

Lignes directrices de l'OIE

Réactifs Sérologiques de Référence Internationaux Destinés à la Détection de l'antigène

1. Introduction

1.1. Objectif

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

1.2. Définitions

1.2.1. Protocole d'épreuve standard

Protocole d'épreuve standard désigne une procédure validée, acceptée à l'échelle internationale, et référencée dans le *Manuel terrestre* 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 normaliser les tests de routine quotidiens.

1.3. Champ d'application

Les réactifs de référence internationaux sont nécessaires pour s'assurer qu'une épreuve de détection de l'antigène est capable de mesurer l'activité antigénique à un niveau spécifié de sensibilité diagnostique. La sensibilité diagnostique correspond au risque d'apparition de faux négatifs lors du test de détection de l'antigène, alors que l'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.

Certains tests de détection de l'antigène peuvent recourir à des échantillons de diagnostic provenant directement d'un cas suspect, alors que d'autres tests font appel à une mise en culture préalable de l'agent, *in vivo* ou *in vitro* (voir le tableau à la fin de ce document).

Pour un nombre limité de maladies, un accord international a été passé concernant un système d'« Unités internationales » caractérisant l'activité antigénique. 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 d'épreuve, 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 tests, 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 une procédure opératoire standard (POS) agréée 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 certains tests non quantitatifs (par exemple les tests d'immunofluorescence, les tests d'agglutination et les tests immuno-histochimiques), les seuls réactifs de référence nécessaires sont les réactifs faiblement positifs.

Pour les épreuves quantitatives qui ne sont pas des dosages (par exemple les immuno-essais dont les dispositifs à flux latéral, la technique rapide ELISpot et l'épreuve immuno-enzymatique de capture de l'antigène [Ag ELISA]), le réactif de référence fortement positif doit définir un pourcentage de positivité fixé arbitrairement à 100 %. 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 d'antigène purifié en infectant des cellules permissives (sensibles à une infection productive) avec le virus, en infectant des animaux de laboratoire avec l'agent pathogène approprié ou en utilisant des préparations de protéines recombinantes (antigène). Celles-ci seront purifiées par chromatographie sur colonne et la pureté du composé sera vérifiée par spectrométrie de masse afin d'obtenir une préparation antigénique homogène exempte de protéines contaminées. Plusieurs méthodes de concentration de l'antigène sont possibles, dont la lyophilisation et l'ultrafiltration. Dans la mesure du possible, les virus et les virus recombinants (y compris les pseudo-particules virales) préparés en culture cellulaire doivent être cultivés dans un milieu de croissance indemne de protéines sériques d'origine animale. Si des sérums de bovins doivent être utilisés, ils doivent provenir d'une source indemne d'ESB. Les antigènes doivent autant que possible être produits à partir d'animaux indemnes d'agents pathogènes spécifiques ou d'animaux gnotobiotiques d'une espèce adaptée à l'épreuve à normaliser.

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 traités par une méthode validée permettant d'inactiver l'agent pathogène sans compromettre sa capacité à réagir au test. Par exemple, les réactifs peuvent être traités par la BEI

(bromoéthylèneimine) ou 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 l'agent pathogène. Après traitement, les échantillons doivent être soumis à des tests d'innocuité appropriés conformément aux recommandations du chapitre 1.1.9 – *Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques* du *Manuel terrestre* pour s'assurer qu'ils sont indemnes d'agents vivants détectables.

2.3. Réactifs de référence positifs

Les réactifs de référence positifs sélectionnés doivent si possible provenir de cultures ou d'animaux de laboratoire infectés. Le moment choisi après l'inoculation pour la collecte du matériel doit être déterminé par la réplication de l'agent pathogène en culture ou *in vivo*, mesurée par le protocole d'épreuve standard. Ce choix peut varier en fonction de la pathogénie de la maladie et de l'épreuve. Les informations détaillées concernant le calendrier de l'inoculation et la nature de l'inoculum doivent être fournies afin de pouvoir préparer les réactifs secondaires selon des méthodes équivalentes. Les réactifs doivent être exempts d'antigène et de 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 inoculation ou une infection contrôlée n'est pas réalisable.

2.4. Réactifs de référence négatifs

Les réactifs de référence négatifs doivent provenir de cultures non infectées ou être sélectionnés à partir d'animaux qui n'ont jamais été exposés à l'agent pathogène en question ni vaccinés contre celui-ci. Ils doivent être exempts d'antigènes d'autres agents pathogènes susceptibles de produire des réactions croisées avec l'épreuve standard. Le réactif négatif peut être produit à partir d'un échantillon unique ou d'un pool d'échantillons.

3. Caractéristiques des réactifs de référence internationaux

3.1. Réactif de référence fortement positif

Pour les immuno-essais qui produisent des courbes dose-réponse de forme sigmoïde typique, le réactif de référence fortement positif doit présenter une activité antigénique 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'antigène pour produire systématiquement la réaction maximale au sein des limites choisies de l'épreuve, par ex., un 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 antigénique 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'antigène 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'une préparation d'antigène positif dans une solution tampon appropriée 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 d'antigène 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, ou toute culture, dans des conditions de routine (comprenant les étapes de dilution qui font partie de la procédure de l'épreuve). 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 antigénique 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 visant à inactiver l'échantillon, 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 de l'antigène ; 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'antigène entraînant une réaction croisée ni de l'existence d'autres facteurs non spécifiques susceptibles de perturber l'interprétation des résultats du test. 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 réactifs de référence internationaux 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 test 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.

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 la culture ou de l'animal donneur d'où provient la préparation antigénique, y compris espèce, âge, statut reproducteur et origine (production naturelle, exempt d'agent pathogène spécifique, gnotobiotique, etc.).
- ii) Informations sur l'agent pathogène utilisé, à savoir : source, souche, sérotype, etc.
- iii) Informations sur le protocole d'infection expérimentale, c.-à-d. mode, dose, programmes de vaccination, méthode et moment du prélèvement des échantillons etc.
- iv) Description du milieu de croissance, des durées d'incubation et des températures pour la préparation des cultures de l'agent pathogène.
- v) Tests de référence utilisés pour sélectionner les antigènes candidats positifs et négatifs, par exemple Western Blot (immunotransfert), épreuve d'immunodiffusion en gélose.
- vi) Échantillon de profils de titration des préparations antigéniques et critères de sélection des dilutions appropriées d'activité définie.
- vii) Présence d'antigènes 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 recommandées.
- 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 de l'Assemblée mondiale 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 fournies. 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

BALAMURUGAN V., VENKATESAN G., SEN A., ANNAMALAI L., BHANUPRAKASH V. & SINGH R.K. (2010). Recombinant protein-based viral disease diagnostics in veterinary medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **10**, 731–753. doi: 10.1586/erm.10.61. (article d'analyse).

CHRISTOPHER-HENNINGS J., ARAUJO K.P., SOUZA C.J., FANG Y., LAWSON S., NELSON E.A., CLEMENT T., DUNN M. & LUNNEY J.K. (2013). Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **25**, 671–791. doi: 10.1177/1040638713507256. Epub 2013 Oct 23. (article d'analyse).

.../Annexe

Annexe

Tableau : Principes des épreuves de détection de l'antigène

Méthode	Échantillons	Observations	Caractéristiques
Épreuves immuno-enzymatiques, par ex. épreuve immuno-enzymatique de capture de l'antigène	Tissus, cellules	Identification de l'antigène par la réaction en présence d'un anticorps dont la spécificité est connue	Rapides, sensibles et spécifiques, par exemple épreuve immuno-enzymatique de capture de l'antigène
Immunochromatographie, immuno-marquage à l'or	Sang, sécrétions et excréments	Identification de l'antigène par la réaction en présence d'un anticorps dont la spécificité est connue	Rapides, sensibles et spécifiques, par ex. dispositifs à flux latéral
Immunofluorescence	Tissus, cellules	Identification <i>in situ</i> de l'antigène par la réaction en présence d'un anticorps dont la spécificité est connue	Rapides, sensibles et spécifiques, par ex. test aux anticorps fluorescents
Immunohistochimie	Tissus, cellules	Identification <i>in situ</i> de l'antigène par la réaction en présence d'un anticorps dont la spécificité est connue	Lentes, mais sensibles et spécifiques; techniquement contraignantes, réservées aux laboratoires spécialisés en histologie et anatomie pathologique
Microscopie immuno-électronique	Tissus, cellules	Formation d'agrégats de l'agent en présence d'un anticorps spécifique dont la spécificité est connue	Rapides, sensibles et spécifiques, par ex. prolongement du diagnostic en microscopie électronique ; techniquement contraignantes, réservées aux laboratoires spécialisés en microscopie
Épreuves radio-immunologiques	Tissus, cellules	Identification de l'antigène par la réaction en présence d'un anticorps dont la spécificité est connue	Nécessitent des équipements et des réactifs sophistiqués
Épreuve d'agglutination au latex	Prélèvements tissulaires, cellules	Identification de l'antigène par la réaction en présence d'un anticorps dont la spécificité est connue	Pas de sensibilité et sujettes à des réactions non spécifiques, par exemple le test d'agglutination sur lame
Immunodiffusion	Prélèvements tissulaires, cellules	Identification de l'antigène par la réaction en présence d'un anticorps dont la spécificité est connue	Pas de sensibilité et sujettes à des réactions non spécifiques ; simplicité

Tableau modifié à partir de : *Veterinary Virology*, 3^e édition, Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C. & Studdert M.J. (édit.), publié en 1999, Academic Press, San Diego, Californie, États-Unis d'Amérique.