existe toutefois certaines pathologies où la réponse immunitaire humorale peut être trompeuse et la détection de l'agent pathogène plus appropriée (p. ex. en cas d'infections à mycobactéries ou à trypanosomes). Dans ces cas, les tests de détection d'antigènes peuvent être plus efficaces. Les tests de dépistage des antigènes doivent présenter une SeD élevée. En effet, ces derniers donnent des taux faibles de faux négatifs (FN) et, lorsqu'ils sont appliqués à des populations où la prévalence est basse, leur VPN est au plus haut. Comme la sensibilité et la spécificité diagnostique sont en général inversement corrélées, une diminution de la SpD se traduira par un taux élevé de faux positifs (FP). C'est pourquoi tous les résultats positifs des tests de dépistage doivent faire l'objet d'un test de confirmation, d'une manière ou d'une autre, pour évaluer leur statut véritable. Les tests de confirmation ont généralement une SpD élevée et donc un taux de FP bas. Ces tests sont souvent plus sophistiqués, plus chers et peuvent nécessiter des compétences plus pointues pour leur interprétation.

1.2. Objectif 2

Pour un certain nombre de maladies incluses dans le *Manuel terrestre*, l'identification de l'agent est désignée comme la méthode de test privilégiée pour démontrer « l'absence d'infection de l'animal à titre individuel avant son déplacement ». Même si cela nécessite dans bien des cas la culture du microorganisme ou la détection de l'acide nucléique, il existe des situations où un test de détection de l'antigène est adapté à l'objectif. Pour éviter les risques de dissémination de la maladie en lien avec les échanges commerciaux, un test offrant une SeD élevée sera privilégié.

1.3. Objectif 3

Si l'objectif du test est l'éradication d'une maladie ou l'élimination d'une infection au sein de populations données, les tests de dépistage des antigènes d'une SeD moyenne à élevée représentent, au même titre que les tests de dépistage des anticorps, les tests de prédilection. La réflexion est toutefois légèrement différente, car les analyses sont susceptibles d'être faites au niveau du troupeau ou du compartiment. Au début de la campagne d'éradication, lorsque la prévalence de la maladie est élevée, une SeD et une SpD modérées sont adéquates puisque les taux de FP et de FN sont moins importants à ce stade et qu'un niveau modéré d'erreur est admissible. Selon la nature de la maladie et la rapidité de sa propagation, un débit élevé et un temps d'exécution court peuvent être essentiels. En règle générale, les décisions prises à ce stade le sont sans test de confirmation.

Dans les stades ultérieurs de la campagne, une SeD élevée se justifie puisque le taux de FN devient le facteur principal. Comme pour l'objectif 1, les résultats positifs doivent faire l'objet d'une forme quelconque de test de confirmation pour évaluer leur statut véritable. Au cours de ces stades ultérieurs, les systèmes de détection d'antigène et/ou d'acide nucléique sont essentiels pour détecter les cas subcliniques, les excréteurs et les éventuels porteurs latents.

1.4. Objectif 4

Même si les titrages d'anticorps d'une SpD élevée sont souvent les tests préférés pour la confirmation du diagnostic des cas cliniques, la détection des anticorps ne constitue pas toujours le meilleur test, notamment si les signes cliniques apparaissent avant que la réponse immunitaire ne soit engagée. L'influenza aviaire hautement pathogène constitue un bon exemple, la mortalité intervenant souvent avant même qu'une détection de la réponse immunitaire ne soit possible. Les tests de détection d'antigène ou d'acide nucléique constituent généralement un meilleur choix pour confirmer des cas cliniques, à condition qu'ils aient un temps d'exécution court. Dans ces cas, l'idée est de maximiser la SpD afin de minimiser, les éventuels FP. Pour certains cas cliniques, comme les maladies vésiculaires des animaux terrestres, plusieurs tests peuvent être requis pour exclure les agents pathogènes dont le tableau clinique est similaire. Dans cette catégorie de tests, des temps d'exécution courts sont extrêmement importants pour identifier les foyers éventuels.

1.5. Objectif 5

Pour estimer la prévalence d'une infection ou de l'excrétion afin de permettre l'analyse du risque, par exemple pour enquêter sur la situation sanitaire, pour déterminer le statut sanitaire des troupeaux ou pour suivre les mesures de lutte contre les maladies, les tests de détection d'antigène d'une SeD et d'une SpD modérées représentent les tests à privilégier. En général, cela permet un équilibre des taux de FN et de FP et résulte dans une estimation plus exacte de la prévalence véritable de l'infection dans la population cible. Cependant, si des estimations exactes de la SeD et de la SpD ont été établies, des méthodes statistiques peuvent être utilisées pour minimiser les biais attribuables aux taux de FN et de FP (voir Chapitre 2.2.5 *Méthodes statistiques de validation*).

1.6. Objectif 6

Ne s'applique pas aux essais de détection d'antigènes.

2. Mise au point de l'essai – expérimentation

2.1. Matériel de référence, réactifs et contrôles

2.1.1. Échantillons de test

Les échantillons requis pour les essais de détection d'antigènes doivent être manipulés comme indiqué dans le Chapitre 1.1.2 *Prélèvement, expédition et stockage des échantillons pour le diagnostic* du *Manuel terrestre*. La matrice de l'échantillon pour les essais de détection d'antigènes peut être très hétérogène (sang, fèces, lait, peau, semence, salive, cloques, vésicules ou écouvillons de tissus lésés : oropharynx [raclage laryngo-pharyngien], trachée, appareil génital, cloaque, œsophage, etc.). L'échantillon idéal est facile à obtenir et l'analyte s'y trouve en grandes concentrations. Dans de nombreux cas, le sang et les écouvillons sont les échantillons de prédilection, mais, selon l'agent pathogène, d'autres tissus ou liquides peuvent

être requis, tels que peau, organes comme le cerveau (rage, encéphalopathies spongiformes transmissibles [EST]), organes lymphatiques comme la rate ou les ganglions lymphatiques (peste porcine classique), reins, fèces, sperme, salive ou tumeurs (leucose bovine enzootique), etc.

Comme décrit dans le Chapitre 1.1.2, il faut penser aux moyens de limiter la contamination bactérienne et fongique des échantillons. L'utilisation d'agents conservateurs et de fixateurs n'est généralement pas recommandée et les échantillons doivent être envoyés réfrigérés et dans les plus brefs délais au laboratoire diagnostique. Durant le transport et le stockage, il est important d'avoir conscience des exigences physiques et chimiques de l'agent pathogène (p. ex. le virus de la fièvre aphteuse est extrêmement labile à un pH bas et nécessite une quantité égale de glycérol et de tampon phosphate pour maintenir le pH au-dessus de 7).

Si les échantillons sont à tester sous forme regroupée, des expériences doivent être réalisées pour démontrer que l'essai est adapté à cet usage (p. ex. sensibilité analytique suffisamment élevée pour détecter un animal infecté dans un ensemble de 5, 10, 50 échantillons d'animaux non infectés ou plus).

2.1.2. Étalons de référence

Voir les Chapitres 2.2.1 *Mise au point et optimisation des essais de détection des anticorps* et 2.2.6. *Sélection et utilisation des échantillons et des panels de référence.*

2.1.3. Panels de référence positifs et négatifs

Durant toute la phase de mise au point et de normalisation de l'essai de détection d'antigène, des échantillons contenant des concentrations d'antigène couvrant la plage de fonctionnement prévue pour l'essai doivent être utilisés. Ces échantillons peuvent être obtenus à partir de prélèvements faits sur le terrain ou produits au laboratoire sous forme d'échantillons enrichis (voir Chapitre 2.2.6). Les échantillons négatifs doivent être prélevés sur des animaux non infectés et la même matrice doit être utilisée pour produire des échantillons enrichis.

2.1.4. Antigènes purifiés et antigènes bruts pour la production d'anticorps

En principe, les antigènes destinés à la production de réactifs immunologiques doivent être d'une conformation aussi naturelle que possible pour garantir que la présentation des épitopes imite leur orientation sur le microorganisme vivant. Les méthodes d'isolement et/ou de purification utilisées doivent donc préserver autant que possible l'intégrité antigénique de l'agent.

Pour les agents pathogènes de très grande taille comme les poxvirus, les bactéries ou les protozoaires, l'utilisation de biopuces à protéines peut être utile pour identifier et sélectionner les antigènes qui induisent des réponses immunitaires fortes.

2.1.5. Anticorps monoclonaux et polyclonaux pour les essais de détection indirecte des antigènes

Les anticorps monoclonaux sont dotés de spécificités analytiques uniques et sont très utiles pour détecter des épitopes spécifiques à un agent à l'échelon du groupe, de la souche ou de la sous-souche. À ce titre, il faut soigneusement réfléchir à l'utilisation prévue et à la spécificité souhaitée pour l'essai. Les anticorps polyclonaux tendent, par nature, à présenter un éventail plus large de spécificités. Les anticorps polyclonaux purifiés ou semi-purifiés sont souvent les réactifs de prédilection pour capturer les antigènes complexes, car ils présentent des affinités plus élevées que leur pendant monoclonal.

2.2. Conception de la méthode de test

2.2.1. Choix du test

Un test bien conçu comprend un examen préalable attentif de plusieurs variables dans le cadre des exigences de performance. Le choix d'un essai doit être associé à l'utilisation prévue, ce qui requiert généralement un consensus entre les concepteurs de l'essai, les statisticiens et les autres parties prenantes tels les épidémiologistes ou les organes de réglementation. Si l'objectif est de mettre au point un test de dépistage (p. ex. durant une période de surveillance post-épidémie), l'accent sera mis sur une SeD élevée, un débit élevé, un

coût faible, sur la simplicité technique, le peu de compétences requises pour l'interprétation, etc. Si l'objectif est de mettre au point un test de confirmation (p. ex. pour la confirmation de cas cliniques ou de résultats positifs au test de dépistage), les priorités comprendront une SpD élevée, un temps d'exécution court, une sophistication technique et de bonnes compétences pour l'interprétation. Le nombre de tests effectués au chevet du patient ou sur le terrain augmente constamment. Ces tests ont leurs propres exigences complémentaires en matière de robustesse, compte tenu des conditions variables de l'environnement dans lequel ils sont utilisés et des qualifications que doit posséder l'opérateur réalisant et interprétant le test.

La méthode de détection des antigènes par ELISA est théoriquement la même que celle employée pour les anticorps (Chapitre 2.2.1), si ce n'est que l'antigène est l'analyte cible et les anticorps sont les réactifs primaires utilisés pour la capture et la détection des antigènes. Différents formats existent selon que l'antigène est directement adsorbé sur la microplaque ou capturé par les anticorps en phase solide avec des étapes ultérieures de détection.

Il n'est pas toujours évident de décider du format de l'essai à utiliser pour répondre au mieux à l'objectif visé. La disponibilité des réactifs et la limite de détection de l'essai pour une utilisation donnée peuvent constituer des facteurs importants limitant le choix. Comme de nombreux systèmes ciblent désormais des antigènes très spécifiques, le choix de l'anticorps pour les capturer ou les détecter devient essentiel.

La préparation des échantillons de test est également un aspect essentiel à prendre en compte selon le format de test utilisé. L'utilisation d'anticorps de capture dans les essais de type sandwich améliore la sélectivité et réduit les effets de matrice éventuels. Pour les épreuves nécessitant une application directe de l'analyte en phase solide, des méthodes d'extraction préalable, de centrifugation ou de filtration peuvent être indispensables pour éliminer les matières étrangères. Pour une description plus détaillée de ces différents formats d'essais, voir Crowther (2001).

La taille et la complexité de l'antigène ainsi que la disponibilité des réactifs principaux comme les anticorps de capture (les antigènes à détecter avec les essais en sandwich doivent avoir au moins deux épitopes libres) sont d'une importance cruciale, ce qui limite ce type d'essai aux antigènes relativement grands ou aux agents pathogènes entiers.

L'existence et l'utilisation d'étalons d'antigènes pour le contrôle qualité et aux fins d'assurance qualité, la répétabilité, la reproductibilité, la capacité de débit, le temps d'exécution du test, le coût, la sophistication technique et les compétences nécessaires à l'interprétation sont autant de considérations pratiques à prendre en compte.

La manipulation d'agents pathogènes exotiques et/ou zoonotiques requiert une attention particulière pour ce qui est des règles de biosûreté et de biosécurité (voir également Chapitre 1.1.4 Biosécurité et biosûreté : norme sur la gestion du risque biologique dans les laboratoires vétérinaires et dans les animaleries).

Aspects qui ont un impact sur le choix du test

- L'essai sera-t-il utilisé pour le dépistage ou à des fins de confirmation, ou les deux?
- Sera-t-il utilisé en laboratoire ou sur le terrain ?
- Sera-t-il utilisé pour une ou plusieurs espèces ? Lesquelles?
- Le test sera-t-il utilisé pour typiser les microorganismes au niveau spécifique du groupe, du sérotype ou de la souche?
- Le test sera-t-il utilisé à l'échelon du pays ou dans le monde entier?

2.3. Études de faisabilité

Le même type d'expériences que celles utilisées pour les titrages d'anticorps est requis pour les tests de détection d'antigènes (voir Chapitre 2.2.1).

2.4. Échantillons et représentation des données

2.4.1. Sélection, stockage et utilisation des échantillons témoins pour la mise au point du test et les études de validation

Il est important d'évaluer et de suivre la sensibilité et la spécificité du test durant sa mise au point et sa validation. Cela se fait en sélectionnant plusieurs échantillons (un nombre de 4 ou 5 est adéquat) allant de négatifs à fortement positifs pour l'analyte concerné. Ces échantillons seront utilisés dans les expériences conçues pour optimiser l'essai. Démontrer la continuité de la preuve nécessite du soin et de la prévoyance dans la préparation et le stockage des échantillons. Un grand volume (p. ex. 10 ml) de chaque échantillon de contrôle est obtenu et divisé en aliquotes de 0,1 ml pour être stocké à -80°C, voire moins. Un aliquote de chaque échantillon est décongelé, utilisé pour le test puis, idéalement, jeté. S'il n'est pas envisageable de jeter l'aliquote, celui-ci peut être conservé entre les tests à 4°C pour une durée allant jusqu'à 2 semaines environ ; dans ces circonstances, une détérioration de l'échantillon ne peut toutefois être exclue. Un autre aliquote sera ensuite décongelé pour les tests suivants. Cette méthode permet d'utiliser la même source de sérum avec le même nombre de cycles de congélation-décongélation pour tous les tests (la congélation et décongélation répétée du sérum peut dénaturer les anticorps et/ou permettre la croissance d'autres microorganismes indésirables et doit donc être évitée). Ainsi, les variations sont réduites puisque l'expérimentateur utilise la même source d'échantillon pour toutes les expériences plutôt que de passer d'un sérum à un autre entre les expériences. Cette méthode a en outre l'avantage de permettre de tracer les données pour les échantillons analysés de manière répétée. Une fois que les étapes initiales de la validation de l'essai sont terminées, un ou plusieurs échantillons peuvent servir d'étalon(s) de référence pour la représentation des données et être utilisés pour les évaluations de la répétabilité intra-cycle et inter-cycles (Jacobson, 1998). Ils peuvent également servir d'étalons de travail internes si leur réactivité a été déterminée au préalable ; ce type de témoins fournit l'assurance que les cycles de l'essai produisent des données exactes (Wright, 1998).

2.4.2. Normalisation et représentation des résultats

Les mêmes procédures de normalisation que celles utilisées pour les essais de détection des anticorps s'appliquent aux essais de détection des antigènes (voir Chapitre 2.2.1 pour les détails).

2.5. Optimisation

L'objectif de cette étape est de définir les paramètres de test relatifs aux réactifs, aux consommables et à l'équipement, pour aboutir à un protocole précis qui sera utilisé durant la Partie B du processus de validation de l'essai (pour les détails, voir Chapitre 2.2.1).

Optimisation et normalisation

- Le test est-il à même de distinguer les échantillons où l'analyte est présent de ceux dont l'analyte est absent (quelle est la limite de détection = sensibilité analytique) ?
- Le test montre-t-il une réactivité croisée avec un antigène non cible dans l'échantillon ou dans sa matrice (spécificité analytique) ?
- Quel est le bruit ou l'activité de fond dans un échantillon négatif ?
- La répétabilité a-t-elle été évaluée pour un éventail d'échantillons témoins sur plusieurs jours ?
- Disposez-vous de suffisamment d'échantillons positifs et négatifs pour mener les expériences d'optimisation et de validation ?
- Si oui, les échantillons de référence sont-ils distribués et stockés correctement pour éviter l'introduction de biais en relation avec les échantillons (détérioration des échantillons) ?
- Les échantillons principaux ont-ils tous été analysés les uns par rapport aux autres avec des titrages en damier ?
- Avez-vous trouvé la concentration/les dilutions optimales pour chaque réactif ?
- Avez-vous incorporé des réactifs de référence et des étalons/témoins de travail et avez-vous normalisé les données de DO pour obtenir les meilleurs résultats possibles en matière de comparabilité ?

2.6. Facteurs inhibiteurs dans la matrice de l'échantillon

En raison de la variabilité et de la complexité plus grandes des échantillons, les essais de détection des antigènes sont plus susceptibles d'être influencés par les facteurs de matrice que les titrages d'anticorps qui détectent généralement les anticorps dans du sérum. Des substances inhibitrices sont souvent présentes dans les matrices complexes telles que pus, sperme, écouillons trachéaux, nasaux ou cloacaux et peuvent avoir un impact sur le résultat du test. Les systèmes de détection des antigènes par ELISA sont plutôt résistants aux facteurs inhibiteurs. Veuillez consulter la Norme de validation de l'OMSA, Section A.2.4, et Greiner *et al.* (1997) pour la description du type d'inhibiteurs susceptibles d'affecter l'essai. Ces références doivent être soigneusement étudiées pour s'assurer que tous les facteurs inhibiteurs ont été pris en compte et contrôlés.

2.7. Étalonage par rapport aux échantillons de référence et comparaison avec les méthodes de test normalisées

Le Chapitre 2.2.1 contient les informations correspondant à cette procédure.

B. PROCÉDE DE VALIDATION D'UN ESSAI

1. Étape 1 – Caractéristiques de performance analytique

1.1. Répétabilité

Chapitre 2.2.1.

1.2. Spécificité analytique

La spécificité analytique (SpA) est définie comme le degré auquel l'essai fait la distinction entre l'analyte cible et les autres composants qui peuvent être détectés dans la matrice de l'échantillon (voir Chapitre 2.2.6, Section 2.1). Plus la SpA est élevée, plus le nombre de résultats faux positifs est bas. La SpA doit être déterminée par l'analyse d'échantillons bien caractérisés d'agents pathogènes similaires ou apparentés, produisant des lésions analogues à celles que provoque l'agent pathogène cible ou fréquemment présents dans les échantillons contenant l'agent pathogène cible. Par exemple, pour évaluer la SpA d'un test ELISA de détection de l'antigène d'un sérotype donné (p. ex. sérotype O) de la fièvre aphteuse, il est nécessaire d'évaluer sa réactivité à toutes les sous-souches de ce sérotype (soit O Campos, O Manisa, etc.) afin de s'assurer qu'elles soient toutes incluses. Parallèlement, il est important de montrer que le test ne présente pas de réactivité croisée avec les autres sérotypes tels que A, ASia 1, C, SAT 1, 2 et 3. Enfin, il est également nécessaire d'évaluer si le test présente une réactivité croisée avec les agents de maladies susceptibles de provoquer des symptômes similaires, comme la stomatite vésiculaire, la maladie vésiculeuse du porc ou l'exanthème vésiculeux du porc. Un autre exemple est un ELISA conçu pour détecter le virus de l'influenza aviaire : en sa qualité de test de dépistage, l'essai devrait détecter la nucléoprotéine ou l'antigène de matrice de tous les sous-types, soit H1-H16 et N1-N9. Il ne doit cependant pas y avoir de réactivité croisée avec les virus responsables de signes cliniques similaires, comme la maladie de Newcastle ou la maladie de Gumboro (spécificité diagnostique) ou avec les autres composants non spécifiques présents dans la matrice ou en phase solide. Certains tests ELISA peuvent être sujets à des résultats faux positifs attribuables à des facteurs non spécifiques, comme la fixation non spécifique de conjugués d'anticorps à la surface plastique, et nécessiter l'utilisation d'agents de blocage. Une attention particulière doit être apportée à l'élimination de ce type d'erreurs.

Caractéristiques de performance analytique

- La répétabilité a-t-elle été établie intra-cycle et inter-cycles pour un éventail d'échantillons positifs et négatifs de l'essai ?
- Les limites de contrôle supérieures et inférieures de l'essai ont-elles été établies ?
- Avez-vous défini la SeA et la SpA pour cet essai ?
- L'essai candidat soutient-il la comparaison avec la méthode normale de test, sur la base de critères quantitatifs et qualitatifs ?

1.3. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique (SeA) est synonyme de la limite de détection (LD) inférieure de la concentration d'anticorps dans un échantillon. Les LD sont généralement déterminées par la dernière dilution à laquelle les copies (idéalement 10) de chaque dilution dans une série de dilutions de \log_2 sont analysées dans l'essai. Plus le nombre de copies est élevé, plus la détermination de la dilution à laquelle l'antigène n'est plus détectable est précise. De plus amples informations sur les LD et sur la SeA figurent dans la Norme de validation de l'OMSA ainsi qu'au Chapitre 2.2.5.

Les essais de dépistage ou les essais conçus pour détecter les infections subcliniques ou les porteurs doivent présenter une SeA très élevée. Dans de tels cas, il peut être difficile d'obtenir des exemples appropriés et de déterminer la SeA comparative en analysant un panel d'échantillons avec l'essai candidat et avec un autre essai indépendant. S'ils existent, des échantillons en série d'animaux infectés de manière expérimentale peuvent fournir des informations temporelles sur la capacité de l'essai à détecter l'antigène au cours de l'infection.

1.4. Comparaison des méthodes de test de référence avec la méthode de test candidate

Voir Chapitre 2.2.1.

2. Étape 2 – Caractéristiques de performance diagnostique

Voir également Chapitre 2.2.1.

2.1. Le défi d'établir des estimations exactes de la SeD et de la SpD pour les essais d'antigènes

Pour tous les essais de détection des antigènes, y compris les tests ELISA, le moment choisi pour le prélèvement doit être soigneusement choisi, la probabilité de détecter l'antigène ou l'agent pathogène lui-même étant très étroitement liée au stade de l'infection. La fenêtre diagnostique sera vraisemblablement beaucoup plus étroite dans les essais de détection d'un antigène/d'un agent pathogène que dans les titrages d'anticorps, la réponse immunitaire pouvant être mesurée sur une longue période. La dynamique de l'infection, à savoir aiguë, persistante, subaiguë, chronique ou à l'état de portage sont des facteurs déterminants pour les recommandations concernant le prélèvement. Ainsi, au cours d'une infection virale aiguë, les échantillons devraient être prélevés aussitôt que possible dès l'apparition des signes cliniques. Chez les animaux infectés de manière persistante, subaiguë, chronique ou chez les porteurs, la relation agent pathogène/hôte peut être en équilibre et l'agent peut être présent en concentrations infimes, difficiles à détecter. Au fil de l'évolution de la maladie, d'autres organes peuvent être touchés et différents tissus ou liquides peuvent devenir des cibles plus appropriées pour le prélèvement.

Caractéristiques de performance diagnostique

- Les critères utilisés pour déterminer les populations de référence positives et négatives sont-ils valables ?
- Les échantillons de référence représentent-ils fidèlement la population ciblée par l'essai ?
- Des difficultés ont-elles été rencontrées pour obtenir un nombre suffisant d'échantillons ? Si oui, comment le problème a-t-il été résolu ?

2.2. Populations d'animaux de référence

2.2.1. Animaux au « statut infectieux connu »

Selon la composition de l'ensemble d'échantillons positifs et négatifs de référence, le même test peut fournir différentes estimations de la SeD et de la SpD. Idéalement, la composition de cet ensemble d'échantillons et d'animaux de référence doit correspondre le plus possible aux échantillons attendus de la population cible pour laquelle le test a été mis au point. Il est important d'avoir une définition claire du cas. Il s'agit d'un ensemble de critères utilisés pour décider si un individu ou un groupe d'animaux est infecté ou non. Le statut de référence doit se rapporter à l'objectif des tests. S'il s'agit d'une utilisation comme test de dépistage pour détecter une infection précoce de fièvre aphteuse (p. ex. chez des bovins en liberté présentant des vésicules), la majorité des échantillons destinés à déterminer la SeD et la SpD doit provenir de cette population cible. Les informations importantes doivent être collectées et compilées pour

tous les animaux concernés à ce stade de la validation (espèce, âge, sexe, race) ainsi que pour les facteurs réputés avoir un effet sur la SeD et la SpD (date et lieu du prélèvement, statut immunologique, commémoratifs de vaccination et de maladie, tests pathognomoniques et indirects utilisés pour définir le statut des animaux, prévalence dans la population et description de la manière dont le statut de référence a été déduit).

Un échantillon d'un animal de référence négatif indique l'absence d'exposition ou d'infection par l'agent concerné. Ainsi, une population négative à la peste porcine classique définit une région ne présentant aucun cas clinique confirmé de la maladie au cours des dernières années dans les troupeaux de porcs, ce à quoi s'ajoutent des tests sérologiques et virologiques aux résultats négatifs pour les cas suspects. Les échantillons provenant de ces animaux remplissent les conditions du statut d'échantillon de référence négatif. La population de référence négative doit être soigneusement choisie, de façon à garantir qu'elle soit représentative et corresponde à la population de référence positive (p. ex. du point de vue de la race et de l'exposition à l'environnement).

Si une vaccination est entreprise, celle-ci peut interférer avec la détection de l'antigène (p. ex. lors de vaccination avec des vaccins viraux vivants modifiés). Les échantillons de ces animaux ne doivent pas être considérés comme des échantillons de référence négatifs.

Les types et les limites des étalons de référence couramment utilisés pour évaluer les caractéristiques de performance d'un nouvel essai sont énumérés ci-dessous. Une description détaillée de chaque étalon de référence figure au Chapitre 2.2.1, Section B.2.2.1 et dans les travaux de Jacobson (1998). Les points forts et les limites de ces étalons de référence doivent être soigneusement étudiés lors de l'utilisation d'échantillons provenant d'animaux issus de l'une des quatre catégories suivantes pour établir la SeD et la SpD de l'essai candidat (Jacobson, 1998).

- i) Étalon de référence absolu : présence de l'agent chez l'hôte ou preuve histopathologique irréfutable (pathognomonique).
- ii) Étalon de référence mixte : vérification des animaux non infectés ou non exposés.
- iii) Étalon de référence relatif : les animaux de référence sont classés selon leur statut infectieux par comparaison avec les résultats de test d'un autre essai de détection des antigènes ou de l'acide nucléique effectué sur les mêmes échantillons. Comme pour les titrages d'anticorps, les estimations de la SeD et de la SpD ne sont utiles que dans la mesure où le test de référence fait état de caractéristiques de performance documentées, établies et acceptables. L'inconvénient des étalons de référence relatifs est qu'ils présentent leurs propres taux de résultats FP et FN, dont les sources d'erreur seront englobées dans les estimations de la SeD et de la SpD du nouvel essai. En règle générale, toutefois, l'utilisation d'autres méthodes de test bien décrites est considérée comme une bonne manière de déterminer le statut des animaux de référence, mais seulement si le biais inhérent introduit par l'étalon de référence relatif est pris en compte.
- iv) Étalon de référence auxiliaire : infection expérimentale ou vaccination

Voir la Norme de validation de l'OMSA, Section B.2.3, pour les limitations importantes de ce type d'étalons. Note : dans le cadre de la détection des antigènes, les tests « comparatifs » doivent comprendre la détection de l'agent pathogène par isolement, culture, détection de l'acide nucléique, histopathologie ou par d'autres techniques *in situ*.

2.2.2. Modèles de structure latente pour la sélection des échantillons

Pour une description de cette méthode, voir la Norme de validation de l'OMSA, Section B.2.5, et le Chapitre 2.2.6.

2.3. Détermination des seuils (valeurs limites)

Il est important de décrire clairement la méthode et les échantillons utilisés pour choisir un seuil. Il est fortement recommandé de procéder à une analyse de la fonction d'efficacité du récepteur (ROC) pour montrer la performance potentielle du test dans d'autres circonstances épidémiologiques.

3. Étape 3 – Reproductibilité et estimation élargie de la répétabilité

L'évaluation de la reproductibilité des tests de détection des antigènes n'est pas fondamentalement différente des évaluations similaires pour d'autres types d'essais. C'est pourquoi le lecteur est invité à consulter la Norme de validation de l'OMSA, Section 3, pour plus de détails sur l'analyse de la reproductibilité et le Chapitre 2.2.6. pour les échantillons et panels de référence. L'OMSA propose des lignes directrices pour le contrôle des compétences des laboratoires (<https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-proposons/reseau-dexpertise/laboratoires-de-reference/#ui-id-5>).

4. Étape 4 – Mise en œuvre des programmes

4.1. Interprétation des résultats

Voir le Chapitre 2.2.1, Section B.4.1.

5. Suivi de la performance de l'essai

5.1. Suivi de l'essai

Une fois que les caractéristiques de performance du nouveau test ont été établies, un suivi continu, un entretien et des améliorations sont requises. Il est important de continuer à surveiller la répétabilité et la reproductibilité de l'essai au fil du temps, pour chaque cycle, les échantillons du contrôle qualité devant se situer dans les limites établies. Si ce n'était pas le cas, le résultat du test ne serait pas valide et le test devrait être répété. Le suivi de la performance des échantillons témoins du test sur la durée constitue un bon moyen de détecter des changements ou des tendances de l'essai. Une simple analyse des résultats (évaluation statistique des valeurs moyennes, écarts-types et coefficient de variation) est utile dans cette démarche, les résultats pouvant être reportés sur un graphique de contrôle. La participation à des contrôles de qualité externes ou à des programmes d'essais d'aptitude est utile pour identifier les erreurs aléatoires ou systématiques et pour démontrer la crédibilité des résultats. De plus amples informations à ce sujet peuvent être obtenues dans Crowther et al. (2006) et au Chapitre 2.2.1, Section B.5.1.

5.2. Modifications mineures de l'essai – remplacement des réactifs épuisés

Au fil du temps, des modifications du protocole de test peuvent être nécessaires en raison de l'existence de réactifs moins chers ou plus efficaces ou parce que l'analyte cible a changé. La variation des réactifs d'un lot à l'autre est considérée comme l'un des principaux facteurs de variation du test. Lorsque des réactifs comme les anticorps ou les antigènes doivent être remplacés, ils doivent être produits ou obtenus selon les mêmes protocoles ou critères que ceux utilisés pour les réactifs d'origine. La comparabilité des nouveaux réactifs biologiques (échantillons de contrôle, antigènes, anticorps de capture ou de détection, conjugués, produits chimiques ou consommables) doit être évaluée. Le Chapitre 2.2.8 *Comparabilité des épreuves suite à des changements introduits dans une méthode de test validée* fournit un résumé des études de comparabilité acceptables. Une règle de base consiste à ne jamais modifier plus d'un réactif à la fois afin d'éviter d'aggraver le problème en ayant à évaluer simultanément plus d'une variable (voir aussi Chapitre 2.2.1, Section B.5.2).

5.3. Modifications majeures de l'essai – changement pour un nouveau type d'ELISA

C'est un défi majeur du diagnostic de laboratoire que de suivre la nature en constante évolution des agents infectieux pathogènes. Au fil du temps, les agents pathogènes peuvent modifier leurs caractéristiques antigéniques et de nouvelles souches peuvent apparaître (p. ex. émergence du sérotype 8 du virus de la langue bleue en Europe du Nord en 2009). Une telle modification nécessite la mise au point complète d'un test ainsi qu'une étude de validation. Un autre changement majeur est l'utilisation d'un test chez une espèce différente de celle pour laquelle il a été validé à l'origine. Il peut ainsi s'avérer nécessaire d'utiliser un ELISA destiné à la détection des antigènes de la fièvre aphteuse, validé chez les bovins, pour les camélidés ou les buffles dans des régions géographiques et climatiques différentes. L'évaluation des échantillons de référence représentant ces populations selon l'étape 2 de la Figure 1 de la Norme de validation de l'OMSA permettra de répondre à ces exigences (voir aussi le Chapitre 2.2.1, Section B.5.3).

5.4. Augmenter la confiance dans les critères de validation

En raison du vaste ensemble de variables ayant un effet sur la performance des essais de détection des antigènes, il est utile d'augmenter autant que possible le nombre de sérums de référence, en partant du principe que l'erreur diminue avec l'augmentation de la taille de l'échantillon (voir aussi Chapitre 2.2.1, Section B.5.4).

RÉFÉRENCES

CROWTHER J.R. (2001). The ELISA guidebook. *In: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 1–421.

CROWTHER J.R., UNGER H. & VILJOEN G.J. (2006). Aspects of kit validation for tests used for the diagnosis and surveillance of livestock diseases: producer and end-user responsibilities. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **25**, 913–935.

GREINER M., BHAT T.S., PATZELT R.J., KAKAIRE D., SCHARES G., DIETZ E., BÖHNING D., ZESSIN K.H. & MEHLITZ D. (1997). Impact of biological factors on the interpretation of bovine trypanosomosis serology. *Prev. Vet. Med.*, **30**, 61–73.

JACOBSON R.H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17**, 469–486.

WRIGHT P.F. (1998). International standards for test methods and reference sera for diagnostic tests for antibody detection. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17**, 527–533.

*
* *

N. B. : ADOPTE POUR LA PREMIERE FOIS EN 2014