

## UTILISATION COMPAREE DU SERUM, DU POU MON ET DU MUSCLE POUR LE DEPISTAGE DE LA MALADIE D'AUJESZKY CHEZ LES SANGLIERS\*

---

Bernard Toma<sup>1</sup>, Cécilia Agier<sup>1</sup>, Nadia Haddad<sup>1</sup>,  
Franck Boué<sup>2</sup>, Marie-Eve Terrier<sup>3</sup> et Jean Hars<sup>3</sup>

**RESUME :** L'étude d'échantillons multiples (sérum, extrait musculaire, extrait pulmonaire) en provenance de plus de 500 sangliers, à l'aide de coffrets ELISA gE maladie d'Aujeszky commercialisés a permis d'estimer les sensibilités et spécificités de ces coffrets par rapport au sérum, lors d'emploi d'extraits tissulaires.

Les résultats obtenus permettent d'envisager dans l'avenir l'emploi de fragments de muscle ou de poumon comme prélèvements destinés à l'épidémiosurveillance de la maladie d'Aujeszky chez les sangliers.

**Mots-clés :** Maladie d'Aujeszky, sanglier, sérologie, surveillance épidémiologique, poumon, muscle.

**SUMMARY :** Many samples (serum, muscle extracts, lung extracts) from more than 500 wild boars were tested for the presence of Aujeszky's disease antibodies, using three ELISA gE commercial kits. This gave the opportunity to evaluate the sensitivity and specificity obtained with tissue extracts, as compared to serum (conventional tests).

The results obtained allow to envisage the use of muscle or lung samples for the epidemiosurveillance of Aujeszky's disease in wild boars.

**Keywords :** Aujeszky disease, wild boar, epidemiological surveillance, lung, muscle, serology.



---

### I – INTRODUCTION

---

Le présent travail fait partie d'une étude plus large, financée par la Direction générale de l'alimentation et destinée à comparer les performances des tests de dépistage de différentes maladies du sanglier (brucellose, peste porcine classique, maladie d'Aujeszky et trichinellose) appliqués à des échantillons de sérum, de muscle et de poumon provenant de

plusieurs centaines de sangliers. L'objectif de cette étude portant sur quatre maladies était de vérifier si des prélèvements de muscle ou de poumon pourraient être substitués aux prélèvements classiques de sang pour des enquêtes épidémiologiques portant sur ces maladies chez le sanglier.

---

\* Texte de la conférence présentée au cours de la Journée AEEMA, 14 mai 2004

<sup>1</sup> Laboratoire de référence OIE pour la maladie d'Aujeszky, ENVA, 94704 Maisons-Alfort cedex, France

<sup>2</sup> AFSSA Nancy, Lerpas, Unité santé et gestion de la faune sauvage, Domaine de Pixérécourt, BP 9, 54220 Malzéville, France

<sup>3</sup> Office national de la chasse et de la faune sauvage, Unité sanitaire de la faune, ZI de Mayencin, 5 allée de Bethléem, 38610 Gières, France

Le présent compte rendu ne concerne que la maladie d'Aujeszky. Pour cette maladie, des études antérieures [Le Potier *et al.*, 1998 ; De Lange *et al.*, 2003] ont comparé les résultats obtenus sur le sérum et sur l'exsudat musculaire chez le porc et ont conclu à l'utilisation possible d'échantillons de muscle

prélevés à l'abattoir pour son épidémiosurveillance.

Il était opportun de vérifier si des résultats semblables pouvaient être obtenus chez le sanglier, espèce chez laquelle la maladie d'Aujeszky semble implantée dans différents départements français.

## II – MATERIEL ET METHODES

### 1. ECHANTILLONS

Les échantillons de sérum, d'exsudat musculaire et d'extrait pulmonaire utilisés ont la même origine et les mêmes modalités de préparation que ceux de l'étude présentée par B. Garin-Bastuji *et al.* dans ce même numéro [Garin-Bastuji *et al.*, 2004].

Le nombre d'échantillons disponibles pour chaque sanglier était de deux ou trois. Les nombres d'échantillons doubles ou triples par sangliers pour chacune des trois campagnes sont indiqués dans le tableau I.

Tableau I

Modalités d'étude des échantillons provenant de sangliers pour le dépistage de la maladie d'Aujeszky au cours des trois campagnes

	2000-2001	2001-2002	2002-2003	
Coffret ELISA utilisé	gE LSI	gE Bommeli	gE Pourquier	
Seuils	positif	Index >45%	Index ≤40%	
	douteux	40% ≤ index ≤ 45%	65% ≥ index ≥ 55%	40% < index < 50%
	négatif	Index <40%	Index <55%	Index ≥50%
Dilution	sérum	1/2	4/5	1/2
	poumon	1/2	4/5	2/5
	muscle	1/2	4/5	2/5
Prélèvements triples	209	205	108	
Prélèvements doubles	sérum+poumon	258	250	171
	Sérum+muscle	223	205	126
Traitement des échantillons d'un même sanglier sur la même plaque	Non	Oui	Oui	

### 2. SEROLOGIE

Les coffrets ELISA utilisés étaient des coffrets gE commercialisés pour l'étude des sérums. Les protocoles étaient ceux des fabricants. Les dilutions des extraits de poumon et de muscle ont été définies en concertation avec les fabricants (tableau I).

Lors de la campagne 2000-2001, pour des raisons de rapidité de fourniture des résultats, les sérums ont été étudiés dans un premier temps et les extraits de poumon et de muscle ultérieurement. Pour les deux campagnes suivantes, les échantillons provenant d'un même sanglier ont été étudiés sur la même microplaque.

### III - RESULTATS

Les résultats de la comparaison sérums-extraits musculaires sont indiqués dans le tableau II et de la comparaison sérums-extraits pulmonaires dans le tableau III.

**Tableau II**  
**Comparaison des résultats obtenus sur sérums et sur muscles de sangliers pour le dépistage de la maladie d'Aujeszky**

Résultats douteux	Performances	2000-2001 (LSI)	2001-2002 (Bommeli)	2002-2003 (Pourquier)
Considérés comme positifs	Concordance	91,5%	94,1%	93,7%
	Kappa	53,8%	81,7%	84,1%
	Sensibilité	50% [30% ; 70%]	79,5% [62,46% ; 86,99%]	93,9% [67,6% ; 99,3%]
	Spécificité	97% [91,6% ; 98,9%]	98,1% [94,65% ; 99,61%]	93,6% [83,1% ; 97,6%]
	$\chi^2$	1,89	2,08	1,12
Considérés comme négatifs	Concordance	92,4%	93,7%	95,2%
	Kappa	51,6%	79,5%	86,8%
	Sensibilité	46% [26% ; 66%]	76,2% [57,7% ; 87,9%]	87,5% [63,6% ; 96,5%]
	Spécificité	98% [92,6% ; 99,5%]	98,2% [91,6% ; 99,6%]	97,9% [86,3% ; 99,7%]
	$\chi^2$	3,76	2,77	0,17

**Tableau III**  
**Comparaison des résultats obtenus sur sérums et sur poumons de sangliers pour le dépistage de la maladie d'Aujeszky**

Résultats douteux	Performances	2000-2001 (LSI)	2001-2002 (Bommeli)	2002-2003 (Pourquier)
Considérés comme positifs	Concordance	95,7%	95,6%	90,1%
	Kappa	81,2%	85,5%	69,2%
	Sensibilité	82,8% [61,3% ; 93,4%]	80 % [63,3% ; 90%]	65% [46,9% ; 79,4%]
	Spécificité	93,5% [88,5% ; 96,3%]	99,5% [92,3% ; 99,99%]	97,7% [89,6% ; 99,5%]
	$\chi^2$	0	5,8	5,89
Considérés comme négatifs	Concordance	96,1%	94,0%	90,6%
	Kappa	82,0%	78,3%	70,2%
	Sensibilité	81,8% [59,5% ; 93,0%]	72,3% [55,3% ; 84,4%]	64,0% [45,8% ; 78,8%]
	Spécificité	98,2% [93,5% ; 99,5%]	99,0% [93,2% ; 99,9%]	98,5% [89,9% ; 99,8%]
	$\chi^2$	0,1	6,67	7,56

---

## IV - DISCUSSION

---

La discussion portera successivement sur le protocole, sur la méthode d'analyse des résultats puis sur les résultats eux-mêmes, d'abord sur ceux relatifs aux extraits musculaires, puis sur ceux relatifs aux extraits pulmonaires.

### 1. PROTOCOLE

➤ En principe, le nombre de prélèvements triples attendus pour chaque campagne était de 300. Sur le tableau I, on constate, d'une part, qu'aucune des trois campagnes n'a permis d'atteindre ce niveau et, d'autre part, que le nombre de prélèvements lors de la troisième campagne est nettement inférieur à celui des deux précédentes. On constate également sur ce tableau que le nombre de prélèvements doubles est toujours plus élevé pour le couple sérum-extrait pulmonaire que pour le couple sérum-extrait musculaire.

Il est évident que la diminution des nombres de prélèvements disponibles par rapport aux nombres attendus augmente la fourchette d'expression des résultats de sensibilité et de spécificité comparée des extraits musculaires et pulmonaires par rapport au sérum et par conséquent diminue la précision des résultats obtenus.

➤ L'avantage d'avoir utilisé plusieurs coffrets est l'obtention de résultats permettant d'avoir une idée initiale sur les performances, et par conséquent l'utilisation possible, de plusieurs coffrets gE commercialisés.

L'inconvénient correspond à des fourchettes d'expression des résultats relativement larges.

➤ Lors de l'analyse des résultats, différentes caractéristiques du protocole ayant pu influencer sur ces résultats, doivent être gardés en mémoire :

La comparaison des résultats sur les trois types d'échantillons lors de la première campagne a pu être biaisée par le fait que les analyses des échantillons provenant d'un même sanglier n'ont pas été faites sur la même microplaque.

Pour la technique utilisée au cours de la dernière campagne, les dilutions des échantillons sont un peu plus fortes pour les extraits pulmonaires et musculaires (2/5) que pour les sérums (1/2) (cf. tableau I). Cette différence peut légèrement « handicaper » ces deux types d'extraits traités avec le coffret

Pourquier par rapport aux deux autres coffrets utilisés au cours des deux années précédentes.

Le mode d'obtention des extraits musculaires et des extraits pulmonaires est différent (Garin-Bastuji *et al.*, 2004]. Pour l'obtention des extraits musculaires, il n'existe pas de facteur de dilution alors qu'il en existe un pour les extraits pulmonaires. Ce facteur risque de diminuer légèrement les performances de sensibilité des extraits pulmonaires par rapport à celles des extraits musculaires. Il serait opportun de revoir les modalités de préparation des extraits pulmonaires et de comparer plusieurs protocoles quant à leurs effets sur la spécificité et la sensibilité par rapport au sérum.

Enfin, la comparaison des performances de sensibilité et de spécificité des trois coffrets ELISA utilisés doit demeurer très prudente dans la mesure où les coffrets n'ont pas été utilisés sur les mêmes prélèvements.

### 2. METHODE D'ANALYSE DES RESULTATS

On peut s'interroger sur la pertinence du choix de l'indicateur à privilégier pour l'interprétation des résultats.

D'une manière générale, l'évaluation de la concordance entre deux tests à réponse qualitative repose sur le taux de concordance observée et sur le coefficient Kappa qui exprime une différence relative par rapport à la concordance observée et à la concordance aléatoire.

Plus le pourcentage du taux de concordance observée est proche de 100 et le coefficient Kappa, proche de 1, plus la concordance entre les deux tests est élevée. Cependant, ces deux indicateurs ne font pas de différence entre les résultats obtenus par défaut ou par excès par rapport au test considéré comme le test de référence (en l'occurrence, le test ELISA sur sérum). Or, pour le jugement des performances du test ELISA sur muscle et sur poumon, il n'est pas possible de ne pas tenir compte du type d'erreur, par excès ou par défaut, des résultats obtenus. La symétrie (ou la « neutralité ») du taux de concordance observée et celle du coefficient Kappa ne sont pas acceptables et doivent être complétées par les informations supplémentaires apportées par le calcul de la sensibilité et de la

spécificité par rapport à la méthode considérée comme référence (ELISA sérum).

D'une manière générale, pour des actions de dépistage d'une maladie en région indemne ou peu infectée, on peut accepter plus facilement un défaut de sensibilité individuelle qu'un défaut de spécificité individuelle (en exprimant ces deux qualités individuelles par des pourcentages analogues).

Autrement dit, le jugement porté sur les résultats de cette étude doit prendre davantage comme indicateur les valeurs de sensibilité et de spécificité que les valeurs de concordance générale et du coefficient Kappa et, pour sensibilité et spécificité, l'exigence quantitative sera plus élevée pour la spécificité individuelle que pour la sensibilité individuelle.

### 3. RESULTATS OBTENUS AVEC LES EXTRAITS MUSCULAIRES

#### 3.1. RESULTATS DOUTEUX

Les résultats douteux, obtenus aussi bien sur sérum que sur muscle, ont été considérés soit comme positifs, soit comme négatifs pour le calcul des valeurs des indicateurs (l'hypothèse de les sortir des calculs n'a pas été envisagée).

Quelle que soit l'année (et, par conséquent, le producteur de coffret), en faisant passer les résultats douteux de positif à négatif, on tend à :

- augmenter la spécificité, et
- diminuer la sensibilité (tableau II).

On retrouve cette même tendance (à une exception près) avec les poumons.

Compte tenu de l'indicateur à privilégier (spécificité), il paraît souhaitable de considérer les résultats douteux comme négatifs.

#### 3.2. SPECIFICITE ET SENSIBILITE INDIVIDUELLES

Lorsque l'on considère les résultats douteux comme négatifs, la **spécificité** individuelle de l'ELISA muscle des trois coffrets utilisés est assez voisine :

- Coffret gE LSI : 98% [92,6% ; 99,5%]
- Coffret gE Bommeli : 98,2% [91,6% ; 99,6%]
- Coffret gE Pourquier : 97,9% [86,3% ; 99,7%]

Ce niveau de spécificité peut être considéré comme satisfaisant. Il correspond à un risque moyen d'erreurs par excès de l'ordre de 2% et à un risque maximal d'erreurs par excès de l'ordre de 10%.

Autrement dit, lors de dépistage de la maladie d'Aujeszky sur des échantillons de muscle de sanglier, dans une région à statut sanitaire inconnu au regard de cette maladie, en cas de réponse positive unique sur un nombre de prélèvements inférieur ou égal à 50, il ne serait pas possible d'affirmer la présence de cette infection chez les sangliers.

En ce qui concerne la **sensibilité** individuelle de l'ELISA muscle (en considérant les résultats douteux comme négatifs), le niveau est assez différent en fonction du coffret utilisé, par ordre croissant de sensibilité, on a :

- Coffret gE LSI : 46% [26% ; 66%]
- Coffret gE Bommeli : 76,2% [57,7% ; 87,9%]
- Coffret gE Pourquier : 87,5% [63,6% ; 96,5%]

Compte tenu de la différence de traitement des échantillons entre la première année (traitement différé des échantillons de muscle et de poumon par rapport au sérum) et les années suivantes (traitement simultané), il n'est pas certain que la sensibilité individuelle du coffret ELISA LSI soit effectivement dans la fourchette 26%-66%.

Si, dans l'avenir, des études complémentaires confirmaient cette fourchette, ceci constituerait un handicap pour l'utilisation de ce coffret.

La sensibilité individuelle estimée des deux autres coffrets les rend utilisables pour un dépistage de la maladie d'Aujeszky sur prélèvement de muscle de sanglier. Il conviendrait, simplement, de prendre la précaution de corriger la prévalence apparente pour se rapprocher de la prévalence réelle, après avoir tenu compte de la spécificité.

#### 3.3. PROPOSITIONS

Compte tenu des valeurs estimées de la sensibilité et de la spécificité individuelles au sein de fourchettes assez larges, et de l'incertitude corollaire, il n'est pas possible de proposer une règle rigide assurant un résultat exact. On peut simplement proposer des orientations pour l'interprétation de résultats positifs en ELISA gE sur muscle de sanglier, avec les coffrets Pourquier et Bommeli (tableau IV).

Tableau IV

**Orientations proposées pour l'interprétation de résultats positifs en ELISA gE sur muscle ou poumon de sanglier, en fonction du nombre d'échantillons testés et du nombre de résultats positifs obtenus**

	Nombre d'échantillons testés		Interprétation
	≤ 50	> 50	
Nombre de résultats positifs	≤ 1	≤ 2%	Infection absente ou taux faible
	2-3	3-7%	Infection probablement présente
	≥ 4	≥ 8%	Infection présente

En cas d'usage d'un coffret gE Pourquoier, il conviendrait d'augmenter la prévalence moyenne apparente de 15% (ex. :  $20\% + (20 \times 0,15) = 23\%$ ) et pour un coffret gE Bommeli, de 25% (ex. :  $20\% + (20 \times 0,25) = 25\%$ ).

#### 4. RESULTATS OBTENUS AVEC LES EXTRAITS PULMONAIRES

##### 4.1. RESULTAT DOUTEUX

La même tendance que précédemment est observée (tableau III).

Cependant, le fait de considérer les résultats douteux comme négatifs plutôt que positifs a tendance à :

- diminuer peu la sensibilité individuelle, pour deux coffrets sur trois,
- augmenter légèrement la spécificité individuelle d'un coffret (Pourquier), l'augmenter nettement pour un autre (LSI) et la diminuer légèrement pour un troisième (Bommeli).

##### 4.2. SPECIFICITE ET SENSIBILITE INDIVIDUELLES

La **spécificité** individuelle des trois coffrets (en considérant les résultats douteux comme négatifs) est satisfaisante. Elle est au moins aussi bonne que celle des mêmes coffrets utilisés pour les muscles, voire plutôt supérieure. Avec le coffret LSI, il ne serait pas possible de considérer les résultats douteux comme positifs (spécificité individuelle de l'ordre de 93,5% seulement).

En ce qui concerne la **sensibilité**, le coffret Pourquoier fournit des résultats décevants par rapport à ceux obtenus sur le muscle (avec le même taux de dilution pour poumon et muscle). En revanche, le coffret LSI fournit de meilleurs résultats qu'avec le muscle.

Le coffret Bommeli fournit de bons résultats (notamment en considérant les résultats douteux comme positifs).

##### 4.3. PROPOSITIONS

Compte tenu des résultats obtenus sur poumons, il est possible de faire des propositions d'interprétation des résultats positifs lors d'emploi de coffrets LSI et Bommeli sur des poumons de sanglier (tableau IV).

Il conviendrait d'augmenter la prévalence moyenne apparente de 20% en cas d'usage d'un coffret gE LSI ou Bommeli.

## V - CONCLUSION

A l'issue de cette étude, il n'est pas possible de proposer un choix entre muscle et poumon pour remplacer le sang lors de dépistage de la maladie d'Aujeszky chez le sanglier. Ainsi, avec le coffret gE Bommeli, les résultats

obtenus sur muscle et sur poumon sont semblables. Pour le coffret gE LSI, sa sensibilité individuelle ne permet pas de le recommander pour l'étude du muscle alors qu'il est utilisable pour le poumon. Au

contraire, pour le coffret gE Pourquier, sa sensibilité individuelle ne permet pas de le recommander pour l'étude du poumon alors qu'il est utilisable pour le muscle.

Cette étude montre que l'utilisation de coffrets gE maladie d'Aujeszky sur muscle et sur poumon est possible en vue de dépister cette maladie chez les sangliers sauvages et d'en apprécier la prévalence. Le prélèvement d'un fragment de muscle ou de poumon sur une carcasse de sanglier est sans doute plus facile que celui du sang. Le recours à un

fragment de muscle ou de poumon serait donc de nature à faciliter la réalisation de prélèvements pour l'épidémiologie de la maladie d'Aujeszky chez les populations de sangliers sauvages.

Les règles de base pour l'interprétation de résultats positifs obtenus sur de tels échantillons sont dès maintenant formulées et utilisables. Des études complémentaires permettraient de les confirmer ou de les affiner.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

De Lange K., Haddad N., Le Potier M.F., Agier C., Le Vée M., Amar P., Toma B. ~ Specificity of three ELISA gE kits for screening pig meat for antibodies to Aujeszky's disease. *Vet. Rec.*, 2003, **153**, 621-624.

Garin-Bastuji B., Cau C., Boué F., Terrier M.E, Hars J. ~ Utilisation comparée du sérum, du poumon et du muscle pour le dépistage

de la brucellose chez les sangliers. *Epidémiol. et santé anim.*, 2004, **45**, 13-23.

Le Potier M.F., Fournier A., Houdayer C., Hutet E., Auvigne V., Hery D., Sanaa M., Toma B. ~ Use of muscle exudates for the detection of anti-gE antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.*, 1998, **143**, 385-387.



### Remerciements

Cette étude a été réalisée grâce à un financement spécifique du Ministère de l'agriculture (Direction générale de l'alimentation).

Chantal Patron et Nathalie Stroucken (Afssa Nancy) sont particulièrement remerciées pour leur excellente collaboration technique, et Moez Sanaa pour son aide dans le domaine de la statistique.

Les auteurs souhaitent également remercier vivement les personnels des DDSV et LVD des départements des Ardennes, des Bouches-du-Rhône et de Moselle ainsi que les Fédérations départementales de chasseurs et les agents de l'ONCFS des trois départements, sans qui cette étude n'aurait pas été possible.