

Journée nationale technique du 11 janvier 2013
Le protocole national de diagnostic différentiel
des avortements chez les bovins

**Le choix des outils de diagnostic
direct et/ou indirect**
Les fondements du raisonnement
R. Guatteo

L'idéal

Diagnostic direct systématique

Sur toutes les matrices d'intérêt

Sur des animaux venant d'avorter

Ces animaux avortant tous en même temps d'un même pathogène

Avec un laboratoire d'analyse juste à côté

Des analyses peu coûteuses



La vraie vie

Vache	BVD		Fièvre Q		Néosporose		Leptospirose		Chlamydirose		Anaplasmosse	Listeriose		Salmonellose
	Séro	PCR	Séro	PCR	Séro	PCR	Séro	PCR	Séro	PCR	Séro	Séro	Bact	Bact
0833	+		-		-				-		-	-		
0548				-	-									
0866		-				-	+			-				
0573														
0782				-										
0879		-				-		-		-			-	-
0902	+		-				-							

Rarement les mêmes analyses, au même moment
Que conclure ?

L'idéal

Diagnostic direct systématique

Sur toutes les matrices d'intérêt

Sur des animaux venant d'avorter



Ces animaux avortant tous en même temps d'un même pathogène

Avec un laboratoire d'analyse juste à côté

Des analyses peu coûteuses

Dans la vraie vie : objectifs

- maximiser l'imputabilité, exclure causes majeures
- à coût raisonnable en faisant avec les aléas du terrain

Diagnostic direct et/ou indirect

Principes de base

Des considérations liées au test

- Moment de sa mise en œuvre
- Qualités intrinsèques
- Facteurs extrinsèques

Des considérations liées au contexte

- Objectif de l'analyse
- Maximisation VPP/VPN



Diagnostic direct et/ou indirect

Principes de base

Des considérations liées au test

- Qualités intrinsèques
- Facteurs extrinsèques

Des considérations liées au contexte

- Objectif de l'analyse
- Maximisation VPP/VPN



Principes de base

La base de tout : un tableau 2x2

		Méthode de référence	
		Etat +	Etat -
Indicateur ou test	Résultat +	VP	FP
	Résultat -	FN	VN

2 questions très pratiques

C'est positif et alors ?

C'est négatif et alors ?

Influence du moment de réalisation

		Méthode de référence	
		Etat +	Etat -
Indicateur ou test	Résultat +	VP	FP
	Résultat -	FN	VN



VPP : Valeur Prédictive Positive
Dans notre cas : probabilité que l'animal
« positif » ait avorté à cause de ce pathogène

Influence du moment de réalisation

		Méthode de référence	
		Etat +	Etat -
Indicateur ou test	Résultat +	VP	FP
	Résultat -	FN	VN



VPP : Valeur Prédictive Négative
Dans notre cas : probabilité que l'animal « négatif »
n'ait pas avorté à cause de ce pathogène

Des considérations liées au test

Pour y répondre : besoins de connaissances

		Méthode de référence	
		Etat +	Etat -
Indicateur ou test	Résultat +	VP	FP
	Résultat -	FN	VN



Sensibilité
Aptitude à éviter FN
Aptitude à détecter tous les malades

Des considérations liées au test

Pour y répondre : besoins de connaissances

		Méthode de référence	
		Etat +	Etat -
Indicateur ou test	Résultat +	VP	FP
	Résultat -	FN	VN



Spécificité
Aptitude à éviter FP
Aptitude à ne détecter que des malades

Diagnostic direct et/ou indirect

Principes de base

Des considérations liées au test

- Moment de sa mise en œuvre
- Qualités intrinsèques
- Facteurs extrinsèques

Des considérations liées au contexte

- Objectif de l'analyse
- Maximisation VPP/VPN



Diagnostic direct et/ou indirect

Principes de base

Des considérations liées au test

- Moment de sa mise en œuvre
- Qualités intrinsèques
- Facteurs extrinsèques

Des considérations liées au contexte

- Objectif de l'analyse
- Maximisation VPP/VPN



Moment de mise en œuvre du test

Risque principal : **Défaut de SENSIBILITE : Faux négatifs**

Exemples

- Délai insuffisant pour observer une séroconversion

Moment de mise en œuvre du test

Réponse sérologique

Chèvres infectées expérimentalement

Densité optique : % de positivité



Moment de mise en œuvre du test

Risque principal : Défaut de **SENSIBILITE** : Faux négatifs

Exemples

- Recherche virus BVD (Ag, ARN) sur sang vache avortée
 - Virémie terminée le plus souvent
- Recherche *Coxiella burnetii* sur placenta 8 jours post-avortement

Moment de mise en œuvre du test

Durée d'excrétion dans le mucus vaginal après mise bas
Bovins infectés naturellement (n=24) suivis post-avortement (J0)

Vache	J0	J14	J21	J28
	Résultats PCR			
1	+	-	-	+
2	+	+	+	+
3	+	-	-	-
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	+	+	-
7	+	+	-	-
8	+	+	-	+
9	+	+	+	+
10	+	+	-	-
11	+	-	-	-
12	+	-	-	-
13	+	+	-	-
14	+	-	-	-
15	+	-	-	-
16	+	-	-	-
17	+	-	-	-
18	+	-	-	-
19	+	-	-	-
20	+	-	-	-
21	+	-	-	-
22	+	-	-	-
23	+	+	-	-
24	+	-	-	-

2/3 des femelles
PCR -

14 jours
post-avortement

Réaliser l'écouvillon
très rapidement

< 7 JOURS

Diagnostic direct et/ou indirect

Principes de base

Des considérations liées au test

- Moment de sa mise en œuvre
- **Qualités intrinsèques**
- Facteurs extrinsèques

Des considérations liées au contexte

- Objectif de l'analyse
- Maximisation VPP/VPN



Qualités intrinsèques

Risques: Défaut de SENSIBILITE ou SPECIFICITE : Faux négatifs et Faux positifs

Défaut Sensibilité

- Liée au test – maladie : (production) connaissance maladie

Qualités intrinsèques

Vache	J0	J0	Séroprévalence Intra-troupeau (%)
	Résultats PCR	ELISA LSI	
1	+	++	51
2	+	-	42
3	+	++	56
4	+	+	51
5	+	+	75
6	+	++	33
7	+	++	40
8	+	+	53
9	+	++	47
10	+	++	40
11	+	-	47
12	+	-	33
13	+	-	15

Manque de Sensibilité sérologie, intérêt échelle troupeau

Qualités intrinsèques

Risques: Défaut de SENSIBILITE ou SPECIFICITE : Faux négatifs et Faux positifs

Défaut Sensibilité

- Liée au test – maladie : (production) connaissance maladie
- Tests aux qualités différentes : choisir le « meilleur »

Qualités intrinsèques

Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
23(5) 924-931
© 2011 Crown Copyright
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1040638711416971
<http://jvdi.sagepub.com>

Mark W. Horigan,¹ Michael M. Bell, Tim R. Pollard, Anthony R. Sayers, Geoff C. Pritchard

Abstract. Q fever is an important zoonotic disease caused by infection with the bacterium *Coxiella burnetii*. Veterinary diagnostic laboratories, including the Veterinary Laboratories Agency (VLA) in England and Wales, have traditionally relied on the complement fixation test (CFT) for serological diagnosis. However, Q fever has assumed greater significance in recent years following several large human outbreaks linked to exposure to infected ruminants and it is essential that more reliable tests are introduced to detect the presence of *C. burnetii* infection in animals. The objective of the current study was to evaluate the performance of 3 commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detection of antibodies to *C. burnetii* and to compare the findings with the CFT using a sample panel of 548 sera from sheep, goats, and cattle, including animals of known disease status. The statistical analysis using TAGS (test accuracy in the absence of a gold standard) software and receiver operating characteristic techniques demonstrated that the 3 ELISAs all showed improved sensitivity over the CFT. The test based on ovine antigen demonstrated the best overall performance and therefore, the VLA has adopted this test for routine use.

Se : 87% vs 77% en faveur ELISA Cb O1...

Qualités intrinsèques

Risques: Défaut de SENSIBILITE ou SPECIFICITE : Faux négatifs et Faux positifs

Défaut Sensibilité

- Liée au test – maladie : (production) connaissance maladie
- Tests aux qualités différentes : choisir le « meilleur »

Défaut Spécificité

- Choix des tests

Qualités intrinsèques

Etude infécondité sur 81 troupeaux laitiers bretons (A. Joly)

Séro chlam spp

93 % des troupeaux

35 % des vaches

Séro chlam abortus

25 % des troupeaux

2 à 3 % des vaches

Que conclure ?

Privilégier recherche directe

Besoin d'EIL +++

Qualités intrinsèques

Risques: Défaut de SENSIBILITE ou SPECIFICITE : Faux négatifs et Faux positifs

Défaut Sensibilité

- Liée au test – maladie : (production) connaissance maladie
- Tests aux qualités différentes : choisir le « meilleur »

Défaut Spécificité

- Choix des tests
- Animaux vaccinés (réponse Ac, DIVA)

Diagnostic direct et/ou indirect

Principes de base

Des considérations liées au test

- Moment de sa mise en œuvre
- Qualités intrinsèques
- **Facteurs extrinsèques**

Des considérations liées au contexte

- Objectif de l'analyse
- Maximisation VPP/VPN



Facteurs extrinsèques

Risques: Défaut de SENSIBILITE ou SPECIFICITE : Faux négatifs et Faux positifs

Défaut Sensibilité

- Délai analyse-prélèvement

Facteurs extrinsèques

	% de résultats PCR positifs			
	J0	J1	J2	J3(5)
Lait (n=36)	100	66,7	72,2	61,1
<i>Mucus vaginal</i> (n=13)	100	53,9	69,2	46,2

Facteurs extrinsèques

Risques: Défaut de SENSIBILITE ou SPECIFICITE : Faux négatifs et Faux positifs

Défaut Sensibilité

- Délai analyse-prélèvement
- Conservation du prélèvement
- Disponibilité matrice d'intérêt

Facteurs extrinsèques

Risques: Défaut de SENSIBILITE ou SPECIFICITE : Faux négatifs et Faux positifs

Défaut Sensibilité

- Délai analyse-prélèvement
- Conservation du prélèvement
- Disponibilité matrice d'intérêt

Défaut Spécificité

- Contamination (qualité du prélèvement : F. Lars)
- Animaux vaccinés

Facteurs extrinsèques

Risques: Défaut de SENSIBILITE ou SPECIFICITE : Faux négatifs et Faux positifs

Défaut Sensibilité

- Délai analyse-prélèvement
- Conservation du prélèvement
- Disponibilité matrice d'intérêt

+ TRACABILITE
ET IDENTIFICATION

Défaut Spécificité

- Contamination (qualité du prélèvement : F. Lars)
- Animaux vaccinés

Des considérations liées au test

Mais la sensibilité et la spécificité ne font pas tout

Exemple : Test Se : 98%, Sp : 99%

Prévalence : 5%

Résultats	Animaux virémiques		VPP	VPN
	Oui	Non		
ELISA Ag				
Positive	196	98	66,7%	99,9%
Négative	4	9702		
Total	200	9800		

VPP et VPN dépendent de la prévalence

Diagnostic direct et/ou indirect

Principes de base

Des considérations liées au test

- Moment de sa mise en œuvre
- Qualités intrinsèques
- Facteurs extrinsèques

Des considérations liées au contexte

- Objectif de l'analyse
- Maximisation VPP/VPN



Diagnostic direct et/ou indirect

Principes de base

Des considérations liées au test

- Moment de sa mise en œuvre
- Qualités intrinsèques
- Facteurs extrinsèques

Des considérations liées au contexte

- Objectif de l'analyse
- Maximisation VPP/VPN



Objectif(s) de(s) l'analyse(s)

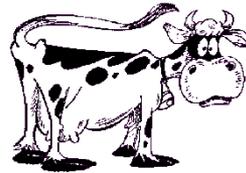
Etape numéro 1 : Définir l'objectif de l'analyse

- Diagnostic sur l'avortée récente
- Diagnostic sur « les » avortées
- Diagnostic d'infection

De l'objectif dépendra le choix des analyses

Objectif de l'analyse

Diagnostic avortement isolé



PCR individuelle

Sérologie

PCR Lait Tank

OUI

NON

NON

Placenta, mucus ou avorton

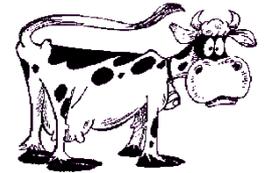


**Existence séro(-)
excréteurs**

**Aucune valeur
prédictive positive**

Objectif de l'analyse

Diagnostic circulation *Coxiella*



PCR individuelle

NON

Sérologie

OUI

5 primipares

5 multipares

PCR Lait Tank

OUI

Augmenter la VPP/VPN

Exemple Néosporose

Valeurs prédictives positives et négatives?

Sensibilité : 98%

Spécificité : 99 %

Prévalence de l'infection : 5%

Prévalence de la maladie : 1%

Augmenter la VPP/VPN

	Neosporose +	Néosporose -
ELISA +	1	1
ELISA -	0	98
Total	1	99

VPN1 (« l'avortement n'est pas dû à ») = 99.98%

VPP 1 (« avortement est dû à ») = 50%

Augmenter la VPP/VPN

	Neosporose +	Néosporose -
ELISA +	5	1
ELISA -	0	94
Total	5	95

VPN2 (« la vache n'est pas contaminée ») = 99.9%

VPP2 (« la vache est contaminée ») = 83%

Diagnostic direct et/ou indirect

Principes de base

Des considérations liées au test

- Moment de sa mise en œuvre
- Qualités intrinsèques
- Facteurs extrinsèques

Des considérations liées au contexte

- Objectif de l'analyse
- Maximisation VPP/VPN



Augmenter la VPP/VPN

Test

VPP : Choix du test le plus spécifique ou augmenter le seuil

VPN : Choix du test le plus sensible ou abaisser le seuil

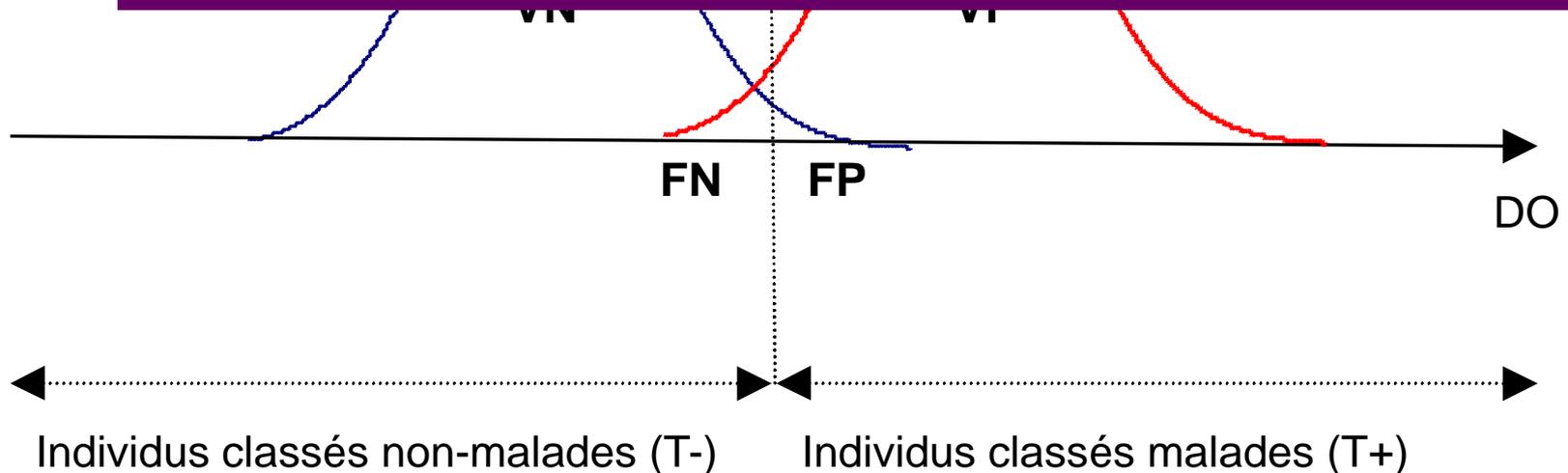
Dist
non

Exemple seuil 10^4 en *Coxiella* (Sp)

Mais choix seuil ?

Information quantitative parfois non disponible, MRI ?

Pas d'harmonisation entre kits : EIL



Augmenter la VPP/VPN

Alternative numéro 1 : combiner/répéter les tests

A l'échelle d'un groupe

- Animaux cibles : même objectif de l'analyse
- $Se_{agg} = 1 - (1 - \text{Prévalence apparente})^n$
- $Sp_{agg} = Sp^n$

Intérêt +++ en cas de séroprévalence « attendue » nulle

Augmenter la VPP/VPN

Exemple Néosporose

Toutes les avortées sont séropositives

Probabilité que l'épisode soit dû à

VPP = 0,4

N=2 → $1 - (1-0,4)^2$ soit 0,64

N=5 → 0,93

Augmenter la VPP/VPN

Alternative numéro 2 : Jouer artificiellement sur la prévalence

Exemple : Test Se : 98%, Sp : 99%

Prévalence 15%

Résultats	Animaux virémiques		VPP	VPN
	Oui	Non		
ELISA				
Positive	1470	85	94,5%	99,6%
Négative	30	8415		
Total	1500	8500		

Prévalence augmentée : VPP maximisée

Suspicion clinique uniquement

Animaux « cas » majoritairement, pas de témoins sains

Au final

Cas → Test Diagnostic → Diagnostics → Statut vrai

Au final

Direct si possible et si l'agent est encore détectable

- Qualité du prélèvement-envoi-analyse +++
- Coût : valeur informative mélange, outil « multiplex »
- Connaissances : connaissances analytiques

Démarche nationale repose sur ces principes

Indirect : interférence

- Maximiser la sensibilité
- Maximiser la spécificité
- Accroître la rapidité
- Seuil de confiance

Une boîte de prélèvement

Des indications : qui prélever/quand prélever ?

Une grille d'interprétation

A vous de jouer !!

Importance de la « mémoire du système »

- Centralisation données
- Analyses rétrospectives
- Banque de données « prélèvements »