

Lignes directrices de l'OIE

Réactifs sérologiques de référence internationaux destinés au titrage des anticorps

1. Introduction

1.1. Objet

Le présent document fournit des lignes directrices applicables à la préparation, à la validation et à la distribution d'anticorps en tant que réactifs internationaux de référence destinés au titrage des anticorps pour le dépistage des maladies infectieuses des animaux. Dans ces lignes directrices, le terme « réactifs » désigne les anticorps sauf indication contraire. Ces préparations sont désignées par l'OIE en tant que réactifs de référence primaires et doivent être utilisées parallèlement aux épreuves décrites dans le *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres* de l'OIE.

1.2. Définitions

1.2.1. Protocole d'épreuve standard

Protocole d'épreuve standard désigne une procédure validée, acceptée à l'échelle internationale, souvent une « épreuve prescrite de l'OIE pour les échanges internationaux », qui est décrite dans le *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres* de l'OIE.

1.2.2. Réactif de référence international

L'expression « réactif de référence international » est synonyme de « réactif de référence primaire » et désigne le réactif par rapport auquel tous les autres sont comparés et calibrés.

1.2.3. Réactifs secondaires et réactifs de travail

Les réactifs secondaires sont préparés par comparaison directe avec le réactif de référence international ; ils doivent autant que possible reproduire les mêmes caractéristiques que celles de l'étalon primaire lors de son utilisation dans le cadre du Protocole d'épreuve standard. Un réactif secondaire sera classiquement préparé par un Laboratoire national de référence et sera désigné en tant que réactif national ou local.

Les réactifs de travail peuvent être synonymes des réactifs secondaires ou être des réactifs tertiaires calibrés par rapport au réactif secondaire. Les réactifs de travail doivent être disponibles en quantités suffisantes pour que les laboratoires de diagnostic puissent les utiliser pour standardiser les tests de routine quotidiens.

1.3. Champ d'application

Les réactifs de référence internationaux sont nécessaires pour assurer qu'une épreuve de titrage des anticorps est capable de mesurer la réponse humorale à un niveau spécifié de sensibilité diagnostique. La sensibilité diagnostique correspond au risque d'apparition de faux négatifs lors d'un titrage d'anticorps, quand un animal est ou a été infecté. Les réactifs de référence internationaux sont normalement destinés à être utilisés par les laboratoires de référence internationaux, nationaux et autres pour l'étalonnage des épreuves standard et comme modèles pour la production de réactifs secondaires. Le réactif secondaire ou un autre réactif de travail doit être utilisé quotidiennement pour normaliser l'épreuve, ce qui n'est pas le cas du réactif standard international.

Pour un nombre limité de maladies, un accord international a été passé concernant un système d'« Unités internationales » caractérisant l'activité anticorps. Dans ces cas, les réactifs de

référence internationaux définissent l'échelle de ces unités. Pour la grande majorité des maladies animales, un tel système n'existe pas et les systèmes de dosage, les réactifs de travail et les échantillons à tester sont définis par rapport aux réactifs de référence internationaux.

1.4. Méthode

Pour la plupart des dosages, trois réactifs de référence primaires doivent être créés : fortement positif, faiblement positif et négatif. Trois réactifs doivent être sélectionnés et caractérisés par un Laboratoire de référence désigné en utilisant un Protocole d'épreuve standard agréé et des réactifs acceptés à l'échelle internationale.

Le réactif faiblement positif est essentiel pour fournir l'assurance de la sensibilité diagnostique de l'épreuve. Pour les épreuves non quantitatives (par ex., immunodiffusion) le réactif de référence faiblement positif peut être le seul réactif positif requis.

Pour les épreuves quantitatives qui ne sont pas des dosages, telles que l'épreuve ELISA indirecte, le réactif fortement positif doit définir un niveau arbitraire de 100 % de positivité. Les réactifs faiblement positif et négatif doivent alors être associés à un pourcentage de positivité proportionnelle correspondant à leur réactivité au moment de leur utilisation dans le protocole d'épreuve standard.

Les Laboratoires de référence de l'OIE qui produisent un réactif international de référence devraient assurer la liaison avec d'autres Laboratoires de référence de l'OIE, en particulier ceux désignés pour la même maladie, dans le but d'organiser un système inter-laboratoire pour améliorer la cohérence des résultats entre les laboratoires participants. La réalisation d'un test de compétence donnerait une valeur ajoutée au réactif international de référence, assurerait l'harmonisation entre les laboratoires et favoriserait la mise en réseau et la coopération entre les centres de référence de l'OIE.

2. Sélection des matériels utilisés comme réactifs

2.1. Types de matériels

La majorité des réactifs de référence internationaux seront préparés à partir de sérum sanguin. Celui-ci doit être exempt d'hémolyse et ne doit pas présenter une lipémie excessive. Les antisérums doivent autant que possible être produits chez des animaux indemnes de certains agents pathogènes ou chez des animaux gnotobiotiques d'une espèce adaptée à l'épreuve à standardiser. D'autres matériels, par exemple du lait écrémé ou des anticorps monoclonaux, peuvent être utilisés le cas échéant pour l'épreuve à standardiser.

2.2. Sécurité

Les réactifs de référence doivent être préparés de manière à ce qu'ils soient exempts de matériels infectieux. Pour faciliter le transport entre pays il est recommandé que les réactifs à l'état frais soient soit traités par la BEI (bromoéthylèneimine) soit irradiés à la dose de 25–30 kilograys (2,5-3,0 Mrad) en maintenant les échantillons à une température de -78°C . L'irradiation des échantillons lyophilisés n'est pas préconisée puisque la dose recommandée peut ne pas suffire pour inactiver complètement les agents pathogènes. Après traitement, les échantillons doivent être soumis à des tests d'innocuité appropriés pour s'assurer qu'ils sont indemnes d'agents vivants détectables. Les sérums provenant de bovins doivent être issus d'une source indemne d'ESB.

2.3. Réactifs de référence positifs

Les réactifs de référence positifs doivent être sélectionnés à partir d'animaux qui présentent une réponse immunitaire humorale typique (anticorps) vis-à-vis du micro-organisme en question. Les animaux hyperimmuns ne sont pas considérés comme typiques et doivent si possible être évités. La réponse immunitaire peut être déclenchée par une infection expérimentale ou par une

vaccination. Le moment choisi après la vaccination pour le recueil du matériel doit être déterminé par la réponse de l'animal mesuré par le protocole d'épreuve standard. Ce choix peut varier en fonction de la nature de la maladie et de l'épreuve. Tous les détails concernant le calendrier de vaccination et la nature de l'immunogène doivent être fournis afin de pouvoir préparer les réactifs secondaires selon des méthodes équivalentes. Les réactifs doivent être exempts d'anticorps dirigés contre des micro-organismes susceptibles de produire une réaction croisée dans l'épreuve standard ou alors des informations relatives à cette réaction croisée doivent être fournies. Le réactif peut être issu d'un animal unique ou d'un pool d'échantillons obtenus à partir de plusieurs animaux. Exceptionnellement, des animaux naturellement infectés peuvent être utilisés comme source du réactif lorsqu'une vaccination contrôlée ou une infection n'est pas réalisable.

2.4. Réactifs de référence négatifs

Les réactifs de référence négatifs doivent être sélectionnés à partir d'animaux qui n'ont jamais été ni exposés au micro-organisme en question ni vaccinés contre celui-ci. Ils doivent être exempts d'anticorps dirigés contre des micro-organismes susceptibles de produire des réactions croisées avec l'épreuve standard. Le réactif négatif peut être produit à partir d'un sérum unique ou d'un pool de sérums.

3. Caractéristiques des réactifs de référence internationaux

3.1. Réactif de référence fortement positif

Pour des épreuves telles que la fixation du complément, la neutralisation virale ou la méthode ELISA indirecte qui produisent des courbes dose-réponse de forme sigmoïde typique, le réactif de référence fortement positif doit présenter une activité anticorps située sur la portion linéaire de la courbe juste sous la phase de plateau. Dans d'autres épreuves, le réactif de référence fortement positif doit contenir suffisamment d'anticorps pour produire systématiquement la réaction maximale au sein des limites choisies de l'épreuve, par ex., arc de précipitation bien net dans une épreuve d'immunodiffusion ou 100 % d'inhibition dans une technique ELISA de compétition / inhibition.

3.2. Réactif de référence faiblement positif

Le réactif de référence faiblement positif doit présenter une activité anticorps qui se situe sur la portion linéaire de la courbe juste au-dessus du seuil positif/négatif. La réaction produite ne doit jamais être équivoque. Dans d'autres épreuves, le réactif de référence faiblement positif doit contenir suffisamment d'anticorps pour produire systématiquement la réaction minimale détectable, par ex., un arc de précipitation peu marqué mais sans équivoque dans une épreuve d'immunodiffusion. Pour les méthodes de compétition/inhibition qui présentent souvent une transition nette du positif au négatif, la sélection du réactif faiblement positif peut être particulièrement difficile. Les mêmes principes s'appliquent, dans la mesure où le réactif doit produire une réponse positive systématique, juste au-dessus du seuil positif/négatif, dans le Protocole d'épreuve standard.

3.3. Réactif de référence négatif

Ce réactif doit toujours produire une réaction au-dessous du seuil positif/négatif dans le Protocole d'épreuve standard. La réaction produite ne doit jamais être équivoque.

4. Préparation des réactifs de référence

4.1. Constitution des réactifs

Les réactifs de référence positifs doivent si possible être préparés à partir de matériels présentant le niveau de réactivité souhaité sans dilution ultérieure. Cependant, il est souvent nécessaire que

le Laboratoire de référence réalise une dilution unique d'un sérum positif dans le sérum négatif pour obtenir le niveau souhaité de réactivité comme décrit au point (3) ci-dessus. Dans ces cas, le réactif de référence faiblement positif peut être obtenu à partir du même stock de sérum positif que le réactif de référence fortement positif.

Un réactif de référence international ne doit exiger de la part du laboratoire de destination aucune manipulation particulière (par ex., prédilution) avant son utilisation dans l'épreuve en question. Le réactif doit être testé comme le serait tout échantillon prélevé sur le terrain dans des conditions de routine (comprenant les étapes de dilution qui font partie de la procédure de l'épreuve de dosage). Cette condition empêche la survenue d'une erreur ou d'un biais lié à une manipulation particulière ou à la préparation. Par conséquent, le degré d'activité anticorps dans un réactif de référence positif doit s'inscrire dans les limites exactes de détection de l'épreuve de diagnostic.

4.2. Stabilité et stockage

Tous les matériels doivent être stockés congelés ou réfrigérés en attendant l'évaluation. Il faut éviter les cycles répétés de congélation-décongélation. Pour en garantir la stabilité, il est recommandé que le réactif final, après traitement de l'échantillon visant à inactiver les agents adventices, soit lyophilisé, et il serait intéressant de fournir le diluant stérile servant à la reconstitution du matériel, avec le réactif lyophilisé. Des ampoules scellées en verre, plutôt que des bouchons en caoutchouc sont préférables pour le stockage à long terme. Les stocks lyophilisés doivent être entreposés à 4 °C, bien que les courts séjours à température ambiante (par ex., pendant le transport) ne devraient pas avoir d'effets néfastes. Le processus de lyophilisation peut modifier la qualité biologique des sérums ; la solution de rechange recommandée est le stockage des réactifs dans des cryotubes à -78 °C.

Après lyophilisation, plusieurs flacons contenant le réactif doivent être reconstitués et réévalués. On ne doit trouver aucune preuve de la présence d'anticorps entraînant une réaction croisée ni de l'existence d'autres facteurs non spécifiques susceptibles de perturber l'interprétation des résultats du dosage. En cas de possibilité de réaction croisée avec des agents étroitement apparentés, cette information doit être mentionnée.

4.3. Contrôle des lots

Le matériel de référence d'origine doit initialement constituer un stock unique suffisant pour durer 5 ans au moins. Il peut être conservé congelé (de préférence à une température de -70 °C ou inférieure) et un lot peut être lyophilisé en vue d'un approvisionnement pour 2 ans au minimum (environ 500 tests). Pour chaque lot, congelé ou lyophilisé, des références de lot doivent être attribuées et des données complètes de contrôle de qualité doivent être conservées.

Chaque lot lyophilisé doit être réétalonné. Chaque flacon ou ampoule doit contenir 0,5–1 ml.

4.4. Étiquetage

L'étiquette doit contenir les informations minimales suivantes : logo de l'OIE ; réactif de référence international de l'OIE pour (épreuve) de dépistage de (maladie) ; préciser la nature du réactif : fortement positif, faiblement positif ou négatif ; nom du Laboratoire de référence ; méthode de reconstitution ; conditions de stockage. L'espace disponible sur l'étiquette peut empêcher l'insertion de tous ces éléments d'information ; il est possible d'utiliser des abréviations et il peut être nécessaire de consigner certaines informations sur la fiche technique au lieu de les rapporter sur l'étiquette.

4.5. Fiches techniques

Les Laboratoires de référence de l'OIE produisant des sérums standards de référence internationale doivent veiller à ce que toutes les portions aliquotes soient accompagnées d'une Fiche technique appropriée. Il doit être clairement signifié aux laboratoires demandeurs que les réactifs de référence internationaux sont destinés à être utilisés pour l'étalonnage de leur propre méthode de dosage et pour favoriser l'harmonisation internationale.

Pour qu'un laboratoire de diagnostic puisse préparer un réactif de référence secondaire pour son propre usage, il sera nécessaire que le Laboratoire de référence de l'OIE fournisse des données spécifiques sur la sélection et/ou la préparation des réactifs de référence primaires. Cela vaut en particulier dans le cas où les réactifs de référence primaires ont été préparés par dilution de sérums fortement positifs ou hyperimmuns dans des sérums négatifs.

4.5.1. Données requises

La fiche technique doit reproduire toutes les informations spécifiées pour l'étiquetage (voir 4.4). Les informations suivantes doivent également être fournies afin de faciliter la sélection et/ou la préparation des réactifs de référence secondaires qui reproduisent aussi fidèlement que possible le réactif de référence primaire.

- i) Description de l'animal donneur du sérum positif et négatif, y compris espèce, âge, statut reproducteur et origine (production naturelle, exempt d'agent pathogène spécifique, gnotobiotique, etc.).
- ii) Nature de la réponse humorale, c-à-d à l'infection naturelle, infection expérimentale, vaccination, etc.
- iii) Informations sur le micro-organisme utilisé pour obtenir la réponse immunitaire, c-à-d source, souche, sérotype, etc.
- iv) Informations sur les protocoles d'infection expérimentale ou de vaccination, c-à-d mode, dose, programmes de vaccination, méthode et moment du prélèvement des échantillons etc.
- v) Tests de référence utilisés pour sélectionner les sérums candidats positifs et négatifs et pour caractériser la réponse humorale, par ex., ELISA, immunodiffusion en gélose, neutralisation virale, etc.
- vi) Échantillon de profils de titration des sérums hyperimmuns et critères de sélection des dilutions appropriées d'activité définie.
- vii) Présence d'anticorps hétérologues, s'ils sont connus, et épreuves utilisées pour leur détection.
- viii) Informations sur les tests d'innocuité effectués sur les matériels
- ix) Une déclaration attestant que le réactif est uniquement destiné à un usage in vitro.
- x) Description des méthodes de stérilisation, y compris type d'irradiation et dose ; état de l'échantillon au moment de la stérilisation (liquide, congelé, lyophilisé, etc.).
- xi) Numéro de lot et date de production.
- xii) Reconstitution (type de liquide de reconstitution et volume), manipulation et conditions de stockage recommandés.
- xiii) Nom et coordonnées complètes, télécopie et courriel du Laboratoire de référence en tant que source d'informations complémentaires.

5. Approbation des réactifs de référence par l'OIE

Un Réactif de référence international ne peut pas être diffusé sous le nom de l'OIE à moins d'avoir été approuvé par la Commission des normes biologiques de l'OIE agissant sous l'autorité du Comité international de l'OIE.

Les données techniques et statistiques complètes sur l'évaluation des réactifs de référence candidats, ainsi que les informations complètes contenues dans les fiches techniques comme indiqué plus haut, doivent être soumises à l'OIE. La Commission des normes biologiques de l'OIE examinera les informations. En cas d'approbation par la Commission des normes, le réactif de référence sera ajouté à la liste des Réactifs de référence internationaux disponibles. La liste sera fournie à tous les Pays Membres de l'OIE sur demande, elle figure également sur le site web de l'OIE (<http://www.oie.int>).

6. Bibliographie

BAHNEMANN H.G. (1975). Bromine ethyleneimine as an inactivant for foot and mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, **47**, 47–56.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO, Geneva, Switzerland.

WRIGHT P.F. (1998). International standards for test methods and reference sera for diagnostic tests or antibody detection. *In: Veterinary Laboratories for Infectious Diseases*, Pearson J.E., ed. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17** (2), 527–533.
