

p 1705

DÉPISTAGE DE LA MALADIE D'AUJESZKY A L'AIDE DE PRÉLÈVEMENTS SUR PAPIER FILTRE

M. ELOIT et B. TOMA

École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Chaire de maladies contagieuses, ENV, 94704 MAISONS-ALFORT Cedex

INTRODUCTION

Parmi les principaux facteurs limitant la prophylaxie sanitaire de la maladie d'Aujeszky figurent les charges financières relatives au dépistage sérologique des animaux et/ou des cheptels infectés. Ces charges se divisent en deux composantes : l'une correspond au coût du prélèvement comprenant le matériel et la rétribution du personnel proportionnelle au temps passé ; l'autre résulte du coût des examens sérologiques.

A la suite de Banks (1985), nous avons montré (Toma *et al.*, 1986) que les coûts de prélèvement pouvaient être abaissés par l'utilisation de disques de papier filtre sensibilisés par le sang de l'animal ponctionné à l'oreille. Parallèlement, nous avons pu démontrer que le coût des examens sérologiques pouvait être nettement diminué en regroupant les échantillons étudiés par mélange de cinq, sans modification significative des résultats obtenus par rapport à l'examen individuel des échantillons.

Ces premiers résultats avaient été obtenus à l'aide d'une technique ELISA expérimentale, non commercialisée. Nous avons voulu vérifier si des résultats comparables pouvaient être retrouvés avec une technique disponible dans le commerce car, dans ce cas, la technique pourrait être transférée facilement aux différents laboratoires agréés pour le diagnostic de la maladie d'Aujeszky. Les lignes qui suivent rendent compte des résultats obtenus à l'aide de réactifs disponibles dans le commerce et largement utilisés.

I/ MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) PRÉLÈVEMENTS DE SANG

525 animaux ont fait l'objet de prélèvements de sang :

- 361 sangs ont été prélevés en tube sur la chaîne d'abattage parallèlement à l'imprégnation de papier circulaire Whatman n° 1 (diamètre 55 mm) (prélèvements effectués par le Laboratoire Vétérinaire Départemental des Côtes-du-Nord).
- 164 sangs ont été prélevés dans des conditions identiques, en tube et sur disque par le G.D.S. de la Sarthe.

2) MÉLANGES DE PRÉLÈVEMENTS SUR DISQUES

Au laboratoire ont été constitués des groupes de 5 prélèvements sur disque de manière à en analyser les performances par rapport à l'étude des disques individuels.

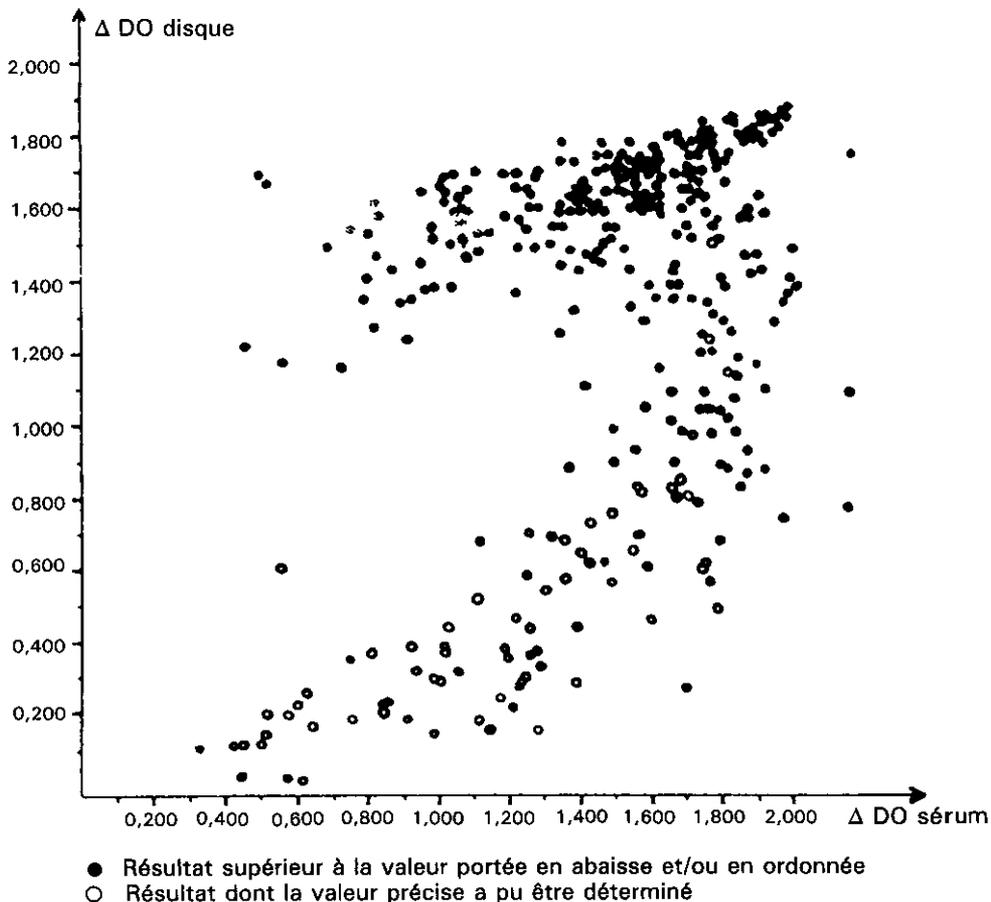
62 groupes de 5 disques correspondant à des animaux à sérologie négative (ELISA serum) ont été réalisés, ainsi que 138 groupes comprenant 1 disque d'un animal à sérologie positive et 4 disques d'animaux à sérologie négative. Les 138 disques d'animaux à sérologie positive nécessaires pour constituer les 138 groupes correspondants ont été choisis de manière à être représentatifs des prélèvements effectués sur le terrain : dans ce but, un histogramme des réponses en ELISA sur sérum, par classe de Δ DO, a été réalisé pour les 312 sérums positifs reçus du département des Côtes-du-Nord, et un nombre proportionnel de disques a été tiré au sort au sein de chaque classe.

3) LA TECHNIQUE ELISA

La technique ELISA utilisée pour les prélèvements de sérum est commercialisée par l'Institut Behring (lot n° 12) et a été utilisée suivant les recommandations du producteur. L'étude des prélèvements sur papier a été décrite antérieurement (Toma et coll., 1986) : à l'aide d'une perforatrice de bureau, on découpe dans chaque disque, deux pastilles de 6 mm dans une zone sensibilisée de manière homogène. Les deux pastilles sont éluées dans 500 μ l de tampon de dilution des sérums fourni avec le kit, pendant une nuit à + 4 °C. Les groupes de cinq prélèvements sont étudiés en éluant deux pastilles par disque (soit 10 pastilles) dans 500 μ l d'éluant nécessaires aux dépôts de 200 μ l dans une cupule contenant l'antigène viral et de 200 μ l dans une cupule contenant l'antigène témoin. La suite de la réaction se déroule suivant le mode d'emploi du producteur.

FIGURE 1

COMPARAISON DES Δ DO OBTENUES POUR UN MÊME ÉCHANTILLON PRÉLEVÉ SUR DISQUE ET EN TUBE



177 prélèvements de Δ DO \leq 0,200 pour le prélèvement de sérum n'ont pas été représentés pour faciliter la lecture (Total : 525 prélèvements).

II/ RÉSULTATS

1) PRÉLÈVEMENTS INDIVIDUELS

525 couples disque-sérum ont été étudiés. La ΔDO comparée entre les prélèvements réalisés sur disque et les sérums est représentée sur la figure 1 et montre que les deux techniques présentent des résultats convergents. La comparaison des résultats obtenus pour chaque type de prélèvement, sur la base du seuil de positivité fourni par le producteur ($\Delta DO = 0,200$) figure au tableau 1. Seuls 7 échantillons ont fait l'objet de résultats divergents, représentant autant d'erreurs par défaut de la technique de prélèvement sur disque : parmi ceux-ci, 4 correspondaient à des animaux à réponse faiblement positive en ELISA sérum (ΔDO comprise entre 0,200 et 0,500). La sensibilité de la technique ELISA appliquée aux prélèvements sur disque par rapport à celle utilisant le sérum est donc de 98 % alors que sa spécificité est égale à 100 %.

TABLEAU 1

COMPARAISON DE LA TECHNIQUE ELISA APPLIQUÉE AUX DISQUES INDIVIDUELS A LA TECHNIQUE ELISA APPLIQUÉE AUX SÉRUMS

(Total 525 prélèvements) ; seuil de positivité = 0,200

ELISA disques \ ELISA sérums	ELISA sérums	
	+	-
+	350	0
-	7	168

Sensibilité = 98 %

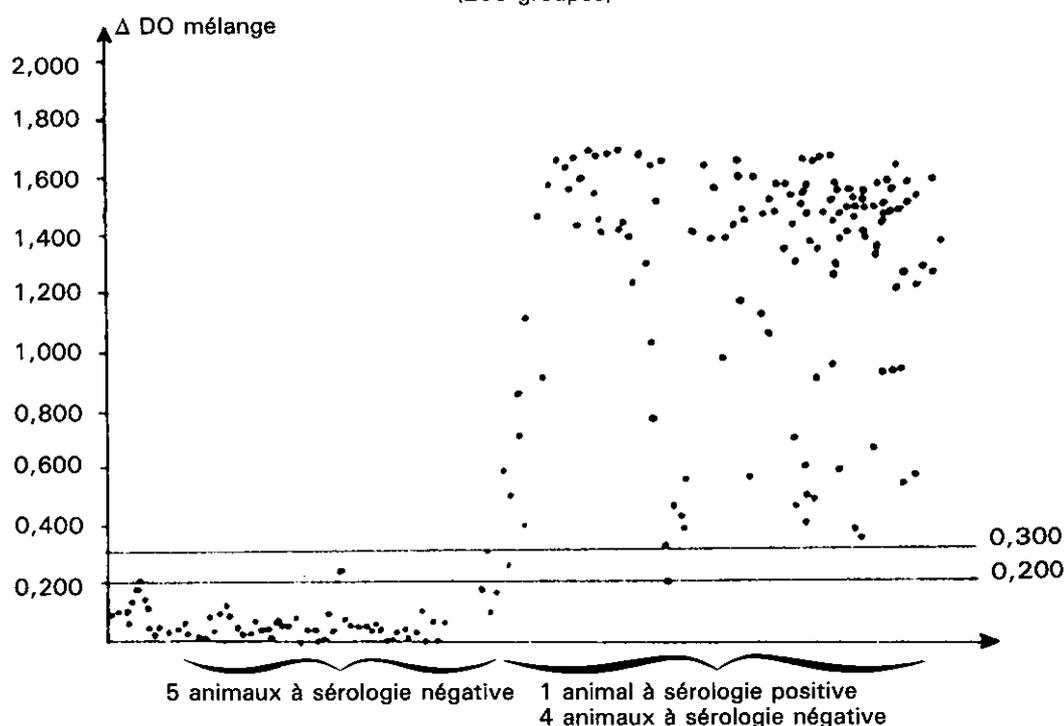
Spécificité = 100 %

2) GROUPES DE PRÉLÈVEMENTS

62 groupes de 5 disques négatifs et 138 groupes contenant un disque d'un animal à sérologie positive (ELISA sérum) et 4 disques négatifs ont été étudiés (figure 2). On constate que le bruit de fond des éluats des groupes de disques négatifs varie de 0 à 0,220 avec une moyenne proche de 0,050.

FIGURE 2

RÉSULTATS OBTENUS PAR LA TECHNIQUE ELISA APPLIQUÉE AUX ÉLUATS DE GROUPES DE 5 DISQUES (200 groupes)



La comparaison des résultats obtenus par rapport à deux seuils de positivité (0,200 et 0,300) figure dans les tableaux 2 et 3.

TABLEAU 2
ÉTUDE DE LA TECHNIQUE ELISA APPLIQUÉE AUX ÉLUATS DE GROUPES DE DISQUES
Seuil de positivité = 0,200 (200 groupes)

Type de groupe	5 animaux à sérologie négative	1 animal à sérologie positive 4 animaux à sérologie négative
ELISA sur éluat de groupes de 5 disques		
+	2	135
-	60	3

Sensibilité = 98 %

Spécificité = 96 %

Le seuil défini par le producteur du kit pour les sérums individuels ($\Delta DO = 0,200$) donne des résultats satisfaisants : 98 % des groupes contenant un disque d'un animal à sérologie positive (ELISA sérum) fournissent un résultat positif, alors que seuls 2 groupes de disques négatifs (4 %) donnent une réponse positive. Si l'on fixe le seuil à $\Delta DO = 0,300$, la sensibilité de la technique passe de 98 % à 97 %, alors qu'aucune réponse positive par excès n'est enregistrée (spécificité = 100 %). Dans ce dernier cas, il est intéressant de noter que les 5 mélanges donnant lieu à des erreurs par défaut correspondent à des disques qui, étudiés individuellement, fournissent une réponse de faible intensité, comprise entre 0,200 et 0,350.

TABLEAU 3
ÉTUDE DE LA TECHNIQUE ELISA APPLIQUÉE AUX ÉLUATS DE GROUPES DE DISQUES
Seuil de positivité = 0,300 (200 groupes)

Type de groupe	5 animaux à sérologie négative	1 animal à sérologie positive 4 animaux à sérologie négative
ELISA sur éluat de groupes de 5 disques		
-	0	133
-	62	5

Sensibilité = 97 %

Spécificité = 100 %

DISCUSSION

Lors d'un travail préliminaire (Toma *et al.*, 1986), nous avons montré que l'usage de prélèvements sur disque de papier filtre pour le sérodiagnostic de la maladie d'Aujeszky se révélait d'emploi aisé et permettait d'obtenir des performances en sensibilité et en spécificité comparables à celles résultant de l'utilisation de prélèvement de sang en tube. Ces résultats avaient été acquis à l'aide d'une technique ELISA développée au sein du laboratoire (Toma *et al.*, 1979). Les données présentées dans ce rapport étendent l'usage de ce type de prélèvement à une technique ELISA commercialisée et permettent de définir un protocole d'utilisation d'emblée transposable aux laboratoires de diagnostic.

Sur le plan du protocole technique, l'élution des disques s'effectue grâce au tampon de dilution des sérums fourni par le producteur. Le volume de tampon utilisé est inférieur à celui fourni pour chaque kit par le fabricant, ne nécessitant donc pas d'approvisionnement complémentaire. Le temps de manipulation relatif à l'élution des disques est comparable à celui nécessité par le traitement des sérums (décantation et prédilution au 1/11^e). Par contre, la durée d'élution des disques (une nuit à + 4 °C) s'ajoute aux temps d'incubation de la technique conventionnelle.

L'étude de **prélèvements individuels** sur disque, rapportée aux résultats enregistrés sur le sérum, montre que le seuil de positivité de 0,200 défini par le producteur pour l'utilisation de sérums, peut être également retenu lors d'emploi de disques. Dans ces conditions, la spécificité et la sensibilité de la technique, rapportées à celles correspondant à l'utilisation de sérums, sont respectivement de 100 % et de 98 %. Les quelques erreurs par défaut rencontrées correspondent pour la plupart à des sérums faiblement positifs et ne devraient pas pénaliser la fiabilité d'un dépistage des cheptels infectés sur la base de ce type de prélèvements individuels, en raison du nombre de prélèvements réalisés au sein d'un élevage (10 à 15 en règle générale).

L'étude de **groupes de 5 disques** nous conduit à proposer une modification du seuil de positivité pour l'établir à $\Delta DO = 0,300$. On constate en effet que le bruit de fond des groupes de disques d'animaux à sérologie négative est plus élevé que celui correspondant à l'étude de disques individuels. Ceci s'explique logiquement par la plus forte concentration protéique de l'éluat des mélanges, résultant de l'éluion de 10 disques dans 500 μ l de tampon au lieu de 2 disques dans le même volume de tampon pour les prélèvements individuels. Le corollaire de ce mode opératoire est qu'il n'existe pas de phénomène de dilution des anticorps pour des mélanges contenant un disque positif, contrairement à l'utilisation de mélanges de sérums. Ceci explique la bonne sensibilité de la méthode (97 %), rapportée à une spécificité de 100 %. Il est important de souligner que ces chiffres sont exprimés par rapport aux résultats individuels de l'ELISA-sérum et tiennent donc compte à la fois des divergences sérum-disque individuel et de celles inhérents aux groupes de disques. Ainsi les 5 disques individuels positifs correspondant aux cinq mélanges donnant lieu à une erreur par défaut ont une ΔDO comprise entre 0,200 et 0,350, soit supérieure au seuil de positivité retenu pour l'étude des prélèvements individuels (0,200) mais inférieure ou très proche du seuil de positivité retenu pour les mélanges de disques (0,300). Enfin, l'expérimentation a été conduite volontairement dans des circonstances défavorables en définissant des groupes de 4 disques négatifs pour 1 positif. Le travail conduit dans le département du Nord (Toma *et al.*, 1986) nous a montré que, le plus souvent, plusieurs disques se révélaient positifs au sein de mélanges de prélèvements effectués dans la même exploitation.

En résumé, l'utilisation de la technique ELISA appliquée à l'étude de groupes de cinq prélèvements nous paraît permettre de détecter, dans d'excellentes conditions de spécificité, la quasi totalité des groupes contenant un ou plusieurs disques positifs.

Dans le cadre de dépistage ou de sondage sérologique concernant la maladie d'Aujeszy, il est généralement retenu de prélever le sang de 10 à 15 porcs par exploitation. L'utilisation de prélèvements sur disque conduit à diminuer aussi bien le coût du matériel de prélèvement que celui de la main-d'œuvre en raison de sa rapidité de mise en œuvre. En fonction des résultats obtenus, il nous paraît que le meilleur rapport coût-efficacité dans la conduite des examens de laboratoire soit de regrouper ces dix à quinze prélèvements par mélange de 5 au plus (soit deux ou trois mélanges), ce qui conduit à des résultats pratiquement superposables à ceux résultant de l'examen des disques ou des sérums individuels. En cas de nécessité, les disques correspondant à des mélanges positifs peuvent être étudiés individuellement de manière à se faire une idée du taux d'infection des animaux au sein du cheptel, en vue de définir éventuellement un plan de lutte adapté. Il reste néanmoins clair que seul le prélèvement de tous les porcs de l'exploitation, ou d'une large fraction d'entre eux, permet d'estimer précisément le taux d'infection des animaux au sein du troupeau.

En conclusion, l'utilisation de prélèvements sur disque et la réalisation de groupes de prélèvements nous paraissent permettre d'étendre les applications du sérodiagnostic de la maladie d'Aujeszy à la lutte, en en réduisant de manière significative le coût de réalisation.

REMERCIEMENTS

Nous remercions :

- l'Institut BEHRING pour nous avoir fourni gratuitement les réactifs nécessaires à cette expérimentation,
- Mme Martine ANDRIAMANGA et Mme Annie FOURNIER, pour leur excellente collaboration technique,
- le Docteur Vétérinaire LORANT (Laboratoire Vétérinaire Départemental des Côtes du Nord) et Monsieur GUILBOT (G.D.S. Sarthe) pour avoir organisé la collecte des prélèvements à l'abattoir.

BIBLIOGRAPHIE

- BANKS M., 1985, J. Virol. Meth., 12, 41-45.
- TOMA B., MOUTOU F., FORTIER B., 1979. Rec. Méd. Vét., 155, 455-463.
- TOMA B., ELOIT M. et TILMANT P., Sérodiagnostic de la maladie d'Aujeszky utilisant des prélèvements de sang sur papier filtre. Rec. Méd. Vét., 1986 (sous presse).