

## CHAPITRE 2.2.1.

# MISE AU POINT ET OPTIMISATION DES METHODES DE DETECTION DES ANTICORPS

---

### 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 des anticorps produits en réponse aux agents infectieux ou à leurs composants constitue un moyen indirect de diagnostiquer une maladie en laboratoire. Les méthodes les plus courantes de détection des anticorps comprennent les tests de neutralisation virale classiques (TNV), les dosages immuno-enzymatiques (ELISA), les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) et les tests de fixation du complément (TFC). D'autres tests de détection des anticorps, moins courants, comprennent l'immunodiffusion sur gélose (IDG), le test d'immunofluorescence indirecte (IFI), le test de séro-agglutination (SAT), le test d'agglutination du latex (LAT) et le test de micro-agglutination (MAT). De nouvelles méthodes plus récentes incluent les biocapteurs, la bioluminométrie, la polarisation de la fluorescence, la chimioluminescence et les dispositifs de flux latéral également connus comme tests au chevet du patient ou tests sur le terrain. Les essais immunologiques qui utilisent des anticorps pour détecter des antigènes sont décrits au Chapitre 2.2.2.*

*Lorsque l'on envisage un type d'essai candidat pour le diagnostic d'une maladie, il faut inclure les essais de détection des anticorps en raison de leur commodité, de la facilité du prélèvement et de la préparation des échantillons, de leurs caractéristiques de performance généralement bonnes, de leur aptitude à l'automatisation (débit élevé), de leur coût bas et de leur temps d'exécution court. Ils sont particulièrement utiles pour traiter de grands nombres d'échantillons dans les études épidémiologiques ou de population ou pour le diagnostic de masse et les programmes de surveillance. Les tests de détection des anticorps sont également largement utilisés pour l'exportation, l'importation et le commerce des animaux et continuent à représenter la majorité des tests recommandés par l'OMSA pour les échanges internationaux.*

*Une caractéristique des épreuves de détection des anticorps est leur capacité à signaler une exposition antérieure à un agent infectieux en l'absence de microorganismes détectables ou de leurs analytes. Ils sont également très adaptables à une multitude de matrices tels le sérum, le plasma, le sang total, le lait, les sécrétions lacrymales ou la salive. Les isotypes d'immunoglobulines ou les systèmes de test spécifiques aux sous-classes peuvent cibler sélectivement les réponses immunitaires précoces ou tardives, soit respectivement les IgM ou les IgG. Des systèmes de détection spécialement conçus pour distinguer les réponses aux vaccins et les réponses aux souches de terrain existent en kits commerciaux, par exemple un test de détection des anticorps au virus de la peste porcine classique chez les porcs. Des techniques compétitives ou de blocage permettent l'utilisation du même essai de base pour une multitude d'espèces animales alors que d'autres techniques sont spécifiques à une espèce. De nombreux types d'indicateurs chimiques ou physiques sont utilisés pour signaler la présence d'anticorps spécifiques dans un échantillon (chromogènes, fluorochromes, agglutinines, entre autres). Au vu du grand nombre de méthodes de détection des anticorps disponibles, il n'est pas possible de décrire les bonnes pratiques de validation pour chacun de ces types d'essai dans le présent chapitre. Le système de détection des anticorps le plus largement utilisé, l'ELISA, servira donc d'exemple pour l'application des bonnes pratiques dans les essais de détection des anticorps. La plupart des processus de base utilisés pour*

valider d'autres types de systèmes d'essais s'imposera naturellement par extrapolation de ceux utilisés pour valider les tests ELISA.

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

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

Le premier élément à prendre en compte lors de la mise au point d'un essai est de définir clairement l'objectif spécifique et l'utilisation du test à développer. De nombreuses décisions intervenant en cours de développement reposeront sur ces premières réflexions. Pour les essais de détection des anticorps (désignés ci-après par « titrage des anticorps ») comme les tests ELISA, ces connaissances orienteront le choix vers le type de système de détection des anticorps le plus adéquat pour atteindre l'objectif prévu. Plusieurs facteurs relatifs à l'objectif prévu du test, comme son utilisation et son adéquation, doivent être pris en compte (voir la Norme de validation de l'OMSA pour d'autres objectifs possibles).

Les six objectifs de base prévus pour les tests diagnostiques sont définis dans la Norme de validation de l'OMSA et énumérés dans la note de bas de page du tableau 1 ci-dessous. Comme les titrages d'anticorps ont un large éventail d'applications et qu'ils peuvent être configurés pour des objectifs très spécifiques, il est utile de prendre en compte et d'évaluer plusieurs paramètres lorsqu'il s'agit de définir le ou les objectifs spécifiques pour le test candidat. Le Tableau 1 résume les caractéristiques des titrages d'anticorps lorsqu'ils sont appliqués pour différents objectifs. La prise en compte de ces caractéristiques fournira une orientation pour définir les objectifs spécifiques auxquels chaque essai candidat sera adapté.

Note – Il est conseillé au lecteur de lire la Section B.4. Mise en œuvre des programmes comme point de départ aux discussions qui suivent. Cette section décrit les relations d'interdépendance entre la sensibilité et la spécificité diagnostiques, entre les erreurs de test faux positifs et faux négatifs ainsi qu'entre les valeurs prédictives positives et négatives. Pour une discussion plus détaillée des valeurs prédictives en fonction de la prévalence, voir Jacobson, 1998.

Tableau 1. Facteurs déterminants de l'adéquation d'un titrage d'anticorps 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)	+	+	+	+	+++	+	+++
Valeur prédictive positive (VPP)	+	+	+	+	+++	+	+++
Valeur prédictive négative (VPN)	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
Capacité de débit	+	+++	++	+	-	++	++
Temps d'exécution du test	+	+	+	+	+++	-	+
Aptitude à l'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.

**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 les objectifs 1a et 1b (Tableau 1), les tests de dépistage des anticorps d'une sensibilité diagnostique élevée (SeD) constituent les tests à privilégier. Comme mentionné dans les objectifs ci-dessus, ces tests seront appliqués à des populations ayant une prévalence apparente de zéro. Les tests d'une SeD élevée montrent un taux de faux négatifs (FN) bas et lorsqu'ils ont été appliqués à des populations où la prévalence est basse, leur valeur prédictive négative (VPN) est à son maximum. Toutefois, la SeD et la spécificité diagnostique (SpD) sont en général inversement proportionnelles, une baisse de la SpD se traduisant par un taux de faux positifs (FP) élevé. Dans les cas où un volume constamment élevé d'échantillons de surveillance doit être traité, il faudra rechercher un débit élevé, un coût faible et la simplicité technique du test. Tous les résultats positifs du test de dépistage doivent faire l'objet d'un test de confirmation pour évaluer leur statut véritable. Les tests de confirmation ont typiquement 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.

S'il s'agit de démontrer l'absence d'infection après un foyer lors duquel la vaccination a été utilisée pour lutter contre la maladie, le dépistage d'un grand nombre de sérums est alors souvent requis. En plus des considérations ci-dessus, cela nécessitera des titrages d'anticorps à même de faire la distinction entre animaux infectés et animaux vaccinés (p. ex. un test DIVA [différenciation des animaux infectés et des animaux vaccinés]). Un test simultané de détection des antigènes ou de l'acide nucléique peut se justifier dans certaines situations pour prouver que l'excrétion et/ou la circulation de l'agent infectieux ont cessé.

### 1.2. Objectif 2

Si l'objectif est de déterminer le statut des animaux à titre individuel pour les déplacements internationaux, les tests de dépistage des anticorps d'une SeD élevée représentent à nouveau les tests à privilégier. Les mêmes réflexions que celles mentionnées plus haut s'appliquent concernant la VPN. À nouveau, tous les résultats positifs devront faire l'objet d'un test de confirmation pour évaluer leur statut véritable ou être exclus de la cargaison sans analyse complémentaire. Dans les cas positifs limites, il peut être judicieux de répéter le prélèvement sur l'animal ou les animaux à un intervalle adéquat afin de s'assurer qu'il ne s'agissait pas d'une infection très récente du troupeau/cheptel.

### 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 anticorps d'une SeD moyenne à élevée représentent 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, 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 moyen d'erreur est admissible. Selon la nature de la maladie et la vitesse 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 les objectifs 1 et 2, les résultats positifs doivent faire l'objet d'un test de confirmation pour évaluer leur véritable statut. Au cours de ces stades ultérieurs, les titrages d'anticorps sont souvent faits en conjonction avec des systèmes de détection des antigènes et/ou de l'acide nucléique afin de détecter les cas subcliniques et les éventuels porteurs latents.

### 1.4. Objectif 4

Pour le diagnostic de confirmation des cas cliniques, les titrages d'anticorps d'une SpD élevée représentent les tests préférés. Dans ce cas, l'idée est de minimiser le taux de FP et de renforcer la VPP du test. En règle générale, l'infection est alors bien établie et la réponse immunitaire bien engagée. Dans certaines situations, il peut être préférable d'effectuer un test de dépistage d'une SeD élevée mais d'une SpD basse, suivi d'un test de confirmation d'une SpD élevée pour les résultats positifs. Dans certains cas cliniques, comme les maladies vésiculaires des animaux terrestres par exemple, plusieurs tests peuvent être requis pour exclure les agents pathogènes dont le tableau clinique est similaire.

Dans d'autres cas, les tests de détection des antigènes et/ou de l'acide nucléique peuvent constituer un meilleur choix pour la confirmation des cas cliniques, pour autant qu'ils aient un temps d'exécution court. 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.

### 1.5. Objectif 5

Pour estimer la prévalence d'une infection ou d'une exposition afin de permettre l'analyse du risque, par exemple pour les enquêtes sanitaires, pour déterminer le statut sanitaire des troupeaux ou pour suivre les mesures de lutte contre les maladies, les titrages d'anticorps d'une SeD et d'une SpD moyennes 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

Pour déterminer le statut immunitaire d'animaux à titre individuel ou de populations, par exemple après vaccination, des titrages d'anticorps d'une SpD élevée sont requis. Ce type de tests présente des taux très bas de FP et, de ce fait, fournit un degré de confiance élevé dans la VPP du résultat. Le test de neutralisation virale (TNV) en culture cellulaire pour la détection des anticorps neutralisants induits par la vaccination antirabique chez les chiens et les chats constitue un bon exemple de test à la SpD élevée, utilisé à l'échelle d'individus et dont les titres sont exprimés en unités internationales. Ces tests sont toutefois techniquement sophistiqués, chers à entretenir et à exécuter et ils requièrent des procédures de biosécurité rigoureuses. Pour une application à de plus grands volumes, tels les programmes de suivi régionaux des vaccinations, les tests ELISA sont mieux adaptés, du fait de leur simplicité, de leur rapport coût/efficacité et de leur débit important. Les mêmes réflexions concernant la SpD s'appliquent à ce type de tests.

L'expérience des diagnosticiens de laboratoire n'est pas seulement essentielle pour le choix du test approprié permettant d'atteindre l'objectif souhaité, elle est également requise pour déterminer la fiabilité des limites scientifiques d'un essai ainsi que pour évaluer certains aspects pratiques comme le coût, la disponibilité des équipements et des réactifs, la capacité de traitement du laboratoire et le temps d'exécution du test.

## 2. Mise au point de l'essai – expérimentation

### 2.1. Matériel de référence, réactifs et contrôles

#### 2.1.1. Échantillons de test

Les échantillons à tester dans les titrages d'anticorps devraient 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 dans lequel les anticorps sont titrés est généralement constituée de sérum, mais peut aussi se composer de plasma, de sang total, de lait, de jus de viande, de jaune d'œuf, de sécrétions lacrymales ou de salive.

#### Conception de la méthode

- La méthode est-elle conçue en fonction des fins prévues pour l'essai ?
- Quelle est son application spécifique ?
- Quels sont les types et quel est le nombre d'échantillons pertinent à tester d'un point de vue statistique ? (Voir Chapitre 2.2.5.)
- Le test sera-t-il effectué sur le terrain ou en laboratoire ?

#### 2.1.2. Étalons de référence

Les antisérums dirigés contre les souches de référence d'un agent pathogène sont appelés sérums de référence ou étalons de référence (Wright *et al.*, 1993 ; Norme de validation de l'OMSA ; Section 1.4 du Chapitre 2.2.6 *Sélection et utilisation des échantillons et panels de référence*). Ces sérums qui contiennent des anticorps à une concentration/activité connue sont utiles pour le développement initial d'un essai. Pour certaines des maladies de la Liste de l'OMSA (influenza aviaire, fièvre aphteuse, peste porcine classique, etc.), des étalons de référence internationaux sont disponibles auprès des Laboratoires de référence de l'OMSA et

des Centres collaborateurs. Lorsqu'ils ne sont pas disponibles auprès de sources externes, il peut s'avérer nécessaire de produire des étalons de référence internes à l'aide desquels les étalons de travail (contrôle de procédé ou de qualité) seront étalonnés.

### 2.1.3. Panels de référence positifs et négatifs

Ces sérums, contenant des concentrations d'anticorps couvrant la plage de fonctionnement prévue pour l'essai (connue également sous le nom de plage dynamique), doivent être utilisés durant toute la phase de mise au point et de normalisation du titrage des anticorps. Il est recommandé de les préparer en quantités suffisantes de sorte qu'ils puissent être utilisés pour plusieurs aspects de la validation. Ces échantillons doivent

représenter des animaux infectés et des animaux non infectés de la population susceptible de devenir la cible de l'essai validé. Ils doivent de préférence se composer d'échantillons individuels, mais peuvent aussi avoir été regroupés à partir de plusieurs animaux (Chapitre 2.2.6).

#### Points essentiels à aborder

- Avez-vous pris en compte le fait que les concentrations d'analytes dans la matrice ont un effet significatif sur le seuil inférieur de détection des anticorps et sur la plage de fonctionnement de l'essai ?
- Les réactifs des anticorps requis (mono/polyclonaux) sont-ils disponibles ?
- L'antigène disponible est-il suffisamment purifié ?
- Les réactifs sont-ils disponibles dans le commerce ? Si ce n'est pas le cas, est-il envisageable de les produire sur place ?
- Existe-t-il des étalons de référence ? Si ce n'est pas le cas, comment allez-vous pallier ce manque ? (Voir Norme de validation de l'OIE, Section A.2.6.)

### 2.1.4. Réactifs à base d'anticorps monoclonaux

L'avènement des anticorps monoclonaux a grandement amélioré les essais immuno-enzymatiques. Tandis que des conjugués d'immunoglobulines polyclonales sont utilisés dans la plupart des tests ELISA indirects, les conjugués d'anticorps monoclonaux sont dirigés contre des isotypes d'immunoglobulines spécifiques. Selon l'épitope d'immunoglobuline ciblé, beaucoup de ces conjugués monoclonaux peuvent être utilisés avec succès chez des espèces apparentées, par exemple les ruminants. L'utilisation de conjugués monoclonaux pour les épitopes des chaînes légères ou pour ceux des chaînes lourdes permet de moduler de manière efficace la SpD et la SeD des tests ELISA indirects.

Les anticorps monoclonaux sont bien connus pour leur utilisation dans les tests ELISA de compétition ou de blocage. Dans ce cas, la spécificité monoclonale est dirigée contre les épitopes de l'agent pathogène concerné. Selon l'épitope ciblé, la spécificité analytique de l'essai peut être modulée.

Les anticorps monoclonaux peuvent également être utilisés dans les tests ELISA en sandwich, soit pour lier l'antigène à la plaque, soit pour ensuite détecter les antigènes qu'ils ont capturés. Selon la taille et la complexité de l'antigène concerné, il est parfois préférable d'utiliser une préparation d'anticorps monoclonaux pour cette capture, dans la mesure où ces préparations contiennent généralement des anticorps aux affinités de liaison élevées.

#### Aspects qui influencent le choix du test

- L'essai sera-t-il utilisé pour le dépistage, à des fins de confirmation ou les deux ?
- Sera-t-il utilisé pour une ou plusieurs espèces ? Lesquelles ?
- Le test est-il prévu pour la détection d'une infection précoce ou tardive ?
- Le test sera-t-il utilisé pour mesurer les anticorps spécifiques à un sérotype ou à un sous-type ?
- L'essai sera-t-il utilisé pour confirmer la séroconversion après vaccination ?
- S'agira-t-il d'un essai DIVA (différenciation des animaux infectés et des animaux vaccinés) ?
- Le test sera-t-il appliqué aux échanges commerciaux ?

### 2.1.5. Antigènes

Les antigènes utilisés dans les tests ELISA sont de toute première importance pour la performance diagnostique, vu leur utilisation particulière. Les antigènes qui expriment des épitopes fortement conservés, tels ceux que l'on trouve dans certaines matrices ou nucléo-protéines virales, sont généralement utiles dans des essais spécifiques à un groupe, comme par exemple les tests ELISA pour la détection des réponses à tous les virus de l'influenza A. D'autres épitopes antigéniques peuvent être utilisés pour limiter la détection à certains sérotypes. Le choix de l'antigène doit être soigneusement réfléchi et évalué.

Les préparations antigéniques brutes comme les lysats cellulaires ont connu un usage très répandu dans le passé et sont toujours employées pour certains essais. Cependant, les antigènes se sont beaucoup améliorés avec les progrès des techniques de purification telle la chromatographie d'affinité. D'autres améliorations ont été obtenues par l'utilisation du clonage moléculaire. Les technologies utilisant les antigènes recombinants ont considérablement amélioré tous les aspects de la performance des essais immuno-enzymatiques, qu'il s'agisse de leur caractéristiques analytiques ou diagnostiques.

## 2.2. Conception de la méthode de test

Lors de la conception d'un test, l'utilisation prévue influence le choix du format de l'essai le mieux adapté à sa mission. Par exemple, si le test est principalement utilisé pour la surveillance, le type d'ELISA doit permettre d'obtenir une SeD élevée, comme décrit dans les objectifs ci-dessus. Si toutefois la SeD de l'essai de dépistage est fixée si haut qu'elle génère beaucoup de faux positifs, un test compagnon simultané de confirmation devrait également être envisagé. De nombreux formats d'ELISA existent, chacun ayant des avantages et des inconvénients permettant une personnalisation des essais à des fins très spécifiques (Tableau 2).

### Aspects pratiques du choix d'un format d'essai

- Un débit élevé est-il crucial ? Sera-t-il automatisé ?
- Quel est le temps d'exécution prévu ? Est-ce adéquat ?
- Quel est le niveau de sophistication requis pour exécuter l'essai ?
- Quelles sont les compétences requises pour interpréter le test ?
- L'essai sera-t-il faisable dans mon laboratoire ?
- Sera-t-il facilement transférable à d'autres laboratoires ?

La disponibilité des réactifs et la probabilité que leur approvisionnement soit continu, non seulement pour les stades de conception et d'optimisation mais aussi pour le stade de mise en œuvre opérationnelle du test, sont des facteurs importants qui ont une influence sur le choix du format de titrage des anticorps. L'absence de réactifs (anticorps) correspondants pour un format donné peut constituer une limitation. Les formats compétitifs ou de blocage, par exemple, requièrent des anticorps monoclonaux spécifiques à l'antigène. La nécessité de disposer d'un antigène de capture efficace est un autre exemple de ces facteurs : un antigène relativement brut peut être acceptable pour un test de dépistage par ELISA en sandwich, tandis qu'un antigène purifié sera nécessaire pour un essai de confirmation. Parmi les autres critères importants pour choisir un format particulier d'ELISA, citons : la pertinence diagnostique des isotypes d'anticorps, des concentrations, des aptitudes et des spécificités antigéniques ; la pertinence des antigènes et, en particulier, des épitopes ; la plage de fonctionnement souhaitée pour l'essai. Tout cela joue un rôle important lors du choix d'un type particulier d'ELISA (Tableau 2). S'il est prévu que le test soit utilisé chez différentes espèces, y compris la faune sauvage, un format compétitif/de blocage peut être utile. Se décider pour un format d'essai nécessite également de prendre en compte l'utilisation de l'essai. Les questions auxquelles il faut répondre sont détaillées dans l'encadré ci-dessus concernant les « Aspects pratiques du choix d'un format d'essai » et les questions pratiques dans les encadrés sous le Tableau 2. Il est important de répondre à ces questions à ce stade du développement de l'essai puisqu'elles sont essentielles pour obtenir des résultats positifs et permettre son utilisation.

**Tableau 2. Formats d'ELISA: avantages et inconvénients\***

Type d'ELISA	Avantages	Inconvénients
Indirect – Anticorps fixés détectés par conjugué anti-espèce ou par conjugués protéines A/G	Utilisation et disponibilité d'une grande variété de conjugués spécifiques anti-espèces ciblant souvent des sous-ensembles donnés d'anticorps (anti IgM, IgG1, IgG2, etc.).  Les conjugués protéine A et protéine G ont une large spécificité d'espèces et peuvent émettre moins de signaux parasites que les réactifs anti-Ig.  Utilisation répandue pour le dépistage d'échantillons en grand nombre	Variation du degré de fixation non spécifique dans les sérums individuels.  Pour compenser ce problème, des dilutions de départ élevées sont requises.  Cela peut conduire à une diminution de la SeD par rapport aux formats compétitifs/de blocage.  Ne peut être utilisé que pour une ou quelques espèces simultanément.

Type d'ELISA	Avantages	Inconvénients
Sandwich – Présentation de l'antigène sur un anticorps de capture immobilisé sur une phase solide	L'anticorps de capture immobilisé sur la phase solide peut aider à orienter la molécule antigénique, ce qui améliore les chances de fixer l'anticorps de l'échantillon.  Des préparations non purifiées d'antigène peuvent être utilisées, car l'anticorps de capture fixe sélectivement l'antigène brut.  Pré-enduire avec l'anticorps de capture peut réduire l'éventualité d'une fixation ultérieure de protéines non spécifiques en cours de test.	Les antigènes doivent avoir au moins deux sites antigéniques ou épitopes, ce qui limite ce type de test aux complexes antigéniques relativement larges ou aux protéines plus complexes.  La taille et le rapport spatial entre les épitopes peuvent influencer l'essai.
Compétition (indirecte et de type sandwich) – les anticorps à tester dans l'échantillon sont mélangés avec des anticorps de détection pré-titrés, puis ajoutés à des puits enrobés d'antigènes de capture, soit directement, soit selon un format d'inhibition/de blocage.	Adaptation facile pour servir de titrages d'anticorps.  Lorsque des anticorps monoclonaux très spécifiques sont utilisés, l'antigène n'a pas besoin d'être hautement purifié.  Peut être utilisé chez différentes espèces pour lesquelles il n'existe pas d'anticorps conjugués.  L'avantage du type sandwich compétitif/de blocage repose sur la capture de l'antigène.  Les sérums peuvent être testés à des dilutions faibles sans risque d'interférences dues à la fixation non spécifique des anticorps. Cela peut contribuer à la sensibilité plus élevée de ce format.  Différentes concentrations d'anticorps peuvent être utilisées pour privilégier soit la sensibilité, soit la spécificité analytiques. Cela est particulièrement pertinent pour les essais utilisant des anticorps polyclonaux, nettement plus influencés par l'utilisation de différentes dilutions de sérums.	En règle générale, des étapes et une optimisation supplémentaires sont nécessaires (par exemple pré-titration et optimisation pour les réactifs en phase liquide ou solide).  Niveau élevé de sophistication technique requis.

\* Source principale : Crowther (2001).

### 2.3. Études de faisabilité

Une fois le format d'essai immuno-enzymatique choisi, les expériences initiales sont conçues pour déterminer si l'essai proposé est viable. Un panel de référence tel que décrit à la Section A.2.1.3 doit être analysé avec le prototype de l'essai. S'il est prévu d'utiliser un étalon de référence pour la normalisation des données du test, celui-ci doit être choisi et intégré à ce point du développement de l'essai. Afin d'assurer la continuité de l'évaluation des données, les panels de référence ainsi que les éventuels étalons de référence doivent être inclus dans tous les autres aspects des études de validation. Le panel de référence utilisé pour l'étude de faisabilité doit couvrir toute la plage de fonctionnement attendue de l'essai candidat et être analysé à plusieurs reprises, à titre de contrôle rapide de la répétabilité.

#### Étude de faisabilité

- L'étude de faisabilité a-t-elle été faite avec au moins 4 à 5 échantillons couvrant la plage de fonctionnement de l'essai ?
- Avez-vous inclus un ou plusieurs étalons de référence, si nécessaire, pour la normalisation des données ?
- La séparation des résultats entre les échantillons négatifs, faiblement positifs et fortement positifs était-elle adéquate ?

L'essai doit assurer une bonne séparation des valeurs de densité optique (DO), couvrant la plage de fonctionnement de l'activité de l'anticorps. Une séparation adéquate est particulièrement importante entre les échantillons négatifs et faiblement positifs. La plage inférieure de DO doit être de 0,1 ou moins pour le témoin négatif des ELISA indirects ou pour les témoins fortement positifs d'ELISA compétitifs/de blocage. Les valeurs de DO à l'extrémité supérieure de la plage de fonctionnement ne doivent pas excéder 2,0 dans la mesure où, au-dessus de cette valeur, les lecteurs de plaque sont moins précis. Si l'essai semble prometteur, l'optimisation constitue l'étape suivante.

## 2.4. Échantillons et représentation des données

### 2.4.1. Préparation et stockage des panels de sérums pour les études d'optimisation

Les bonnes pratiques pour les titrages d'anticorps consistent à sélectionner plusieurs (au minimum quatre à cinq) échantillons de sérum contre l'agent infectieux concerné aux titres d'anticorps allant de nul à très élevé. Ces échantillons sont initialement utilisés dans des tests conçus pour démontrer leur fiabilité. Un grand volume (soit un minimum de 10 ml) de chaque échantillon de sérum est obtenu, divisé en aliquotes de 0,1 ml et stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou 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  $4^{\circ}\text{C}$ , pour une durée allant jusqu'à 2 semaines environ ; dans ces circonstances, une détérioration de l'échantillon ne peut toutefois pas être exclue. Un nouvel aliquote est 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 doit donc être évitée). Ainsi, les variations sont réduites puisque l'expérimentateur utilise la même source de sérum 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 générer un tracé des données pour les échantillons analysés à plusieurs reprises.

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 le panel entier peut être utilisé pour les évaluations de la répétabilité intra-cycle et inter-cycles (Jacobson, 1998). Ils peuvent également servir d'étalons de travail interne, c'est-à-dire comme contrôle de qualité ou de procédés, compte tenu du fait que leur réactivité a été bien caractérisée ; ce type d'échantillons témoins fournit l'assurance que les cycles de l'essai produisent des données exactes (Wright *et al.*, 1993).

### 2.4.2. Normalisation et représentation des résultats

La lecture de la densité optique (DO) des tests ELISA est une mesure de la production de couleur correspondant à la quantité d'anticorps présente dans un échantillon. Comme la production de couleur est fonction d'une réaction de l'enzyme et du substrat en présence d'un chromogène, les résultats peuvent varier d'un jour à l'autre, en raison de facteurs externes tels que la température, le temps de réaction, etc. La comparaison de la DO des mêmes échantillons entre différents cycles d'un essai dans un même laboratoire ou entre différents laboratoires manque de précision en raison de la variation des résultats des étalons de référence inclus dans chaque cycle. Les résultats de DO des échantillons de test doivent donc être ajustés en fonction de la ou des DO d'un ou de plusieurs étalons de référence pour un cycle donné de l'essai. Ce processus est connu sous le terme de « normalisation » des résultats ELISA (pour les détails, voir la Norme de validation de l'OMSA, A.2.7). La méthode de normalisation et de représentation des données doit être déterminée de préférence avant la fin des études de faisabilité.

Les valeurs de DO peuvent être représentées de plusieurs manières (Wright *et al.*, 1993). Une méthode simple consiste à représenter les valeurs de DO sous la forme du pourcentage d'un sérum de contrôle unique fortement positif inclus sur chaque plaque. Pour ce type de calculs, le sérum de contrôle doit donner des résultats situés dans le segment linéaire de la plage de fonctionnement de l'essai. Une procédure plus rigoureuse de normalisation est de calculer les résultats à partir d'une courbe normalisée générée en reportant les valeurs de DO observées en regard de la concentration (ou de la dilution) de l'anticorps pour plusieurs sérums de contrôle couvrant la plage d'activité de l'anticorps pour l'essai. Cela requiert un algorithme plus sophistiqué, de type régression linéaire, logit ou analyse de régression logistique à 4 ou 5 paramètres, entre autres. Cette méthode est plus précise puisqu'elle ne repose pas sur un seul échantillon témoin fortement positif pour la normalisation des données, mais qu'elle utilise plusieurs sérums de contrôle, ajustés aux valeurs attendues, pour dessiner une courbe normalisée à partir de laquelle la valeur de l'échantillon sera extrapolée. Cette méthode permet également d'exclure une valeur de contrôle qui se situerait en dehors des limites de confiance attendues.

## 2.5. Optimisation

Pour les tests ELISA, les variables les plus importantes nécessitant d'être optimisées sont la concentration/dilution de l'antigène adsorbé dans la phase solide, la dilution de travail du sérum à tester, la molarité des enzymes, la dilution anticorps-conjugué et la concentration de la solution de substrat. Ces variables sont estimées au moyen d'évaluations en damier (chaque variable étant comparée à toutes les autres variables au sein d'un même cycle de l'essai répété plusieurs fois). Les autres variables qui doivent être prises en compte sont le pH et l'ionocité des réactifs, les facteurs moléculaires comme la valence, la densité des antigènes en épitopes, l'isotype de l'anticorps cible et l'affinité de l'anticorps. La précision des résultats des tests peut être représentée graphiquement ou exprimée numériquement selon différentes méthodes statistiques (Crowther, 2001). Les études ELISA nécessitent que l'instrumentation (laveurs de plaques et lecteurs, etc.) soit correctement étalonnée avant l'emploi, ce qui fait partie du programme de contrôle qualité du laboratoire.

### Optimisation et normalisation

- Les réactifs essentiels ont-ils tous été testés par rapport à chacun des autres par titrages en damier ?
- Avez-vous trouvé la concentration/les dilutions optimales pour chaque réactif ?
- Avez-vous incorporé des procédures et des réactifs de contrôle de la qualité ou du procédé ?
- Avez-vous incorporé des méthodes de normalisation des données du test ?

## 2.6. Facteurs inhibiteurs dans la matrice de l'échantillon

Même si les systèmes de détection des anticorps par ELISA sont plutôt résistants aux facteurs inhibiteurs, la Norme de validation de l'OMSA, Section A.2.4, et Greiner *et al.* (1997) fournissent une description du type d'inhibiteurs susceptibles d'influencer l'essai. Ces références doivent être soigneusement étudiées afin de garantir que tous les facteurs inhibiteurs ont été pris en compte et contrôlés.

## 2.7. Étalonnage par rapport aux sérums étalons de référence

Si des sérums de référence internationaux, nationaux ou d'une autre provenance sont disponibles, l'essai doit être étalonné pour correspondre, au niveau des unités métrologiques, à la sensibilité analytique attribuée aux sérums étalons (Wright, 1998).

# B. PROCÉDE DE VALIDATION D'UN ESSAI

## 1. Étape 1 – Caractéristiques de performance analytique

### 1.1. Répétabilité

La répétabilité est le degré de concordance entre les résultats d'analyses répétées d'un échantillon, intra-cycle et inter-cycles, avec la même méthode et dans un même laboratoire. Un panel d'échantillons identique ou similaire à celui utilisé pour l'étude de faisabilité est adéquat. Trois (de préférence 5) échantillons au moins sont nécessaires, couvrant la plage de fonctionnement de l'essai et en quantité suffisante pour un minimum de 20 cycles de l'essai sur plusieurs jours. Les détails sur la manière de préparer et de manipuler les échantillons sont donnés dans le Chapitre 2.2.6 et dans la Norme de validation de l'OMSA, Section B.1.1. Dans les ELISA indirects, il est utile d'inclure au moins un échantillon de référence (un sérum de contrôle positif) par rapport auquel les échantillons du test pourront être normalisés selon le pourcentage de témoins positifs. La variation intra-cycle peut être déterminée par la DO moyenne et

### 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 supporte-t-il la comparaison avec la méthode normale de test, sur la base de critères quantitatifs et qualitatifs ?

par le coefficient de variation (CV) des copies de chaque échantillon. Le CV ne devrait pas excéder 15 % (à l'exception éventuelle d'échantillons négatifs ou très faiblement positifs qui peuvent avoir un CV plus haut (et dénué de signification). Si tous les échantillons ont été préalablement échelonnés par rapport aux étalons de référence et que leurs DO sont connues, les DO observées pour chaque échantillon dans chaque cycle peuvent être normalisées en fonction des DO attendues selon une analyse de régression linéaire. Celle-ci fournira un coefficient de corrélation démontrant la proximité par rapport à la valeur attendue et permettant aux valeurs normalisées d'être reportées sur des diagrammes de contrôle (Crowther, 2001).

## 1.2. Spécificité analytique

La spécificité analytique (SpA) se détermine en testant des sérums d'animaux connus pour avoir été infectés/exposés par/à toutes les espèces/souches que le test devrait détecter (Chapitre 2.2.6., Section 2.1). La réactivité croisée avec les sérums d'animaux infectés par des espèces apparentées est utilisée pour évaluer la SpA. Les tests ELISA sont aussi sujets à des résultats faux positifs, attribuables à des facteurs externes tels que la fixation non spécifique de sérum ou de conjugué à la surface plastique pouvant nécessiter l'utilisation d'agents de blocage. Il faudra veiller à éliminer cette source d'erreur. Les tests ELISA compétitifs/de blocage peuvent également souffrir de problèmes de spécificité dus à un encombrement stérique empêchant les protéines de se fixer à leurs sites cibles.

## 1.3. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique (SeA) est synonyme de limite inférieure de détection (LD) de la concentration d'anticorps dans un échantillon. Les différents types de titrages d'anticorps varient considérablement du point de vue de leur limite intrinsèque de détection des anticorps. Par exemple, les LD de huit types différents de titrages d'anticorps vont de 1000 ng/ml (immunodiffusion radiale) à 0.01 ng/ml (chimiluminescence) (Nielsen *et al.*, 1996). Les LD se déterminent généralement au moyen de la dernière dilution lors de laquelle les copies (idéalement 10) de chaque dilution d'une série de dilutions de log<sub>2</sub> sont analysées.

## 1.4. Comparaison de la méthode de test candidate avec la méthode de test étalon

La méthode de test candidate doit être employée parallèlement à une méthode de test de référence de l'OMSA ou une autre méthode de référence, en utilisant le même panel d'échantillons pour les deux, afin de déterminer si la méthode candidate présente les mêmes caractéristiques quantitatives et qualitatives que la méthode de référence. Si la méthode candidate soutient la comparaison, cela renforce la conviction qu'elle constituera un bon substitut à la méthode de référence (voir aussi études de comparaison des méthodes, Chapitre 2.2.5).

## 2. Étape 2 – Caractéristiques de performance diagnostique

La SeD et la SpD sont les principaux indicateurs de performance du processus de validation. Les titrages d'anticorps sont sujets aux mêmes procédures générales pour obtenir des estimations de la SeD et de la SpD que les autres types d'essais (voir Norme de validation de l'OMSA, Section B.2 pour les principaux détails). Le nombre d'échantillons nécessaires pour établir ces estimations pour un titrage d'anticorps donné requiert un plan d'échantillonnage tenant compte de nombreuses variables. Cela inclut la constitution d'un panel d'échantillons spécifiquement adapté aux fins prévues de l'essai (p. ex. test de dépistage versus test de confirmation). Cela nécessite également de définir préalablement le niveau de SeD et de SpD désiré (traduisant le taux acceptable de faux négatifs et de faux positifs), l'erreur acceptable pour les estimations de la SeD et de la SpD ainsi que le degré de confiance requis pour ces estimations.

Le nombre d'animaux requis pour établir des estimations acceptables de la SeD et de la SpD dépend du degré de confiance souhaité pour ces estimations ainsi que de la marge d'erreur acceptable. Par exemple, pour une maladie comme la fièvre aphteuse, il est nécessaire de minimiser la probabilité que des animaux infectés soient classés de manière erronée comme non infectés, ce qui diminue l'erreur acceptable pour ce résultat de test et, par conséquent, augmente le nombre d'échantillons nécessaires pour établir un degré élevé de confiance dans l'estimation de la SeD. Par ailleurs, pour un essai de confirmation, il est souhaitable de réduire la probabilité que des animaux non infectés soient classés comme infectés. Une SpD élevée avec une marge d'erreur acceptable minimale est donc souhaitée, ce qui nécessite un grand nombre d'échantillons d'animaux non infectés. Toutes ces questions d'ordre général relatives à la taille de l'échantillonnage, aux intervalles de confiance et à la marge

d'erreur acceptable pour l'estimation de la SeD et de la SpD sont décrites dans la Norme de validation de l'OMSA, Section B.2, de plus amples détails et des tableaux indiquant le nombre d'échantillons requis étant disponibles ailleurs (Jacobson, 1998).

Il est souvent difficile d'obtenir un nombre suffisant de sérums bien caractérisés pour disposer d'estimations de la SeD et de la SpD suffisantes aux fins prévues de l'essai. Il peut s'agir au début d'un compromis entre le statistiquement significatif et le pratiquement réalisable, résultant dans un essai provisoirement reconnu (Norme de validation de l'OMSA, Section B.2.6). Au fil du temps, avec l'accumulation d'autres échantillons bien caractérisés, les estimations de la SeD et de la SpD pourront toutefois être renforcées (voir Section 5.4 ci-dessous).

## 2.1. Le défi d'établir des estimations exactes de la SeD et de la SpD pour les titrages d'anticorps

Les titrages d'anticorps soumis à une validation posent des problèmes uniques lorsqu'il s'agit de réunir des échantillons dont le statut positif ou négatif est connu en quantités suffisantes afin de déterminer les caractéristiques de performance de l'essai. Les anticorps sont un indicateur indirect de la présence ou de l'exposition antérieure à un agent infectieux ou à l'un de ses composants. Les déductions légitimes suivant la détection ou non d'anticorps dépendent des réponses qualitatives et quantitatives de l'hôte au microorganisme. Les facteurs qui influencent la concentration et la composition des anticorps spécifiques dans les échantillons de sérum sont inhérents à l'hôte (p. ex. âge, sexe, race, état nutritionnel, gestation, réactivité immunologique) ou acquis (p. ex. anticorps acquis de manière passive ou immunité active induite par la vaccination ou l'infection). En théorie, des échantillons d'animaux représentatifs de toutes ces variables doivent être inclus dans les panels utilisés pour établir les estimations de la SeD et de la SpD. Il s'agit clairement d'une tâche colossale, voire impossible. Pour surmonter ce problème, le panel d'échantillons initial doit être représentatif de la majorité des animaux de la population cible lorsqu'il s'agit d'obtenir des estimations de la SeD et de la SpD. En réalité, il est nécessaire d'améliorer les estimations de la SeD et de la SpD une fois que l'essai a été mis en œuvre, dans la mesure où des échantillons bien caractérisés supplémentaires deviennent accessibles (voir Section 5.4, ci-dessous).

Comme il est souvent souhaitable d'étendre l'utilisation des titrages d'anticorps à un grand nombre d'animaux à l'échelle de vastes étendues géographiques (par exemple dans les essais de dépistage à l'échelle d'un continent), réunir des panels d'échantillons parfaitement représentatifs d'une fenêtre de variables diagnostiques aussi large s'avère pratiquement impossible. Une solution consiste à définir d'abord des estimations de la SeD et de la SpD pour une population relativement homogène d'animaux. Si l'essai

est destiné à être utilisé dans des populations animales disparates et susceptibles de présenter des profils d'agents infectieux différents (avec l'éventualité de réactions croisées absentes de la population ciblée initialement), une réévaluation de la SeD et de la SpD peut se révéler nécessaire, qui s'inspirera des données acquises en utilisant de nouveaux panels d'échantillons représentatifs de la ou des populations cibles.

### Caractéristiques de performance diagnostique

- Les critères utilisés pour déterminer les populations de référence positives et négatives sont-ils légitimes ?
- 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 c'est le cas, comment le problème a-t-il été résolu ?

## 2.2. Populations d'animaux de référence

### 2.2.1. Animaux au « statut infectieux connu »

Les animaux de référence connus pour être infectés ou non infectés constituent la source idéale d'échantillons pour déterminer la SeD et la SpD. De tels échantillons sont toutefois rares et difficiles à déterminer. Le terme le plus courant pour les animaux ou les échantillons de référence utilisés pour établir la SeD et la SpD est celui de « gold standard » en anglais (référence absolue), un terme inapproprié couramment utilisé pour classer presque chaque animal de référence comme infecté/exposé ou non infecté, avec des échantillons de ces animaux définis comme positifs ou négatifs (voir Norme de validation de l'OMSA, Section B.2.1–3).

Les concepteurs de l'essai doivent être conscients des avantages mais aussi des pièges associés aux différentes méthodes utilisées pour classer les animaux de référence comme infectés ou non infectés. Les échantillons de ces animaux sont présumés soit positifs, soit négatifs et deviennent collectivement l'étalon de référence par rapport auquel la SeD et la SpD de l'essai candidat sont basées. Il est donc crucial d'examiner soigneusement la validité des différents étalons de référence, ainsi que le montrent les quatre exemples suivants :

- i) Étalon de référence absolu : présence de l'agent chez l'hôte ou preuve histopathologique irréfutable (pathognomonique)

Si un agent infectieux ou un critère histopathologique irréfutable est détecté chez un animal, cela constitue généralement un étalon de référence clair pour l'animal concerné. Les échantillons de sérum provenant de ces animaux sont généralement considérés comme des étalons de référence absolus pour déterminer la SeD et la SpD de l'essai candidat. Ces échantillons peuvent cependant avoir des limites. À l'échelon de la population, un agent pathogène peut être présent sans équivoque chez certains animaux, mais si les échantillons de sérum ont été prélevés chez ceux-ci au stade précoce du processus infectieux, la réponse immunitaire peut ne pas avoir encore produit d'anticorps détectables. Dans ce cas, les échantillons de sérum utilisés comme étalons de référence seraient des faux négatifs pour le sous-ensemble d'animaux se trouvant à un stade précoce de l'infection. Au contraire, pour les types plus chroniques d'infection, n'utiliser que des animaux de référence confirmés par culture ou par histopathologie peut aboutir à une valeur estimative de la SeD supérieure à ce qu'elle est réellement pour la population cible de l'essai, car la réponse immunitaire sera toujours bien établie.

- ii) Étalon de référence mixte : vérification des animaux non infectés ou non exposés

Cet étalon est obtenu en choisissant des animaux de référence dans des zones géographiques où les antécédents des troupeaux, les profils cliniques, les résultats des tests antérieurs ainsi que d'autres paramètres apportent la preuve de l'absence de l'agent pathogène et donc de l'absence de réponse humorale spécifique de l'hôte à l'agent pathogène ciblé par l'essai candidat. Ces types de matériel de référence, leurs points forts et leurs limites sont décrits ailleurs (Jacobson, 1998) et doivent être soigneusement étudiés lorsque des échantillons de ce type de provenance sont utilisés pour établir la SeD et la SpD d'un essai candidat.

- iii) Étalon de référence relatif : sérologie comparative

Cet étalon est caractérisé par les animaux de référence qui ont été classés selon leur statut infectieux par comparaison avec les résultats de test d'un autre essai sérologique effectué sur les mêmes échantillons. Il s'agit souvent de la seule source de matériel de référence disponible pour l'évaluation d'un nouveau test sérologique. Si les résultats d'un test de référence de ce type sont choisis comme étalon pour déterminer les caractéristiques de performance diagnostique de l'essai candidat, les estimations de la SeD et de la SpD qui en résultent ne seront utilisés que dans la mesure où le test de référence fait état de caractéristiques de performance documentées, établies et acceptables. Le défaut des étalons de référence relatifs est qu'ils ont leurs propres taux de résultats FP et FN dont les sources d'erreurs seront englobées dans des 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). Dans certains cas, l'infection expérimentale constitue la seule manière d'obtenir des échantillons positifs. Cette méthode est parfaitement adaptée pour modéliser la dynamique de l'infection et pour déterminer la « fenêtre diagnostique » du nouvel essai. Ainsi, il est possible d'obtenir une estimation de l'intervalle entre l'exposition à l'agent pathogène et le moment où les anticorps deviennent détectables ou lorsque 20, 50, 75 ou 100 % des animaux infectés fournissent un résultat positif. Néanmoins, il existe des pièges à éviter lors de l'utilisation de données de séries chronologiques. Les données qui représentent des observations répétées faites sur les mêmes animaux ne peuvent pas

être utilisées pour le calcul de la SeD et de la SpD, car les modèles statistiques utilisés pour les établir requièrent des observations indépendantes (un seul échantillon par animal). Pour des études portant sur une évolution dans le temps statistiquement valable ou lorsque des échantillons uniques de plusieurs animaux de laboratoire sont utilisés, la souche du microorganisme cultivé, le mode et la dose d'exposition, l'infection par d'autres microorganismes apparentés ayant une réactivité croisée ou d'autres microorganismes non apparentés n'ayant pas de réactivité croisée sont des variables susceptibles de produire des réponses quantitativement et qualitativement atypiques qui ne sont pas observées lors d'infections naturelles dans la population cible. Les conditions expérimentales mènent en général à une surestimation de la sensibilité et de la spécificité, par exemple lors de l'inoculation de doses artificiellement élevées ou lors de l'utilisation d'animaux non porteurs de l'organisme pathogène étudié comme témoins négatifs.

Le moment du prélèvement des échantillons (dans les jours suivant l'infection) doit être indiqué. La provenance et les commémoratifs des animaux de laboratoire doivent être décrits. La validation ne doit pas reposer uniquement sur des animaux de laboratoire, ceux-ci n'étant pas représentatifs des populations naturelles d'animaux sujets aux agents pathogènes en cas d'exposition naturelle.

### **2.2.2. Modèles de structure latente pour l'estimation de la SeD et de la SpD**

Pour une description de cette méthode d'estimation de la performance diagnostique, voir la Norme de validation de l'OMSA, Section B.2.5, ainsi que le Chapitre 2.2.5.

### **2.3. Détermination des seuils (valeurs limites)**

Les procédures pour établir les seuils entre les résultats positifs et négatifs des titrages d'anticorps figurent dans la Norme de validation de l'OMSA, Section B.2.4.

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

La reproductibilité est l'indicateur de la précision d'un essai lorsqu'il est utilisé dans plusieurs laboratoires situés dans des régions ou des pays distincts utilisant le même essai (protocole, réactifs et contrôles) pour tester le même panel d'échantillons. Les évaluations de la reproductibilité des titrages d'anticorps ne sont pas fondamentalement différentes d'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.

## **4. Étape 4 – Mise en œuvre des programmes**

### **4.1. Interprétation des résultats et détermination des valeurs prédictives**

Les bonnes pratiques de mise en œuvre des programmes sont communes à tous les types d'essais (Norme de validation de l'OMSA, section B.4). Cependant, comme les tests ELISA sont souvent les tests privilégiés pour les programmes de surveillance afin de confirmer l'absence de maladie, d'éradiquer une maladie ou d'éliminer une infection de populations données, la question des résultats faux positifs peut constituer un problème majeur, même si la spécificité diagnostique est très élevée.

Une erreur courante de perception consiste à penser qu'un test doté d'une SpD et d'une SeD de 99 % échouera dans 1 % seulement des cas à classer correctement les animaux comme étant FP ou FN. Les taux de FN et de FP varient selon la prévalence de l'infection dans la population cible. Les résultats faux positifs dans la campagne d'éradication d'une maladie peuvent varier de manière significative entre le début de la campagne, alors que la prévalence est relativement élevée (p. ex. 10 %), et la fin de la campagne où la prévalence aura baissé à 0,1 %. Les valeurs prédictives des résultats du test prennent alors toute leur importance. Elles indiquent la probabilité qu'un résultat de test soit vraiment positif ou vraiment négatif. Dans notre exemple où l'essai utilisé est doté d'une SeD et d'une SpD de 99 % pour tester une population d'animaux avec une prévalence de 10 % d'une maladie donnée, la valeur prédictive d'un résultat de test positif (VPP) est de 91,7 %, ce qui signifie que la probabilité que l'animal soit véritablement infecté est de 91,7 %. La valeur prédictive d'un résultat de test négatif (VPN) est de 99,9 %. Lorsque la prévalence recule à 5 %, la VPP et la VPN sont respectivement de 83,9 % et de

99,9 %. Si la prévalence continue à baisser jusqu'à 0,1 % grâce au retrait réussi des animaux infectés de la population, le même test produira une VPP de 9 % et une VPN de 99,9 %, ce qui signifie qu'il y a seulement 9 % de chances qu'un test positif détecte un animal véritablement infecté (parmi 1000 animaux testés, un seul des 10 résultats positifs indiquera un animal infecté, les 9 autres étant des faux positifs). Par conséquent, si le test a pour finalité l'éradication d'une maladie ou l'élimination d'une infection au sein d'une population, le concepteur du test aura intérêt à envisager le déplacement de l'essai vers un second seuil générant une SpD plus élevée dans la phase tardive de la campagne afin de réduire la probabilité de faux positifs. Il est instructif d'étudier un tableau des valeurs prédictives pour les essais dont la SeD et la SpD varient afin de visualiser les retombées d'une diminution de la prévalence sur les valeurs prédictives de l'essai (Norme de validation de l'OMSA, Tableau 2 et Jacobson, 1998).

## 5. Suivi de la performance de l'essai

### 5.1. Suivi de l'essai

Une fois que l'essai est utilisé en routine, un contrôle interne de qualité sera effectué sous forme d'un suivi constant de l'essai au moyen de graphiques de contrôle de la qualité afin d'en évaluer la répétabilité et l'exactitude. Des graphiques représentant au moins 30 cycles montreront les tendances ou l'évolution des valeurs des témoins et des étalons. Des lignes représentant la valeur moyenne d'un échantillon témoin sur 30 cycles au moins, plus ou moins 3 écarts-types, constituent des critères de décision utiles pour inclure ou exclure un cycle d'essai. Le cycle est rejeté si l'un des témoins/étalons excède  $\pm 3$  écarts-types ou si 2 témoins (ou plus) excèdent  $\pm 2$  écarts-types (Crowther, 2001). Les critères de décision peuvent nécessiter d'être adaptés à un essai donné en raison de différences entre les essais attribuables au système agent pathogène/hôte. Le Chapitre 2.2.4 donne un exemple de la manière d'appliquer l'incertitude des mesures à un titrage d'anticorps par ELISA en utilisant un échantillon témoin positif interne.

La reproductibilité des résultats de test entre laboratoires doit être évaluée par une assurance qualité externe au moins une fois par an et constitue l'une des exigences clés pour les laboratoires accrédités selon la norme ISO 17025. Il est utile d'appartenir à un consortium de laboratoires souhaitant évaluer leurs résultats.

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

Lorsque des échantillons de contrôle de la qualité ou du procédé arrivent à épuisement, il est crucial de préparer et de tester à plusieurs reprises les échantillons de remplacement. Ces derniers doivent être inclus dans un minimum de 10 cycles de routine de l'essai et leurs résultats normalisés par rapport aux étalons de référence existants. L'activité du nouveau témoin doit être comparable à celle du témoin remplacé et il faut veiller à choisir un remplaçant dont toutes les caractéristiques correspondent autant que possible à celles du sérum d'origine, permettant ainsi l'utilisation du remplaçant pour normaliser les résultats de test avec des résultats comparables (voir aussi Chapitre 2.2.8 *Comparabilité des épreuves suite à des changements introduits dans une méthode de test validée*).

Lorsqu'il faut remplacer d'autres réactifs, tels les antigènes de capture pour les anticorps, ceux-ci doivent être produits ou obtenus selon les mêmes protocoles ou critères que ceux utilisés pour les réactifs d'origine. Ils nécessitent d'être évalués au moyen de sérums provenant d'examen de routine sur 5–10 cycles parallèles incluant le ou les anciens et nouveaux réactifs. Un panel

#### Suivi de la performance de l'essai

- Les fins de l'essai ont-elles été modifiées ?
- L'épidémiologie de la maladie concernée a-t-elle changé (prévalence, nouveaux sérotypes ou souches, etc.) ?
- Des réactifs essentiels ont-ils été modifiés; si oui, la comparabilité des nouveaux réactifs a-t-elle été évaluée ?
- Des indicateurs de performance sont-ils inclus au quotidien dans l'essai (graphiques de contrôle, statistiques de base) ?
- Les limites supérieures et inférieures des graphiques de contrôle sont-elles régulièrement actualisées parallèlement à l'expérience acquise grâce aux échantillons témoins ?
- Les panels de test sont-ils partagés avec d'autres laboratoires pour évaluer la reproductibilité ?
- Des essais d'aptitude font-ils partie de l'évaluation de l'essai sur la durée ?

d'échantillons représentatifs, du type de ceux utilisés pour les essais d'aptitude, constitue également un outil utile pour évaluer la comparabilité des réactifs (Chapitre 2.2.6).

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

Si l'essai devait passer, par exemple, d'un ELISA en sandwich à un format compétitif/de blocage, cela nécessiterait une revalidation en raison de la multitude de variables susceptibles d'influencer les caractéristiques de performance de l'essai. Lorsqu'il est envisagé de mettre en œuvre un essai dans une région géographique différente, p. ex. passage de l'hémisphère nord à l'hémisphère sud, il est essentiel de le valider en le soumettant à des sérums de populations animales locales. L'évaluation des sérums de référence qui représentent ces populations sera menée en suivant les étapes 3 à 5 de la Figure 1 de la Norme de validation de l'OMSA. C'est le seul moyen de garantir la validité de l'essai pour ces populations, dont la composition diffère de la population initialement ciblée par l'essai.

### 5.4. Augmenter la confiance dans les critères de validation

En raison du vaste ensemble de variables ayant un effet sur la performance des épreuves sérologiques, il est utile d'augmenter autant que possible le nombre de sérums de référence selon le principe qui veut que l'erreur diminue avec l'augmentation de la taille de l'échantillonnage. Une vaste banque de sérums de référence doit être constituée, contenant des sérums bien caractérisés, et utilisée régulièrement pour actualiser les estimations de la SeD et de la SpD pour la population ciblée par l'essai.

## RÉFÉRENCES

- CROWTHER J.R. (2001). The ELISA guidebook. *In: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 1–421.
- JACOBSON R.H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17**, 469–486.
- GREINER M., BHAT T.S., PATZELT R.J., KAKAIRE D., SCHARLES 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.
- NIELSEN K., GALL D., KELLY W., VIGLIOCCO A., HENNING D. & GARCIA M. (1996). *Immunoassay Development: Application to Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of Brucellosis*, Copyright, Agriculture and Agri-Food Canada.
- 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.
- WRIGHT P.F., NILSSON E., VAN ROOIJ E.M., LELENTA, M. & JEGGO, M.H. (1993). Standardization and validation of enzyme linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 435–450.

\*  
\* \*

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