

Standardisations internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques : méthodes, intérêts et limites

M. Desquesnes

Centre de coopération internationale pour la recherche agronomique et le développement, Département d'élevage et de médecine vétérinaire tropicale, s/c Centre international de recherche-développement sur l'élevage en zone subhumide, B.P. 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

Résumé

Les techniques immuno-enzymatiques (*enzyme-linked immunosorbent assay*: ELISA) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses ont fait l'objet de nombreuses études de standardisation visant une meilleure reproductibilité des tests, l'expression des résultats, le choix du seuil de positivité et des échantillons de référence. Il apparaît que la standardisation internationale des réactifs et des protocoles est nécessaire pour permettre les contrôles de qualité et la comparaison des résultats entre laboratoires, mais que l'interprétation des résultats peut se heurter à des différences importantes selon le secteur géographique étudié. Partant de ces travaux, et à la lumière du modèle de l'ELISA indirecte pour la recherche des anticorps dirigés contre *Trypanosoma vivax* chez les bovins, l'auteur propose de réaliser la standardisation internationale des réactifs, du protocole et du mode d'expression des résultats ELISA à l'aide d'échantillons de référence internationaux. En revanche, pour la standardisation locale, il est proposé de réaliser :

- l'échantillonnage des populations de référence locales ;
- l'établissement des fréquences de distribution des populations locales infectée et non infectée ;
- le choix de témoins représentatifs des populations locales (échantillons de référence secondaires) ;
- l'expression des résultats de la réaction par rapport à ces témoins ;
- l'établissement d'un contrôle interne de qualité fondé sur la réponse des témoins ;
- la détermination du seuil de positivité selon les exigences de l'utilisateur ;
- l'adaptation du seuil de positivité selon la prévalence observée dans le secteur géographique étudié.

Ces mesures permettent de déterminer la sensibilité et la spécificité du test dans la population étudiée et, lorsque la prévalence de l'infection est connue, de calculer les valeurs prédictives du test.

Mots-clés

Épreuve immuno-enzymatique (ELISA) – Interprétation des résultats – Standardisation internationale – Standardisation régionale – *Trypanosoma vivax*.

Introduction

Les épreuves immuno-enzymatiques (*enzyme-linked immunosorbent assay* : ELISA) utilisées pour la détection des anticorps ont, depuis leur développement au début des

années 1970, fait l'objet de nombreuses études et de l'établissement de multiples protocoles (3, 8, 9, 12, 17) ; en conséquence, la nécessité de standardiser ces méthodes est rapidement apparue (19).

Afin d'obtenir une bonne reproductibilité de la réaction ELISA, sur le modèle de la détection des anticorps dirigés contre *Trypanosoma congolense* chez les bovins, Bocquentin et Duvallet (3) ont proposé plusieurs mesures qui peuvent être appliquées à l'ensemble des ELISA.

Le Comité d'experts de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA), réuni à Vienne en janvier 1992, a publié des recommandations communes avec l'Office international des épizooties (OIE), pour la standardisation internationale des protocoles et des réactifs ELISA (19).

Les règles de la standardisation internationale des multiples composantes de la réaction ELISA qui mènent de la préparation des réactifs spécifiques à la lecture des densités optiques (DO) des échantillons seront rappelées. Toutefois, le plus souvent, le seuil de positivité, la sensibilité et la spécificité des tests ne peuvent être définis de manière internationale qu'à titre indicatif, car la réactivité des échantillons provenant des populations infectée et non infectée varie selon les secteurs géographiques ; ces variations seront illustrées par des modèles d'ELISA pour le diagnostic des trypanosomoses animales. Les limites de la standardisation internationale seront tracées, et la nécessité de réaliser des études de populations par secteur géographique sera soulignée. Partant des recommandations du Comité d'experts de la FAO et de l'AIEA (19), des propositions seront faites pour la méthode d'échantillonnage des populations de référence locale, le choix de témoins représentatifs de ces populations, l'expression des résultats de la réaction, l'établissement d'un contrôle de qualité interne local, la détermination du seuil de positivité selon les exigences de l'utilisateur qui peuvent porter sur le risque d'erreur, la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives. L'exemple de l'ELISA indirecte pour la recherche d'anticorps dirigés contre *Trypanosoma vivax* chez les bovins servira d'illustration à cette étude.

Standardisation internationale de l'épreuve immuno-enzymatique

Comme indiqué par le Comité d'experts de la FAO/AIEA (19), il est impératif de standardiser de manière internationale les réactifs et protocoles des réactions ELISA ; à l'aide de quelques exemples, les points critiques de cette standardisation sont présentés dans le cas de la trypanosomose animale.

Les réactifs spécifiques

Détection des antigènes

La méthode générale de l'ELISA pour la détection des antigènes des trypanosomes chez les animaux a été mise au point par Nantulya et Lindqvist (15) ; elle repose sur

l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques d'espèces, utilisés à la fois pour capturer les antigènes parasitaires et pour révéler leur présence à l'aide du même anticorps monoclonal conjugué à la peroxidase. La qualité des anticorps monoclonaux et du conjugué étant supposée constante, on n'attend pas de variations dues aux réactifs dans ce cas. Ce type de réactifs possède des qualités de standardisation internationale.

Détection des anticorps

Pour la détection des anticorps dirigés contre les trypanosomes chez les animaux, la méthode générale de l'ELISA indirecte a été étudiée et décrite par Luckins (12) ; elle repose sur la préparation d'antigènes solubles de trypanosomes qui permettent de sensibiliser la plaque ELISA, et sur l'utilisation d'un conjugué d'espèce permettant de révéler la présence des immunoglobulines (Ig) (IgG le plus souvent).

Des « conjugués d'espèce » (anticorps dirigés contre les Ig d'une espèce, et conjugués à une enzyme) dirigés contre la plupart des espèces d'importance vétérinaire sont disponibles dans le commerce ; la constance de leur qualité est généralement considérée comme satisfaisante. Lorsqu'un test est établi avec l'un de ces réactifs, il est impératif de se tenir à ce réactif sans changer de référence ou de fabricant.

Les antigènes de trypanosomes ne sont en revanche pas disponibles dans le commerce. À ce jour, pour le diagnostic des trypanosomoses animales, il n'existe pas d'antigènes recombinants qui pourraient être universellement mis à disposition des laboratoires de diagnostic, aussi, chaque laboratoire est-il tenu de préparer ses propres antigènes. La qualité de ce réactif, sur lequel repose l'ensemble de la réaction, revêt une importance capitale. Pour les trypanosomes qui cultivent facilement *in vitro* ou chez les animaux de laboratoire, la tentation est grande pour les divers laboratoires de diagnostic d'utiliser des souches locales pour la production des antigènes. Il conviendrait, pour ces parasites, d'identifier des souches, ou mieux des clones, dont les qualités antigéniques permettent une utilisation universelle, comme il a été tenté avec *T. evansi* dans le cas du test d'agglutination des trypanosomes sur carte (CATT) (2). L'idéal serait qu'un laboratoire de référence international fournisse aux laboratoires de diagnostic l'antigène permettant la sensibilisation des plaques ELISA.

Dans le cas de *T. vivax*, la culture *in vitro* n'étant pas aisée, et seules quelques souches cultivant sur rongeurs, il est difficilement envisageable qu'un unique laboratoire de référence puisse assurer la production des antigènes pour l'ensemble des laboratoires de diagnostic. En revanche, il est possible qu'un laboratoire de référence fournisse un clone de production universel.

La qualité des parasites produits *in vivo* reste intrinsèquement variable, en particulier chez les trypanosomes dont les

antigènes de surface sont hautement variables. Dans l'attente qu'un antigène recombinant choisi pour ses qualités cosmopolites puisse être proposé, il conviendrait que l'ensemble des laboratoires utilisent un même clone de parasites, cultivés et isolés dans les mêmes conditions. Des méthodes de culture, d'isolement (11) et de préparation des antigènes (9) peuvent être proposées pour la réalisation de l'ELISA indirecte pour la détection des anticorps dirigés contre *T. vivax*. Pour *T. vivax*, à ce jour, seule la standardisation internationale des méthodes est possible, celle des réactifs ne l'est pas ; en conséquence, les contrôles de qualité et les comparaisons entre laboratoires sont très difficiles.

Une fois standardisée la qualité de l'antigène et du conjugué, il convient d'établir une standardisation internationale du protocole de la réaction ELISA.

Standardisation du protocole de l'épreuve immuno-enzymatique

Optimisation du protocole

L'optimisation du protocole ELISA est réalisée de telle sorte que les rapports de DO échantillons positifs/échantillons négatifs soient le plus élevés possible. Des études préliminaires permettent de choisir le type de plaques de microtitration, les solutions tampon et les agents bloquants donnant les meilleurs résultats, et d'établir un protocole optimal qui fixe les conditions pour la procédure générale du test ELISA qui mène jusqu'à la lecture des DO. Dans le cas de l'ELISA pour la recherche de l'antigène de *T. vivax*, un protocole a été décrit par ses auteurs (15), puis modifié par la FAO/AIEA (16). Pour l'ELISA indirecte pour la détection des anticorps dirigés contre *T. vivax*, des protocoles voisins de celui décrit par Ferenc et coll. (9), qui repose sur les recommandations de J. Katende, ont été utilisés avec succès (6, 9). Pour le choix des puits « blancs », il est recommandable d'utiliser des puits n'ayant pas reçu d'échantillon mais contenant le substrat de la réaction chromogénique ; ceci afin d'éliminer le bruit de fond dû à la densité optique du substrat.

Reproductibilité du test

La reproductibilité du test ELISA est de première importance. Afin d'obtenir une bonne reproductibilité, sur le modèle de la détection des anticorps dirigés contre *T. congolense* chez les bovins, Bocquentin et Duvallet (3) ont proposé d'effectuer le dosage de tous les lots d'antigènes utilisés, de contrôler la température des réactifs, de réaliser une disposition topographique particulière de quatre échantillons du même sérum sur la plaque de microtitration, et de lire la plaque en fonction du degré d'avancement de la réaction, lorsqu'un sérum de contrôle fortement positif atteint une valeur cible prédéterminée. Cette technique de lecture sera en particulier préférée à celle des temps d'incubation fixe qui ne prennent pas en compte les variations globales d'intensité de la réaction.

Les mesures préconisées par Bocquentin et Duvallet (3) peuvent être retenues et appliquées pour l'ensemble des ELISA.

Échantillons de référence

L'utilisation d'échantillons de référence internationaux est actuellement recommandée, afin de standardiser la réaction entre les laboratoires ; le Comité d'experts de la FAO/AIEA (19) recommande l'utilisation de trois échantillons de référence internationaux fournis par un laboratoire de référence : un fortement positif, un négatif, et un faiblement positif. Ces échantillons doivent être disposés en plusieurs exemplaires sur chaque plaque de microtitration et permettre d'établir, au vu des résultats qu'ils fournissent, si la réaction ELISA s'est déroulée normalement. Les résultats étant exprimés en pourcentage de positivité (PP) par rapport à l'échantillon de référence fortement positif, on peut, par exemple, proposer que la plaque ne soit acceptée que si le rapport PP échantillon faiblement positif/PP échantillon négatif ne s'éloigne pas de plus de 1 écart-type de la valeur moyenne obtenue au laboratoire de référence après une série de tests de ces échantillons (la valeur de cet écart-type étant fournie par le laboratoire de référence).

Expression des résultats

L'expression des résultats de l'ELISA en DO doit être abandonnée au profit du PP par rapport à un échantillon de référence positif, comme indiqué par Wright et coll. (19). Nous proposons d'ajouter à cette référence internationale un mode d'expression local, qui référence les résultats à la fois à un échantillon positif et à un échantillon négatif, issus tous deux du secteur géographique étudié.

L'ensemble des mesures ci-avant exposées doit permettre le choix et/ou la préparation des réactifs spécifiques ainsi que la réalisation de la procédure amenant à la lecture des plaques ELISA de manière reproductible et comparable, sur des standards internationaux.

Limites de la standardisation internationale

La lecture quantitative des résultats d'une ELISA doit être réduite à un résultat qualitatif (« ELISA positive »/« ELISA négative », voire « ELISA douteuse »), lorsque l'objectif du diagnostic doit être atteint (10) ; la standardisation internationale de cette étape ne peut être faite qu'à titre indicatif, pour une première utilisation dans un nouveau secteur géographique. En effet, les réponses immunitaires des animaux étant variables d'une région à l'autre, la standardisation internationale doit alors faire place à la standardisation régionale.

Origine des variations

Détection des antigènes

Dans le cas de la détection des antigènes, les variations observées entre divers secteurs géographiques sont principalement dues à l'agent infectieux, et dépendent donc de cet agent. Prenons exemple de l'ELISA pour la détection des antigènes de *T. vivax* ; ce test a présenté une spécificité de 100 % et une sensibilité supérieure à 70 % lors de son évaluation sur quatre bovins africains infectés par un clone africain de *T. vivax* (15). Lors de son évaluation chez quatre bovins africains infectés par une souche de *T. vivax* isolée en Guyane française, le test a présenté une sensibilité de 4 % seulement (5). Évaluée chez des moutons infectés par *T. evansi*, sa spécificité n'a été que de 60 % (7). Dans cet exemple extrême, la validité du test est remise en question ; les différences observées sont probablement dues à l'existence de phénotypes de *T. vivax* et *T. evansi* éloignés de ceux utilisés pour la préparation des anticorps monoclonaux et/ou pour l'évaluation initiale des qualités du test.

Les écarts entre divers contextes épidémiologiques sont rarement aussi importants, mais il est nécessaire de déterminer la réponse des populations infectée et non infectée dans un secteur donné, pour connaître les qualités intrinsèques du test dans ce secteur, faute de quoi les résultats d'enquêtes peuvent apporter des données erronées.

Détection des anticorps

Dans le cas de la détection des anticorps, les variations observées entre divers secteurs géographiques sont dues à la fois aux agents infectieux et à l'hôte, et traduisent d'importantes variations qualitatives et quantitatives des Ig spécifiques détectées.

Les principales raisons de la variation de distribution des réponses ELISA des populations infectée et non infectée sont exposées ci-dessous.

Population non infectée

La réactivité moyenne des échantillons issus d'une population non infectée est variable d'une région à l'autre, à la fois par sa moyenne et son écart-type (position et profil de la distribution des fréquences de la réponse au test) (19), du fait de l'ensemble des germes présents localement, qui modifient le « bruit de fond » de la réaction. Un exemple théorique des positions et profils de distribution des fréquences des animaux non infectés dans trois secteurs géographiques différents est présenté à la Figure 1 (aux côtés de ceux des animaux infectés qui sont commentés dans le paragraphe suivant).

Population infectée

Pour l'ELISA indirecte pour la recherche des anticorps dirigés contre *T. vivax*, prise en exemple dans cette étude, l'intensité de la réponse au test dépend de l'aspect quantitatif de la reconnaissance des antigènes adsorbés sur la plaque ELISA par les anticorps présents dans l'échantillon. Si, en appliquant

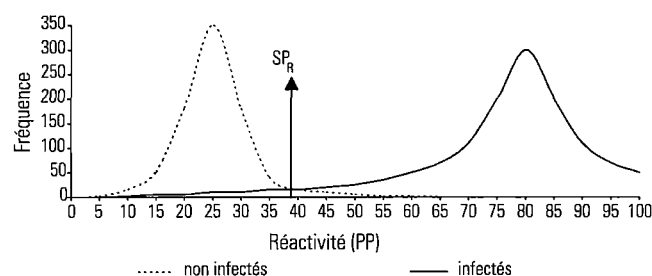


Fig. 1a
Distributions observées par le laboratoire de référence (R), et seuil de positivité recommandé (SP_R)

Au SP_R de 37,5 %, la spécificité est de 96 % et la sensibilité de 96,4 %

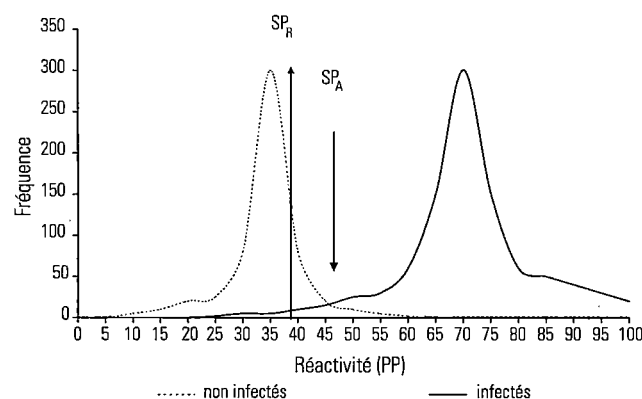


Fig. 1b
Distributions observées par le laboratoire A dans le secteur géographique A, seuil de positivité recommandé par le laboratoire de référence (SP_R), et seuil de positivité adapté à la distribution observée (SP_A)

Au SP_R de 37,5 %, la spécificité est de 78,9 % et la sensibilité de 98,7 %

Au SP_A de 47,5 %, la spécificité est de 96,9 % et la sensibilité de 96 %

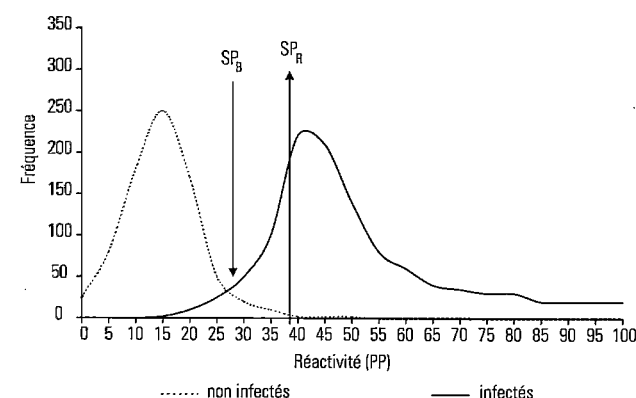


Fig. 1c
Distributions observées par le laboratoire B dans le secteur géographique B, seuil de positivité recommandé par le laboratoire de référence (SP_R), et seuil de positivité adapté à la distribution observée (SP_B)

Au SP_R de 37,5 %, la spécificité est de 99,2 % et la sensibilité de 83,2 %

Au SP_B de 27,5 %, la spécificité est de 95,4 % et la sensibilité de 96,7 %

Fig. 1
Distributions théoriques des réponses à un test immuno-enzymatique (ELISA) en pourcentage de positivité (PP) des populations infectée et non infectée dans trois secteurs géographiques différents, et seuils de positivité (SP)

les mesures précédemment évoquées, les variations qualitatives de l'antigène utilisé pour sensibiliser la plaque sont limitées, il n'en va pas de même des antigènes rencontrés sur le terrain. La variabilité des phénotypes parasitaires présents d'une région à l'autre engendre une variabilité des réponses immunitaires. D'autre part, la réponse immunitaire varie en qualité et en quantité selon l'hôte infecté (variations d'espèce, voire de race). La variation des réponses immunitaires chez le N'Dama (*Bos taurus*) et le Boran (*Bos indicus*) a en particulier été étudiée par Authié et coll. (1), et montre que la reconnaissance de certains antigènes est très différente d'une espèce à l'autre. En définitive, l'aspect quantitatif de la réaction ELISA dépend étroitement du contexte zootechnique et épidémiologique : la race de l'animal hôte, la souche ou l'ensemble de souches infectantes, l'existence ou non de plusieurs espèces de trypanosomes, et même celle d'autres germes engendrant éventuellement des réactions croisées, etc.

Un exemple théorique des positions et profils des distributions de fréquences des réponses à un test ELISA chez des animaux infectés issus de trois secteurs géographiques différents est représenté à la Figure 1.

Conséquences

Nous envisageons successivement le choix du seuil de positivité (SP) par le laboratoire de référence puis par des laboratoires régionaux.

Laboratoire de référence

Seuil de positivité

Le choix du SP d'un test est généralement considéré comme une étape arbitraire prenant en considération les critères liés de sensibilité et de spécificité de la réaction (10). Il est recommandé d'abandonner l'utilisation de SP fixes (par exemple une valeur de DO) au profit d'un SP exprimé en PP défini par un laboratoire de référence. Pour ce faire, le laboratoire de référence identifie deux populations, non infectée et infectée (naturellement et/ou expérimentalement), et détermine un SP de référence (SP_R) optimal avec une sensibilité et une spécificité satisfaisantes (19). Un exemple théorique est donné à la Figure 1a.

Qualités intrinsèques du test

La sensibilité et la spécificité sont des qualités intrinsèques du test (4) qui sont calculées avec les réponses des populations étudiées par le laboratoire de référence. Dans l'exemple donné, le SP_R est fixé à 37,5 %, avec une sensibilité de 96,4 % (ce qui signifie que 96,4 % des animaux infectés ont fourni une réponse supérieure au PP de 37,5 %), et une spécificité de 96,0 % (ce qui signifie que 96,0 % des animaux non infectés testés par le laboratoire de référence ont fourni un PP inférieur à 37,5 %).

Laboratoires régionaux

Dans les exemples théoriques présentés à la Figure 1, les distributions des populations non infectée et infectée, dans des secteurs géographiques A et B (Figures 1b et 1c) sont

différentes de celles observées par le laboratoire de référence (Fig. 1a). Si l'on appliquait le SP_R défini par le laboratoire de référence dans les secteurs géographiques A et B, on obtiendrait de très nombreuses réponses fausses ; en effet, pour le secteur A la sensibilité du test serait de 98,7 % mais sa spécificité ne serait que de 78,9 % (inacceptable), et pour le secteur B, la sensibilité serait de 83,2 % (inacceptable) et la spécificité de 99,2 %.

En réalité, lorsque les distributions de fréquence des réponses au test dans un secteur géographique n'ont pas les mêmes coordonnées (moyennes et écarts-types) que les populations étudiées par le laboratoire de référence, le seuil de positivité et les caractéristiques intrinsèques du test doivent être redéfinis. On pourrait, à ce titre, définir la sensibilité et la spécificité non comme les qualités intrinsèques du test, mais comme les qualités intrinsèques du test *dans la population étudiée*. Dans notre exemple, le laboratoire A pourrait déterminer un SP_A optimal de 47,5 % de PP (Fig. 1b) avec une sensibilité de 96,0 % et une spécificité de 96,9 %, et le laboratoire B pourrait déterminer un SP_B optimal de 27,5 % de PP (Fig. 1c) qui fournirait une sensibilité de 96,7 % et une spécificité de 95,4 %.

Cet exemple souligne combien il est illusoire de déterminer sur des standards internationaux le seuil de positivité, la sensibilité et la spécificité d'un test. Quoi qu'il en soit, un seuil de positivité peut être fixé par un laboratoire de référence, et utilisé en première intention dans un secteur géographique encore non étudié, dans l'attente que la distribution des réponses des populations locales soit mieux connue. La standardisation locale de l'ELISA sera donc la première préoccupation lorsqu'un laboratoire est amené à utiliser un nouveau test dans son secteur géographique.

Principes de la méthode de standardisation par secteur géographique

Les multiples composantes des étapes de la standardisation des ELISA qui ont été évoquées et qui précèdent la détermination du seuil de positivité du test sont du ressort de la standardisation internationale par un laboratoire de référence ; elles doivent rester inchangées, quel que soit le secteur géographique dans lequel le test est utilisé. Elles incluent en particulier l'utilisation d'échantillons de référence primaires, fournis par le laboratoire de référence.

En revanche, pour une utilisation locale du test, afin de fixer le seuil de positivité, de connaître la sensibilité et la spécificité du test, et en particulier la signification d'une réponse en termes de valeur prédictive, il est impératif de réaliser une étude des populations (infectée/non infectée) dans le secteur géographique concerné.

Dans le cas de l'ELISA indirecte pour la détection des anticorps dirigés contre *T. evansi* chez le chien, Greiner et coll. (10) ont fait des propositions visant à déterminer le seuil de positivité du test à l'intérieur de la population exposée. Cette méthode peut être retenue car elle permet de déterminer les caractéristiques d'un test dans le secteur étudié. Toutefois, plutôt que de supposer le statut infectieux des individus comme le proposent Greiner et coll., il est préférable de le déterminer avec certitude, comme le recommande le Comité d'experts de la FAO et de l'AIEA (19).

Partant des recommandations générales décrites par Wright et coll. (19), ces propositions visent à standardiser la méthode pour permettre :

- l'échantillonnage des populations de référence locales ;
- l'établissement des fréquences de distribution des populations locales infectée et non infectée ;
- le choix de témoins représentatifs des populations locales (échantillons de référence secondaires) ;
- l'expression des résultats de la réaction par rapport à ces témoins ;
- l'établissement d'un contrôle interne de qualité fondé sur la réponse des témoins ;
- la détermination du seuil de positivité et des qualités intrinsèques du test selon les exigences de l'utilisateur ;
- la précision de certains de ces paramètres selon la prévalence observée dans le secteur géographique étudié.

L'exemple de l'ELISA indirecte pour la recherche des anticorps dirigés contre *T. vivax* chez les bovins de Guyane suit et illustre l'étude théorique.

Étude des populations de référence

Échantillonnage

Un ou plusieurs tests doivent être utilisés pour identifier une dizaine d'élevages indemnes et une dizaine d'élevages infectés, dans le secteur géographique étudié. Les échantillons provenant d'environ 300 individus indemnes et 300 individus infectés sont nécessaires pour constituer un échantillonnage représentatif (13) et pouvoir définir la loi de distribution de la réponse de ces populations au test étudié.

Étude de la distribution des résultats du test

Le test est pratiqué selon les recommandations énoncées auparavant, mis à part que, dans un premier temps, les résultats sont exprimés en DO. Les DO des 300 échantillons de chaque population (infectés/non infectés) sont regroupées par classes de 0,025 unités de DO (pour plus de clarté, les valeurs de DO fournies par le lecteur ELISA sont multipliées par 1 000, on retient donc des classes de 25 DO). La distribution des DO fournies par les deux populations est reportée sur un graphe, sous forme d'histogramme ; l'allure de la distribution sera généralement celle de courbes de Gauss (Fig. 2a). Il est vérifié que les distributions sont celles de courbes de Gauss en effectuant un changement d'échelle de

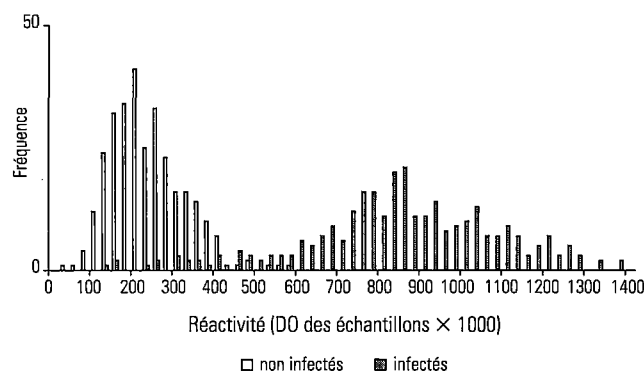


Fig. 2a
Histogrammes de distributions des fréquences

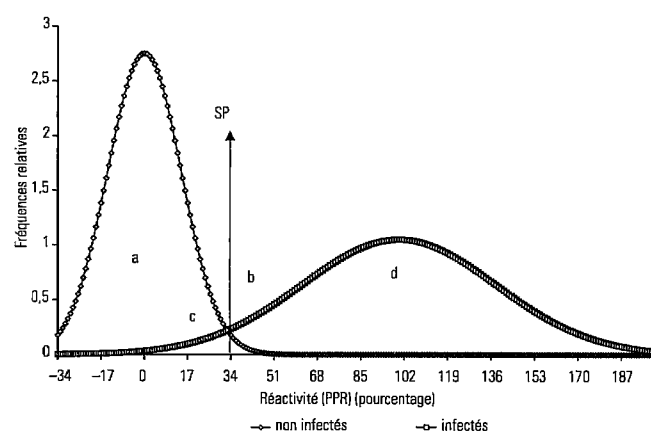


Fig. 2b
Courbes de Gauss théoriques des distributions de fréquence

À la Figure 2b, par rapport à la Figure 2a, l'échelle des x a subi un changement de repère du fait de l'expression des résultats en pourcentages de positivité relatifs (PPR). À titre indicatif, un seuil de positivité (SP) défini par résolution graphique, ainsi que les secteurs a, b, c, et d définis par le SP sont représentés sur la figure

Fig. 2
Distributions observées des fréquences de l'intensité des réponses à l'épreuve immuno-enzymatique (ELISA) indirecte pour la détection des anticorps dirigés contre *Trypanosoma vivax* chez 300 bovins infectés et 300 bovins non infectés par *T. vivax* en Guyane française

l'axe des y en logarithme (échelle d'anamorphose) ; on obtient dans ce cas une droite dite « droite de Henry » (donnée non représentée).

Transformation en distribution théorique

Partant de la distribution observée des DO, on calcule la moyenne et l'écart-type de chaque population ; on détermine ainsi la densité optique moyenne des échantillons provenant de sujets infectés (μ_p) et non infectés (μ_n), et les écarts-types de ces populations (σ_n et σ_p).

Ces éléments permettent de réaliser la transformation des distributions observées en courbes de Gauss théoriques (loi de

probabilité) représentatives de ces populations selon l'équation :

$$y = \left(\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \right) \times e^{-\left(\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2} \right)}$$

La représentation graphique est celle de courbes de Gauss parfaites (Fig. 2b).

Choix des échantillons de référence secondaires et expression des résultats

Pour le contrôle international de qualité, l'expression des résultats doit être faite en PP par rapport à l'échantillon de référence international, et la plaque acceptée ou rejetée selon les critères définis par le laboratoire de référence.

Pour l'interprétation locale du test il est proposé d'y adjoindre un autre mode d'expression, relatif à μ_n et μ_p . Pour ce faire, des échantillons dont la réponse au test ne s'éloigne pas de plus de 5 % (en PP) de la valeur de μ_n sont retenus comme « témoins négatifs » du secteur géographique étudié. De même avec μ_p pour des « témoins positifs ». Par la suite, ces échantillons seront disposés sur chaque plaque en quatre exemplaires et leur DO servira au changement de repère qui permettra d'exprimer les résultats de la réaction en pourcentage de positivité relatif (PPR) à la fois à la DO moyenne (DOM) des témoins positifs et des témoins négatifs, selon la formule :

PPR d'un échantillon =

$$\frac{\text{DOM échantillon} - \text{DOM témoins négatifs}}{\text{DOM témoins positifs} - \text{DOM témoins négatifs}}$$

où DOM signifie la moyenne des quatre valeurs du même échantillon ou du même témoin sur la même plaque.

Cette expression engendre un changement de repère, dont l'avantage est que le PPR indique directement la distance de l'échantillon avec la moyenne des échantillons non infectés (0 % de PPR), la moyenne des échantillons infectés étant alors de 100 % de PPR. Dans ce système, des échantillons peuvent présenter des PPR inférieurs à 0 % ou supérieurs à 100 % pour lesquels l'interprétation des résultats sera univoque.

Étant donné que la distinction des échantillons positifs et négatifs se fait dans l'intervalle qui sépare la moyenne des deux populations, l'expression des résultats en PPR donne un meilleur pouvoir de résolution que le résultat exprimé en PP par rapport à l'échantillon de référence primaire.

Contrôle de qualité interne

L'utilisation de ces échantillons de référence secondaires sur chaque plaque ELISA permettra de vérifier que la qualité du test est suffisante pour permettre de distinguer les échantillons locaux provenant d'animaux infectés/non infectés de manière satisfaisante, et de rejeter le test dans le cas contraire.

Après avoir réalisé une série d'une trentaine de plaques, la moyenne et l'écart-type du rapport témoins positifs/témoins négatifs doivent être établis, et pour les plaques ultérieurement testées, ce rapport devra toujours être dans l'intervalle :

$$m - \sigma < \frac{\text{DOM témoins positifs}}{\text{DOM témoins négatifs}} < + \sigma$$

Dans le cas contraire la plaque sera rejetée.

Cette mesure est un contrôle de qualité interne adapté à l'interprétation d'échantillons originaires du secteur géographique étudié. Dans ces conditions, une plaque pourrait être acceptable selon les critères internationaux mais rejetée localement si sa capacité diagnostique ne permet pas de distinguer avec une sécurité suffisante les réponses moyennes des populations locales.

Détermination du seuil de positivité et des qualités du test

Dans cet exemple théorique, on a choisi d'étudier le même nombre d'animaux infectés et non infectés (300) ; on se place donc dans l'hypothèse d'une population dans laquelle la prévalence de l'infection est de 50 %. Nous verrons dans l'exemple pratique qui suivra comment adapter les calculs à d'autres prévalences.

Partant des distributions de fréquence des populations infectée et non infectée, à l'aide d'un tableur informatique, par le cumul des fréquences, on calcule les paramètres a, b, c et d, définis au Tableau I (d'après Cuisance [4]) et illustrés à la Figure 2b, ainsi que la sensibilité, la spécificité, et les valeurs prédictives. Ces calculs permettent de dresser un tableau du type de celui présenté au Tableau II (dont les valeurs seront commentées dans la partie suivante).

Tableau I
Critères de définition des sous-populations pour l'évaluation des tests (4)

	Animaux non infectés	Animaux infectés
Test négatif	a	c
Test positif	b	d

Quelle que soit la valeur du SP qui sera retenu (exprimé en PPR dans la colonne de gauche), on peut lire dans les colonnes du tableau :

- a (colonne 4) : la fréquence cumulée des non infectés (f_{cn}), qui correspond aux vrais négatifs (partie de la distribution de fréquence cumulée des non infectés située à gauche du seuil de positivité) ;

Tableau II

Extrait de la distribution des fréquences et fréquences cumulées (%) selon le seuil de positivité (SP) ; erreur cumulée, sensibilité, spécificité et valeurs prédictives (prévalence de 50 %)

SP (en PPR)	Fni	Fi	Vrais négatifs (a)	Faux positifs (b)	Faux négatifs (c)	Vrais positifs (d)	Erreur cumulée (b+c)	Sensibilité (d÷[c+d])	Spécificité (a÷[a+b])	VPP (d÷[b+d])	VPN (a÷[a+c])
-34 %	0,18	0,00	1,04	98,96	0,00	100,00	98,96	100,0 %	1,0 %	50,3 %	100,0 %
0 %	2,75	0,03	51,35	48,65	0,42	99,58	49,07	99,6 %	51,4 %	67,2 %	100,0 %
10 %	2,17	0,06	76,52	23,48	0,91	99,09	24,39	99,1 %	76,5 %	80,8 %	98,8 %
11 %	2,06	0,07	78,58	21,42	0,98	99,02	22,39	99,0 %	78,6 %	82,2 %	98,8 %
12 %	1,95	0,07	80,53	19,47	1,05	98,95	20,51	98,9 %	80,5 %	83,6 %	98,7 %
13 %	1,84	0,08	82,37	17,63	1,12	98,88	18,75	98,9 %	82,4 %	84,9 %	98,7 %
14 %	1,73	0,08	84,10	15,90	1,21	98,79	17,10	98,8 %	84,1 %	86,1 %	98,6 %
15 %	1,61	0,09	85,71	14,29	1,29	98,71	15,58	98,7 %	85,7 %	87,4 %	98,5 %
16 %	1,50	0,09	87,21	12,79	1,38	98,62	14,18	98,6 %	87,2 %	88,5 %	98,4 %
17 %	1,38	0,10	88,59	11,41	1,48	98,52	12,89	98,5 %	88,6 %	89,6 %	98,4 %
18 %	1,27	0,10	89,86	10,14	1,58	98,42	11,72	98,4 %	89,9 %	90,7 %	98,3 %
19 %	1,17	0,11	91,03	8,97	1,69	98,31	10,66	98,3 %	91,0 %	91,6 %	98,2 %
20 %	1,06	0,11	92,09	7,91	1,81	98,19	9,71	98,2 %	92,1 %	92,5 %	98,1 %
21 %	0,96	0,12	93,05	6,95	1,93	98,07	8,87	98,0 %	93,1 %	93,4 %	98,0 %
22 %	0,87	0,13	93,92	6,08	2,05	97,95	8,13	97,9 %	93,9 %	94,2 %	97,9 %
23 %	0,78	0,13	94,71	5,29	2,19	97,81	7,48	97,8 %	94,7 %	94,9 %	97,7 %
24 %	0,70	0,14	95,40	4,60	2,33	97,67	6,93	97,7 %	95,4 %	95,5 %	97,6 %
25 %	0,62	0,15	96,03	3,97	2,48	97,52	6,45	97,5 %	96,0 %	96,1 %	97,5 %
26 %	0,55	0,16	96,58	3,42	2,64	97,36	6,06	97,4 %	96,6 %	96,6 %	97,3 %
27 %	0,49	0,17	97,06	2,94	2,81	97,19	5,74	97,2 %	97,1 %	97,1 %	97,2 %
28 %	0,43	0,17	97,49	2,51	2,98	97,02	5,49	97,0 %	97,5 %	97,5 %	97,0 %
29 %	0,37	0,18	97,86	2,14	3,16	96,84	5,30	96,8 %	97,9 %	97,8 %	96,9 %
30 %	0,32	0,19	98,19	1,81	3,36	96,64	5,17	96,6 %	98,2 %	98,2 %	96,7 %
31 %	0,28	0,20	98,47	1,53	3,56	96,44	5,09	96,4 %	98,5 %	98,4 %	96,5 %
32 %	0,24	0,21	98,71	1,29	3,77	96,23	5,06	96,2 %	98,7 %	98,7 %	96,3 %
33 %	0,21	0,22	98,91	1,09	3,99	96,01	5,08	96,0 %	98,9 %	98,9 %	96,1 %
34 %	0,18	0,23	99,09	0,91	4,22	95,78	5,14	95,8 %	99,1 %	99,1 %	95,9 %
35 %	0,15	0,24	99,24	0,76	4,47	95,53	5,23	95,5 %	99,2 %	99,2 %	95,7 %
36 %	0,13	0,25	99,36	0,64	4,72	95,28	5,36	95,3 %	99,4 %	99,3 %	95,5 %
37 %	0,11	0,27	99,47	0,53	4,99	95,01	5,52	95,0 %	99,5 %	99,4 %	95,2 %
38 %	0,09	0,28	99,56	0,44	5,27	94,73	5,71	94,7 %	99,6 %	99,5 %	95,0 %
39 %	0,07	0,29	99,63	0,37	5,56	94,44	5,92	94,4 %	99,6 %	99,6 %	94,7 %
40 %	0,06	0,30	99,69	0,31	5,86	94,14	6,16	94,1 %	99,7 %	99,7 %	94,5 %
41 %	0,05	0,31	99,74	0,26	6,17	93,83	6,43	93,8 %	99,7 %	99,7 %	94,2 %
42 %	0,04	0,33	99,79	0,21	6,50	93,50	6,71	93,5 %	99,8 %	99,8 %	93,9 %
43 %	0,03	0,34	99,82	0,18	6,84	93,16	7,02	93,2 %	99,8 %	99,8 %	93,6 %
44 %	0,03	0,35	99,85	0,15	7,20	92,80	7,35	92,8 %	99,8 %	99,8 %	93,3 %
45 %	0,02	0,37	99,87	0,13	7,57	92,43	7,70	92,4 %	99,9 %	99,9 %	93,0 %
46 %	0,02	0,38	99,89	0,11	7,95	92,05	8,06	92,1 %	99,9 %	99,9 %	92,6 %
47 %	0,01	0,40	99,90	0,10	8,35	91,65	8,44	91,7 %	99,9 %	99,9 %	92,3 %
48 %	0,01	0,41	99,91	0,09	8,76	91,24	8,84	91,2 %	99,9 %	99,9 %	91,9 %
49 %	0,01	0,43	99,92	0,08	9,18	90,82	9,26	90,8 %	99,9 %	99,9 %	91,6 %
50 %	0,01	0,44	99,93	0,07	9,63	90,37	9,70	90,4 %	99,9 %	99,9 %	91,2 %
51 %	0,01	0,46	99,94	0,06	10,08	89,92	10,15	89,9 %	99,9 %	99,9 %	90,8 %
52 %	0,00	0,47	99,94	0,06	10,56	89,44	10,62	89,4 %	99,9 %	99,9 %	90,4 %
53 %	0,00	0,49	99,94	0,06	11,05	88,95	11,10	89,0 %	99,9 %	99,9 %	90,0 %
54 %	0,00	0,50	99,95	0,05	11,55	88,45	11,60	88,5 %	99,9 %	99,9 %	89,6 %
55 %	0,00	0,52	99,95	0,05	12,07	87,93	12,12	87,9 %	99,9 %	99,9 %	89,2 %
100 %	0,00	1,05	99,95	0,05	50,52	49,48	50,57	49,5 %	100,0 %	99,9 %	66,4 %
199 %	0,00	0,04	99,96	0,04	99,57	0,43	99,62	0,4 %	100,0 %	100,0 %	50,1 %
200 %	0,00	0,03	99,96	0,04	99,60	0,40	99,65	0,4 %	100,0 %	100,0 %	50,1 %
> 200 %	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,0 %	100,0 %	100,0 %	50,0 %

PPR : pourcentage de positivité relatif

fni : fréquence des animaux non infectés

fi : fréquence des animaux infectés, calculée avec l'équation de la courbe de Gauss pour les moyennes et écarts-types des animaux non infectés (0 ; 14,44) et des animaux infectés (100 ; 37,98)

VPP : valeur prédictive positive

VPN : valeur prédictive négative

- **b** (colonne 5) : la fréquence cumulée complémentaire des non infectés, ou $100 - f_{cni}$, qui correspond aux faux positifs (partie de la distribution de fréquence cumulée des non infectés située à droite du seuil de positivité) ;
- **c** (colonne 6) : la fréquence cumulée des infectés (f_{ci}), qui correspond aux faux négatifs (partie de la distribution de fréquence cumulée des infectés située à gauche du seuil de positivité) ;
- **d** (colonne 7) : la fréquence cumulée complémentaire des infectés, ou $100 - f_{ci}$, qui correspond aux vrais positifs (partie de la distribution de fréquence cumulée des infectés située à droite du seuil de positivité) ;
- **b + c** (colonne 8) : la somme des résultats faux (somme des faux positifs et des faux négatifs) ;
- **d ÷ (c + d)** (colonne 9) : la sensibilité ;
- **a ÷ (a + b)** (colonne 10) : la spécificité ;
- **d ÷ (b + d)** (colonne 11) : la valeur prédictive positive (VPP) à la prévalence 50 % ;
- **a ÷ (a + c)** (colonne 12) : la valeur prédictive négative (VPN) à la prévalence 50 %.

Dans ces conditions, l'utilisateur peut déterminer le SP pour une valeur choisie de sensibilité, de spécificité ou de valeur prédictive. En outre, il peut déterminer le SP selon d'autres exigences :

- nombre minimal d'erreur : on retient comme SP la valeur minimale de la somme ($b + c$) ; ce mode de détermination du SP est recommandé pour un laboratoire de référence ;
- nombre de faux positifs = nombre de faux négatifs ($b = c$) : ce mode de détermination du SP est particulièrement adapté aux enquêtes épidémiologiques puisqu'il permet de déterminer la prévalence en annulant les effets des faux positifs et faux négatifs.

Enfin, on peut déterminer un intervalle de signification à l'aide de deux SP ayant chacun une valeur prédictive très élevée, ce qui permet d'exprimer les résultats en positif, douteux ou négatif. Ces méthodes seront illustrées dans l'exemple de l'ELISA indirecte pour la détection des anticorps dirigés contre *T. vivax* chez les bovins de Guyane française.

Adaptation du test à la prévalence réelle

Il est encore possible d'affiner l'interprétation du test lorsque la prévalence (P) de l'infection est connue dans le secteur géographique étudié. Ainsi, on peut dresser le tableau des distributions de fréquence réelles en multipliant les paramètres des infectés (c et d) par la prévalence P et ceux des non infectés (a et b) par $(1 - P)$. Dans ces conditions, on peut calculer avec une meilleure précision les valeurs prédictives du test, choisir un seuil de positivité fournissant le nombre minimum d'erreur, ou encore un nombre de faux positifs égal au nombre de faux négatifs.

L'ensemble de ces calculs est illustré ci-après.

Application à l'épreuve immuno-enzymatique indirecte pour la détection des anticorps dirigés contre *T. vivax* chez les bovins de Guyane française

Étude des populations de référence

Échantillonnage

Les individus infectés ou non infectés sont identifiés par observations cliniques, test de Woo (18), test de Murray (14) et ELISA indirecte pour la recherche des anticorps dirigés contre *T. vivax* selon la méthode de Ferenc et coll. (9).

Trois cent échantillons de bovins provenant de dix élevages non infectés sont collectés, et 300 échantillons de bovins activement infectés ou ayant subi une séroconversion contemporaine de l'observation du parasite dans l'élevage sont collectés.

Étude de la distribution des réponses du test

Le test est pratiqué et les résultats des 300 échantillons de chaque population (infectés/non infectés) sont regroupés par classes de 25 unités de DO. Les distributions des DO fournies par les deux populations sont reportées sur un graphe, sous forme d'histogramme (Fig. 2a). Il est vérifié que les distributions sont celles de courbes de Gauss comme indiqué précédemment.

Expression des résultats et transformation en distribution théorique

On calcule les moyennes et écarts-types des deux populations :

$$\mu_n = 229, \sigma_n = 89, \mu_p = 845 \text{ et } \sigma_p = 234.$$

On effectue le changement de repère par rapport aux réponses moyennes des non infectés et des infectés ; dans le cas de cette étude on obtient :

$$\text{PPR d'un échantillon} = \frac{\text{DO échantillon} - 229}{845 - 229}.$$

Les nouvelles moyennes ($\mu_n = 0\%$ et $\mu_p = 100\%$) et les nouveaux écarts-types ($\sigma_n = 14,44$ et $\sigma_p = 37,98$) des deux populations, permettent la représentation graphique des courbes de Gauss à l'aide d'un logiciel informatique (Fig. 2b), ce qui donne une bonne visualisation de la distribution des populations. À ce stade, une détermination graphique du SP peut être réalisée (environ 35 %).

Stockage des échantillons de référence secondaire

Plusieurs échantillons de référence régionaux ayant présenté des valeurs ne s'éloignant pas de plus de 5 % (en PPR) de μ_n et μ_p sont identifiés, aliquotés et stockés à -80°C ; ils serviront

de témoins négatifs et positifs régionaux de la réaction (échantillons de référence secondaires), et permettront pour des tests ultérieurs le calcul du PPR des échantillons de chaque plaque ELISA selon la relation :

PPR d'un échantillon =

$$\frac{\text{DOM échantillon} - \text{DOM témoins négatifs}}{\text{DOM témoins positifs} - \text{DOM témoins négatifs}}$$

Contrôle de qualité interne

Pour le contrôle de qualité interne local, après avoir réalisé une série de 37 plaques, la moyenne du rapport témoins positifs/témoins négatifs a été de 3,71 et l'écart-type de 0,29. Le rapport témoins positifs/témoins négatifs des plaques ultérieurement testées devra donc toujours être dans l'intervalle :

$$3,42 < \frac{\text{DOM témoins positifs}}{\text{DOM témoins négatifs}} < 4.$$

Détermination du seuil de positivité et des qualités du test selon les exigences de l'utilisateur

Dans cet exemple, pour lequel on a choisi d'étudier 300 animaux infectés et 300 non infectés, la prévalence théorique de l'infection est de 50 %.

Le Tableau II présente, selon le SP choisi (exprimé en PPR dans la colonne de gauche), la fréquence des non infectés (fni) et des infectés (fi), ainsi que les paramètres a (fci ou vrais négatifs), b (100 - fci, ou faux positifs), c (100 - fci, ou faux négatifs), d (fci, ou vrai positifs), la somme des erreurs (b + c), la sensibilité ($d \div [c + d]$), la spécificité ($a \div [a + b]$), la VPP ($d \div [b + d]$) et la VPN ($a \div [a + c]$). Toutes les données ne pouvant être représentées, seules les valeurs extrêmes et la partie moyenne des valeurs du SP sont indiquées (valeurs du SP comprises entre 10 % et 55 %).

- Si l'utilisateur souhaite fixer la sensibilité à 98 %, en lisant le Tableau II (colonne 9), on voit qu'il faut choisir un SP de 21 % de PPR, que la spécificité du test est de 93,1 %, la VPP de 93,4 % et la VPN de 98,0 %.

- Si l'utilisateur souhaite une spécificité de 98 % (colonne 10), il faudra fixer le SP au PPR 30 %, la sensibilité du test sera de 96,6 %, la VPP de 98,2 % et la VPN de 96,7 %.

- Si l'utilisateur souhaite réaliser un nombre minimum de diagnostics erronés, il choisira en fonction de la colonne 8 du tableau, un SP de 32 %, avec une sensibilité de 96,2 % et une spécificité de 98,7 %.

- S'il désire que le nombre de faux positifs soit égal au nombre de faux négatifs, en comparant les colonnes 5 et 6 il choisira le SP de 27 %, avec une sensibilité, une spécificité et des valeurs prédictives voisines de 97 %.

- S'il souhaite une VPN de 98 %, le SP sera de 21 %.

- S'il souhaite une VPP de 99 %, le SP sera de 34 %.

- Enfin, s'il souhaite déterminer un intervalle de signification à partir de valeurs prédictives très élevées, par exemple un seuil de positivité inférieur (SPI) avec une VPN de 98,5 % (colonne 12) et un seuil de positivité supérieur (SPS) avec une VPP de 99,8 % (colonne 11), il retiendra un SPI de 15 % et un SPS de 42 %. Les échantillons fournissant des PPR inférieurs au SPI seront donc négatifs, ceux compris entre le SPI et le SPS seront douteux et ceux donc le PPR est supérieur au SPS seront positifs, avec des probabilités très élevées. L'intervalle de signification est illustré dans le Tableau II par des traits horizontaux.

Ce dernier type d'expression des résultats est particulièrement adapté au diagnostic médical, alors qu'un seuil de positivité unique est d'avantage adapté aux études de population. L'intervalle de signification peut encore être calculé avec un nombre minimum d'erreur ou un nombre de faux positifs égal au nombre de faux négatifs, etc.

Les caractéristiques précédentes ont été établies arbitrairement à partir d'un échantillonnage comportant autant d'individus infectés que d'individus non infectés. Les valeurs et les seuils qui ont été indiqués sont donc relatifs à une prévalence de 50 %.

Lorsqu'on connaît, ou qu'on a pu estimer la prévalence des infections dans la population dont sont issus les échantillons testés, l'ensemble de ces paramètres peuvent être affinés.

Adaptation de l'interprétation du test à la prévalence réelle

Au cours d'une enquête épidémiologique chez 2 953 bovins de Guyane française, la séroprévalence des infections à *T. vivax* a été de 22 % (6). La connaissance de la prévalence de l'infection dans un secteur géographique donné permet d'affiner les résultats précédents en affectant aux distributions théoriques les facteurs de prévalence observée. La représentation graphique des populations de bovins infectés et non infectés en Guyane française est indiquée à la Figure 3. On voit que la distribution de fréquence des infectés est « écrasée » du fait d'une prévalence de 22 % seulement, une détermination graphique du SP amènerait à déplacer ce seuil vers la droite (environ 39 %). Ce serait le contraire si la prévalence était supérieure à 50 %.

Le Tableau III, présenté comme le Tableau II, permet d'effectuer avec une meilleure précision les mêmes calculs que précédemment. Les exigences sur la sensibilité et la spécificité sont inchangées puisqu'il s'agit de valeurs intrinsèques du test pratiqué dans la même population, en revanche elles sont associées à des valeurs prédictives différentes.

- Si l'utilisateur souhaite fixer la sensibilité à 98 %, en lisant le Tableau III (colonne 9) on voit que le SP de 21 % et la spécificité de 93 % sont inchangés, mais la VPP n'est plus que de 80 % (au lieu de 93,4 % avec la prévalence de 50 %) et la VPN est de 99,4 % (au lieu de 98 %). Dans ces conditions il sera préférable de ne retenir qu'une sensibilité de 97 % si l'on souhaite avoir des valeurs prédictives acceptables.

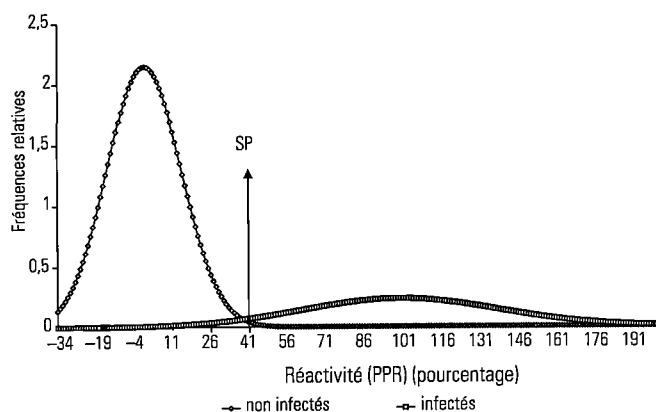


Fig. 3
Distributions théoriques des fréquences de l'intensité des réponses à l'épreuve immuno-enzymatique (ELISA) indirecte pour la détection des anticorps dirigés contre *Trypanosoma vivax* dans l'ensemble de la population de bovins de Guyane française (prévalence de l'infection : 22 %)

À titre indicatif, un seuil de positivité (SP) défini par résolution graphique est représenté sur la figure ; du fait de « l'écrasement » relatif de la courbe de Gauss des échantillons infectés par rapport à celle des échantillons non infectés, le SP est déplacé vers la droite

– Si l'utilisateur souhaite une spécificité de 98 %, le SP de 30 % et la sensibilité de 96,6 % restent inchangés, mais la VPP n'est alors que de 93,8 % et la VPN de 99,0 %.

– S'il souhaite réaliser un nombre minimum de diagnostics erronés, il choisira en fonction de la colonne 8 du tableau, un SP de 38 % (au lieu de 32 % précédemment), avec une sensibilité de 94,7 % et une spécificité de 99,6 %.

– S'il désire que le nombre de faux positif soit égal au nombre de faux négatifs, en comparant les colonnes 5 et 6 il choisira le SP de 33 % (au lieu de 27 % précédemment), avec une sensibilité de 96 % et une spécificité de 98,9 %. Au terme d'une première enquête épidémiologique, il est donc possible d'adapter le SP à la prévalence observée afin d'affiner les résultats de l'enquête jusqu'au point de raisonnable pour lequel le SP est parfaitement adapté à la prévalence.

– Si l'utilisateur souhaite une VPN de 98 %, le SP sera de 44 %, valeur très supérieure à celle précédemment définie (SP = 21 % à la prévalence de 50 %).

– S'il souhaite une VPP de 99 %, le SP sera de 41 % (au lieu de 34 % précédemment).

– Enfin, si l'utilisateur souhaite déterminer un intervalle de signification à partir de valeurs prédictives très élevées, par exemple et comme précédemment, un seuil inférieur avec une VPN de 98,5 % et un seuil supérieur avec une VPP de 99,8 %, il retiendra un SPI de 38 % et un SPS de 52 %. Ces valeurs sont particulièrement éloignées de celles précédemment définies dans l'hypothèse d'une prévalence de 50 % (SPI = 15 % et SPS = 42 %), ce qui souligne l'importance de l'adaptation des seuils à la prévalence réelle. Les SPI et SPS sont illustrés au Tableau III par des traits horizontaux.

Discussion et conclusion

La standardisation internationale des réactifs (échantillons de référence primaires inclus), du protocole et du mode d'expression des résultats (PP de l'échantillon de référence fortement positif), comme elle a été définie par Wright et coll. (19) est non seulement recommandée mais nécessaire pour permettre une bonne reproductibilité des tests, un contrôle de qualité du diagnostic, et des comparaisons entre laboratoires.

Si, pour un test donné, un laboratoire de référence peut fournir à titre indicatif les caractéristiques générales d'un test qu'il a étudié : SP, sensibilité et spécificité, il est essentiel d'avoir présent à l'esprit le fait que ces caractéristiques ne devraient être appliquées que dans des populations infectée et non infectée ayant des distributions de fréquences identiques à celles décrites par le laboratoire de référence.

Pour une utilisation du test dans un secteur géographique différent de celui du laboratoire de référence, une étude de populations infectée et non infectée est nécessaire. S'il s'avère que ces populations se présentent différemment (position et profil des distributions de fréquences) de celles décrites par le laboratoire de référence, l'étude aboutira à la définition de nouveaux SP avec des sensibilités et spécificités différentes des précédentes. Les caractéristiques dites « intrinsèques d'un test » (sensibilité et spécificité) peuvent donc être variables d'un secteur géographique à l'autre. En réalité, la sensibilité et la spécificité d'un test sont des caractéristiques intrinsèques du test dans la population étudiée.

Les modalités d'expression des résultats et d'interprétation des tests qui ont été proposées permettent aux laboratoires régionaux de :

- sélectionner des échantillons de référence secondaires au sein de la population régionale ;
- déterminer les qualités intrinsèques du test dans la population régionale (sensibilité et spécificité) ;
- exprimer les résultats individuels du test en PPR, valeur indiquant directement la distance de l'échantillon testé avec les moyennes des individus infectés et non infectés de la population locale ;
- fixer des SP selon plusieurs modalités, en fonction des critères définis par l'utilisateur, et qui dépendent de l'objectif du diagnostic (médical, épidémiologique, priorité à la sensibilité, à la spécificité ou aux valeurs prédictives) ;
- introduire un contrôle de qualité interne reposant sur le rapport des échantillons de référence secondaires (DO témoins positifs/témoins négatifs) issus du secteur géographique étudié.

Les valeurs prédictives du test peuvent être affinées lorsqu'on a pu déterminer la prévalence réelle de l'infection dans la population dont les échantillons sont issus. L'exemple donné indique que les valeurs prédictives du test peuvent être très

Tableau III

Extrait de la distribution des fréquences cumulées (%) selon le seuil de positivité (SP) ; erreur cumulée, sensibilité, spécificité et valeurs prédictives (prévalence de 22 %)

SP (en PPR)	Fni 1-P = 0,78 %	Fi P = 0,22 %	Vrais négatifs (a)	Faux positifs (b)	Faux négatifs (c)	Vrais positifs (d)	Erreur cumulée (b+c)	Sensibilité (d÷[c+d])	Spécificité (a÷[a+b])	VPP (d÷[b+d])	VPN (a÷[a+c])
-34 %	0,137	0,000	0,81	77,19	0,000	22,00	77,19	100,0 %	1,0 %	22,2 %	99,9 %
0 %	2,145	0,007	40,05	37,95	0,093	21,91	38,04	99,6 %	51,4 %	36,6 %	99,8 %
11 %	1,609	0,015	61,29	16,71	0,215	21,79	16,92	99,0 %	78,6 %	56,6 %	99,7 %
12 %	1,523	0,016	62,82	15,18	0,230	21,77	15,41	99,0 %	80,5 %	58,9 %	99,6 %
13 %	1,435	0,017	64,25	13,75	0,247	21,75	13,99	98,9 %	82,4 %	61,3 %	99,6 %
14 %	1,346	0,018	65,60	12,40	0,265	21,73	12,67	98,8 %	84,1 %	63,7 %	99,6 %
15 %	1,256	0,019	66,85	11,15	0,284	21,72	11,43	98,7 %	85,7 %	66,1 %	99,6 %
16 %	1,167	0,020	68,02	9,98	0,304	21,70	10,28	98,6 %	87,2 %	68,5 %	99,6 %
17 %	1,079	0,021	69,10	8,90	0,326	21,67	9,23	98,5 %	88,6 %	70,9 %	99,5 %
18 %	0,993	0,023	70,09	7,91	0,348	21,65	8,26	98,4 %	89,9 %	73,2 %	99,5 %
19 %	0,909	0,024	71,00	7,00	0,372	21,63	7,37	98,3 %	91,0 %	75,6 %	99,5 %
20 %	0,829	0,025	71,83	6,17	0,397	21,60	6,57	98,2 %	92,1 %	77,8 %	99,5 %
21 %	0,752	0,027	72,58	5,42	0,424	21,58	5,84	98,1 %	93,1 %	79,9 %	99,4 %
22 %	0,679	0,028	73,26	4,74	0,452	21,55	5,19	97,9 %	93,9 %	82,0 %	99,4 %
23 %	0,61	0,030	73,87	4,13	0,482	21,52	4,61	97,8 %	94,7 %	83,9 %	99,4 %
24 %	0,545	0,031	74,42	3,58	0,513	21,49	4,10	97,7 %	95,4 %	85,7 %	99,3 %
25 %	0,485	0,033	74,90	3,10	0,546	21,45	3,65	97,5 %	96,0 %	87,4 %	99,3 %
26 %	0,43	0,035	75,33	2,67	0,581	21,42	3,25	97,4 %	96,6 %	88,9 %	99,2 %
27 %	0,379	0,037	75,71	2,29	0,617	21,38	2,91	97,2 %	97,1 %	90,3 %	99,2 %
28 %	0,332	0,038	76,04	1,96	0,656	21,34	2,61	97,0 %	97,5 %	91,6 %	99,1 %
29 %	0,29	0,040	76,33	1,67	0,696	21,30	2,36	96,8 %	97,9 %	92,7 %	99,1 %
30 %	0,252	0,042	76,58	1,42	0,738	21,26	2,15	96,6 %	98,2 %	93,8 %	99,0 %
31 %	0,218	0,044	76,80	1,20	0,783	21,22	1,98	96,4 %	98,5 %	94,7 %	99,0 %
32 %	0,188	0,047	76,99	1,01	0,829	21,17	1,84	96,2 %	98,7 %	95,4 %	98,9 %
33 %	0,161	0,049	77,15	0,85	0,878	21,12	1,73	96,0 %	98,9 %	96,1 %	98,9 %
34 %	0,137	0,051	77,29	0,71	0,929	21,07	1,64	95,8 %	99,1 %	96,7 %	98,8 %
35 %	0,116	0,054	77,41	0,59	0,983	21,02	1,58	95,5 %	99,2 %	97,2 %	98,7 %
36 %	0,098	0,056	77,50	0,50	1,039	20,96	1,54	95,3 %	99,4 %	97,7 %	98,7 %
37 %	0,083	0,058	77,59	0,41	1,097	20,90	1,51	95,0 %	99,5 %	98,1 %	98,6 %
38 %	0,069	0,061	77,66	0,34	1,159	20,84	1,50	94,7 %	99,6 %	98,4 %	98,5 %
39 %	0,058	0,064	77,71	0,29	1,222	20,78	1,51	94,4 %	99,6 %	98,6 %	98,5 %
40 %	0,048	0,066	77,76	0,24	1,289	20,71	1,53	94,1 %	99,7 %	98,9 %	98,4 %
41 %	0,039	0,069	77,80	0,20	1,358	20,64	1,56	93,8 %	99,7 %	99,0 %	98,3 %
42 %	0,032	0,072	77,83	0,17	1,430	20,57	1,60	93,5 %	99,8 %	99,2 %	98,2 %
43 %	0,026	0,075	77,86	0,14	1,505	20,49	1,65	93,2 %	99,8 %	99,3 %	98,1 %
44 %	0,021	0,078	77,88	0,12	1,583	20,42	1,70	92,8 %	99,8 %	99,4 %	98,0 %
45 %	0,017	0,081	77,90	0,10	1,664	20,34	1,77	92,4 %	99,9 %	99,5 %	97,9 %
46 %	0,014	0,084	77,91	0,09	1,749	20,25	1,84	92,1 %	99,9 %	99,6 %	97,8 %
47 %	0,011	0,087	77,92	0,08	1,836	20,16	1,91	91,7 %	99,9 %	99,6 %	97,7 %
48 %	0,009	0,091	77,93	0,07	1,927	20,07	1,99	91,2 %	99,9 %	99,7 %	97,6 %
49 %	0,007	0,094	77,94	0,06	2,020	19,98	2,08	90,8 %	99,9 %	99,7 %	97,5 %
50 %	0,006	0,097	77,95	0,05	2,118	19,88	2,17	90,4 %	99,9 %	99,7 %	97,4 %
51 %	0,004	0,101	77,95	0,05	2,218	19,78	2,27	89,9 %	99,9 %	99,7 %	97,2 %
52 %	0,003	0,104	77,95	0,05	2,322	19,68	2,37	89,4 %	99,9 %	99,8 %	97,1 %
53 %	0,003	0,108	77,96	0,04	2,430	19,57	2,47	89,0 %	99,9 %	99,8 %	97,0 %
54 %	0,002	0,111	77,96	0,04	2,541	19,46	2,58	88,5 %	99,9 %	99,8 %	96,8 %
55 %	0,002	0,115	77,96	0,04	2,656	19,34	2,70	87,9 %	99,9 %	99,8 %	96,7 %
100 %	1E-10	0,231	77,96	0,04	11,115	10,89	11,15	49,5 %	100,0 %	99,7 %	87,5 %
199 %	3E-41	0,008	77,96	0,04	21,905	0,09	21,94	0,4 %	100,0 %	99,8 %	78,1 %
200 %	1E-41	0,007	77,96	0,04	21,913	0,09	21,95	0,4 %	100,0 %	99,8 %	78,1 %
>200 %	78,00	0,00	22,000	0,00	22,00	0,0 %	100,0 %	0,0 %	78,0 %

À la prévalence de 22 %, la fréquence relative des non infectés (fni) est affectée d'un facteur de 0,78, et celle des infectés (fi) d'un facteur de 0,22

PPR : pourcentage de positivité relatif

VPP : valeur prédictive positive

VPN : valeur prédictive négative

différentes de la valeur théorique (à la prévalence théorique de 50 %) ; il est important de souligner l'impact de la prévalence sur la signification du test.

Ainsi les résultats d'une enquête épidémiologique peuvent-ils être affinés à posteriori, par une redéfinition du SP.

Ces modes d'interprétation du test sont plus souples et plus adaptés à l'utilisation locale que le PP d'un échantillon de référence international qui peut avoir localement des significations contradictoires. L'utilisation des échantillons de référence internationaux reste strictement nécessaire afin de garantir la qualité du test. Les échantillons de référence primaires et secondaires n'ont pas les mêmes rôles, et leur utilisation conjointe doit apporter le maximum de sécurité et d'information aux utilisateurs.

L'exemple de l'ELISA indirecte pour la détection des anticorps dirigés contre *T. vivax* pour le diagnostic des trypanosomoses bovines a servi d'illustration à cette étude, mais les principes de la méthode qui a été exposée peuvent être appliqués à la détection des antigènes ou des anticorps, chez l'homme ou chez les animaux.

Remerciements

L'auteur remercie vivement L. Tresse, C. Garrain et J. Issaly pour leur collaboration technique indispensable à la réalisation de ces travaux.

International and regional standardisation of immuno-enzyme tests: methods, advantages and limitations

M. Desquesnes

Summary

Numerous attempts have been made to standardise immuno-enzyme techniques (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) used for the diagnosis of infectious diseases, in order to improve the reproducibility of the tests, expression of results, choice of a positive threshold, and selection of reference samples. The international standardisation of reagents and test protocols appears essential for quality control and the comparison of results between laboratories, but the interpretation of results can encounter major differences depending on the geographical sector under study. Based on these studies, and in the light of a model indirect ELISA for detecting antibodies against *Trypanosoma vivax* in cattle, the author proposes the international standardisation of reagents, test protocol, and the expression of results of ELISA using international reference samples. For local standardisation, the following proposals are made:

- sampling of representative local populations
- establishment of the distribution patterns of infected and uninfected local populations
- selection of representative controls from local populations (secondary reference samples)
- expression of test results in comparison with these controls
- establishment of internal quality control based on the response of controls
- determination of a positive threshold, in accordance with the requirements of the user
- adaptation of the positive threshold according to the prevalence observed in the geographical sector under study.

These measures will make it possible to determine sensitivity and specificity of the test in the population studied and, when the prevalence of infection is known, to calculate the predictive values of the test.

Keywords

Immuno-enzyme techniques (ELISA) – International standardisation – Interpretation – Regional standardisation – *Trypanosoma vivax*.

■

Estandarización internacional y regional de los ensayos inmunoenzimáticos: métodos, interés y límites

M. Desquesnes

Resumen

Las técnicas inmunoenzimáticas (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) utilizadas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas han sido objeto de numerosos estudios de estandarización centrados en una mejor reproductibilidad de las pruebas, la expresión de los resultados y la elección del umbral de positividad y de las muestras de referencia. Dichos estudios ponen de manifiesto que la estandarización internacional de los reactivos y los protocolos es condición necesaria para la aplicación de controles de calidad y la comparación de los resultados obtenidos por distintos laboratorios, pero también que las importantes diferencias en función del sector geográfico del que se trate pueden dificultar la interpretación de los resultados. A partir de esas investigaciones, y ateniéndose al modelo del ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma vivax* en los bovinos, el autor propone llevar a cabo la estandarización internacional de los reactivos, el protocolo y la expresión de los resultados del ELISA con ayuda de muestras de referencia internacionales. En cambio, para la estandarización a nivel local, se sugiere de realizar:

- el muestreo en las poblaciones de referencia locales,
- la determinación de las frecuencias de distribución de las poblaciones locales infectada y no infectada,
- la elección de testigos representativos de las poblaciones locales (muestras de referencia secundarias),
- la expresión de los resultados del ensayo en relación con los mencionados testigos,
- la implantación de un control de calidad interno basado en la respuesta de los testigos,
- la determinación del umbral de positividad en función de las exigencias del usuario,
- la adaptación del umbral de positividad según la prevalencia observada en el sector geográfico que se estudie.

Tales medidas permiten determinar la sensibilidad y especificidad del ensayo sobre la población investigada y, suponiendo que se conozca la prevalencia de la infección, calcular los valores predictivos de la prueba.

Palabras clave

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) – Estandarización internacional – Estandarización regional – Interpretación de resultados – *Trypanosoma vivax*.

■

Bibliographie

1. Authie E., Muteti D.K. & Williams D.J.L. (1993). – Antibody responses to variant antigens of *Trypanosoma congolense* in cattle of differing susceptibility to trypanosomiasis. *Parasite Immunol.*, **15**, 101-111.
2. Bajyana Songa E. & Hamers R. (1988). – A card agglutination test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1/2 of *Trypanosoma evansi*. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, **68**, 233-240.
3. Bocquentin R. & Duvallet G. (1990). – Amélioration de la reproductibilité du test ELISA adapté à la détection d'anticorps anti-*Trypanosoma congolense* chez les bovins. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **43**, 179-186.
4. Cuisance D. (1995). – Note pédagogique : l'évaluation des tests de diagnostic : quels indices peut-on calculer ? *Bull. Liais. doc. OCEAC*, **28** (1), 3135.
5. Desquesnes M. (1996). – Evaluation of three antigen detection tests (monoclonal trapping ELISA) for African trypanosomes, with an isolate of *T. vivax* from French Guyana. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **791**, 172-184.
6. Desquesnes M. & Gardiner P.R. (1993). – Épidémiologie de la trypanosomose bovine (*Trypanosoma vivax*) en Guyane française. *Rev. Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **46**, 463-470.
7. Desquesnes M. & La Rocque S. de (1997). – Sensitivity and specificity of the antigen-ELISA tests for *Trypanosoma* species. In Proc. First Symposium on New World Trypanosomes, 20-22 novembre 1996, Georgetown, Guyane (sous presse).
8. Engval E. & Perlmann P. (1971). – Enzyme-linked immunosorbent assay: quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871.
9. Ferenc S.A., Stopinski V. & Courtney C.H. (1990). – The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey in the eastern Caribbean basin. *Int. J. Parasitol.*, **20** (1), 51-56.
10. Greiner M., Franke C.R., Böhning D. & Schlattmann P. (1994). – Construction of an intrinsic cut-off value for the sero-epidemiological study of *Trypanosoma evansi* infections in a canine population in Brazil: a new approach towards an unbiased estimation of prevalence. *Acta trop.*, **56**, 97-109.
11. Lanham S.M. & Godfrey D.G. (1970). – Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Expl Parasitol.*, **28**, 521-534.
12. Luckins A.G. (1977). – Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, **9**, 53-62.
13. Martin S.W., Meek A.H. & Willeberg P. (1987). – Veterinary epidemiology; principles and methods. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 343 pp.
14. Murray M., Murray P.K. & McIntyre W.I.M. (1977). – An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, **71**, 325-326.
15. Nantulya V.M. & Lindqvist K.J. (1989). – Antigen-detection enzyme-immunoassays for diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop. Med. Parasitol.*, **40**, 267-272.
16. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture/Agence internationale de l'énergie atomique (FAO/AIEA) (1994). – Trypanosomiasis ELISA kit. Direct sandwich enzyme immunoassay for the detection of antigens of *T. brucei*, *T. congolense* and *T. vivax*. FAO/AIEA, Vienne, 50 pp.
17. Voller A., Bartlett A. & Bidwell D.E. (1976). – Enzyme-immunoassays for parasitic diseases. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, **70**, 98-106.
18. Woo P.T.K. (1970). – The haematocrit centrifuge technique for diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta trop.*, **27**, 384-386.
19. Wright P.F., Nilsson E., Van Rooij E.M.A., Lelenta M. & Jeggo M.H. (1993). – Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. In Biotechnologie appliquée au diagnostic des maladies animales. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12** (2), 435-450.