

COMPARAISON DE CINQ MODES DE PRÉLÈVEMENT SANGUIN CHEZ LE PORC : AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS RESPECTIFS DANS LA CHAÎNE D'ANALYSE SÉROLOGIQUE

Y. LEFORBAN - P. VANNIER

Ministère de l'Agriculture, Station de Pathologie Porcine, B.P. 9 - 22440 PLOUFRAGAN - FRANCE

INTRODUCTION

Les prélèvements sanguins dans l'espèce porcine ont, jusqu'à une période récente été considérés comme difficiles voire aléatoires et donc réservés aux laboratoires de recherches et aux spécialistes de l'élevage porcin. Depuis quelques années, le développement des prophylaxies sanitaires s'est accompagné d'un accroissement important du nombre d'examens sérologiques à réaliser et donc des prélèvements sanguins à effectuer sur les différentes catégories d'animaux. Les prélèvements sur les porcs charcutiers et les truies de réforme peuvent être réalisés à l'abattoir, mais outre que cette solution n'intéresse que ces deux catégories d'animaux, il semble qu'elle ne soit pas si aisément réalisable qu'il n'y parait en raison des cadences des chaînes d'abattage et de la difficulté d'identifier les animaux sur la chaîne. Les prélèvements sur l'animal vivant dans l'élevage demeurent donc encore les plus utilisés. Ils étaient jusqu'à présent réalisés par ponction de la veine jugulaire. Mais cette technique de prélèvement nécessite une certaine expérience et ne peut donc être pratiquée que par des personnes entraînées, c'est pourquoi d'autres modes de prélèvement, de réalisation plus aisée, ont été essayés. Ceux-ci sont réalisés par ponction des veines superficielles auriculaires ou caudales. Ces méthodes ne permettent pas de récolter de grands volumes de sang mais les méthodes sérologiques actuelles et en particulier les méthodes immuno-enzymatiques sont pratiquées en microcuvette nécessitant de faibles quantités de sérum. Le sang est alors collecté sur papier buvard ou au moyen de tubes capillaires. Différentes méthodes de récolte du sang sur buvards ont été décrites pour la sérologie Aujeszky (BANKS M., 1985 ; TOMA B. et coll., 1986, ELOIT et Coll 1987 ; LEDRU M. et coll., 1987 ; MOTA M. et coll., 1987). En fait ces méthodes pourraient être utilisées pour d'autres sérologies et en particulier pour le dépistage des anticorps dirigés contre la Peste Porcine Classique et les Pestivirus à condition que le volume de sang et de sérum récolté soit suffisant.

Le but de la présente étude est de comparer différentes méthodes de prélèvements et de juger de leurs avantages et inconvénients réciproques tout au long de la chaîne d'analyse depuis la collecte jusqu'à la réalisation du test sérologique. Le

test sérologique utilisé dans le cas présent est une méthode ELISA de dépistage des anticorps Border Disease (LEFORBAN Y., 1988).

1. MATÉRIEL ET MÉTHODE

1.1. Animaux et souche virale

2 truies EOPS contaminées expérimentalement dans 1 animalerie protégée de la Station de Pathologie Porcine, par la souche Aveyron(1) du virus Border Disease (CHAPPUIS et coll., 1986) et 9 de leurs porcelets ont été soumis à deux séries de prélèvements sanguins. Une première série a été réalisée sur les truies et 2 porcelets âgés de 10 jours, la deuxième série sur 8 porcelets à l'âge de 3 mois. L'ensemble des 2 truies et des 9 porcelets avaient dans leur sérum des anticorps dirigés contre le virus Border Disease. Il s'agissait d'anticorps actifs pour les 2 truies et d'anticorps passifs, transmis pour le colostrum pour les porcelets. La cinétique des anticorps étudiée par le test ELISA sur des prélèvements hebdomadaires de sérum effectués à la veine jugulaire, avait montré que les titres d'anticorps étaient homogènes pour l'ensemble des animaux à un temps donné.

Un groupe de 4 porcs séronégatifs a aussi été testé lors de la deuxième série de prélèvement.

1.2. Matériel de prélèvement et de transport

Nous avons distingué le matériel destiné à la ponction veineuse d'une part (tableau 1) et le matériel de récolte et de transport du sang d'autre part (tableau 2). Cinq modes de prélèvement ont été testés. Le système de récolte du sang par ponction de la veine jugulaire n'est envisagé que comme méthode de référence. Parmi les quatre autres systèmes,

(1) aimablement fournie par le Docteur G. CHAPPUIS (Rhône-Mérieux)

TABLEAU 1
SYSTÈMES DE PONCTION VEINEUSE TESTÉS

Désignation	Fabricant	Fournisseur	Coût unitaire H.T.
1- Microlance Réf. 5752 F	Becton Dickinson	DEUTCHER Dominique SARL 5,A rue Christine de Saxe BP 62 67170 BRUMATH Tél. 88.51.92.43	0,31 FF
2- Monolet Blood lancets Réf. 1100-602018	Monoject Ballymoney, Co Antrim Northern Ireland	LABO EXPRESS SERVICE 4, rue de Seine - BP 46 91171 VIRY CHATILLON CEDEX Tél. 69.44.41.41	0,20 FF
3- Translet Device	Livestock Control BV (Holland)	L.T.P. 4, rue Rabelais 92600 ASNIERES	inclus dans le prix du système de récolte

TABLEAU 2
SYSTÈMES DE RÉCOLTE DE SANG TESTÉS

No Abréviation	Désignation Référence	Fabricant	Fournisseur	Coût unitaire H.T
1	Aiguille 18G x 1 1/2 RW Bleu	Vénoject	Rockall SA Route de Beauvais 35500 VITRE Tél. : 99.75.26.67	0,52 FF
VC	Vacurette sérum Sep 10 ml = stéril	Greiner	Deutcher Dominique SARL 5 A, rue Christine de Saxe BP 62 67170 BRUMATH Tél. : 88.51.92.43	0,94 FF
2 TD	Translet Device Kit	Livestock Control -BV (Holland)	L.T.P. 4, Rue Rabelais 92600 ASNIERES Tél. 47.90.65.09 (non commercialisé)	4,00 FF (environ)
3 TC	Tubes capillaires 7.5 x 1,5 Réf. 3.530.08	Fortuna W.G.C (Portugal)	Laboratoire National de Recherche Vétérinaire Lisbonne (Portugal)	0,10 FF
	Poirette CAPTROL Réf. 03029000	Drumond Scientific Co (USA)	Touzart et Matignon 8 rue Eugène Hénaff 94403 VITRY/SEINE Cedex	116,16 FF réutilisé
4 SB5	SéroBuvard 5	LDA des Côtes-du-Nord	LDA des Côtes-du-Nord BP 54 Rue du Sabot 22440 PLOUFRAGAN Tél. : 96.01.37.37	1,04 FF
5 DB	Disques Papier Whatman No 1 (5,5 cm) Réf. 360-10-55	Whatman International LTD Maidstone England	Proscience 1 rue de l'Ecole de Médecine 75005 Paris Tél. : 43.60.10.55	0,07 FF
	Panier rangement Diapositives	Divers	Magasins photos	15,00 FF réutilisé

deux utilisent les tubes capillaires, Translet Device et Tube hémotocrite et deux les buvards, Sérobuvard 5 et Disque buvard.

1.3. Mode de prélèvement

Le prélèvement à la veine jugulaire est effectué selon la technique couramment utilisée à la Station de Pathologie Porcine (CARIOLET, 1983).

Tous les autres prélèvements ont été réalisés par ponction des veines auriculaires marginale ou centrale sur la face supérieure de l'oreille gauche. Comme il n'était pas possible de ponctionner la même oreille à plusieurs reprises pour comparer le matériel de ponction, cette comparaison a été faite lors d'une étude préalable consistant à tester les différents types de matériel d'incision sans récolter le sang. Pour l'étude des systèmes de récolte et de transport, l'oreille a été ponctionnée une seule fois, exceptionnellement deux fois, avec le Translet Device et les quatre dispositifs ont été utilisés successivement pour récolter le sang obtenu par cette ponction. Les animaux testés étant hébergés dans une animalerie protégée le transport des prélèvements de l'animalerie au laboratoire a été réalisé dans un double sac plastique désinfecté extérieurement à l'eau de javel puis par passage sous la douche.

1.4. Test sérologique

Les anticorps ont été titrés dans les différents prélèvements sériques par un test ELISA utilisant le principe de la compétition. Ce test établi pour le dépistage des anticorps dirigés contre le virus de la Peste Porcine Classique (HAVE, P., 1984 ; LEFORBAN et coll., 1987) a été modifié pour le dépistage des anticorps dirigés contre les autres Pestivirus (LEFORBAN, 1988). L'antigène est préparé dans les mêmes conditions que l'antigène Peste mais en utilisant cette fois le virus Border Disease souche Aveyron. Un sérum de lapin dirigé contre ce virus a également été préparé.

2. RÉSULTATS

2.1. Prélèvement

2.1.1. Ponction veineuse

Les trois systèmes testés permettent d'obtenir une ponction de la veine auriculaire. L'étendue de la perforation veineuse doit être fonction de la quantité de sang à récolter. Avec la Micro-lance et le Blood Lancet, il apparaît difficile de bien doser l'étendue de la perforation de la veine car ils sont pourvus seulement d'une pointe qui produit dans la veine un trou de la dimension de la pointe. Le Translet Device est équipé d'une lancette qui permet d'inciser la veine, la longueur de l'incision étant proportionnelle à la force avec laquelle elle est faite. Cette force peut être facilement dosée car l'appareil est bien tenu en main.

2.1.2. Récolte

Les quatre dispositifs permettent de réaliser la récolte du sang dans des conditions similaires. Les tubes capillaires (T.C.) doivent être tenus bien horizontalement, alors que le Translet Device (T.D.) doit être légèrement penché. Le disque buvard (D.B.) peut être posé directement sur la goutte, qui le fait

adhérer à l'oreille, il suffit alors de surveiller la progression du sang en faisant tourner légèrement le buvard si nécessaire. Le Sérobuvard 5 (SB5) dont chaque languette est pourvue de 6 minidisques (ou pastilles) prédécoupés, s'imbibe de sang d'une manière homogène ; le prédécoupage ne semble pas modifier la diffusion du sang sur le buvard. Le T.D. présente l'avantage d'avoir la lancette de ponction disposée sur l'appareil lui-même ce qui évite d'avoir à utiliser une aiguille séparée pour réaliser la ponction. Pour les deux systèmes de buvard, le séchage constitue une étape importante du prélèvement. Le SB5 peut être suspendu mais le même dispositif est utilisé pour 5 animaux et il faut donc qu'il soit repris d'un animal à l'autre avant d'être séché avec les 5 languettes de buvard utilisées.

Les D.B. imbibés de sang sont mis à sécher dans un panier à diapositives. Le buvard ne doit pas être imbibé à plus des 2/3 de sa surface sinon il perd sa rigidité et les buvards ont tendance à se toucher lors du séchage, il est prudent de laisser une case vide entre chaque buvard dans le panier de séchage pour éviter ce contact.

Le sang collecté avec les tubes capillaires et le Translet Device est transféré dans des tubes ou des microcupules. Le kit Translet est livré avec des barettes de 8 microcupules disposées dans un cadre au format microplaque, les cupules peuvent être obturées par des petites languettes plastiques. La récupération du sang récolté avec le Translet Device se fait par retournement de l'appareil, les gouttes de sang tombant par gravité. La plaque contenant 96 prélèvements de sang peut ainsi être expédiée directement au laboratoire. Dans la présente étude, les microcupules livrées avec le Translet ont été utilisées aussi pour le transfert et le transport des sangs récoltés avec les tubes capillaires (T.C.). La vidange du tube capillaire est assurée au moyen de la poirrette spéciale. Le volume de sang recueilli avec le système Translet correspond à 1 ou 2 gouttes soit 22 ou 44 μ l (± 2 p. cent), alors que les tubes capillaires permettent de récolter 3 gouttes, soit 66 μ l (tableau 3).

2.2. Transport au Laboratoire

Dans la présente expérimentation les prélèvements placés dans plusieurs sacs plastiques ont été transportés au laboratoire immédiatement, aucune précaution particulière concernant le maintien à l'horizontal de la plaque du kit Translet dans le sac plastique n'a été prise entre l'animalerie et le laboratoire. Cependant les modalités du transport à partir d'un élevage n'ont pas été véritablement étudiées.

Lors des prélèvements effectués en élevage, les SB5 comme les D.B. peuvent être glissés dans une simple enveloppe et expédiés en l'état par la poste au laboratoire.

La plaque contenant le sang prélevé avec le Translet Device ou les tubes capillaires peut aussi être expédiée par la poste, après un emballage soigné pour éviter la casse.

2.3. Traitement du prélèvement au laboratoire

2.3.1. Traitements préliminaires

Lorsque le sang récolté avec le T.D. ou les T.C. est transféré sur une microplaque, le retournement de celle-ci au moment du transport ne gêne pas ; cependant s'agissant de faibles volumes, il est préférable de centrifuger la plaque à l'arrivée au

laboratoire pour resédimer le sang au fond des cupules. Dans notre expérimentation, 100 µl de milieu de dilution (PBS-Tween 20, 0,1 p. cent) ont ensuite été ajoutés dans chaque cupule. Le volume final du prélèvement dilué varie ainsi de 122 à 166 µl correspondant à 1 à 3 gouttes de sang prélevées. Les dilutions obtenues du sérum ou plasma figurent dans le tableau 3. Il est possible d'éviter de reprendre les culots de globules rouges si une nouvelle centrifugation du plasma dilué est effectuée en utilisant une plaque à fonds coniques. Les culots de globules rouges restent au fond des cones lorsque l'on reprend les surnageants.

Pour le système buvard, des tests préliminaires ont montré

qu'une bonne élution était obtenue avec deux mini disques dans 300 µl de PBS - Tween 20, 0,1 % dans un tube à hémolyse à la température du laboratoire pendant une heure avec agitation chaque 15'.

Dans le cas des D.B., des cercles de 5 mm de diamètre ont été découpés à l'aide d'une perforuse de bureau, pour les S.B.5 les mini disques prédécoupés de la même dimension sont détachés à l'aide d'une pointe. Dans les deux cas, pour obtenir une meilleure élution il est conseillé de plier les mini disques en 2 ou en 4 avant de les placer dans le tube à hémolyse sinon les 2 disques restent collés l'un à l'autre et l'élution est moins bonne.

TABLEAU 3
VOLUMES ET DILUTIONS DES ÉCHANTILLONS OBTENUS PAR LES CINQ
MODES DE PRÉLÈVEMENT (VALEURS CALCULÉES)

No	Mode de récolte et de traitement du prélèvement	Nombre d'unités : gouttes (g) ou pastilles (p)	Volume de sang (l)	Volume de sérum ou plasma (l)	Volume de diluant (l)	Volume final (l)	Dilution finale du sérum ou plasma
1	Vacurette (VC)	/	/	60	60	120	1/2
2	Translet Device (TD) A	2 g	44	22	100	144	1/6,5
	B	1 g	22	11	100	122	1/11
	C	2 g	44	22	250	294	1/14
3	Tube Capillaire (TC)	3 g	66	33	100	166	1/5
4	Sero Buvard 5 (SB5)	2 p	/	6	300	307	1/50
5	Disque Buvard (DB)	2 p	/	6	300	306	1/50

2.3.2. Test sérologique

100 µl de la dilution de chaque échantillon ont été utilisés dans le test ELISA. La dilution correspondant à chaque mode de prélèvement a été calculée, elle varie de 1/2 pour le sérum collecté à la veine jugulaire à 1/50 pour le D.B. Trois modalités de dilution A, B, C ont été essayées pour le sang collecté avec le T.D., ainsi 7 catégories d'échantillons différents ont été testées en ELISA (tableau 3). Trois modalités ont été utilisées lors de la première série de prélèvement (tableau 4) et 6 lors de la deuxième série (tableau 5).

Les résultats obtenus avec le test ELISA sont exprimés en pourcentage d'Inhibition de Densité Optique (IDO)p. Ce pourcentage est proportionnel d'une part à la concentration en anticorps du prélèvement sanguin d'origine et d'autre part à sa dilution. Les résultats individuels correspondant aux animaux de la série 1 et 2 figurent respectivement aux tableaux 4 et 5.

Les valeurs d'(IDO)p obtenues en ELISA avec les sérums prélevés à la veine jugulaire par le système vacuette (V.C.) sont homogènes dans les deux séries de prélèvement ($78,5 \pm 1,29$ et $67,75 \pm 4,16$ respectivement pour les séries 1 et 2). En conséquence, la concentration en anticorps des sérums d'une série d'animaux peut être considérée, elle aussi, comme homogène. La moyenne, et l'écart type des valeurs d'(IDO)p correspondant aux autres modes de prélèvement peuvent donc être elles aussi calculées. Les valeurs correspondantes figurent au bas des tableaux 4 et 5, leur variation correspond à la concentration en anticorps et donc à la dilution du sérum obtenu avec chaque mode de prélèvement. Les résultats du test ELISA confirment les dilutions calculées au tableau 3 et permettent donc de vérifier les volumes de sang collectés avec chaque mode de prélèvement.

Les valeurs d'(IDO)p obtenues avec les prélèvements des 4 porcs dépourvus d'anticorps Border, étaient voisines de zéro (0 ± 5) avec les six modes de récolte et de traitement des prélèvements testés.

TABLEAU 4
RÉSULTATS INDIVIDUELS ET COLLECTIFS DES 4 PORCS
DE LA PREMIÈRE SÉRIE EN ELISA BORDER
(RÉSULTATS EXPRIMÉS EN POURCENTAGE
D'INHIBITION DE DENSITÉ OPTIQUE (IDO)P)

No d'animal	Mode de récolte et de traitement des prélèvements		
	1 (VC)*	2C (TD)**	5 (SB5)***
388	78	76	69
389	80	71	74
158	79	76	70
159	77	74	66
Moyenne	78,5	74,25	69,75
Ecart type	$\pm 1,29$	$\pm 2,36$	$\pm 3,30$

* VC : système Vacuette avec prélèvement à la veine jugulaire

** TD : système Translet Device avec prélèvement à la veine auriculaire, transfert du sang récolté sur microplaque spéciale et dilution du sang à 1/14 (2C)

*** SB5: système Sérobuvard 5 permettant de prélever le sang sur 5 animaux à la veine auriculaire.

TABEAU 5
RÉSULTATS INDIVIDUELS ET COLLECTIFS DES 8 PORCS DE LA DEUXIÈME SÉRIE EN ELISA BORDER
(Résultats exprimés en pourcentage d'inhibition de densité optique IDOP)

No Animal	Mode de récolte et de traitement des prélèvements					
	1 (VC)*	2 A(TD)**	2 B (TD)**	3 (TC)***	4(SB5)****	5(DB)*****
148	70	64	56	65	49	48
150	68	49	30	61	32	39
151	69	61	ND	62	40	41
152	74	61	57	48	38	40
153	60	62	61	65	45	ND
156	68	63	60	58	25	32
157	69	59	55	69	42	39
158	64	59	53	54	28	18
Moyenne	67,75	59,75	53,14	60,25	37,37	36,71
Ecart types	± 4,16	± 4,68	± 10,57	± 6,75	± 8,38	± 9,48

N.D. = Non Déterminé

* VC : système Vacuette avec prélèvement à la veine jugulaire

** TD : système Translet Device avec prélèvement à la veine auriculaire, transfert du sang récolté sur microplaque spéciale et dilution du sang à 1/6,5 (2A) et 1/11 (2B).

*** TC : système Tube capillaire avec prélèvement à la veine auriculaire et dilution du sang à 1/5

**** SB5: système Sérobuvar 5 permettant de prélever le sang sur 5 animaux à la veine auriculaire

***** DB : système Disque Buvar permettant de prélever le sang sur 1 animal à la veine auriculaire.

3. DISCUSSION

Les avantages et inconvénients réciproques de chaque mode de prélèvement ont pu être évalués au cours de cette étude : les trois stades de la chaîne d'analyse à savoir la collecte, le transport et le test de laboratoire seront appréciés individuellement puis collectivement pour un mode de prélèvement donné.

3.1. Collecte

L'ensemble du processus de récolte, depuis l'entrée dans la porcherie jusqu'à l'obtention du prélèvement sanguin prêt à être expédié, a été évalué. Dans les conditions de notre essai en animalerie, aucun des 5 systèmes de prélèvements testés n'a évité la contention de l'animal au lasso : il semble en effet que même avec le système de prélèvement à l'oreille sur papier buvard, la contention soit recommandée, mais un personnel entraîné peut réaliser le prélèvement sans contention (HUMBERT E., communication personnelle). Le prélèvement à la queue n'a pas été testé, ceci a été fait par d'autres auteurs chez la truie et dans ce cas la contention ne serait pas nécessaire dans la mesure où les truies sont déjà immobilisées. (LEDRU et coll., 1987).

Concernant le prélèvement à la veine jugulaire, outre l'habitude qu'il demande pour être correctement et rapidement réalisé, son inconvénient majeur réside dans le coût de l'aiguille et du tube à prélèvement. Il est cependant irremplaçable quant la récolte d'un volume important de sang est nécessaire et quand la réaction sérologique à réaliser nécessite l'utilisation d'un sérum non hémolysé comme c'est le cas pour le test de séroneutralisation sur cultures cellulaires. C'est aussi ce mode de prélèvement qui sera choisi lorsque plusieurs examens sérologiques doivent être réalisés à partir du prélèvement.

Le dispositif T.D. permet de collecter 2 gouttes sans difficulté, si l'on désire collecter 3 gouttes il paraît nécessaire de bien laisser le Translet se remplir et de le transférer immédiatement dans la microcupule sans le déposer sur le support d'attente car il peut y avoir une fuite de sang pendant cette phase et la quantité de sang restant dans le Translet n'est plus alors suffisante pour former 3 gouttes. Cependant ce matériel semble étalonné pour 1 ou 2 gouttes, avec l'habitude il est d'ailleurs facile de ne prélever que la quantité suffisante pour former soit 1, soit 2 gouttes.

L'utilisation de microcupules de transfert, du sang prélevé avec le système Translet Device, constitue un avantage certain. Ces microcupules sont disposées par barrettes de 8 ce qui permet de ne rentrer dans la porcherie que le nombre de barrettes adapté au nombre de prélèvements à effectuer. Après le prélèvement, les barrettes utilisées sont replacées sur le cadre format microplaque prévu à cet usage. De plus la fermeture des cupules par des petites languettes de plastique permet de les manipuler et de les transporter sans risque de les renverser. Des formulaires avec le schéma de la microplaque peuvent également être établis, mentionnant le numéro de l'animal correspondant à la cupule du dépôt de son sérum dans la microplaque. Ce formulaire peut accompagner le prélèvement jusqu'à la fin de l'analyse au laboratoire : il peut être utilisé en l'état au niveau d'un système d'analyse informatisé par exemple.

Les tubes capillaires sont également tout à fait faciles à manipuler mais présentent le double inconvénient par rapport au Translet Device de nécessiter l'utilisation d'un autre appareil pour ponctionner la veine et d'un système de poire pour transférer le sang dans un tube ou une cupule. Il nous semble en effet que le système tube capillaire ne peut être recom-

mandé que dans la mesure où il n'y a pas à transporter le tube lui-même qui, très fragile, risque de se casser.

Les deux systèmes de buvards, Sérobuvard 5 et Disques, sont également commodes à utiliser et paraissent absorber des quantités équivalentes de sang par unité de surface, ce qui est normal s'agissant d'un même type de buvard (Whatman no 1). Le prédécoupage des pastilles du sérobuvard ne gêne pas l'absorption. La phase de séchage est très importante : le Sérobuvard 5 est pourvu d'un trou qui permet de l'accrocher dans la porcherie ou la voiture, en attendant qu'il sèche alors que les Disques peuvent être disposés dans un panier à diapositives. Ce panier est ensuite remis dans sa boîte avec les buvards même non complètement secs, ceux-ci continuant de sécher dans la boîte. Pour les Sérobuvards 5 il faut attendre qu'ils soient complètement secs avant de les manipuler.

3.2. Transport - Conservation

Les deux systèmes buvard présentent une très grande supériorité par rapport aux autres systèmes pour cette phase puisqu'il suffit de les glisser tel quel dans une enveloppe et de les expédier au laboratoire par la poste. De plus leur stockage au niveau du laboratoire est très aisé et surtout prend une place très limitée. Leur conservation à -20°C ou $+4^{\circ}\text{C}$ pendant un an ne semble pas modifier leur titre en anticorps ce qui est très important quand une cinétique est réalisée sur un même animal (observation personnelle non publiée).

Le transport des microcupules contenant le sang prélevé avec le Translet Device est également aisé. Cependant les plaques de transport sont fragiles et un emballage soigné avec une immobilisation complète de la plaque est nécessaire. Une boîte de transport en polystyrène au format de la plaque serait particulièrement intéressante en complément du kit. La conservation du sang prélevé avec les systèmes capillaires ne peut être envisagée au-delà de quelques semaines...

3.3. Test de laboratoire

Le traitement préliminaire de l'échantillon sanguin dépend des modalités du prélèvement.

Les prélèvements avec tubes capillaires et Translet Device avec transfert du sang immédiatement après la collecte dans les cupules de la microplaque nécessitent une centrifugation préliminaire à l'aide d'un support spécial adapté au format microplaque. Le prélèvement sanguin est ainsi prêt à être dilué : le volume de diluant à ajouter est fonction de la dilution initiale désirée et du nombre de gouttes collectées. Sachant qu'une goutte correspond approximativement à $22\ \mu\text{l}$ de sang, soit $11\ \mu\text{l}$ de sérum ou plasma, le dépôt de $100\ \mu\text{l}$ de diluant correspondra approximativement à une dilution 1/10 du sérum. Dans les tests ELISA Peste et Border Disease, le sérum de porcs à tester était jusqu'à présent utilisé à la dilution 1/2 ; il semble possible d'utiliser une dilution supérieure à condition de fixer le seuil de positivité non plus à 20 ou 25 p. cent d'inhibition mais à environ 15 p. cent. Des essais complémentaires seront nécessaires pour déterminer ce nouveau seuil en fonction du système de prélèvement utilisé. Dans tous les cas, le test ELISA par compétition nécessitera un sérum peu dilué et la dilution 1/10 paraît être la dilution maximale pour obtenir une sensibilité acceptable du test. De plus il ne semble pas que la présence de globules rouges ou d'hémoglobine dans le prélèvement ait un quelconque effet sur

le résultat du test ELISA : des essais préliminaires ont montré que le sang total donnait des résultats équivalents à ceux obtenus avec le plasma après décantation des globules rouges. Cette constatation ne s'applique que pour le test par compétition Pestivirus, cela n'est pas vérifié pour le test "sandwich" utilisé dans la recherche des anticorps Aujeszky. Un autre point concerne la possibilité de répétition du même test en cas de résultat douteux ou la réalisation d'autres tests à partir du même prélèvement. Les deux systèmes buvard permettent de réaliser plusieurs tests : le disque buvard moitié imbibé de sang permet le découpage d'environ 20 minidisques, alors que le sérobuvard 5 actuel présente 6 minidisques prédécoupés. Les systèmes tubes capillaires ne permettent pas de répéter l'analyse ce qui constitue actuellement l'inconvénient majeur de ces systèmes.

3.4. Evaluation globale des cinq Modes de Prélèvement

Le système Vacuette présente le maximum d'inconvénients dans les phases de transport et de traitement préliminaire du prélèvement puisqu'une centrifugation et un transvasement sont généralement nécessaires avant utilisation, ce qui représente un coût supplémentaire important en temps et matériel. Le système buvard nécessite une phase d'élution et donc l'utilisation d'un tube supplémentaire avec la manipulation individuelle de chaque pastille ce qui constitue un travail préliminaire pour le laboratoire. Le pliage des minidisques, qui a été réalisé lors de la présente étude est difficilement envisageable en routine. L'élution directement sur microplaque a été essayée, mais ce procédé ne nous a pas donné de résultats satisfaisants. De plus la dilution de sérum obtenue avec 2 minidisques de buvards dans notre tampon d'élution est de 1/40 à 1/50 : cette dilution est trop élevée pour les tests ELISA Pestivirus actuels qui manquent de sensibilité à cette dilution de sérum. Cependant il serait possible d'utiliser un plus grand nombre de minidisques de manière à obtenir une concentration de sérum plus élevée. Dans le test ELISA Aujeszky par compétition, des résultats satisfaisants ont été obtenus en éluant 10 minidisques dans $500\ \mu\text{l}$ d'éluant ce qui correspond à une dilution théorique du sérum de $6 \times 10/500$ soit 1/8ème (ELOIT M. communication personnelle). De plus un nouveau modèle de Sérobuvard 5 utilisant le papier Whatman no 3, deux fois plus absorbant que le Whatman no 1 est à l'étude (LORANT J.M. communication personnelle). Une autre manière de pallier la plus faible concentration de sérum obtenue avec les systèmes buvard, serait d'augmenter la sensibilité du test ELISA lui-même. En agissant à la fois sur le pouvoir absorbant du papier, sur la phase d'élution (en choisissant un tampon permettant une élution maximale et en augmentant le nombre de minidisques) et sur la sensibilité du test ELISA, il sera sans doute possible à l'avenir d'obtenir un éluat correspondant à une dilution du sérum voisine de 1/10 et donc d'utiliser les buvards pour la recherche des anticorps Pestivirus.

Cependant, dans l'état actuel de nos recherches sur les tests ELISA Pestivirus, le système tube capillaire paraît mieux adapté aux prélèvements sanguins à la veine auriculaire que le système buvard si le prélèvement doit être seulement destiné à la recherche des anticorps Pestivirus chez le porc. En effet le sang ainsi collecté permet d'obtenir une dilution 1/10 du sérum contre 1/50 pour le système buvard actuel. L'utilisation d'une plaque de transfert avec le système TD résoud d'une manière élégante le problème du transport des échantillons après la collecte. En revanche il semble que la centrifugation de la plaque à l'arrivée au laboratoire soit indispensable et celui-ci devra donc être équipé d'une centrifugeuse avec des

plateaux adaptés. Ce type de plaque de transport a l'avantage d'être du même format que les plaques ELISA utilisées au laboratoire. La dilution du prélèvement peut se faire in situ et le transfert des prélèvements dilués de la plaque transport à la plaque réaction peut être réalisé très facilement et très rapidement avec une pipette multicanal par exemple. Le coût de la manipulation au laboratoire est donc très réduit puisqu'il n'y a aucun transfert intermédiaire, ce qui contrebalance le coût assez élevé de l'appareil lui-même.

Cependant le calcul du coût global précis de l'analyse correspondant à chaque mode de prélèvement n'a pas été réalisé car il est trop dépendant des modalités de transport et de traitement préliminaire du prélèvement. Le récapitulatif des éléments positifs et négatifs de chacun des systèmes de prélèvement figurent dans les tableaux 6 et 7, les coûts étant seulement estimés comme faibles (élément positif +) ou élevés (élément négatif -) dans le tableau 6.

TABLEAU 6
FACILITÉ D'UTILISATION ET COÛTS DES CINQ TYPES DE MATÉRIEL DANS LA CHAÎNE D'ANALYSE
(POINTS POSITIFS +, POINTS NÉGATIFS -)

	Collecte		Transport		Examen	
	Facilité de réalisation	Coût	Facilité de réalisation	Coût	Facilité de réalisation	Coût
1 - Vacutainer (VC)	-	-	-	-	+/-	-
2 - Translet Device (TD)	+	-	+/-	-	+	+
3 - Tube Capillaire (TC)	+/-	+	?	?	+	+
4 - SéroBuvard 5 (SB5)	+	+/-	+	+	+	+/-
5 - Disque Buvard (DB)	+	+	+	+	+/-	+/-

TABLEAU 7
LES POINTS FORTS ET FAIBLES DE CHAQUE SYSTÈME DE PRÉLÈVEMENTS

	Points forts	Points faibles
1 - Vacutainer (VC)	- grand volume de sérum - sérum de qualité non hémolysé	- difficulté de la prise de sang - coût élevé du matériel
2 - Translet Device (TD)	- système complet couvrant toute la chaîne d'analyse	- pas de possibilité de répéter l'analyse
3 - Tube Capillaire (TC)	- faible coût	- beaucoup de manipulations - fragile
4 - SéroBuvard 5 (SB5)	- transport - utilisation facile	- sérum très dilué - phase d'élution
5 - Disque Buvard (DB)	- transport - faible coût	- sérum très dilué - phase d'élution

CONCLUSION

Cette étude préliminaire montre qu'il n'existe pas de système universel de prélèvement sanguin chez le porc. Chaque mode de prélèvement correspond au choix d'une priorité. Selon que l'on voudra privilégier la quantité et la qualité du sérum, la facilité et la rapidité de la manipulation dans l'élevage ou au laboratoire, la simplicité du transport, la possibilité de répéter le test au laboratoire, le coût du prélèvement ou de l'analyse globale, le choix se portera sur l'un ou l'autre système.

Cette étude montre d'autre part que les modalités du prélèvement ne doivent pas être dissociées de celles de l'examen de laboratoire et réciproquement. L'ensemble des étapes de la chaîne d'analyse doivent être considérées quand on veut calculer le coût d'un examen sérologique particulier.

Avec les critères retenus dans la présente expérimentation, et en faisant abstraction des problèmes spécifiques de coût, le système Translet Device paraît être actuellement le plus intéressant pour la sérologie Pestivirus utilisant la méthode ELISA Blocking. Nous pensons cependant qu'à l'avenir, les 2 systèmes buvard pourront également être utilisés pour cette même sérologie mais le nombre de minidisques devra être supérieur à 2 et la sensibilité du test ELISA Pestivirus devra aussi être améliorée pour être adaptée aux prélèvements sur papier filtre.

Des études complémentaires en élevage seront nécessaires pour étudier plus complètement les modalités pratiques de l'utilisation des différents systèmes sur le terrain. Cette étude

pourrait être réalisée dans plusieurs élevages et les recherches sérologiques pourraient porter sur les anticorps du virus de la maladie d'Aujeszky détecté par le test ELISA direct et les anticorps Pestivirus détectés par ELISA Blocking, il est possible alors que d'autres critères de choix que ceux qui ont été pris en compte ici, soient mis en évidence.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements s'adressent à Madame Catherine HOUDAYER et à Monsieur André KERANFLECH pour leur excellente collaboration technique et au Professeur Marc ELOIT qui a bien voulu accepter de relire notre manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- BANKS M., 1985. J. of Virol. Methods, **12**, 41-45
- CARIOLET R., 1983. Bull. Lab. Vet., **7**, 55-58
- CHAPPUIS G., BRUN A., KATO F., DAUVERGNE M., REYNAUD G., DURET Christiane., 1986. C.R. des Journées Nationales de la Société Française de Buiâtrie et de son GEPOC sur les Pestiviroses des ovins et des bovins. Paris, 6-7 novembre 1986, 55-65
- ELOIT M. TOMA B., 1987. Journée Rech. Porcine en France, **19**, 183-188
- HAVE P., 1984. Acta. Vet. Scand., **25**, 462-465
- LE DRU M., TOURATIER A., DUFOUR B., POURPAU-CAZALET X., 1987. Bull. des GDS, no 88, août-septembre
- LEFORBAN Y., 1988. Annual Meeting of the National Swine Fever, Laboratories Brussel, 19-20 april
- LEFORBAN Y., HAVE P., JESTIN A., VANNIER P., 1987. Rec. Med. Vet., **163** (6- 7), 667-677
- MOTH A.M.X.J., OLIVER R.E., PENROSE M.E., FORBES S.D., 1987. N.Z. Vet. J., **35**, 77-79
- TOMA B., ELOIT M., TILMANT P., 1986. Rec. Med. Vet., **162** (10), 1111-1117