



# Utilisation des méthodes d'analyses sérologiques et interprétation des résultats



**L**es analyses de laboratoire, en particulier la sérologie, sont des outils indispensables à la pratique vétérinaire actuelle. Cependant, l'utilisation de ces techniques et l'interprétation de leurs résultats ne sont pas toujours aussi simples qu'il puisse y paraître. L'objectif de cet article est de faire un rappel sur la précision et la validation des méthodes d'analyses, l'interprétation des résultats et la définition des plans d'échantillonnage.

## Précision des méthodes d'analyses sérologiques

La méthode d'analyse idéale doit permettre de **repérer tous les sujets infectés**, c'est-à-dire ne pas générer de faux négatifs, tout en détectant uniquement les infectés, c'est-à-dire ne pas générer de faux positifs. Mais, hélas, en pratique, la méthode idéale n'existe pas et les résultats d'un test sont forcément associés à un risque de faux résultats. L'existence de ces faux résultats est expliquée par la répartition des résultats de densité optique obtenue, pour un test donné, sur une population de référence de statut connu (Figure 1). Une petite partie des sujets infectés présente des résultats négatifs (**faux négatifs**). De même, une petite partie des sujets indemnes génère des résultats positifs (**faux positifs**). La fréquence de ces faux résultats va conditionner la validité du test, la fiabilité des réponses positives ou négatives obtenues et le plan d'échantillonnage.

### La sensibilité = vrais positifs

La sensibilité est l'aptitude d'un test à donner un résultat positif chez un sujet infecté, c'est-à-dire la proportion des vrais positifs sur l'ensemble des infectés. A partir de la figure 1, elle se calcule selon la formule suivante :

$$\text{Sensibilité} : S = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$$

Elle se calcule donc exclusivement sur une population de sujets infectés, ce qui nécessite théoriquement l'existence d'un **test de référence** (autre méthode validée) ou une infection expérimentale. De plus, son calcul doit se faire sur un **échantillon représentatif** de la population qui tienne compte de différents facteurs dont l'**ancienneté** de l'infection et la **variation individuelle** de la réponse.

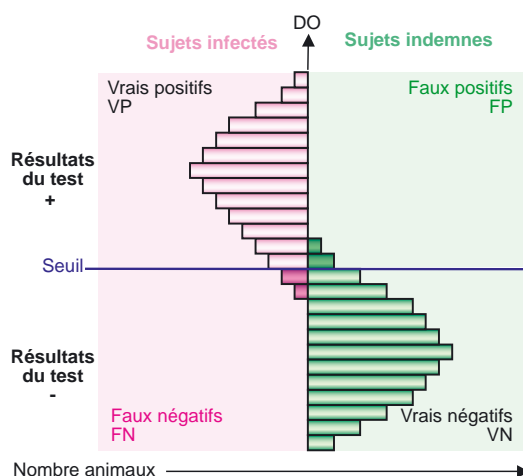


Figure 1

### La spécificité = vrais négatifs

La spécificité est l'aptitude d'un test à donner un résultat négatif chez un sujet indemne, c'est-à-dire la proportion des vrais négatifs sur

## Résumé

La méthode d'analyse idéale doit permettre de repérer tous les sujets infectés, c'est-à-dire ne pas générer de faux négatifs, tout en détectant uniquement les infectés, c'est-à-dire ne pas générer de faux positifs. La fréquence de ces faux résultats va conditionner la validité du test, la fiabilité des réponses positives ou négatives obtenues et le plan d'échantillonnage. Bien que les analyses de laboratoires, et tout particulièrement la sérologie, soient des outils de progrès dans la pratique vétérinaire actuelle, il convient de les utiliser de manière raisonnée. Le nombre d'analyses réalisées est souvent un élément clé dans la pertinence de l'interprétation des résultats. Prouver l'infection d'un troupeau ou d'un animal est assez facile et incontestable ce qui n'est pas le cas pour prouver qu'un animal, ou un troupeau, est indemne.

Isabelle CORRÉGÉ  
Sylvie DUBROCA



l'ensemble des indemnes. A partir de la figure 1, elle se calcule selon la formule suivante :

**Spécificité :**  

$$Sp = VN / (VN + FP)$$

Elle se calcule donc exclusivement sur une population de sujets indemnes, ce qui nécessite là aussi l'existence d'un test de référence (autre méthode validée) et d'un échantillon représentatif.

**Facteurs de variation de la sensibilité et de la spécificité**

La sensibilité et la spécificité ne dépendent pas de la fréquence de la maladie. Ce sont donc des valeurs intrinsèques au test, qui n'atteignent cependant jamais les 100 % en raison des facteurs suivants :

- pour la sensibilité : délai entre la date d'infection et celle d'apparition des anticorps, variabilité individuelle de la réponse et phénomènes d'immunotolérance ;
- pour la spécificité : la fréquence de réactions non spécifiques, comme par exemple entre la Brucellose et *Yersinia enterocolitica*, intervient.

Il est important de garder à l'esprit les deux principales caractéristiques de la sensibilité et de la spécificité.

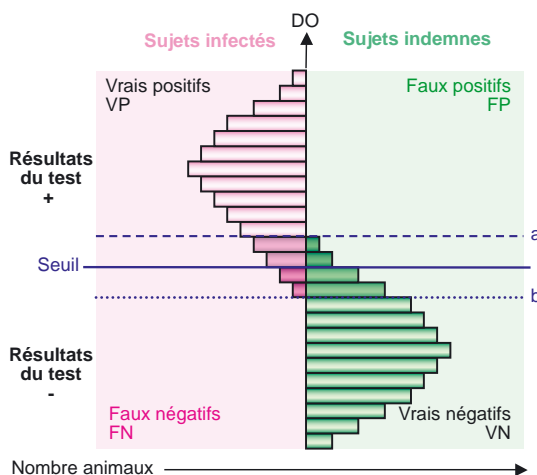


Figure 2

D'une part, elles dépendent de la valeur choisie pour le seuil de positivité et d'autre part l'amélioration de l'une se fait au détriment de l'autre (Figure 2). Si le seuil de positivité choisi est fixé à **b**, la sensibilité devient égale à 1, mais la spécificité se détériore. L'inverse se produit si le seuil est égal à **a**.

Par ailleurs, la sensibilité et la spécificité d'un test sont calculées à partir d'une population témoin. De fortes variations de ces valeurs peuvent se produire selon les conditions de milieux de la population sur laquelle est utilisé ultérieurement le test. Ainsi pour l'intradermotuberculation, les différentes publications font état de valeurs de sensibilité de 0,69 à 0,96 et de spécificité de 0,89 à 0,99.

**Valeurs prédictives d'un résultat positif ou négatif**

En plus de la sensibilité et de la spécificité, les notions de valeurs prédictives d'un résultat positif ou d'un résultat négatif doivent être connues afin d'interpréter correctement les résultats d'un test.

Ces notions de valeurs prédictives ont pour but de répondre aux questions :

- parmi les positifs lesquels sont des vrais positifs, c'est-à-dire des infectés, lesquels sont des faux positifs c'est-à-dire des indemnes ?
- parmi les négatifs, lesquels sont des vrais négatifs, c'est-à-

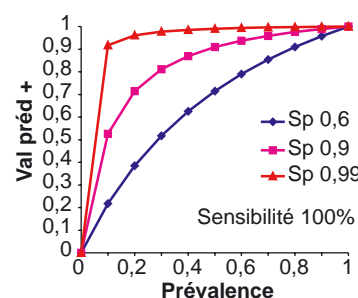


Figure 3 : Valeur prédictive positive

dire des indemnes, lesquels sont des faux négatifs c'est-à-dire des infectés ?

Pour tenter d'y répondre, seule une valeur prédictive, c'est-à-dire la confiance d'un résultat est calculable. Il s'agit :

- pour un résultat positif, de la proportion de vrais positifs par rapport à l'ensemble des positifs, soit, à partir de la figure 1, la formule suivante :

**Valeur prédictive positive =**  

$$VP / (VP + FP)$$

- pour un résultat négatif, de la proportion de vrais négatifs par rapport à l'ensemble des négatifs, soit, à partir de la figure 1, la formule suivante :

**Valeur prédictive négative =**  

$$VN / (VN + FN)$$

Les valeurs prédictives d'un résultat positif et d'un résultat négatif dépendent de la sensibilité et de la spécificité du test (Figures 3 et 4). En effet, lorsque la sensibilité est bonne, VP est grand. Lorsque la spécificité est bonne, FP est petit et donc la valeur prédictive positive est grande. Le raisonnement est le même pour la valeur prédictive d'un résultat négatif.

De plus, à la différence de la sensibilité et de la spécificité, ces valeurs prédictives dépendent de la fréquence de la maladie dans la population. Quand la prévalence diminue, le nombre de vrais posi-

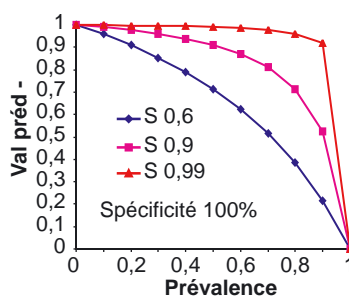


Figure 4 : Valeur prédictive négative



tifs diminue et le nombre de faux positifs reste sensiblement constant (tableau 1). Ainsi pour de fortes prévalences, les faux positifs sont négligeables alors qu'ils sont prépondérants pour de faibles prévalences. Ainsi la confiance d'un résultat positif est élevée en milieu très infecté, faible en milieu peu infecté.

**Tableau 1 : Valeur prédictive des résultat en fonction de la prévalence**

Prévalence	VP	FP	Valeur prédictive
10 %	9900	90	99 %
1 %	990	99	91 %
0,1 %	99	100	50 %
0,01 %	10	100	9 %
0 %	0	100	0

Exemple : 100 000 animaux, S=99%, Sp=99,9%

La valeur prédictive d'un résultat négatif évolue aussi en fonction de la prévalence mais en sens inverse à la valeur prédictive d'un résultat positif. Ainsi la confiance d'un résultat négatif est faible en milieu très infecté, forte en milieu peu infecté.

### Conséquence : estimation de la prévalence

Les résultats d'un test permettent de calculer la prévalence apparente de la maladie dans la population (= vrais positifs + faux positifs) et non la prévalence réelle (= vrais positifs + faux négatifs). Ces deux prévalences diffèrent par les nombres d'erreurs, c'est-à-dire les faux positifs et les faux négatifs. Cette estimation de la prévalence va dépendre de la sensibilité et de la spécificité du test ainsi que de la prévalence réelle (Figure 5). Prenons deux exemples :

- Exemple 1 :  
- si sensibilité = spécificité et prévalence réelle = 50%

alors faux positifs = faux négatifs  
et prévalence apparente = prévalence réelle  
- si sensibilité = spécificité et si la prévalence réelle est faible alors faux positifs >> faux négatifs et prévalence apparente >> prévalence réelle

- Exemple 2 :  
- si sensibilité = 0,90 et spécificité = 0,95 et  
- si prévalence réelle = 20% alors prévalence apparente = 27%  
- si prévalence réelle = 2% alors prévalence apparente = 11%

### Autres facteurs de variation

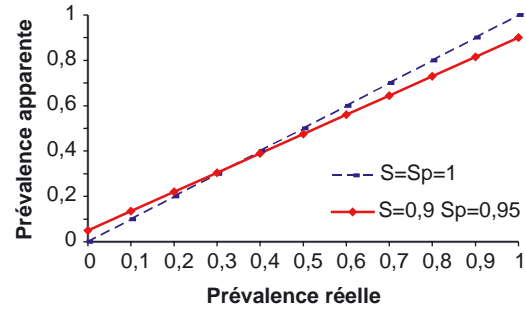
#### La détectabilité

La détectabilité correspond à la concentration d'anticorps la plus faible détectable par le test, c'est-à-dire **le seuil de détection**. En général, les tests qui ont une bonne détectabilité, ont une bonne sensibilité même si ces deux notions diffèrent.

La détectabilité est facile à déterminer à partir de sérums de référence de dilutions connues. Elle permet donc de réaliser facilement des estimations comparées des sensibilités de différents tests et aussi de tester chaque lot d'un même test.

#### La répétabilité et la reproductibilité

- La répétabilité est **la fidélité** des résultats pour un même laboratoire, un même opérateur, une même procédure et un même prélèvement.
- La reproductibilité correspond à la fidélité des résultats pour un même prélèvement et une même procédure mais avec un **opérateur**, un **laboratoire** différents ou à une **période** différente.



**Figure 5 : Prévalences réelle et apparente**

Afin de limiter cette variabilité des résultats, il est nécessaire d'employer des techniques standardisées et de réaliser régulièrement des essais inter-laboratoires.

### Utilisation en pratique de la sérologie

#### Pourquoi utiliser des analyses de laboratoire ?

L'utilisation d'analyses de laboratoire peut se résumer à deux catégories, **le dépistage et le diagnostic**, qu'il est important de définir et de différencier. Le dépistage concerne des animaux « sains » vis à vis de l'agent pathogène considéré et il consiste en la recherche des individus ou groupes d'individus atteints par un agent infectieux jusque là inaperçu. Le diagnostic se rapporte à des animaux malades et il a pour objectif l'identification d'une maladie chez un sujet ou un groupe de sujets présentant des signes cliniques.

Le distinguo entre ces deux objectifs est important puisqu'il va conditionner le choix de la ou des méthodes utilisées ainsi que le plan d'échantillonnage. De plus dans le cas du dépistage, l'analyse de laboratoire est souvent à la base du dispositif alors que dans le cas du diagnostic, elle est un outil complémentaire des autres démarches diagnostiques disponibles, telle que les signes cliniques, l'autopsie, l'observation des lésions à l'abattoir ou même l'analyse des **outils de ges-**

**Le dépistage concerne des animaux « sains » vis à vis de l'agent pathogène tandis que le diagnostic se rapporte à des animaux malades.**

**Dans le cas du dépistage, l'analyse de laboratoire est à la base du dispositif alors que dans le cas du diagnostic, elle est un outil complémentaire.**





**Une sérologie négative ne signifie pas forcément l'absence de l'agent pathogène.**

**tion technique** (GTTT, GTE, classement des carcasses).

Le recours à des analyses **complémentaires** doit aussi se faire en fonction des critères suivants :

- le ou les agents pathogènes concernés ;
- les différentes méthodes disponibles : bactériologie, virologie, PCR, sérologie
- la validation des méthodes (cf. paragraphe suivant)
- l'ancienneté supposée de l'infection
- les connaissances épidémiologiques sur la maladie (délai d'apparition des anticorps, durées d'excrétion et de persistance de l'agent pathogène, type de prélèvement ...)
- le niveau de réponse attendu : une sérologie positive ne signifie pas nécessairement la présence de l'agent pathogène mais signe seulement qu'il y a eu contact avec l'animal. Une sérologie négative ne signifie pas forcément l'absence de l'agent pathogène (contact trop récent, pas de séroconversion ; portage digestif uniquement comme par exemple dans le cas des salmonelles).

**Il convient d'être très prudent dans le choix et l'utilisation des analyses.**

En production porcine, les investigations peuvent concerner quatre

niveaux, niveaux qui conditionneront le choix du type d'analyse et du plan d'échantillonnage :

- **Animal** : dépistage ou diagnostic sur futur reproducteur (essentiellement verrat à l'entrée en CIA)
- **Groupe d'animaux** : dépistage ou diagnostic sur futurs reproducteurs (livraison de cochettes), diagnostic d'une pathologie à un stade physiologique,...
- Elevage : qualification d'un cheptel ,...
- **Groupe d'élevages** : zone géographique (SDRP, maladies réglementées), schéma de sélection-multiplication,...

**Validation des méthodes d'analyses**

Comme nous l'avons vu précédemment, la **validation** des méthodes d'analyses et en particulier de la sérologie nécessite l'estimation de leurs caractéristiques intrinsèques, à savoir la sensibilité et la spécificité, ce qui nécessite une méthode de référence et/ou une population de statut connu et maîtrisé ainsi qu'un plan d'échantillonnage suffisant et représentatif. Les populations à statut connu et maîtrisé ne peuvent être obtenues que dans des conditions expérimentales très strictes et rigou-

reuses : peu de dispositifs expérimentaux le permettent et elles sont très onéreuses. Par ailleurs, pour un certain nombre de maladie, la ou les méthodes de référence n'existent pas ou le choix de la méthode de référence ne fait pas l'unanimité de la communauté scientifique.

Même lorsque l'une ou les deux de ces conditions sont remplies, le plan d'échantillonnage n'est pas toujours suffisant, bien souvent pour des raisons de moyens financiers. Enfin, il peut arriver que, malgré une validation expérimentale rigoureuse, l'utilisation sur le terrain d'une méthode révèle, dans certaines populations, un certain nombre de surprises.

Force est de constater qu'aujourd'hui, hormis pour les maladies réglementées ou pour certains pathogènes majeurs, la validation des méthodes d'analyse laisse bien souvent à désirer, faute de procédures officielles ou de méthodologies reconnues. C'est pourquoi il convient d'être très prudent dans le choix et l'utilisation des analyses.

En production porcine, nous avons été confrontés à de nombreux exemples, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PCV2 ou plus récemment la sérologie « salmonelles » dont l'exemple suivant illustre parfaitement notre propos (tableau 2).

**Tableau 2 : Comparaison de 5 sérologies salmonelles**

Méthode	Résultat	Contaminés	Non	Sensibilité **	Spécificité **
			contaminés		
A	+	73 *	2	24,3	95,4
	-	227	42		
B	+	54	0	22,5	100
	-	186	31		
C	+	87	0	29,2	100
	-	211	44		
E1	+	176	0	58,7	100
	-	124	44		
E2	+	138	0	46,0	100
	-	162	44		
* Nombre de sérums			** Pourcentage		

Méthode AFSSA Ploufragan complète (E1), méthode AFSSA Ploufragan simplifiée (E2 ; sans les antigènes de *Salmonella hadar* et *Salmonella anatum*), 3 kits commerciaux (A, B, C) – (PROUX K. and coll., International Symposium of Salmonelles and Salmonellosis, Ploufragan, mai 2002)

**Plan d'échantillonnage**

En production porcine, nous nous intéressons le plus souvent à un **groupe d'animaux** (élevage ou groupe d'animaux à un stade physiologique donné) et non à l'individu. Pour que les coûts d'analyses restent dans des limites acceptables, nous sommes amenés à ne prélever qu'une partie de la popu-



lation étudiée. Cependant il faut garder à l'esprit que le nombre de prélèvements conditionnera en partie le résultat et qu'il faut adapter ce nombre à l'objectif recherché, au niveau de sécurité attendu et à l'épidémiologie de la maladie concernée par l'analyse.

### Détection de l'infection

Pour détecter une maladie, le nombre d'animaux à prélever va dépendre de la **taille de la population et de la prévalence de la maladie**. Des tables statistiques permettent de le définir, comme par exemple au tableau 3 où figure le nombre d'animaux à prélever avec un risque de 5 %.

En pratique, la détection de l'infection pour des faibles prévalences (< 5 %) est très onéreuse, en raison du nombre important d'analyses à effectuer. Pour des prévalences de plus de 5 %, le nombre d'animaux à prélever ne varie presque plus avec l'augmentation de la taille de la population. Ainsi le nombre d'analyses à effectuer se raisonne en fonction de la prévalence supposée de la maladie.

En élevage de porc, si nous réalisons 5 prélèvements, nous ne pouvons mettre en évidence qu'une prévalence minimum de 50 %, c'est-à-dire un **agent très contagieux et/ou une phase aiguë** (infection virale type Grippe). Le prélèvement de 15 porcs permet la mise en évidence d'une infection dont la prévalence est de l'ordre de 20 %. Pour des pathogènes moins contagieux, comme par exemple *Actinobacillus pleuropneumoniae* en phase chronique, dont la prévalence est sans doute de l'ordre de 5 à 10 %, il faut prélever de 30 à 50 porcs.

A noter que, si tous les prélèvements sont négatifs, cela ne signifie pas for-

**Tableau 3 : Nombre d'animaux à prélever en fonction de la taille de la population et de la prévalence de la maladie**

Taille population	Prévalence					
	1 %	5 %	10 %	20 %	40 %	50 %
100	95	45	25	13	6	5
200	155	51	27	14	6	5
400	211	55	28	14	6	5
1000	258	57	29	14	6	5

cément l'absence d'infection mais que la prévalence de la maladie peut être inférieure au seuil donné par la table. Ce point est capital dans l'interprétation des résultats.

### Technique d'échantillonnage

En théorie, d'après le paragraphe précédant, la réalisation des prélèvements sur une bande ou sur la totalité de l'élevage permet la mise en évidence d'une prévalence minimale proche. Cependant, en pratique, la prise en compte des éléments suivants nous laisse à penser qu'il est préférable, dans la majorité des cas, de prélever des individus de la ou des deux bandes les plus âgées :

- persistance éventuelle des anticorps maternels ;
- infection tardive ;
- lors de circulation lente de l'agent infectieux, la prévalence est *a priori* plus élevée sur les animaux les plus âgés ;
- la persistance des anticorps est en général suffisamment longue.

Cependant, s'il y a des variations de contamination entre les bandes ou entre les salles, un tel plan d'échantillonnage risque de fausser le résultat.

Par ailleurs dans le cas de suivi épidémiologique plus poussé, comme par exemple la détermination du moment de séroconversion, les prélèvements doivent être réalisés à des stades ciblés en fonction de l'objectif.

Les pools ou mélanges de prélèvements, même s'ils présentent

l'intérêt de diminuer les frais d'analyses, doivent être utilisés avec prudence. En particulier, ils doivent être utilisés en milieu très infecté avec des méthodes « validées » pour ce type d'analyse. De même, les analyses sérologiques après prélèvements sur jus de viande ne consistent pas en une « simple dilution » des taux d'anticorps et nécessitent donc des mises au point préalables.

### Estimation du pourcentage d'animaux atteints

A partir d'une série d'analyses, le pourcentage de positifs obtenus correspond à une estimation très grossière du pourcentage théorique, c'est-à-dire de la prévalence réelle dans la population échantillonnée. Cette estimation dépend de plus de la taille de l'échantillon. En effet, l'intervalle de confiance, c'est-à-dire la fourchette de variation des pourcentages théoriques, donné par des tables statistiques, est très grand (Tableau 4).

**Tableau 4 : Fourchette de variation des % de positifs en fonction de la taille de l'échantillon**

Taille échantillon	Pourcentage observé		
	10 %	20 %	40 %
10	0-45 *	3-56	12-74
20	1-32	6-44	19-64
50	3-22	10-34	25-57
100	5-18	13-29	30-50

\* Intervalle de confiance des % théoriques

### Suivi de l'éradication d'une maladie d'un élevage

Dans le cadre du suivi d'une tentative d'éradication progressive

Prévalence = nombre de cas de la maladie enregistré dans une population déterminée.

**La détection de l'infection pour des faibles prévalences est très onéreuse.**

**En pratique il est préférable de prélever des individus des bandes les plus âgées.**



**Tableau 5 : Exemples de plans d'échantillonnage, pour un élevage de 120 truies, dans le cadre d'un suivi SDRP**

	Structure du troupeau						TOTAL N=120
	Cochettes N=20	Truies rang 1 N=20	Truies rang 2 N=20	Truies rang 3 N=20	Truies rang 4 N=20	Truies rang ≥ 5 N=20	
Début infection	10 à 15 - 20 à 30 % *						
Arrêt circulation plan 1	16-10%	1 -10%					32-10%
Arrêt circulation plan 2	5-50%	5-50%	5-50%	5-50%	5-50%	5-50%	30-10%
Eradication plan 1	50- 5%						
Eradication plan 2	16-10%	16-10%		40-5%			70-2%
Eradication plan 3	Totalité des truies						120

\* nombre d'analyses - % prévalence minimale mise en évidence

**Selon la stratégie de prélèvement, les résultats obtenus n'ont pas la même signification.**

d'un pathogène sur un troupeau de truies, l'utilisation de la sérologie peut être un outil précieux à condition de raisonner son plan d'échantillonnage et de ne pas être avara sur le nombre de sérologies à effectuer.

Le tableau 5 présente des exemples de plans d'échantillonnage, pour un élevage de 120 truies, dans le cadre d'un suivi SDRP par exemple. Ce tableau montre que selon la stratégie de prélèvement

choisie, les résultats obtenus n'ont pas la même signification.

### Conclusion

Bien que les analyses de laboratoires, et tout particulièrement la sérologie, soient des outils de progrès dans la pratique vétérinaire actuelle, il convient de les utiliser de manière raisonnée. Le choix de la ou des méthodes n'est jamais facile, le plan d'échantillonnage n'est jamais simple à élaborer et l'in-

terprétation des résultats doit toujours être nuancée en fonction des méthodes et des types de prélèvements retenus. De plus, le nombre d'analyses réalisées est souvent un élément clé dans la pertinence de l'interprétation des résultats, sachant qu'il y a souvent opposition avec les moyens financiers.

En général, prouver l'infection d'un troupeau ou d'un animal est assez facile et incontestable : il suffit de multiplier les prélèvements et les analyses et de confirmer les positifs par d'autres méthodes.

Par contre, prouver qu'un animal, ou un troupeau, est indemne, est souvent beaucoup plus délicat et contestable : prélèvements avant séroconversion, impossibilité de tester tous les tissus, phénomène d'immunotolérance, absence de méthodes d'analyses. Ceci peut être à l'origine de dérives « juridiques » ou commerciales au sein de filières telles que la production porcine. ■

*Communication présentée au congrès de l'AFMVP - Maisons-Alfort, 4 et 5 décembre 2003 « Diagnostic de laboratoire »*

**Contact :**  
isabelle.correge@itp.asso.fr

#### Pour en savoir plus

*Pour la rédaction de ce document, nous nous sommes fortement inspirés de l'ouvrage : « Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures » du professeur Toma et collaborateurs, édité par L'AEEMA.*

*Nous invitons donc les personnes qui souhaitent approfondir le sujet à le consulter.*