



Réseaux

Étude de deux ans portant sur les résultats d'essais inter-laboratoires de diagnostic de la rage (test d'immunofluorescence, test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage, test d'inoculation à la souris, techniques de PCR) : point de départ pour l'harmonisation des méthodes

Emmanuelle Robardet (emmanuelle.robardet@anses.fr), Evelyne Picard-Meyer, Alexandre Servat, Florence Cliquet

Anses, Centre collaborateur de l'OMS (recherche et management) pour la lutte contre les zoonoses, Laboratoire de référence de l'OIE pour la rage, Laboratoire de référence de l'UE pour la rage, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy, Malzéville, France

Deux essais inter-laboratoires portant sur les techniques de diagnostic de la rage ont été menés en 2009-2010 par le laboratoire de référence de l'Union européenne (LR-UE) pour la rage. Les résultats ont montré que les laboratoires avaient obtenu le pourcentage le plus élevé de résultats concordants avec les techniques de PCR (90,5 %), l'immunofluorescence (87,1 %), suivies par le test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage (70,0 %) et le test d'inoculation à la souris (35,0 %) en 2009 et l'immunofluorescence (85,0 %) et les techniques de PCR (80,6 %) suivies du test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage (77,3 %) en 2010. Indépendamment de l'année, les techniques moléculaires sont les techniques qui ont présenté le pourcentage le plus faible de résultats faux négatifs, alors que le test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage et le test d'inoculation à la souris (uniquement réalisé en 2009 pour ce dernier) sont les techniques qui ont obtenu le pourcentage le plus faible de résultats faux positifs. Au vu des résultats obtenus par les laboratoires participants, la technique d'immunofluorescence standard de référence présente une meilleure spécificité que la RT-PCR, avec 1,6 % de faux positifs en 2009 et 5,8 % en 2010, et une meilleure sensibilité que le test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage, avec 1,6 % de faux négatifs en 2009 et en 2010. Que ce soit avec les techniques de biologie moléculaire ou avec les tests d'immunofluorescence, les résultats faux négatifs n'ont été observés que sur des souches provenant de chauves-souris, soulignant le besoin d'améliorer plus particulièrement la qualité pour ces souches-là. L'analyse des questionnaires techniques et des procédures fournis par les laboratoires participants a fait ressortir la variabilité des méthodes employées, susceptible d'entraîner des incohérences entre les résultats. En 2009, l'impact du nombre de personnes interprétant les lames d'immunofluorescence a été souligné, et reconnu comme un facteur important influant sur les résultats des laboratoires. Cette constatation confirme qu'il est nécessaire de confier cette opération à deux personnes indépendantes, dans le cadre d'un diagnostic de routine de la rage. De tels résultats soulignent le besoin pour les laboratoires de diagnostic de la rage d'améliorer l'harmonisation des procédures. Pour faciliter ce travail, une première étape consiste à émettre des recommandations relatives aux techniques de référence les plus courantes, à savoir l'immunofluorescence et le test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage. Ces recommandations ont été élaborées sur la base des recommandations internationales de l'OIE et de l'OMS ainsi que d'une actualisation des connaissances relatives aux facteurs critiques connus pour avoir un impact sur les résultats.

Introduction

La rage est une maladie infectieuse neurotropicque et mortelle provoquée par un rhabdovirus du genre *Lyssavirus*. Cette maladie représente un problème important de santé publique dans de nombreux pays dans le monde, étant responsable de 55 000 cas estimés de décès humains par an, principalement des enfants en Asie et en Afrique (OMS, 2005). Étant donné que le diagnostic clinique de la rage animale n'est pas fiable, ce diagnostic est obtenu au moyen de recherches post-mortem en laboratoire sur des tissus cérébraux. Ces recherches consistent généralement à examiner les animaux ayant mordu une personne ou ayant potentiellement contaminé des humains, mais aussi à évaluer la situation épidémiologique des pays infectés dans le cadre de la surveillance de la rage dans la faune sauvage. Par exemple, en Europe, 63 218 animaux ont été examinés en 2012, révélant 4 893 cas positifs (Source: données de *Rabies Bulletin Europe* <http://www.who-rabies-bulletin.org/>).

Même si plusieurs méthodes ont été publiées pour le diagnostic post-mortem, trois techniques de référence sont

couramment utilisées et actuellement recommandées tant par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS, 1996; OMS, 2005) que par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE, 2011). La première technique est le test d'immunofluorescence (*Fluorescent Antibody Test* ou FAT) qui détecte les antigènes viraux au moyen d'anticorps antirabiques fluorescents spécifiques (Dean *et al.*, 1996). Cette technique est considérée comme la norme de référence et permet d'identifier directement et rapidement le virus à moindre coût. Les deux autres techniques impliquent d'isoler le virus en vue de détecter l'infectiosité des particules: le test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage (*Rabies Tissue Culture Infection Test* ou RTCIT) est une technique *in vitro* qui utilise une culture cellulaire (Webster and Casey, 1996) alors que le test d'inoculation à la souris (*Mouse Inoculation Test* ou MIT) est une technique *in vivo* qui a recours à une inoculation intracérébrale du virus chez des souris sensibles (Koprowski, 1996). Cependant, pour des motifs éthiques et financiers ainsi que pour des raisons de rapidité, il est préférable d'utiliser la technique *in vitro* (OIE, 2011). Au cours des trois dernières décennies, de nombreux



Réseaux

outils moléculaires ont été mis au point et utilisés (Fooks *et al.*, 2009; Dacheux *et al.*, 2010). Il existe donc un nombre important de tests moléculaires disponibles pour compléter le diagnostic classique de la rage. Un diagnostic fiable de la rage est une condition préalable à la collecte, l'analyse, la comparaison et l'interprétation systématique et continue des données sur la rage et à la diffusion de ces informations (Cliquet *et al.*, 2010). Ce diagnostic est aussi une condition indispensable en médecine humaine pour l'administration d'un traitement préventif en temps et en heure après une exposition (OMS, 2005; OMS, 2010). Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire de mettre en place un système d'harmonisation adéquat. Cette harmonisation passe notamment par la comparaison des résultats des laboratoires et des méthodes utilisées. C'est à ces fins que le LR-UE pour la rage a préparé un essai inter-laboratoire annuel portant sur les techniques de diagnostic de la rage au titre de la directive européenne (règlement (CE) N° 737/2008 de la Commission). Le présent article présente les données des deux premiers essais inter-laboratoires annuels complets (FAT, RTCIT, MIT et PCR) et les recommandations consécutives élaborées pour améliorer l'harmonisation des techniques de référence.

Matériels et méthodes

Deux essais inter-laboratoires ont été organisés de 2009 à 2010. Deux panels de prélèvements différents ont été utilisés en 2009, alors qu'en 2010 on n'en a utilisé qu'un seul. En 2009, un panel concernait les techniques de diagnostic de référence (FAT, RTCIT et MIT) alors que l'autre ne concernait que les techniques de biologie moléculaire (RT-PCR, PCR en temps réel). Les deux panels comprenaient les mêmes lots de virus et ont été adressés le même jour à tous les laboratoires participants. En 2010, un seul panel de prélèvements se rapportait aux techniques de référence (FAT et RTCIT) et également aux

techniques de biologie moléculaire (l'essai circulaire sur le MIT a été organisé uniquement en 2009). Pour chaque étude, les laboratoires étaient tenus d'analyser le panel en utilisant leurs propres procédures en vigueur.

1. Laboratoires participants

Des laboratoires nationaux de référence (LNR) d'États membres de l'Union européenne et de pays tiers ont été invités à participer aux essais inter-laboratoires (**Figure 1**). En 2009, 32 laboratoires ont participé à l'essai inter-laboratoire sur le diagnostic de la rage pour les techniques de référence, notamment 21 LNR européens et 11 laboratoires de pays tiers. Trente-deux laboratoires ont exécuté le FAT, 20 ont exécuté le RTCIT et huit ont exécuté le MIT. Pour ce qui est de l'essai inter-laboratoire relatif aux techniques de PCR, 21 laboratoires y ont participé. Parmi ces participants se trouvaient 17 LNR européens et quatre laboratoires de pays tiers. En 2010, 42 laboratoires ont participé à l'essai inter-laboratoire, dont 24 LNR européens et 18 laboratoires de pays tiers. Quarante-quatre laboratoires ont effectué le FAT, 23 le RTCIT et 31 une technique de PCR.

2. Formation et composition des panels à tester

Chaque lot de virus a été produit par inoculation intracérébrale dans des animaux (souris, renards roux, chiens viverrins ou chiens, selon la souche) conformément aux consignes d'expérimentation sur les animaux fournies par le comité consultatif national d'éthique. Pour chaque lot de virus, les tissus cérébraux recueillis ont été mélangés afin de garantir une certaine homogénéité, répartis en tubes de 1 ml, puis lyophilisés. Les souches de virus de la rage (RABV) utilisées dans les essais inter-laboratoires étaient la souche GS7 (souche provenant de renards roux naturellement infectés en France), celles des chiens viverrins (souche de chiens viverrins de

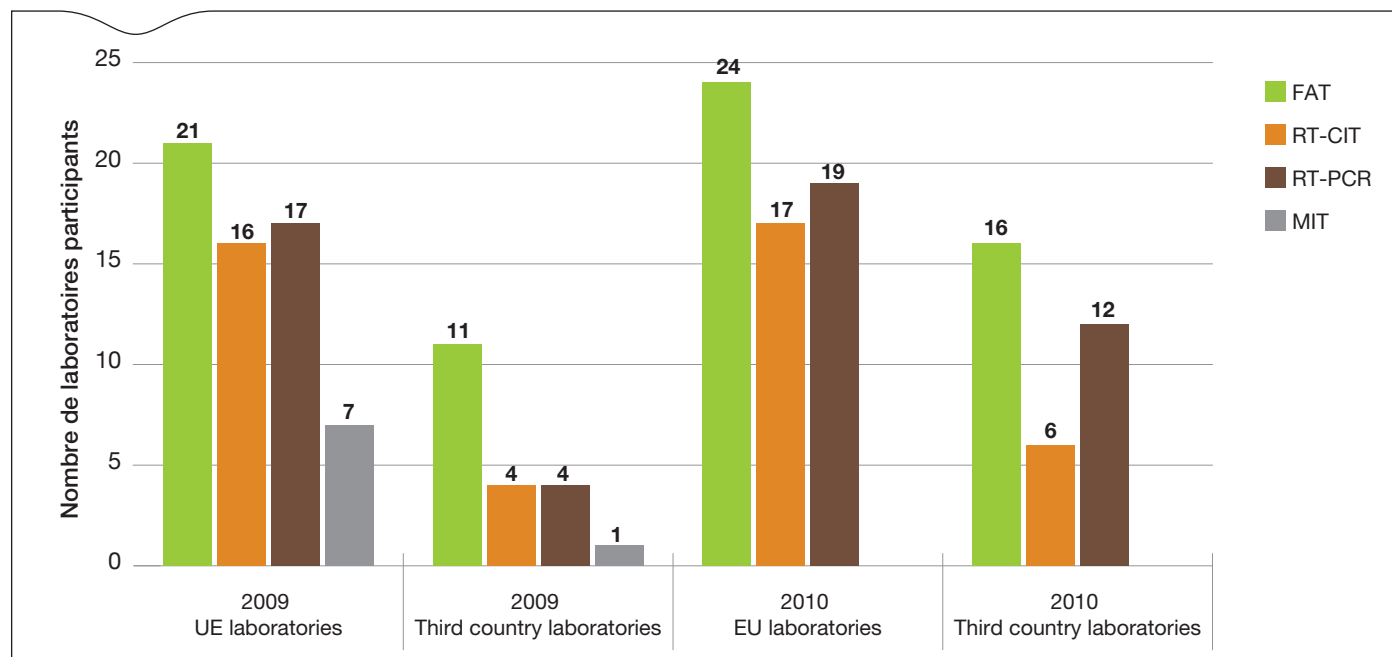


Figure 1. Nombre de laboratoires issus d'États membres de l'UE et de pays non membres de l'UE ayant participé aux essais inter-laboratoires de diagnostic de la rage en 2009 et 2010.



Réseaux

Pologne), des chiens Ariana (race de chien de Tunisie), EBLV-1b (souche de *Lyssavirus* de type 1, sous-type b prélevée sur la chauve-souris européenne provenant de France) et EBLV-2 (souche de *Lyssavirus* de type 2 prélevée sur la chauve-souris européenne provenant du Royaume-Uni), ABLV (souche de *Lyssavirus* prélevée sur la chauve-souris australienne) et des prélèvements négatifs (cerveau de renard roux négatif).

Le panel pour l'essai inter-laboratoire sur les techniques de diagnostic de référence comprenait huit prélèvements codés aléatoirement en aveugle (GS7, EBLV-1b, EBLV-2, Ariana, Ariana weak (prélèvement Ariana dilué donnant un signal de fluorescence faible en immunofluorescence), chien viverrin, 2 négatifs), tandis que le panel pour l'essai inter-laboratoire sur les techniques de PCR comprenait sept prélèvements codés en aveugle (GS7, EBLV-1b, EBLV-2, Ariana, chien viverrin, 2 négatifs). Le panel utilisé dans l'essai inter-laboratoire de 2010 comprenait sept prélèvements codés en aveugle (GS7, EBLV-1a (souche de *Lyssavirus* de type 1, sous-type a prélevée sur la chauve-souris européenne provenant de France), EBLV-2, ABLV, 3 négatifs).

3. Contrôle et stabilité des panels

En 2009, la stabilité des deux panels à tester a été évaluée par analyse après dix jours à température ambiante. En 2010, la stabilité du panel a été évaluée en examinant les prélèvements après sept et 14 jours à température ambiante. Dans ces conditions et pour tous les panels, tous les prélèvements positifs sont restés positifs et tous les prélèvements négatifs sont restés négatifs pour les tests FAT, RTCIT et RT-PCR (données non communiquées). Chaque lot de virus utilisé dans les essais a été vérifié par RT-PCR et typé avant et après l'essai inter-laboratoire.

4. Conditions d'expédition des panels

Les panels de 2009 et 2010 ont été expédiés à température ambiante et pris en charge par un transporteur international agréé, dans des conditions conformes aux recommandations UN2814, à la réglementation de l'association internationale du transport aérien (IATA) et à l'accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route (ADR,

2009). Tous les panels, sauf un, ont été réceptionnés dans un laps de temps pour lequel la stabilité était garantie. Étant donné que tous les résultats reçus concordaient, les données du panel réceptionné après le délai de stabilité garantie ont malgré cela été incluses elles aussi dans la présente étude. Les deux années, il a été recommandé aux laboratoires d'entreposer le panel à 4 °C dès réception, jusqu'à réalisation de l'analyse.

5. Questionnaire technique

En 2009, un questionnaire technique relatif à chaque étape de la procédure des méthodes à l'étude a été adressé aux laboratoires participants en même temps que les panels. En 2010, les procédures techniques originales des laboratoires participants ont été demandées. L'analyse des questionnaires techniques et les procédures techniques pour le FAT et le RTCIT ont été examinées afin de repérer et de délibérer sur les légères variantes susceptibles d'avoir un impact sur les résultats.

Résultats

Le **Tableau 1** présente les résultats généraux de l'essai pour 2009 et 2010 en fonction des différentes techniques utilisées.

1. Résultats du test d'immunofluorescence (FAT)

En 2009, quatre laboratoires (12,9 %) ont produit des résultats discordants, à savoir un résultat faux positif (1,6 % des prélèvements négatifs) et trois résultats faux négatifs (1,6 % des prélèvements positifs). Tous les laboratoires ont renvoyé des résultats satisfaisants pour les souches RABV (GS7, Ariana, Ariana weak, chien viverrin). Deux faux négatifs ont été trouvés pour EBLV-1 (6,5 % des prélèvements EBLV-1) et un pour EBLV-2 (3,2 % des prélèvements EBLV-2). En 2009, le test FAT a donc révélé des résultats faux négatifs uniquement dans les souches provenant de chauves-souris.

En 2010, six laboratoires (15,0 %) ont produit des résultats discordants pour le FAT. Sept tests (5,8 %) ont été identifiés en tant que résultats faux positifs et 3 tests (1,9 %) ont fourni des résultats faux négatifs. Des faux négatifs ont été identifiés pour la souche EBLV-1a (2,5 %), la souche EBLV-2 (2,5 %) et la souche ABLV (25,0 %). Aucun résultat faux négatif n'a

Tableau 1. Résultats des essais inter-laboratoires de 2009 et 2010

	2009		2010	
	nb discordants/ total	% discordants et intervalle de confiance	nb discordants/ total	% discordants et intervalle de confiance
FAT				
Nombre de laboratoires	4/31	12,9 [4,2-30,8]	6/40	15 [6,2-30,5]
Prélèvements négatifs	1/62	1,6 [0,1-9,8]	7/120	5,8 [2,6-12,1]
Prélèvements positifs	3/186	1,6 [0,5-5,1]	3/160	1,9 [0,5-5,8]
GS7	0/31	0 [0,0-13,7]	0/40	0 [0,0-10,9]
Ariana	0/31	0 [0,0-13,7]	–	–
Ariana (weak)	0/31	0 [0,0-13,7]	–	–
Chien viverrin	0/31	0 [0,0-13,7]	–	–
EBLV-1a	–	–	1/40	2,5 [1,3-14,7]
EBLV-1b	2/31	6,5 [1,1-22,8]	–	–
EBLV-2	1/31	3,2 [0,2-18,5]	1/40	2,5 [1,3-14,7]
ABLV	–	–	1/40	2,5 [1,3-14,7]



Réseaux

Tableau 1. Résultats des essais inter-laboratoires de 2009 et 2010 (suite)

	2009		2010	
	nb discordants/ total	% discordants et intervalle de confiance	nb discordants/ total	% discordants et intervalle de confiance
RTCIT				
Nombre de laboratoires	4/16	30 [8,3-52,3]	5/22	22,7 [8,7-45,8]
Prélèvements négatifs	0/40	0 [0,0-10,9]	3/66	4,6 [1,2-13,6]
Prélèvements positifs	6/96	6,3 [2,6-13,6]	7/88	8 [3,5-16,2]
GS7	0/16	0 [0,0-24,1]	0/22	0 [0,0-18,5]
Ariana	2/16	12,5 [2,2-39,6]	–	–
Ariana (weak)	0/16	0 [0,0-24,1]	–	–
Chien viverrin	1/16	6,3 [0,3-32,3]	–	–
EBLV-1a	–	–	3/22	13,6 [3,6-36,0]
EBLV-1b	0/16	0 [0,0-24,1]	–	–
EBLV-2	3/16	18,8 [5,0-46,3]	1/22	4,5 [0,2-24,9]
ABLV	–	–	3/22	13,6 [3,6-36,0]
MIT				
Nombre de laboratoires	6/8	75 [35,6-95,5]		
Prélèvements négatifs	0/16	0 [0,0-24,1]		
Prélèvements positifs	11/48	22,9 [12,5-37,7]		
GS7	1/8	12,5 [0,7-53,32]		
Ariana	2/8	25 [4,45-64,4]		
Ariana (weak)	0/8	0 [0,0-40,3]		
Chien viverrin	1/8	12,5 [0,7-53,3]		
EBLV-1b	1/8	12,5 [0,7-53,3]		
EBLV-2	6/8	75 [35,6-95,5]		
RT-PCR				
Nombre de laboratoires	2/21	9,5 [1,7-31,8]	6/31	19,4 [8,2-38,1]
Prélèvements négatifs	3/42	7,1 [1,9-20,6]	8/93	8,6 [4,1-16,7]
Prélèvements positifs	0/101	0 [0,0-4,6]	1/120	0,8 [0,0-5,2]
GS7	0/21	0 [0,0-20,0]	0/31	0 [0,0-13,7]
Ariana	0/21	0 [0,0-20,0]	–	–
Chien viverrin	0/21	0 [0,0-20,0]	–	–
EBLV-1a	–	–	0/31	0 [0,0-13,7]
EBLV-1b	0/20	0 [0,0-20,0]	–	–
EBLV-2	0/18	0 [0,0-21,9]	1/31	3 [0,2-18,5]
ABLV	–	–	0/27	0 [0,0-15,5]

été observé avec la souche RABV. Comme en 2009, les résultats faux négatifs ont uniquement été trouvés dans les souches provenant de chauves-souris. En ce qui concerne l'analyse des procédures, il a été trouvé qu'un facteur avait une influence importante sur les résultats en 2009 (cette analyse est décrite en détail dans le rapport sur l'essai inter-laboratoire de diagnostic de la rage réalisé en 2009 (Robardet, 2010). En général, chaque lame est examinée par deux personnes (67 % des laboratoires), alors que 22 % des laboratoires font

examiner les lames par trois personnes et 11 % par une seule personne. Le nombre de laboratoires présentant des résultats discordants (deux laboratoires sur trois avec une personne, un sur 17 avec deux personnes, deux sur sept avec trois personnes) pouvait grandement varier en fonction du nombre de personnes examinant les lames ($p\chi^2$ [correction de Yates] = 0,03), les laboratoires ayant deux examinateurs étant ceux qui ont rapporté le pourcentage le plus faible de résultats discordants.



Réseaux

2. Résultats du test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage (RTCIT)

En 2009, quatre laboratoires (30,0 %) ont produit des résultats discordants, avec six résultats faux négatifs (6,3 % des prélèvements positifs). Trois d'entre eux concernaient la souche EBLV-2 (représentant 18,8 % des tests pour cette souche), deux concernaient les prélèvements de la souche Ariana (12,5 % des prélèvements de la souche Ariana) et le dernier a été identifié dans la souche de chien viverrin (6,3 % de la souche de chien viverrin). Au vu de ces résultats, le pourcentage de faux résultats dans l'essai inter-laboratoire varie en fonction des souches, le pourcentage le plus élevé de faux résultats concernant la souche EBLV-2, puis la souche Ariana et ensuite la souche de chien viverrin.

En 2010, l'analyse des résultats de laboratoire a révélé que cinq laboratoires (22,7 %) avaient obtenu des résultats discordants. Ils ont produit trois résultats faux positifs (4,6 % des prélèvements négatifs) et sept résultats faux négatifs (8,0 % des prélèvements positifs). Une analyse plus approfondie a confirmé que les résultats faux négatifs se limitaient aux souches EBLV-1a provenant de chauves-souris (13,6 % des

prélèvements d'EBLV-1), EBLV-2 (4,5 % des prélèvements d'EBLV-2) et ABLV (13,6 % des prélèvements d'ABLV) provenant des chauves-souris.

3. Résultats du test d'inoculation à la souris (MIT)

Ce test a été réalisé en 2009 uniquement, et a inclus huit participants volontaires. Six laboratoires (75,0 %) ont présenté des résultats discordants, avec 11 résultats faux négatifs (22,9 % des tests sur des prélèvements positifs). Un faux négatif a été rapporté pour la souche EBLV-1b (12,5 %) et six résultats faux négatifs pour la souche EBLV-2 représentant 75,0 % des tests sur cette souche. Un résultat faux négatif a été décelé pour la souche GS7 (12,5 %), deux résultats faux négatifs ont été identifiés avec les prélèvements Ariana (25,0 % des tests sur la souche Ariana) et un résultat faux négatif pour la souche du chien viverrin (25,0 % des tests sur la souche de chien viverrin). En résumé, le pourcentage plus élevé de faux résultats a été obtenu avec la souche EBLV-2, puis avec la souche Ariana et les souches GS7 et EBLV-1b du chien viverrin.

Tableau 2. Recommandations du LR-UE relatives au FAT

Les « recommandations fortes » sont jugées irrévocables, car il a déjà été démontré que le fait de les modifier a une influence importante sur les résultats. Les « recommandations » ne sont pas obligatoires, mais certaines modifications peuvent éventuellement avoir une influence sur les résultats, Elles doivent donc être respectées afin de maximiser l'harmonisation européenne. La colonne « Au libre choix du laboratoire » signale des modifications acceptables pour lesquelles aucune influence importante sur les résultats n'a été démontrée.

Étape de la procédure	Recommandation forte	Recommandation	Au libre choix du laboratoire
1. Partie du cerveau	Tronc cérébral et cervelet ou hippocampe (deux répétitions par prélèvement)		
2. Préparation des lames	Méthode d'impression/de frottis		
3. Séchage avant fixation		15 à 30 min à température ambiante	
4. Fixation	Acétone, -20 °C, 30 min	Lames témoins et lames avec prélèvements placées dans des bacs de rinçage différents	
5. Séchage avant coloration		15 à 30 min à température ambiante	
6. Coloration	Respect strict des recommandations du fabricant 37 °C, 30 min, pièce humide		Ajout de bleu d'Evans au conjugué
7. Lavage	Lames témoins et avec prélèvements placées dans des bacs de rinçage différents	Immersion pendant 2 x 5 min dans du PBS	
8. Préparation	Préparation dans un tampon de pH ≥ 8,5 Une concentration élevée de glycérol peut estomper la coloration		
9. Lecture	Lire les lames dans les 2 heures qui suivent la préparation 2 examinateurs formés indépendants	Grossissement final de 200 à 400	
10. Témoins	Inclure des témoins positifs et négatifs des espèces virales cibles à chaque session		



Réseaux

4. Résultats de la PCR

Des résultats discordants ont été décelés dans deux laboratoires (9,5 %) avec trois résultats faux positifs (7,1 % des tests sur les prélèvements négatifs). Aucun résultat faux négatif n'a été retourné pour les souches EBLV-1b, EBLV-2, GS7, Ariana et de chien viverrin. En 2010, des résultats discordants ont été identifiés dans six laboratoires (19,4 %). Les résultats discordants ont inclus huit faux positifs (8,6 % des prélèvements négatifs) et un résultat faux négatif (0,8 % des prélèvements positifs). Les résultats faux positifs et faux négatifs provenaient de différents laboratoires participants. Le seul résultat faux négatif a été observé avec la souche EBLV-2 (3 % d'EBLV-2).

Discussion

1. Test d'immunofluorescence (FAT)

87 % et 85 % des laboratoires participant à l'essai sur le FAT ont présenté des résultats satisfaisants en 2009 et 2010 respectivement. Même si la rage terrestre (provoquée par le virus de la rage RABV classique) est la maladie la plus couramment étudiée, la rage de la chauve-souris est aussi diagnostiquée de plus en plus souvent. Cette situation souligne le besoin d'inclure de telles souches dans le processus d'évaluation de la qualité du diagnostic. L'étude montre que la détection des souches RABV n'a produit aucune erreur, tandis que toutes les souches provenant de chauves-souris (EBLV-1, EBLV-2 et ABLV) avaient fourni des résultats faux négatifs. Étant donné que l'infection par RABV est responsable de la majorité des

Tableau 3. Recommandations du LR-UE relatives au RTCIT

	Recommandation forte	Recommandation	Au libre choix du laboratoire
1. Matériel	Microplaque ou Labtek		
2. Culture cellulaire	Lignée cellulaire : Neuroblastome		E-MEM, Milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (D-MEM), Milieu essentiel minimum de Glasgow (G-MEM)
	Milieu : Milieu essentiel minimum d'Eagle (EMEM) sans acides aminés essentiels + 10 % de FBS (sérum de veau fœtal) + antibiotiques		
	La trypsination doit être effectuée lorsque la monocouche cellulaire atteint une confluence de 80 %		
3. Préparation de l'inoculum	Préparation à 10 %		Étape de givrage/dégivrage
	Milieu de broyage : culture cellulaire + antibiotique		
	Centrifugation à basse température		
4. Inoculation (microplaque)	Monocouche confluence de 80 %		Volume de milieu et de l'inoculum
4. Inoculation (Labtek)	Monocouche confluence de 80 %	50 µl d'inoculum et 400 µl de milieu par puits (10 ⁵ cellules /mL)	
5. Incubation	De 48 h à 96 h, 36 °C ± 2, 5 % de CO ₂		
	Changer le milieu après 72 h		
6. Lavage	PBS	Immersion 2x	
7. Fixation	Acétone 100 % (Labtek), acétone 80 % (microplaque)		
8. Séchage		15 à 30 min à température ambiante	
9. Coloration	Respect strict des recommandations du fabricant		Utilisation de bleu d'Evan
	37 °C, 30 min		
10. Lavage	PBS	Immersion 2x pour la microplaque, Immersion 2x 5 min pour Labtek	
11. Lecture	2 examinateurs formés indépendants	Grossissement général de 200 à 400	
12. Témoins	Inclure des témoins positifs et négatifs des espèces virales cibles à chaque session		



Réseaux

décès chez l'homme, les résultats de cet essai ont révélé la grande performance des laboratoires, laissant transparaître un niveau de qualité supérieur de la prise en charge en santé publique de la rage classique. En revanche, les résultats provenant des souches de chauves-souris soulignent le fait que les laboratoires doivent faire des efforts pour améliorer la sensibilité de leurs méthodes de diagnostic pour ces souches. Étant donné que ces souches ne fournissent pas le même type de fluorescence que les souches RABV classiques, les résultats faux négatifs pourraient être dus aux difficultés pour identifier la fluorescence obtenue avec ces souches. L'analyse des questionnaires techniques réalisée à la lumière des résultats inter-laboratoires a indiqué que le nombre de personnes examinant les lames pourrait avoir un impact sensible sur la fiabilité des résultats du FAT. Il conviendrait que deux personnes examinent systématiquement et de manière indépendante toutes les lames et comparent ensuite leurs résultats pour éviter toute erreur d'interprétation. Si leurs résultats concordent, il conviendrait de les valider; dans le cas contraire, ce serait à une troisième personne (plus expérimentée) de trancher. Même si aucun autre facteur significatif n'a été identifié, en raison du faible nombre de résultats discordants, l'on sait que de petites variations potentielles dans la procédure peuvent affecter, et même de manière critique, la sensibilité et la spécificité du FAT. La zone du cerveau examinée (Bingham and van der Merwe, 2002), la durée et le type de fixation (Upcott and Markson, 1971), la nature du conjugué d'anticorps antirabique couplé au FITC (Robardet *et al.*, 2013), l'alcalinité du milieu de montage (Durham *et al.*, 1986; Pital and Janowitz, 1963), le pourcentage de glycérol (Rudd *et al.*, 2005) et le recours à des filtres de microscopie adéquats (Lewis *et al.*, 1973) font partie de ces facteurs. Le LR-UE a établi des recommandations relatives à tous ces paramètres (**Tableau 2**). Ces recommandations ont été élaborées après consultation des LNR à l'occasion de l'atelier sur la rage organisé par l'UE en 2010 et sont en phase avec d'autres recommandations internationales (OMS, 1996; OIE, 2011).

2. Test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage (RTCIT)

70 % et 77,3 % des laboratoires participants ont produit des résultats satisfaisants en 2009 et 2010 respectivement. Des résultats insatisfaisants ont été obtenus pour les souches (négatifs) EBLV-2, EBLV-1a, Ariana et chien viverrin, laissant à penser que les faux résultats obtenus étaient indépendants de l'espèce. Seule la souche RABV provenant du renard roux (GS7) n'a présenté aucun résultat discordant que ce soit en 2009 ou en 2010. Même s'il n'était pas significatif, le pourcentage de laboratoires obtenant de bons résultats était plus élevé en 2010 qu'en 2009, laissant entrevoir une légère augmentation de la qualité des résultats pour le RTCIT.

L'analyse du questionnaire technique a montré que différentes souches de cellules étaient couramment utilisées. Il est reconnu que les cellules de neuroblastome murin permettent d'obtenir de meilleurs résultats pour isoler les souches de virus sauvage (Rudd and Trimarchi, 1989; Webster and Casey, 1996) et qu'elles sont à privilégier pour obtenir un diagnostic correct. Chaque laboratoire doit aussi veiller à ce que le milieu utilisé au laboratoire soit adapté à la culture cellulaire, sachant que l'ajout de sérum au milieu de culture (sérum de veau fœtal, 10 %) peut améliorer la croissance. Si l'on considère la densité cellulaire, le nombre de cellules par puit, le volume des inoculums et

la durée de l'incubation, les étapes de culture du virus dans les cellules présentent de grandes variations. Quelle que soit la quantité utilisée, il est nécessaire de s'assurer que la monocouche de cellules atteint une confluence de 80 % au terme de l'incubation. Il est également préconisé de changer le milieu après les 24 premières heures lorsque l'incubation atteint 72 h (OIE, 2011). Des guides de référence ont défini une étape de fixation dans de l'acétone à 70-80 % pendant 30 minutes à température ambiante pour les tests sur microplaques (Webster and Casey, 1996) et dans de l'acétone à 100 % pendant 30 minutes à -20 °C pour les tests en chambres de verre Lab-Tek (Barrat *et al.*, 1988). Les conditions convenables pour l'étape de lecture sont les mêmes que celles de la technique du FAT. Le **Tableau 3** propose un résumé des recommandations du LR-UE. Ces recommandations ont également été élaborées après consultation des LNR à l'occasion de l'atelier sur la rage organisé par l'UE en 2010 et sont en phase avec d'autres recommandations internationales (OMS, 1996; OIE, 2011).

3. Test d'inoculation à la souris (MIT)

25 % des laboratoires participants ont présenté des résultats satisfaisants. 22,9 % de résultats faux négatifs ont été obtenus. L'essai inter-laboratoire pour le MIT a donc enregistré le pourcentage le plus élevé de résultats faux négatifs parmi les techniques étudiées. La sensibilité inter-laboratoire du MIT était faible, en raison principalement du nombre élevé de faux négatifs pour la souche EBLV-2. Afin d'éviter toute perte de sensibilité et de spécificité de cette technique, il convient de privilégier de jeunes souris de souche albinos suisse, en particulier des nouveau-nés de moins de trois jours dans la mesure du possible, étant donné que ce sont elles les plus sensibles au virus de la rage (Koprowski, 1996). Il faudrait soumettre les souris ayant été amenées au laboratoire à une étape d'adaptation de trois jours minimum, afin d'écartier les souris immatures suite à des conditions de transport difficiles avant de mener l'expérience (Koprowski, 1996). Il faut ajouter des agents antimicrobiens à la préparation de tissus cérébraux pour éviter toute mortalité non spécifique (streptomycine à 1560 UI/mL et pénicilline à 500 UI/mL) (Koprowski, 1996). Pour éviter les phénomènes d'interférence, il est aussi recommandé de préparer le tissu en suspension pour inoculation à 10 % (Koprowski, 1996). Pour éviter détresse et souffrance aux animaux, ainsi qu'une mortalité non spécifique, il convient de réaliser l'injection intracérébrale sous anesthésie. Il faut souligner que la moitié des laboratoires participants n'anesthésiaient pas les souris avant l'inoculation, ce qui n'est pas conforme à la réglementation éthique et aux efforts entrepris pour éviter la souffrance des animaux utilisés à des fins expérimentales et scientifiques (directive 89/609/CEE du Conseil européen, 1986). À chaque fois que cela est possible, l'isolement de virus en culture cellulaire doit remplacer le test d'inoculation à la souris (OMS, 2005; OIE, 2011).

4. Techniques de biologie moléculaire (RT-PCR: PCR en temps réel et RT-PCR classique)

90,5 % des laboratoires participants ont produit des résultats satisfaisants en 2009 et 80,5 % en 2010. Aucun prélèvement faux négatif n'a été enregistré pendant l'essai en 2009, tandis qu'il en a été détecté 0,83 % en 2010, à savoir un résultat faux négatif sur un prélèvement d'EBLV-2. Même s'il est statistiquement non significatif, le pourcentage de résultats faux positifs en 2009 (7,1 %) a été inférieur à celui de 2010 (8,6 %). Des résultats faux positifs ont été relevés dans un unique



Réseaux

laboratoire ayant recours à la fois à la technique de RT-PCR en deux étapes et de PCR en temps réel. La comparaison des questionnaires techniques a révélé de grandes variations dans les techniques et les protocoles. Chaque laboratoire utilisait ses propres réactifs validés, amorces et kits commerciaux pour l'extraction de l'ARN, pour la génération d'ADNc ou pour la RT-PCR à une étape. Même si les outils de biologie moléculaire ne sont pas actuellement recommandés pour le diagnostic post-mortem de routine, ils sont de plus en plus utilisés. Cependant, si elle n'est pas réalisée par un personnel bien formé dans le domaine de la biologie moléculaire, cette technique très sensible présente un fort risque de contamination et peut donc générer des résultats faux positifs, notamment pour la PCR nichée. L'essor considérable de ces techniques au cours des dernières décennies a produit une grande diversité de techniques de biologie moléculaire (hnRT-PCR, hnRT-PCR en une étape, PCR en temps réel). Les laboratoires doivent donc prendre soin de vérifier la validité de ces techniques très sensibles en se fiant aux directives internationales relatives à l'assurance qualité (OIE, 2011).

5. Comparaisons des techniques

Les comparaisons des différentes techniques démontrent que les techniques de RT-PCR produisaient le pourcentage le plus faible de résultats faux négatifs et étaient donc les plus sensibles, tandis que les techniques de RTCIT et MIT produisaient le pourcentage le plus faible de résultats faux positifs et étaient plus spécifiques. Inversement, le pourcentage de faux positifs de la technique de RT-PCR était le plus élevé parmi toutes les techniques utilisées, tandis que le pourcentage de faux négatifs était plus élevé pour les techniques de RTCIT et MIT. La grande sensibilité de la PCR, qui en fait un outil de recherche puissant, signifie qu'il faut faire très attention d'éviter de générer des résultats faux positifs. On a trouvé que le FAT était un bon compromis étant donné qu'il n'a généré que quelques résultats faux positifs et faux négatifs (uniquement dans les souches de chauves-souris). Chaque technique concerne des composants différents du virus (antigène viral dans le cas du FAT, infectiosité virale dans le cas du RTCIT et du MIT et ARN viral dans le cas de la RT-PCR) ce qui engendre des résultats différents en termes de spécificité et de sensibilité. Alors qu'il n'était pas possible de détecter la rage par un FAT ou un RTCIT en raison de la dégradation de l'antigène et de la perte de viabilité du virus, la RT-PCR s'est avérée apte à détecter l'ARN dans des prélèvements putréfiés (David *et al.*, 2002) ou dans des prélèvements examinés après un stockage prolongé (Lopes *et al.*, 2010). On peut donc avoir recours à la RT-PCR dans un éventail plus large de conditions, par exemple, un papier FAT® imprégné après 43 jours de stockage à température ambiante (Picard-Meyer *et al.*, 2007) alors qu'il n'est pas possible de réaliser un FAT ou un RTCIT dans de telles conditions.

6. Système d'harmonisation

Cette étude souligne dans un premier temps qu'il existe de nombreuses variantes de procédure d'un laboratoire à l'autre, même avec les techniques de référence décrites dans les manuels de l'OIE (2011) et de l'OMS (1996 et 2005). Étant donné qu'il suffit de modifier un tant soit peu une technique pour entraîner une diminution drastique de la sensibilité et de la spécificité d'un test (Rudd *et al.* 2005), tout changement, même mineur, doit s'accompagner d'une validation adéquate du test

qui en évalue l'impact sur les résultats (McElhinney *et al.*, 2008). Dans le but d'utiliser des méthodes comparables et efficaces, les instances internationales (OMS, OIE et la Commission européenne) recommandent de plus en plus d'avoir recours à des méthodologies de test normalisées. Sur le plan européen, la Commission européenne a confié au laboratoire de référence de l'Union européenne (LR-UE) la tâche d'harmoniser les techniques de diagnostic utilisées pour les maladies animales (Règlement (CE) N° 737/2008 de la Commission). Un tel système a été mis en place suite à une discussion consensuelle entre les LNR et le LR-UE à la lumière des techniques normalisées existantes. Les premières recommandations fondées sur les recommandations internationales de l'OIE et de l'OMS ainsi que sur l'actualisation des connaissances relatives aux facteurs critiques susceptibles d'avoir un impact sur les résultats ont été proposées au niveau européen pour améliorer la normalisation des techniques de référence les plus utilisées, à savoir le FAT et le RTCIT.

Remerciements

Ce travail a été financé par la Commission européenne et l'Anses. Nous tenons à remercier le personnel de l'Anses ayant participé à cette étude pour la réalisation du travail technique. Nous tenons aussi à remercier tous les laboratoires nationaux de référence qui ont pris part à cette étude.

Bibliographie

- ADR. (2009) European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road, 146 pp. édition (ECE/TRANS/202, Vol. I and II), as amended by document ECE/TRANS/WP.15/199, annex 1. ed.
- Barrat, J., Barrat, M.J., Picard, M., Aubert, M.F.A., Gerard, Y., Patron, C., Ambert, J. and Quillou, B. (1988) Diagnostic de la rage sur culture cellulaire: Comparaison des résultats de l'inoculation au neuroblastome murin et de l'inoculation à la souris. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 11(3-4), 207-214.
- Bingham, J. and van der Merwe, M. (2002) Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *Journal of Virological Methods* 101(1-2), 85-94.
- Cliquet, F., Freuling, C., Smreczak, M., Van der Poel, W.H.M., Horton, D., Fooks, A.R., Robardet, E., Picard-Meyer, E. and Müller, T. (2010) Development of harmonised schemes for monitoring and reporting of rabies in animals in the European Union. *Rabies Bulletin Europe* 34 (2), 7-8.
- Dacheux L.; Wacharapluesadee S.; Hemachudha T.; Meslin F.X., Buchy P.; Reynes J.M.; Bourhy H. (2010). More accurate insight into the incidence of human rabies in developing countries through validated laboratory techniques. *PLoS Negl. Trop. Dis* 4 (11), 5 p
- David, D., Jakobson, B., Rotenberg, D., Dveres, N., Davidson, I. and Stram, Y. (2002) Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Veterinary Microbiology* 87(2), 111-118.
- Dean, D., Ableseth, M.K. and Atanasiu, P. (1996) The fluorescent antibody test. In: F.X. Meslin, M.M. Kaplan and H. Koprowski (Eds), *Laboratory techniques in rabies*, pp. 88-95. Vol. Fourth edition. World Health Organization, Geneva.
- Durham, T.M., Smith, J.-S. and Reid, F.L. (1986) Stability of immunofluorescence reactions produced by polyclonal and monoclonal antibody conjugates for rabies virus. *Journal of Clinical Microbiology* 24(2), 301-303.
- European Commission. (2008) COMMISSION REGULATION (EC) N° 737/2008 of 28 July 2008 designating the Community Reference Laboratories for crustacean diseases, rabies and bovine tuberculosis, laying down additional responsibilities and tasks for the Community Reference Laboratories for rabies and bovine tuberculosis and amending Annex VII to Regulation (EC) N° 882/2004 of the European Parliament and of the Council.



Réseaux

Fooks, A.R., Johnson, N., Freuling, C.M., Wakeley, P.R., Banyard, A.C., McElhinney, L.M., Marston, D.A., Dastjerdi, A., Wright, E., Weiss, R.A. and Müller, T. (2009) Emerging technologies for the detection of rabies virus: Challenges and hopes in the 21st century. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(9).

IATA. (2009) (International Air Transport Association) *Infectious Substances Shipping Guidelines*, 187 pp.

Koprowski, H. (1996) The mouse inoculation test, *Laboratory techniques in rabies*, pp. 476. Vol. Fourth edition. World Health Organization, Geneva.

Lewis, V.J., Thacker, W.L. and Engelman, H.M. (1973) Evaluation of the interference filter for use in rabies diagnosis by the fluorescent antibody test. *Journal of Applied Microbiology* 26(3), 429-430.

Lopes, M.C., Venditti, L.L.R. and Queiroz, L.H. (2010) Comparison between RT-PCR and the mouse inoculation test for detection of rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. *Journal of Virological Methods* 164(1-2), 19-23.

McElhinney, L., Fooks, A.R. and Radford, A.D. (2008) Diagnostic tools for the detection of rabies virus. *EJCAP* 18(3), 224-230.

OIE. (2011) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 7th ed, Paris.

Picard-Meyer, E., Barrat, J. and Cliquet, F. (2007) Use of filter paper (FTA®) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. *Journal of Virological Methods* 140(1-2), 174-182.

Pital, A. and Janowitz, S.L. (1963) Enhancement of staining intensity in the fluorescent antibody reaction. *J. Bacteriol.* 86, 888-889.

Robardet, E., Cliquet, F. (2010) Inter-laboratory trial 2009: Fluorescent antibody test (FAT), Rabies Tissue Culture Infection test (RTCIT), Mouse Inoculation Test (MIT). Report of the Community Reference Laboratory for Rabies, January 2010, 43p.

Robardet, E., Andrieu, S., Rasmussen, T.B., Dobrostana, M., Horton, D.L., Hostnik, P., Jaceviciene, I., Juhasz, T., Muller, T., Mutinelli, F., Servat, A., Smreczak, M., Vanek, E., Vazquez-Moron, S., Cliquet, F., Demerson, J.-M., Picard-Meyer, E., Moroz, D., Trotsenko, Z., Drozhzhe, Z., Biarnais, M. and Solodchuk, V. (2013) Comparative assay of fluorescent antibody test results among twelve European National Reference Laboratories using various anti-rabies conjugates. *Journal of Virological Methods*. 191, 88-94

Rudd, R.J., Smith, J.-S., Yager, P.A., Orciari, L.A. and Trimarchi, C.V. (2005) A need for standardized rabies-virus diagnostic procedures: Effect of cover-glass mountant on the reliability of antigen detection by the fluorescent antibody test. *Virus Research. Rabies in the Americas* 111(1), 83-88.

Rudd, R.J. and Trimarchi, C.V. (1989) Development and evaluation of an *in vitro* virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 27(11), 2522-2528.

Upcott, D.H. and Markson, L.M. (1971) Some aspects of fixation in the fluorescent antibody test for rabies. *Tropical Animal Health and Production* 3(2), 83-85.

Webster, W.A. and Casey, G.A. (1996) Virus Isolation in neuroblastoma cell culture, *Laboratory techniques in rabies*. Vol. Fourth Edition. World Health Organization. pp. 476.

WHO. (1996) *Laboratory techniques in rabies*, 4th edition ed, edited by F. Meslin, C. Kaplan and H. Koprowski. Geneva. 476 pp.

WHO. (2005) WHO Expert Consultation on rabies. World Health Organization technical report series. 931, 1-88.

WHO, (2010) *Rabies Pre and Post exposure Prophylaxis in Humans*. World Health Organization. 1-21