

QUALITE DES ANALYSES BIOLOGIQUES EN EPIDEMIOLOGIE ET DECISIONS DE SANTE : LA LEUCOSE BOVINE ENZOOTIQUE*

M. ELOIT^[1], B. PERRIN^[2], M. PERRIN^[2], M. FEDIDA^[2] et B. TOMA^[1]

RESUME : Les auteurs présentent une synthèse des informations disponibles sur les performances des tests ELISA appliqués aux mélanges de sérums ou de laits dans le dépistage de la leucose bovine enzootique (L.B.E.). Les principales performances (spécificité, sensibilité, détectabilité, valeurs prédictives) sont décrites pour différents réactifs commercialisés et dans différentes situations épidémiologiques. Le bilan de ces informations permet d'en tirer plusieurs conséquences pour la conduite du dépistage au cours de la prophylaxie de la L.B.E.

SUMMARY : The authors present a synthesis of the available informations on ELISA test performances when applied to pooled serum or milk samples when screening for enzootic bovine leukosis (E.B.L.). The major performances (specificity, sensitivity, detectability, predictive values) are described for different commercial reagents already available, and in different epidemiological situations. The result from these informations is enough to draw consequences in away to lead a campaign against E.B.L.

* * *

L'utilisation des techniques de diagnostic sérologique en matière de leucose bovine enzootique (L.B.E.) correspond à plusieurs impératifs :

- dépistage des cheptels infectés, avec un objectif d'assainissement de ces cheptels et/ou de qualification des cheptels indemnes,
- dépistage des animaux infectés, dans les cheptels infectés ou lors de transactions.

Le problème majeur à résoudre concerne le dépistage des cheptels infectés car plusieurs stratégies sont possibles : contrôle sérologique individuel des animaux, étude du mélange de sérums de tout ou partie des animaux de l'exploitation, auxquels s'ajoute, pour les cheptels laitiers, le dépistage sur lait de tank. Le coût de ces protocoles est, à l'évidence, très différent et il est donc nécessaire d'étudier, au plan technique, leurs performances respectives, puis d'envisager les conséquences pour la définition de stratégies de dépistage.

* Texte de l'exposé présenté le 7 décembre 1989.

[1] E.N.V.A., Maladies contagieuses, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France.

[2] C.N.E.V.A., Laboratoire de Pathologie Bovine, 31 avenue Tony Garnier, B.P. 7033, 69342 Lyon cedex 07, France.

LES TECHNIQUES UTILISABLES SUR MELANGE DE PRELEVEMENTS DE LAIT ET DE SERUM

I - LES TESTS ELISA SUR MELANGE DE SERUMS

L'utilisation des tests ELISA appliqués aux mélanges de sérums a fait l'objet de peu d'études portant sur leur sensibilité, leur spécificité ou leurs valeurs prédictives. Seul le niveau de détectabilité des trousse commercialisées fait actuellement l'objet d'une étude systématique par le L.P.B. avant agrément pour commercialisation en raison, depuis juin 1988, de l'existence de normes communautaires. Ces normes définissent le nombre maximal de sérums qui peuvent être mélangés pour une trousse donnée, en fonction de son niveau de détectabilité défini par rapport au sérum standard européen, le sérum E4. Ainsi, pour être agréée pour l'examen de sérums individuels, une trousse doit repérer le sérum E4 dilué au 1/10, ce niveau en anticorps correspondant à un titre faible chez un animal infecté. Une trousse repérant la dilution au 1/20 peut être utilisée pour un mélange de deux sérums, etc (tableau I).

Tableau I : ELISA sur mélange de sérums :
Niveau de détectabilité suivant la norme C.E.E.

Titre du sérum E4 dilué dans un sérum négatif	Nombre maximal de sérums pouvant être mélangés
1/10	1
1/20	2
1/40	4
.	
.	
.	
1/400	40
.	.
.	.
.	.

L'intérêt de cette norme est de permettre une classification des trousse entre elles, comme le montre le tableau II. Ce tableau permet de constater une certaine hétérogénéité entre les producteurs, mais également entre les trousse d'un même producteur. Il ne faudrait pas pour autant conclure de ces données qu'une trousse permettant, au regard de cette norme, d'étudier un mélange de 20 sérums, est capable de repérer toutes les exploitations dont un animal (ou plus) sur 20 est infecté, et surtout qu'elle ne repère aucune exploitation dont un animal sur plus de 20 est infecté.

Enfin, il faut remarquer que, en France, même pour des lots très performants, il est interdit de mélanger plus de 10 sérums (Note de service du 22.07.87 ; directive technique du L.P.B. du 26.10.89).

Tableau II : ELISA sur mélange de sérums :
Résultats obtenus suivant la norme C.E.E. pour différents lots
de trousse commercialisées.

N° 1	N° 2	Producteurs				N° 6
		N° 3	N° 4	N° 5		
5*	25	25	10	10	12	
15	10	15		8	12	
25	25	25				
5	5	20				
15		10				
		10				

* Indique le nombre maximal de sérums pouvant être mélangés en respectant le niveau de détectabilité fixé par la C.E.E.

II - LES TESTS ELISA SUR LAIT DE MELANGE

L'existence d'études variées nous permet d'envisager l'étude de la spécificité, de la sensibilité et des valeurs prédictives de ces tests dans l'identification de cheptels infectés ou indemnes, en prenant comme situation de référence l'étude des sérums individuels.

A. SPECIFICITE

Strictement, la spécificité de la technique ELISA appliquée au lait de mélange doit être étudiée sur un échantillon d'étables dont tous les animaux ont fourni une réponse négative à un contrôle sérologique individuel. Ces études ont été conduites avec des trousse de 4 producteurs, mais le faible nombre d'élevages qui peuvent être testés dans ces conditions limite la portée de l'étude (tableau III), qui ne peut que révéler l'existence éventuelle de défauts importants de spécificité ; ceci n'a pas été le cas dans ces deux études, car, aussi bien avant qu'après concentration du lactosérum, la spécificité s'est révélée égale à 100 p. cent.

Tableau III : ELISA sur lait de mélange :
Spécificité (étables indemnes)
[Prévost et coll., 1988 ; Eloit et coll., 1990].

Nombre d'étables indemnes (I.D.G. sur sérums individuels)	Nombre d'étables à réponse ELISA négative sur lait de mélange	Spécificité
122	Producteur 1 = 122	100 %
76	Producteur 1 (Producteur 2) 76 Producteur 3 (100 %

L'étude de la spécificité d'une trousse peut également être conduite, moyennant certaines approximations, dans une zone à faible prévalence d'infection leucosique. Dans ce cas, le protocole choisi consiste en une étude du lait de mélange d'un grand nombre d'exploitations par la technique ELISA, avec confirmation par sérologie individuelle des résultats positifs. La spécificité est alors calculée en supposant que le nombre d'élevages infectés à lait de mélange négatif (C) est très faible par rapport au nombre d'élevages indemnes à lait de mélange négatif (D) (tableau IV).

Le tableau IV montre que dans ces conditions, les deux trouses qui ont été utilisées ont fourni de très bons résultats (98 p. cent et 99,8 p. cent).

Tableau IV : ELISA sur lait de mélange : Spécificité (zones à faible prévalence)
[Eloit et coll., 1988 ; Eloit et coll., 1990].

		IDG			D		Total - A - B
		+	-		-----		-----
	+	A	B	SP =	B + D		Total - A
ELISA	-----						
	-	C	D				

Département	Nombre total d'étables	Producteur	Nombre d'étables à réponse ELISA négative sur lait de mélange (total A - B)	Nombre d'étables infectées (A)	Spécificité
Côtes-d'Armor	933	1	899	19	98 %
Finistère	9.457	3	9.418	18	99,8 %

B. SENSIBILITE ET DETECTABILITE

Le calcul de la sensibilité du test ELISA sur lait de mélange devrait se fonder sur l'étude du lait de mélange d'un échantillon d'exploitations infectées représentatif de la population générale des cheptels soumise au dépistage. En pratique, ce type d'échantillon ne pourrait être constitué que très difficilement, dans l'ignorance où nous sommes d'une variable fondamentale représentée par le pourcentage d'animaux infectés dans les cheptels (même si quelques données départementales sont disponibles).

Cette difficulté conduit donc les responsables d'études portant sur ce thème à apprécier la détectabilité des tests sur le marché. Le tableau V montre le résultat de deux études portant sur des cheptels de taux d'infection connu, utilisant les trouses de 4 producteurs avant et après concentration du lactosérum. Ces résultats montrent que, si la plupart des trouses permettent de repérer la quasi totalité des exploitations dont plus de 10 p. cent de vaches laitières sont infectées, l'aptitude au repérage des exploitations plus faiblement infectées est variable selon les trouses. Ainsi, la trousse 2 repère, sans concentration du lactosérum 13 exploitations sur 14 de taux d'infection des animaux supérieur à 5 p. cent, et le quart des exploitations infectées dont le taux d'infection des animaux est compris entre 2 et 4,9 p. cent. A l'inverse, la trousse 1 est très en deçà de ces résultats, qu'elle n'atteint même pas après concentration.

Ces différences de détectabilité entre trouses sont bien démontrées par l'étude des résultats en vue d'agrément obtenus par le L.P.B. [Perrin et coll., 1990]. Par analogie avec la norme C.E.E. appliquée aux sérums, une trousse ne peut être agréée pour être utilisée avec du lait que si elle repère le sérum E4 dilué au 1/250 dans du lait négatif. En effet, il a été considéré (même si cette notion reste discutable), que le titre en anticorps présent dans le lait était environ le 1/25ème de celui présent dans le sérum.

Tableau V : ELISA sur lait de mélange :
Déteçtabilité [Prévost et coll., 1988 ; Eloit et coll., 1990].

Taux d'infection des vaches (%)	Nombre de cheptels	ELISA + ou douteux					
		Normal			Après lactoconcentration		
		Producteurs					
		1	2	3	1	2	3
1 - 1,9	5	1			4		
2 - 4,9	17	10			14		
5 - 9,9	9	7			9		
≥ 10	13	12			13		
1 - 1,9	14	3	6	4	4	6	6
2 - 4,9	16	0	4	2	5	7	7
5 - 9,9	11	2	11	8	8	11	8
≥ 10	3	2	2	1	2	2	2

Pour définir le nombre de vaches dont le lait de mélange peut être étudié, sans perte du niveau de déteçtabilité, à l'aide d'une trousse donnée, il faut considérer le titre obtenu avec cette trousse sur le sérum E4 dilué dans du lait négatif (nombre de vaches = titre obtenu divisé par 250). Ainsi, un lait de mélange de 20 vaches ne peut être, suivant cette norme, étudié qu'avec une trousse capable de repérer le niveau du sérum E4 dilué au 1/5000 (250 x 20) dans du lait négatif (tableau VI). Les mêmes commentaires que pour les sérums peuvent être faits pour cette norme, qu'il ne faut pas considérer comme mathématiquement applicable aux résultats du dépistage.

Tableau VI : ELISA sur lait de mélange :
Déteçtabilité suivant la norme C.E.E.

Titre du sérum E4 dilué dans du lait négatif	Nombre maximal de vaches dont le lait est utilisable pour le lait de mélange
1/250	1
1/500	2
1/750	3
.	.
.	.
.	.
1/5000	20
.	.
.	.
.	.

Le tableau VII montre les résultats obtenus pour différents lots de 6 producteurs. Ils témoignent, là encore, de l'hétérogénéité des résultats enregistrés entre producteurs (cf producteurs 1 et 3) et entre lots d'un même producteur (cf producteur 2). Depuis le 1er janvier 1990, seules les trousse d'indice supérieur à 20 sont autorisées à la vente en France.

Tableau VII : ELISA sur lait de mélange : Résultats obtenus suivant la norme C.E.E. pour différentes trousse commercialisées [Perrin et coll., 1990].

N° 1	Producteurs				
	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6
4*	75	12	20	20	30
50	12	8		20	35
50		12			
50		20			
30		16			
10					

* Indique le nombre maximal de vaches dont le lait peut entrer dans la constitution du lait de mélange à étudier.

C. VALEUR PREDICTIVE NEGATIVE (V.P.N.)

La valeur prédictive négative (= la proportion de résultats négatifs obtenus sur du lait de mélange correspondant effectivement à des cheptels indemnes) s'étudie avec le protocole suivant. Le lait de mélange d'un échantillon de cheptels est étudié et une partie des cheptels à résultats négatifs sont contrôlés en sérologie individuelle de manière à vérifier le résultat du lait de mélange. On sait que la V.P.N. d'un même test est d'autant meilleure que la prévalence est faible. Nous avons pu retrouver cette notion théorique en constatant qu'une même trousse (trousse 1) fournissait une V.P.N. de 100 p. cent dans un département à faible prévalence d'infection, alors que la V.P.N. était de 67 p. cent dans un département à prévalence élevée (tableau VIII). Dans ce dernier cas, ce chiffre signifie que 33 p. cent (100 - 67) des cheptels à résultat négatif étaient en fait infectés.

Tableau VIII : ELISA sur lait de mélange : Valeur prédictive négative.

Département	Prévalence de l'infection des cheptels	Nombre de cheptels fournissant une réponse négative au test ELISA sur lait de mélange	Nombre de cheptels à réponses négatives en I.D.G. sur sérums individuels et nombre de cheptels étudiés	Producteur	V.P.N.
Landes*	50 %	237	33/49	1	67 %
Côtes d'Armor**	1 %	899	46/46	1	100 %

* Toma et coll. [1986] - ** Eloit et coll. [1988]

Par rapport à cette étude, déjà un peu ancienne, une nouvelle étude fournirait très probablement de meilleurs résultats avec les troussees actuelles, plus sensibles et améliorant donc la V.P.N. dans une population de prévalence constante. Il n'empêche que ces chiffres ne peuvent que confirmer que la qualification de cheptel reste difficile en région fortement infectée, même s'il ne faut pas perdre de vue que les cheptels infectés non repérés sont des cheptels peu infectés correspondant donc à un risque mineur en cas de vente d'animaux, surtout lorsqu'elle est assortie d'un contrôle sérologique individuel de l'animal acheté (comme cela est obligatoire en France).

D. VALEUR PREDICTIVE POSITIVE OU DOUTEUSE (V.P.P.)

La valeur prédictive positive ou douteuse (proportion de cheptels à réponse positive ou douteuse effectivement infectés) s'étudie avec le protocole suivant. Le lait de mélange d'un échantillon de cheptels est étudié et les cheptels à résultat positif sont contrôlés en sérologie individuelle afin de vérifier le résultat obtenu sur lait de mélange.

Trois études ont été conduites, une en zone à forte prévalence, une autre avec des troussees du même producteur en zone à faible prévalence, une dernière dans une zone à faible prévalence avec des troussees d'un autre producteur (tableau IX). On sait que la V.P.P. est d'autant plus élevée que la prévalence de l'infection est forte, ce qui a été à nouveau confirmé par les résultats obtenus. Avec des troussees du même producteur (producteur 1), la V.P.P. était de 98,9 p. cent dans un département où environ 50 p. cent des cheptels étaient infectés ; elle passait à 55,9 p. cent dans le cas d'un département dont le taux d'infection de cheptels était proche de 1 p. cent. Une V.P.P. comparable (46,1 p. cent) a été enregistrée dans un département de situation épidémiologique favorable comparable avec une trousse d'un autre producteur (producteur 3). Ceci signifie que dans des départements faiblement infectés, avec des troussees de très bonne spécificité (voir plus haut), environ un cheptel sur deux à résultat positif sur lait de mélange correspond en fait à un cheptel indemne. Des résultats comparables sont bien connus dans le cas de la brucellose et de la tuberculose en fin d'éradication.

**Tableau IX : ELISA sur lait de mélange :
Valeur prédictive positive et douteuse.**

Lieu	Prévalence de l'infection des cheptels	Nombre de cheptels testés	Nombre de cheptels ayant fourni une réponse positive au douteuse au test ELISA sur lait de mélange	Nombre de cheptels infectés (IDG positive sur sérums individuels)	Producteur	V.P.P./Douteux
Landes*	50 %	325	88	87	1	98,9 %
Côtes-d'Armor**	1 %	933	34	19	1	55,9 %
Finistère***	1 %	9.457	39	18	3	46,1 %

* Toma et coll. [1986] - ** Eloit et coll. [1990] - *** Résultats non publiés

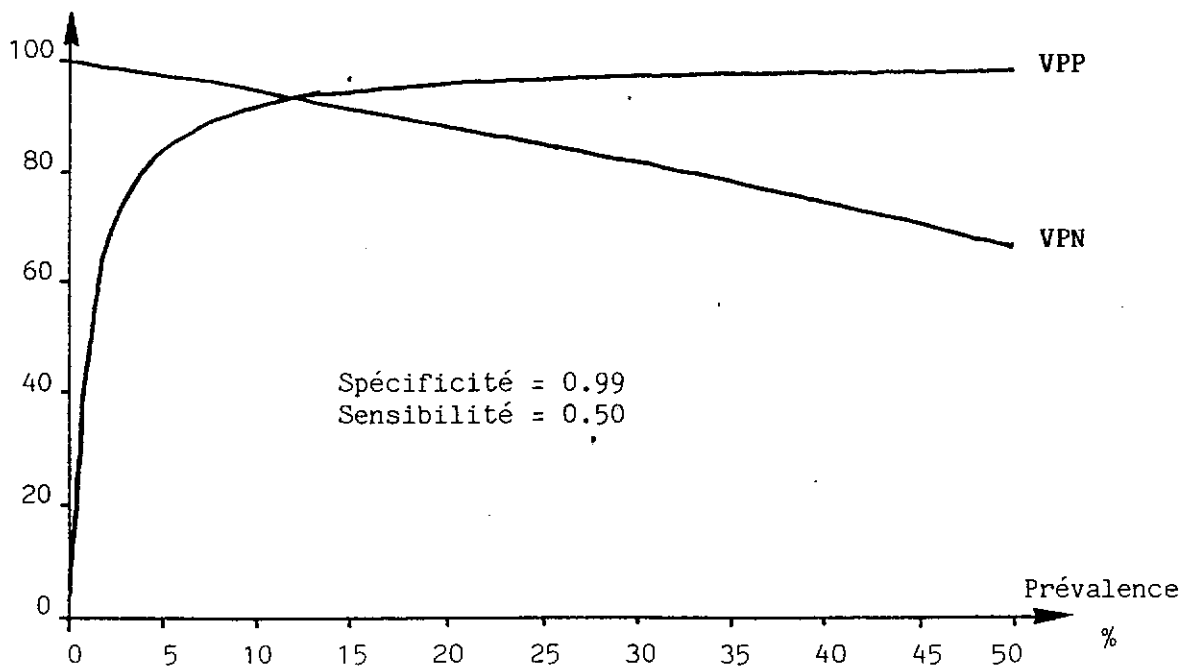
CONSEQUENCES SUR LA DEFINITION DE STRATEGIES DE DEPISTAGE

I - EVOLUTION DES PERFORMANCES OU DEPISTAGE EN FONCTION DE LA PREVALENCE

La figure 1 représente l'évolution **théorique** des valeurs prédictives en fonction de la prévalence d'une technique ELISA lait de mélange de spécificité = 99 p. cent et de sensibilité = 50 p. cent.

Cette valeur de spécificité a été choisie car elle est proche des valeurs effectivement enregistrées pour les troussees disponibles. La valeur de la sensibilité, comme nous l'avons vu, n'est pas connue. Nous avons fait le choix de retenir le chiffre de 50 p. cent car il permet d'obtenir des valeurs prédictives positives et négatives comparables à celles effectivement enregistrées dans les enquêtes précédemment décrites.

Figure 1 : Evolution des valeurs prédictives des tests ELISA sur lait de mélange en fonction de la prévalence de l'infection.



Ce graphique montre que, en début de prophylaxie dans des zones fortement infectées (prévalence comprise en 25 et 50 p. cent environ), la V.P.P. est élevée, proche de 100 p. cent alors que la V.P.N. reste perfectible (comprise entre 70 et 90 p. cent). Autrement dit, si les résultats positifs enregistrés correspondent quasi systématiquement à des cheptels infectés, 10 à 30 p. cent des résultats négatifs correspondent à des cheptels infectés qui ne sont pas repérés. La valeur de la qualification indemne que l'on peut donner aux cheptels à résultat négatif n'est donc pas absolue, mais nous avons déjà souligné les raisons pour lesquelles le risque épidémiologique que représentent les cheptels infectés à résultat négatif est limité.

Lorsque la prévalence de la maladie diminue et arrive dans une fourchette de l'ordre de 10 à 25 p. cent, les V.P.N. et V.P.P. deviennent peu différentes de 90 p. cent. Autrement dit, la très grande majorité des exploitations à résultat positif ou négatif sont respectivement infectées ou indemnes, le dépistage s'effectuant alors dans des conditions optimales, ou du moins ressenties comme telles par les utilisateurs.

Enfin, en fin de prophylaxie ou dans les zones à faible prévalence initiale (< 10 p. cent), la V.P.N. devient proche de 100 p. cent alors que, à mesure que le taux d'infection des cheptels tend vers 0 p. cent, la V.P.P. tend également vers 0 p. cent. La qualification indemne des cheptels est alors très solide mais le principal problème rencontré résulte d'une proportion de plus en plus élevée de cheptels à lait de mélange positif dont le contrôle sérologique individuel des animaux ne repère aucun bovin infecté (V.P.P. faible). Cette proportion peut être supérieure à 50 p. cent quand la prévalence devient plus faible que 1 p. cent.

En fin de prophylaxie, il est donc légitime de souhaiter améliorer la V.P.P. On sait que ceci passe essentiellement par une amélioration de la spécificité du test. On ne peut donc qu'être vigilant, au niveau des organismes de contrôle des réactifs, sur cet aspect de la valeur des trousse à une période où une certaine course à la sensibilité pourrait tendre à aller dans un sens opposé. Une autre modalité d'amélioration de la spécificité, au bénéfice de la V.P.P., passe par un contrôle des résultats positifs enregistrés sur lait de mélange par une répétition du test sur un ou plusieurs autres prélèvements, comme nous le verrons au chapitre suivant.

Enfin, au-delà des arguments techniques sur l'intérêt et les limites des tests ELISA sur lait de mélange, on ne peut pas ne pas mentionner l'aspect économique qui est souvent limitant. Pour s'en convaincre, on peut consulter le tableau X qui montre les résultats du coût de trois approches de dépistage dans un département comme le Morbihan. Le coût du dépistage sur sérums (mêlés ou non) apparaît disproportionné par rapport à quatre tests ELISA sur lait de mélange par an, essentiellement en raison d'un coût de prélèvement non compressible.

Tableau X : Coût du dépistage des cheptels infectés suivant différents scénarios (département du Morbihan).

Protocole	Coût annuel
4 laits de mélange par an	545.000 F.
1 mélange de sérums par an	7.250.000 F.
1 sérologie individuelle par an	13.300.000 F.

II - CONDUITE A TENIR EN PRESENCE D'UN RESULTAT POSITIF OU DOUTEUX LORS DE L'ETUDE D'UN LAIT DE MELANGE

De manière à tenter d'améliorer la V.P.P. du test ELISA sur lait de mélange en zone faiblement infectée, nous avons comparé deux attitudes en cas de résultat positif ou douteux sur lait de mélange [Eloit et Toma, 1989 ; Eloit et coll., 1990b] : Contrôle immédiat des animaux en sérologie individuelle (protocole 1) ou 5 répétitions ultérieures de l'examen du lait de mélange (protocole 2).

Le tableau XI montre les résultats obtenus. Ils sont particulièrement favorables pour les résultats douteux sur lait de mélange. Le protocole 1 révèle 16 cheptels à réponse faussement douteuse contre aucun au protocole 2 (sur 9.457 cheptels testés, par des trousseaux du producteur 3). Néanmoins, le protocole 1 identifie un peu plus de cheptels infectés (3) que le protocole 2 (2). En résumé, il semble que, tout particulièrement dans les départements à faible taux d'infection, on puisse recommander un second contrôle systématique des résultats douteux sur un nouveau prélèvement de lait de mélange, avant de réaliser, en cas de résultats à nouveau douteux ou positif, un contrôle individuel des animaux de l'exploitation.

Tableau XI : Performances du dépistage des cheptels infectés, par la technique ELISA sur lait de mélange en fonction du type de protocole utilisé [Eloit et coll., 1990].

Principe	Protocole 1	Protocole 2
	Pas de confirmation	5 tests de confirmation
Cheptels indemnes à réponse positive initiale	5	1
Cheptels infectés à réponse positive initiale identifiés	15	14
V.P. positive	75 %	93 %
Cheptels indemnes à réponse douteuse initiale	16	0
Cheptels infectés à réponse douteuse initiale identifiés	3	2
V.P. douteuse	16 %	100 %

En conclusion, la plupart des données chiffrées concernant les performances des kits de diagnostic de la L.B.E. sont actuellement suffisamment connues pour pouvoir analyser, voire prédire, les résultats et les éventuelles difficultés du dépistage. Comme pour toute prophylaxie, l'obtention de taux résiduels d'infection des cheptels faibles pose de nouveaux problèmes qu'il est nécessaire de prendre en compte, comme nous l'avons souligné, dans la conduite à tenir en cas de résultat positif ou douteux.

BIBLIOGRAPHIE

- ELOIT M., HILLION E., ARGENTE G., DANIEL L. et TOMA B.- Dépistage de la leucose bovine enzootique par le test ELISA sur lait de mélange dans un département à faible prévalence de l'infection leucosique. Rev. Méd. Vét., 1988, **139**, 293-299.
- ELOIT M. et TOMA B.- Aide à la décision en présence de résultat positif ou douteux au test ELISA appliqué au lait de mélange pour le dépistage de la leucose bovine enzootique. G.D.S. I.S., 1989, N° 95, 20-24.
- ELOIT M., KUSMAK J., DHEILER M., BENET J.J. and TOMA B.- Comparison of performances of four ELISA kits in the detection of BLV antibodies in bulk tank milk or concentrated lactoserum from herds with low prevalence of infection. J. Biol. Stand., 1990a, sous presse.
- ELOIT M., LAMY F., GLEVAREC M., GALAUP F., TURMEL R., VIGOUROUX A., BENET J.J. and TOMA B.- Detection of bovine leukemia virus antibodies in bulk tank milk using an ELISA test : improvement of the predictive value of results by repeated testing. J. Biol. Stand., 1990b, sous presse.
- PERRIN B., BETEMPS Dominique et FEDIDA M.- La détection des anticorps de la leucose bovine enzootique par le test ELISA : Bilan de 3 ans de contrôle des réactifs en France. Bull. Lab. Serv. Vét., 1990, sous presse.
- PREVOST P., ELOIT M. et TOMA B.- Dépistage de la leucose bovine enzootique par le test ELISA appliqué au lactosérum concentré de tank. J. Biol. Stand., 1988, **16**, 91-97.
- TOMA B., VUILLAUME A., PREVOST P., DURET Christiane, ELOIT M., CHAPPUIS G. et PARODI A.L.- Dépistage de la leucose bovine enzootique à l'aide du test ELISA appliqué au lait de mélange et au lait individuel. Ann. Rech. Vét., 1986, **17**, 75-83.