

## ESTIMATION BAYÉSIENNE DE LA SENSIBILITÉ DE QUATRE TECHNIQUES DE PRÉLÈVEMENT COUPLÉES À UNE PCR NICHÉE POUR DÉTECTER *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* CHEZ LES PORCS EN ÉLEVAGE\*

**Christelle Fablet<sup>1</sup>, Corinne Marois, Virginie Dorenlor, Florent Eono, Eric Eveno,  
Typhaine Poëzévara, Marylène Kobisch, François Madec et Nicolas Rose**

### RÉSUMÉ

L'étude a pour objectif de comparer quatre techniques de prélèvement : écouvillonnage nasal, écouvillonnage oro-pharyngé, lavage trachéo-bronchique et sondage trachéo-bronchique, alliées à une technique de laboratoire de réaction de polymérisation en chaîne nichée (n-PCR), pour détecter *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) chez le porc vivant naturellement infecté. Les prélèvements ont été réalisés dans un élevage chroniquement atteint de troubles respiratoires. Un échantillon de 60 porcs aléatoirement sélectionnés dans une bande en fin d'engraissement a été utilisé. Chaque porc a été soumis aux quatre techniques de prélèvement. Les échantillons ont été analysés par n-PCR pour détecter *M. hyopneumoniae*. Les résultats ont été classés en n-PCR positif ou négatif. Une approche Bayésienne a été utilisée pour estimer la sensibilité de chaque technique de prélèvement couplée à la n-PCR, la spécificité étant fixée à 1. Pour 70% des porcs, *M. hyopneumoniae* a été détecté par n-PCR dans au moins un échantillon. Les méthodes fournissant les sensibilités les plus élevées étaient le sondage trachéo-bronchique (0,74 ; intervalle de crédibilité à 95% (IC<sub>95%</sub>) (0,59 ; 0,86)) et le lavage trachéo-bronchique (0,68 ; IC<sub>95%</sub> (0,53 ; 0,82)). L'écouvillonnage nasal présentait la plus faible sensibilité (0,19 ; IC<sub>95%</sub> (0,09 ; 0,32)). Les résultats indiquent que le prélèvement trachéo-bronchique associé à une PCR-nichée est un outil de choix pour évaluer la dynamique d'infection des porcs en élevage par *M. hyopneumoniae*.

**Mots-clés :** *Mycoplasma hyopneumoniae*, détection, technique de prélèvement, analyse Bayésienne.

### SUMMARY

Four sampling techniques for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection, namely nasal swabbing, oral-pharyngeal brushing, tracheo-bronchial swabbing and tracheo-bronchial washing, were compared in naturally infected live pigs. 60 finishing pigs were randomly selected from a batch of contemporary pigs on a farm chronically affected by respiratory disorders. Each pig was submitted to nasal swabbing, oral-pharyngeal brushing, tracheo-bronchial swabbing and tracheo-bronchial washing. A nested-Polymerase Chain Reaction (PCR) assay was performed on all samples. A Bayesian approach was used to analyze the results of the four sampling methods to estimate the sensitivity of each method coupled to n-PCR, the specificity was taken as equal to one. The most sensitive sampling methods for detecting *M. hyopneumoniae* in live naturally-infected pigs were tracheo-bronchial swabbing and tracheo-bronchial washing, as compared to oral-pharyngeal brushing and nasal swabbing.

**Keywords:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, Detection, Sampling methods, Bayesian.



\* Article reçu le 6 janvier 2011, accepté le 23 juin 2011

<sup>1</sup> Anses-site de Ploufragan, B.P. 53, 22440 Ploufragan, France

---

## I - INTRODUCTION

---

*Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) est l'agent étiologique primaire de la pneumonie enzootique du porc et, en interaction avec d'autres agents infectieux de l'appareil respiratoire, il est impliqué dans la pathogénèse du complexe respiratoire porcin [Thacker, 2006]. Ces deux maladies sont mondialement responsables de pertes économiques importantes pour la production porcine [Maes *et al.*, 1999b ; Aubry *et al.*, 2010]. La dynamique et la pression d'infection de ce micro-organisme influencent le développement de ces deux syndromes respiratoires [Sibila *et al.*, 2004 ; Fano *et al.*, 2005 ; Fano *et al.*, 2007]. Le suivi de la contamination des porcs vivants fournit des informations sur la dynamique d'infection intra-élevage et permet de rechercher les facteurs associés aux profils infectieux. Sur la base de ces résultats, des programmes de lutte et de prévention appropriés peuvent être élaborés. Toutefois, l'établissement de la dynamique de contamination repose sur la disponibilité d'outils de diagnostic alliant une technique de prélèvement et d'analyse de laboratoire fiables, rapides et faciles à mettre en œuvre. De nombreuses études ont été menées afin d'évaluer l'infection des porcs par *M. hyopneumoniae* à l'aide d'outils sérologiques [Maes *et al.*, 1999a ; Andreasen *et al.*, 2000 ; Rautiainen *et al.*, 2000 ; Andreasen *et al.*, 2001a ; Andreasen *et al.*, 2001b ; Leon *et al.*, 2001]. Cependant, les anticorps d'origine maternelle ou vaccinale n'étant pas distingués de ceux résultant de l'infection, la recherche du statut de contamination des porcs par *M. hyopneumoniae* dans ces conditions n'est pas possible. Par ailleurs, lors de suivis longitudinaux, les techniques sérologiques permettent de déterminer le moment de séroconversion mais pas précisément le moment de contamination. Le développement de techniques de laboratoire de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a permis de s'affranchir de ces limites, constituant ainsi un

outil de choix afin d'appréhender la dynamique de contamination des porcs. Différents sites et types de prélèvement ont été utilisés pour détecter, par PCR, la contamination des porcs vivants expérimentalement ou naturellement infectés, *i.e.* l'écouvillonnage ou brossage nasal, amygdalien ou trachéal, le lavage trachéo-bronchique ou broncho-alvéolaire [Baumeister *et al.*, 1998 ; Calsamiglia *et al.*, 1999a ; Calsamiglia *et al.*, 1999b ; Verdin *et al.*, 2000 ; Kurth *et al.*, 2002 ; Otagiri *et al.*, 2005 ; Moorkamp *et al.*, 2008 ; Moorkamp *et al.*, 2009]. Pour des raisons pratiques en élevage, les cavités nasales constituent le site de prélèvement le plus fréquemment retenu pour évaluer la contamination des porcs par *M. hyopneumoniae*. Bien qu'une association entre la détection de *M. hyopneumoniae* dans les cavités nasales ou les bronches et la pneumonie ait été identifiée, des travaux expérimentaux montrent que le brossage trachéal et le lavage trachéo-bronchique constituent les techniques de prélèvement les plus efficaces pour détecter les porcs contaminés par *M. hyopneumoniae* [Kurth *et al.*, 2002 ; Marois *et al.*, 2007a]. Ceci est en accord avec les résultats de travaux qui indiquent que le micro-organisme est présent de manière transitoire et en plus faible quantité dans les cavités nasales que dans les parties profondes de l'arbre respiratoire [Otagiri *et al.*, 2005]. *M. hyopneumoniae* se multiplie dans les bronches et les bronchioles [Blanchard *et al.*, 1992]. Toutefois les caractéristiques intrinsèques des différentes techniques de prélèvement pour détecter *M. hyopneumoniae* chez le porc vivant dans les conditions du terrain ne sont pas établies. L'objectif de ce travail est de comparer quatre techniques de prélèvement : l'écouvillonnage nasal, l'écouvillonnage oro-pharyngé, le lavage trachéo-bronchique et le sondage trachéo-bronchique, couplées à un test de PCR nichée pour détecter *M. hyopneumoniae* chez des porcs en élevage.

---

## II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

### 1. SÉLECTION DE L'ÉLEVAGE

L'étude a été réalisée dans un élevage naisseur-engraisseur breton chroniquement

atteint de maladies respiratoires selon le vétérinaire sanitaire. Les porcs expriment de la toux en engraissement et les maladies respiratoires constituent le principal motif

d'antibiothérapie. Une vaccination à l'égard de *M. hyopneumoniae* est pratiquée à 4 et 7 semaines d'âge. Des lésions de pneumonie sont régulièrement observées à l'abattoir. Une visite préalable à l'étude a été effectuée pour confirmer les signes cliniques et évaluer la contamination d'un lot de porcs de 180 jours d'âge vis-à-vis de *M. hyopneumoniae*. Sur un échantillon de 10 porcs, sélectionnés par tirage au sort et soumis à un sondage trachéo-bronchique, l'ADN de *M. hyopneumoniae* a été détecté par PCR-nichée pour six d'entre eux. L'étude a été réalisée trois semaines après la visite de qualification sur un lot consécutif de 87 porcs. Les porcs n'avaient fait l'objet d'aucun traitement antibiotique dans les trois semaines précédant l'étude.

## 2. ÉCHANTILLONNAGE

Le calcul de la taille d'échantillon a été fondé sur le niveau de prévalence et de sensibilité attendus en appliquant la méthode pour deux tests appariés décrite par Zhou *et al.* [2002]. Les données de travaux expérimentaux ont été utilisées pour produire des hypothèses sur les sensibilités et les corrélations de l'écouvillonnage nasal, du lavage et du sondage trachéo-bronchique [Marois *et al.*, 2007a]. La prévalence attendue a été estimée selon les résultats de la première visite et de travaux antérieurs qui indiquaient des taux de positivité de 53,6% et de 64,9% en fin d'engraissement dans des élevages chroniquement atteints de pathologie respiratoire [Marois *et al.*, 2007b]. De plus, la prévalence de l'infection par *M. hyopneumoniae* peut varier selon les bandes [Vigre *et al.*, 2004]. Compte tenu de ces données, afin de s'assurer que la taille d'échantillon soit suffisante pour une prévalence inférieure à celle estimée lors de la première visite, une prévalence attendue de 55% a été retenue. Les calculs de la taille d'échantillon ont été effectués au seuil de significativité de 5% et à une puissance de 75%. Une taille minimale de 61 porcs est nécessaire pour mettre en évidence une différence de sensibilité de 40% entre l'écouvillonnage nasal et le sondage trachéo-bronchique et entre l'écouvillonnage nasal et le lavage trachéo-bronchique avec un coefficient de corrélation de 0,3. Un échantillon d'au moins 55 porcs est nécessaire pour détecter une différence de sensibilité de 35% entre le sondage trachéo-bronchique et le lavage trachéo-bronchique pour un coefficient de corrélation de 0,8. Un écart de sensibilité de 35% entre l'écouvillonnage oro-pharyngé et le

lavage trachéo-bronchique et entre l'écouvillonnage oro-pharyngé et le sondage trachéo-bronchique, avec un niveau de corrélation de 0,7 entre les techniques requiert un échantillon minimal de 54 porcs. Pour des considérations pratiques, un échantillon de 60 porcs a été retenu pour l'étude. Il a été constitué par tirage au sort.

## 3. PRÉLÈVEMENTS

Les porcs ont été contenus au moyen d'un lasso et soumis à quatre prélèvements dans l'ordre suivant : écouvillonnage oro-pharyngé, sondage trachéo-bronchique, lavage trachéo-bronchique et écouvillonnage nasal. Pour effectuer les prélèvements oro-pharyngés et trachéo-bronchiques, la cavité buccale du porc a été maintenue ouverte à l'aide d'un pas d'âne. Les échantillons oro-pharyngés ont été obtenus en frottant soigneusement et délicatement la cavité oro-pharyngée avec un écouvillon dont l'extrémité est de type « brosse » muni d'un cathéter de protection (Ori Endometrial Brush™, Orifice Medical AB, Ystad, Sweden). Le sondage trachéo-bronchique a été effectué à l'aide d'un cathéter utilisé pour des intubations trachéales (Euromedis, Neuilly-sous-Clermont, France). La sonde est introduite par voie buccale en suivant la voûte du palais. Elle vient généralement buter sur le cartilage épiglottique qui ferme l'accès à la trachée. A l'inspiration du porc, l'épiglotte dégage l'ouverture de la trachée. La sonde est alors insérée profondément dans la trachée et de légers mouvements de rotation et de « va et vient » sont effectués. Le lavage trachéo-bronchique a été effectué par aspiration trans-trachéale de 10 mL de PBS 0,1 M (pH 7,4), NaCl 0,15 M. Suite à l'introduction du cathéter dans la trachée, selon un mode opératoire identique au sondage, la solution tampon a été injectée et immédiatement aspirée. Pour l'écouvillonnage nasal, les deux cavités nasales ont été prélevées à l'aide d'un écouvillon dont l'extrémité est de type brosse (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). Chaque prélèvement, à l'exception du liquide de lavage trachéo-bronchique, a été placé dans un tube contenant 2 ml d'eau peptonée tamponnée. L'eau peptonée tamponnée permet de conserver les mycoplasmes, bactéries sans paroi, dans un état viable. Les prélèvements ont été identifiés et transportés à une température comprise entre 4 et 10°C jusqu'au laboratoire.

#### 4. ANALYSES DE LABORATOIRE

Tous les prélèvements ont été analysés par PCR nichée à l'Anses-site de Ploufragan. Les ADNs ont été préparés par lyse chimique et thermique [Kellog et Kwok, 1990]. *M. hyopneumoniae* a été détecté par la méthode de PCR-nichée décrite par Calsamiglia *et al.* [1999b]. Les échantillons ont été classés en résultat de PCR-nichée positif ou négatif.

#### 5. ANALYSES STATISTIQUES

##### 5.1. DESCRIPTION DU MODELE

Les résultats obtenus par PCR-nichée ont été analysés par une approche Bayésienne décrite par Berkvens *et al.* [2006] et élaborée pour estimer les caractéristiques de quatre tests conditionnellement dépendants en l'absence de « gold standard ». Cette approche est fondée sur l'idée que le ou les paramètres d'intérêt ne sont pas des constantes mais des variables aléatoires. Les paramètres possèdent donc une distribution de probabilité connue *a priori* en fonction d'informations qui sont disponibles avant la réalisation de l'expérience. Par le théorème de Bayes il est possible d'en déduire une distribution de probabilité *a posteriori* qui tient compte des informations antérieures à l'expérience et des informations apportées par l'expérience. Un modèle fondé sur une distribution multinomiale et incluant toutes les interactions entre les quatre tests nécessite l'estimation de 31 paramètres : la prévalence, la sensibilité et la spécificité du premier test, deux spécificités conditionnelles et deux sensibilités conditionnelles pour le second test, quatre spécificités conditionnelles et quatre sensibilités conditionnelles pour le troisième test et huit spécificités conditionnelles et huit sensibilités conditionnelles pour le quatrième test (tableau 1).

Un tel modèle est inestimable puisque les données (16 classes de résultat) fournissent 15 degrés de liberté. L'incorporation de données externes antérieures à l'étude permet de réduire le nombre de paramètres à estimer et l'étendue des valeurs de certains paramètres [Dunson, 2001]. Pour certains

paramètres, lorsqu'aucune donnée antérieure à l'expérience n'est disponible, leurs *a priori* sont laissés non informatifs [Gelman *et al.*, 2002].

##### 5.2. CONSTRUCTION DU MODELE

Des distributions de type Beta  $Be(a,b)$  ont été utilisées pour les *a priori* des paramètres du modèle [Saporta, 1990 ; Enøe *et al.*, 2000 ; Evans *et al.*, 2000]. Les distributions des paramètres ont été déterminées sur la base de données externes antérieures à l'étude. Les *a priori* sur la proportion de porcs positifs par PCR-nichée ont été établis selon les résultats de la première visite de l'élevage et de travaux indiquant qu'en fin d'engraissement, quelle que soit la méthode de prélèvement, la proportion de porcs positifs par PCR-nichée est élevée [Calsamiglia *et al.*, 1999a ; Verdin *et al.*, 2000]. Calsamiglia *et al.* [1999a] qui ont travaillé dans cinq élevages ont enregistré des proportions de porcs positifs en fin d'engraissement variant de 50 à 100%. Dans l'étude de Verdin *et al.* [2000], 88% des porcs en fin d'engraissement issus de huit élevages étaient positifs par n-PCR. Des échantillons issus de porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) fournissant 100% de résultats négatifs quelle que soit la méthode de prélèvement, une contrainte déterministe a été utilisée comme *a priori* sur la spécificité : elle a été fixée à 1 [Marois *et al.*, 2007a ; Marois *et al.*, 2010]. Les distributions *a priori* des probabilités conditionnelles reposent sur les données d'essais précédents menés sur des porcs expérimentalement et naturellement infectés [Kurth *et al.*, 2002 ; Otagiri *et al.*, 2005 ; Marois *et al.*, 2007a]. La distribution *a priori* de la probabilité conditionnelle  $p_2$  a été définie en prenant en compte les données des trois études, l'écouvillonnage nasal étant réalisé dans toutes les études. L'essai expérimental de Marois *et al.* [2007] était le seul à utiliser l'écouvillonnage nasal, oro-pharyngé et trachéo-bronchique en parallèle, les résultats de ce travail ont servi à établir les distributions *a priori* des probabilités conditionnelles relatives à ces techniques de prélèvement.

**Tableau 1**  
**Probabilités conditionnelles pour un modèle de quatre tests non indépendants**

p1*	$P(D^+)^{**}$	p17	$P(T_4^+   D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^-)$
p2	$P(T_1^+   D^+)$	p18	$P(T_4^+   D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^+)$
p3	$P(T_1^-   D^-)$	p19	$P(T_4^+   D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^-)$
p4	$P(T_2^+   D^+ \cap T_1^+)$	p20	$P(T_4^+   D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+)$
p5	$P(T_2^+   D^+ \cap T_1^-)$	p21	$P(T_4^+   D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+)$
p6	$P(T_2^-   D^- \cap T_1^-)$	p22	$P(T_4^+   D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^-)$
p7	$P(T_2^-   D^- \cap T_1^+)$	p23	$P(T_4^+   D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^-)$
p8	$P(T_3^+   D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+)$	p24	$P(T_4^-   D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^-)$
p9	$P(T_3^+   D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^-)$	p25	$P(T_4^-   D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+)$
p10	$P(T_3^+   D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+)$	p26	$P(T_4^-   D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^-)$
p11	$P(T_3^+   D^+ \cap T_1^- \cap T_2^-)$	p27	$P(T_4^-   D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+)$
p12	$P(T_3^-   D^- \cap T_1^- \cap T_2^-)$	p28	$P(T_4^-   D^- \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^-)$
p13	$P(T_3^-   D^- \cap T_1^- \cap T_2^+)$	p29	$P(T_4^-   D^- \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^+)$
p14	$P(T_3^-   D^- \cap T_1^+ \cap T_2^-)$	p30	$P(T_4^-   D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^-)$
p15	$P(T_3^-   D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+)$	p31	$P(T_4^-   D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+)$
p16	$P(T_4^+   D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+)$		

\* p1 à p31 : probabilités conditionnelles 1 à 31 -

\*\* P()=probabilité d'être (),

D<sup>+</sup>: Porc infecté par *Mycoplasma hyopneumoniae*, D<sup>-</sup>: Porc non infecté par *M. hyopneumoniae*

T<sub>x</sub><sup>+</sup>: Résultat positif par PCR-nichée suite à un prélèvement effectué selon la technique x, T<sub>x</sub><sup>-</sup>:

Résultat négatif par PCR-nichée suite à un prélèvement effectué selon la technique x,

T<sub>1</sub>: Ecouvillonnage nasal, T<sub>2</sub>: écouvillonnage oro-pharyngé, T<sub>3</sub>: lavage trachéo-bronchique, T<sub>4</sub>: sondage trachéo-bronchique

e.g.: P(T<sub>1</sub><sup>+</sup> | D<sup>+</sup>) est la probabilité que le porc soit positif par écouvillonnage nasal sachant que le porc est infecté par *M. hyopneumoniae*

Aucune information relative aux paramètres à estimer pour le sondage trachéo-bronchique n'étant disponible, des *a priori* non informatifs ont été utilisés. L'influence du choix des distributions des *a priori* sur les résultats du modèle a été évaluée en comparant trois modèles élaborés avec différents jeux de distribution d'*a priori*, allant d'un modèle avec des *a priori* peu informatifs (M1) à un modèle comportant des *a priori* plus informatifs (M3) (tableau 2). Les analyses ont été conduites avec le logiciel WinBUGS [Spiegelhalter *et al.*, 1996], sur la base de 25 000 itérations pour l'algorithme de Gibbs avec 5 000 itérations de « chauffe ». Trois chaînes parallèles ont été utilisées avec différentes valeurs de départ

sélectionnées au hasard dans une loi de distribution uniforme (0,1). La convergence des modèles a été évaluée par les tests de Raftery et Lewis et la technique de diagnostic de Gelman-Rubin. Les modèles ont été comparés sur la base du critère d'information sur la déviance (DIC), le nombre de paramètres estimés dans le modèle (pD) et la valeur du p-Bayésien (Bayes-p).

La sensibilité du test de PCR nichée étant inconnue, les sensibilités estimées par cette approche correspondent à la combinaison de la probabilité de la méthode de prélèvement de collecter l'agent infectieux et de la sensibilité du test PCR.

**Tableau 2**  
**Description des *a priori* utilisés dans les trois modèles comparés**

Paramètres*	Modèles									
	M1		M2				M3			
	Paramètres des lois bêta		Caractéristiques des distributions des <i>a priori</i> informatifs		Paramètres des lois bêta		Caractéristiques des distributions des <i>a priori</i> informatifs		Paramètres des lois bêta	
a	b	Limite inférieure à 95%	Mode	a	b	Limite inférieure à 95%	Mode	a	b	
p1	1	1	>0,5	0,7	13,32	6,28	>0,5	0,7	13,32	6,28
p2	1	1			1	1	>0,1	0,25	3,13	7,39
p3	***	***			***	***			***	***
p4	1	1			1	1	>0,4	0,8	4,61	1,90
p5	1	1			1	1	>0,2	0,4	5,03	7,03
p6	***	***			***	***			***	***
p7	-	-			-	-			-	-
p8	1	1			1	1	>0,6	0,8	14,84	4,46
p9	1	1			1	1	>0,1	0,15	14,54	77,72
p10	1	1			1	1	>0,5	0,7	13,32	6,28
p11	1	1			1	1	>0,2	0,4	5,03	7,03
p12	***	***			***	***			***	***
p13 à p15	-	-			-	-			-	-
p16 à p24	1	1			1	1			1	1
p25 à p31	-	-			-	-			-	-

\*p1,...,p31 représentent les probabilités conditionnelles à estimer

\*\*\* : contrainte déterministe paramètre fixé à 1 (spécificité)

- : non estimé, situation improbable avec une spécificité fixée à 1

### III - RÉSULTATS

#### 1. DÉTECTION DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*

*M. hyopneumoniae* est respectivement détecté chez 13,3% (intervalle de confiance à 95% (IC<sub>95%</sub>) : 11,3 ; 15,3), 40% (IC<sub>95%</sub> : 38,0 ; 42,0), 53,3% (IC<sub>95%</sub> : 51,3 ; 55,3) et 60% (IC<sub>95%</sub> : 58,0 ; 62,0) des porcs par écouvillonnage nasal, oro-pharyngé, lavage trachéo-bronchique et sondage trachéo-bronchique. Sur les huit porcs positifs par écouvillonnage nasal, sept étaient détectés positifs par les trois autres techniques de prélèvement. Au total, 70% (IC<sub>95%</sub> : 68,0 ; 72,0) des porcs échantillonnés donnaient une réponse positive pour au moins une technique de prélèvement.

#### 2. ESTIMATION BAYÉSIENNE DES CARACTÉRISTIQUES DES TECHNIQUES DE PRÉLÈVEMENT

Par l'utilisation des informations antérieures sur la spécificité du test (fixée à 1 pour toutes les techniques) le nombre de paramètres à estimer dans le modèle hiérarchique a été réduit à 17. L'incorporation d'informations sur la proportion de porcs à réponse positive vis-à-vis de *M. hyopneumoniae*, supposée être supérieure à 0,5 avec un mode à 0,7 pour 95% de certitude, a permis une très légère amélioration du modèle en comparaison au modèle M1 pour lequel tous les *a priori* étaient non informatifs (tableau 3). La valeur du DIC et le nombre de paramètres à estimer ont

légèrement diminué. L'ajout d'*a priori* plus informatifs sur les autres paramètres du modèle (modèle M3) abaisse légèrement la valeur de DIC par rapport aux modèles M2 et M1. Le p-Bayésien augmente légèrement dans le modèle M3 tout en restant proche de 0,5 ce qui indique que le modèle M3 est correct. Les sensibilités moyennes et leur intervalle de crédibilité à 95% sont donnés au tableau 4.

Quel que soit le modèle, l'écouvillonnage nasal présente la plus faible sensibilité et le sondage trachéo-bronchique la plus élevée. L'incorporation d'informations sur les paramètres à estimer permet d'augmenter la précision des estimations, les intervalles de crédibilité étant plus restreints entre les modèles M1 et M2 et M3.

Tableau 3

Comparaison des modèles selon le critère d'information sur la déviance (DIC), le nombre de paramètres à estimer ( $p_D$ ) et le p-Bayésien (Bayes-p)

Modèle	DIC	Bayes-p	$p_D$
M1 ( <i>a priori</i> vague sur Se, Sp des 4 tests=1)	47,6	0,51	7,9
M2 ( <i>a priori</i> légèrement informatif sur la prévalence, Sp des 4 tests=1)	47,4	0,51	7,7
M3 ( <i>a priori</i> légèrement informatif sur la prévalence et les paramètres à estimer, Sp des 4 tests=1)	47,2	0,54	6,1

Tableau 4

Sensibilité moyenne et intervalle de crédibilité à 95% des distributions *a posteriori* des quatre techniques de prélèvement couplées à un test de PCR-nichée pour la détection de *M. hyopneumoniae* pour les trois modèles utilisant différents *a priori* (60 porcs, Sp=1 pour tous les modèles et les techniques)

Modèle*	Écouvillonnage nasal	Écouvillonnage oro-pharyngé	Lavage trachéo-bronchique	Sondage trachéo-bronchique
M1	0,19 (0,09-0,31)	0,51 (0,35-0,67)	0,66 (0,49-0,81)	0,72 (0,55-0,86)
M2	0,19 (0,09-0,32)	0,53 (0,38-0,68)	0,68 (0,53-0,82)	0,74 (0,59-0,86)
M3	0,25 (0,14-0,37)	0,53 (0,39-0,65)	0,62 (0,51-0,73)	0,73 (0,59-0,84)

\*: M1 : *a priori* vague sur Se, Sp des 4 tests=1, M2 : *a priori* légèrement informatif sur la prévalence, Sp des 4 tests=1, M3 : *a priori* légèrement informatif sur la prévalence et les paramètres à estimer, Sp des 4 tests=1

## IV - DISCUSSION

*M. hyopneumoniae* étant l'agent central du complexe respiratoire porcin, la détection de ce micro-organisme constitue un point crucial pour la compréhension des phénomènes influençant le développement des maladies respiratoires enzootiques chez le porc. Des méthodes rapides, faciles à mettre en œuvre en élevage et fiables sont donc indispensables pour les chercheurs et les vétérinaires praticiens en vue de lutter et de prévenir ces maladies. En élevage, la contamination des porcs vivants est généralement évaluée au

travers de tests PCR à partir d'écouvillonnage nasal. Toutefois, des travaux expérimentaux indiquent que les sites de prélèvements optimaux pour détecter *M. hyopneumoniae* sont situés dans les parties profondes des voies respiratoires, *i.e.* la trachée et les bronches [Kurth *et al.*, 2002 ; Marois *et al.*, 2007a]. L'objectif de cette étude était d'évaluer les capacités de quatre techniques de prélèvement pour détecter, par PCR-nichée, *M. hyopneumoniae* chez des porcs en élevage.

Le statut infectieux des animaux étant inconnu et aucun test parfait (« gold standard ») n'étant disponible, la sensibilité des techniques de prélèvement alliées à un test de PCR-nichée a été évaluée en utilisant une approche Bayésienne. A notre connaissance, ces travaux sont les premiers à évaluer, par une analyse Bayésienne, les sensibilités de quatre techniques de prélèvement couplées à un test de PCR-nichée pour détecter *M. hyopneumoniae* chez le porc vivant et en élevage. Ce type d'analyse permet d'évaluer les caractéristiques de tests de diagnostic en fonction des résultats de l'étude et des données antérieures à l'expérience sans avoir recours à un test de référence ou gold standard. En effet, par rapport à l'approche fréquentiste, dans l'analyse Bayésienne, les paramètres d'intérêt sont des variables aléatoires et non des constantes. Les paramètres à estimer possèdent donc une distribution de probabilité connue *a priori* en fonction d'informations qui sont disponibles avant la réalisation de l'expérience. Le choix des *a priori* constitue donc un point clé. Les *a priori* doivent être établis indépendamment des données de l'étude. Afin de limiter l'introduction de biais, il est proposé de privilégier des *a priori* définis sur la base d'études comparables lorsque ces données sont disponibles [Praud *et al.*, 2010]. Ainsi, dans notre étude, les données de différents travaux précédemment publiés ont été utilisées pour établir les *a priori* nécessaires à l'élaboration des modèles [Calsamiglia *et al.*, 1999a ; Verdin *et al.*, 2000 ; Kurth *et al.*, 2002 ; Otagiri *et al.*, 2005 ; Marois *et al.*, 2007a ; Marois *et al.*, 2010]. L'utilisation d'un test de PCR nichée et d'au moins une des techniques de prélèvement évaluée dans notre étude a conditionné le choix de ces travaux. Les informations utilisées pour établir les *a priori* sur la prévalence de l'infection par *M. hyopneumoniae* étaient issues de travaux en élevage et concernaient des porcs en fin d'engraissement, situation comparable à celle de notre étude. Les *a priori* des probabilités conditionnelles permettant d'estimer les sensibilités des techniques de prélèvement ont essentiellement été définis à partir de résultats obtenus sur des porcs expérimentalement infectés. Dans aucune étude disponible visant à comparer les performances des sites de prélèvement, les données n'ont été collectées en élevage sur des porcs vivants [Kurth *et al.*, 2002 ; Otagiri *et al.*, 2005 ; Marois *et al.*, 2007]. L'ajout d'informations disponibles sous forme d'*a priori* plus informatifs dans les modèles n'améliorait pas fortement l'ajustement du

modèle aux données et ne modifiait pas les conclusions au regard des niveaux de sensibilité estimés pour les différentes techniques de prélèvement. Toutefois, l'introduction d'*a priori* informatifs a permis d'augmenter la précision des résultats.

Dans notre étude, la spécificité des quatre techniques a été fixée à 100%. En effet, la méthode de PCR nichée est rapportée être très spécifique puisque, d'une part, aucune amplification d'ADN d'autres mycoplasme ou bactérie spécifiques du porc n'a été notée [Calsamiglia *et al.*, 1999b], d'autre part, des échantillons issus de porcs témoins naïfs fournissent 100% de résultats négatifs quelle que soit la méthode de prélèvement [Marois *et al.*, 2007a ; Marois *et al.*, 2010].

L'étude a été réalisée sur un échantillon de 60 porcs dans un élevage naisseur-engraisseur. L'échantillon d'étude a été constitué par tirage au sort aléatoire simple afin de s'assurer de la représentativité de l'échantillon [Toma *et al.*, 1996]. Les prélèvements ont été réalisés par deux enquêteurs, préalablement formés aux techniques, et les analyses de laboratoire ont été réalisées au sein d'un laboratoire par une seule personne. Ceci devait permettre de limiter les biais de mesure dus aux enquêteurs et aux analyses de laboratoire.

Bien que l'élevage ait été sélectionné sur la base du volontariat, les conditions d'élevage correspondaient à celles de la majorité des élevages de porcs travaillant en système confiné-intensif du Grand Ouest de la France (*i.e.* bâtiment fermé avec un contrôle de la ventilation et un sol de type caillebotis intégral). L'élevage a été sélectionné pour son niveau d'atteinte à l'égard des troubles respiratoires et est caractérisé par une proportion élevée de porcs infectés par *M. hyopneumoniae* en fin d'engraissement. Plusieurs études montrent que les maladies respiratoires sont fréquentes en élevage de porcs utilisant un système confiné intensif et que la prévalence de l'infection à *M. hyopneumoniae* est élevée en fin d'engraissement [Grest *et al.*, 1997 ; Leneveu *et al.*, 2005 ; Marois *et al.*, 2007b ; Meyns *et al.*, 2011]. Il peut donc être supposé que les résultats d'estimation de la sensibilité des techniques de prélèvement couplées la PCR nichée sont extrapolables à la population de porcs en fin d'engraissement.

Les sensibilités et spécificités de tests de diagnostic sont considérées comme des valeurs « intrinsèques » et ne varient pas en fonction de la fréquence de la maladie [Toma

*et al.*, 1996]. Toutefois, ces valeurs peuvent varier selon les caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée, par exemple en fonction du moment d'infection. Le délai entre l'exposition à l'agent, l'infection et la réalisation du prélèvement est inconnu dans notre étude. L'influence du stade de l'infection sur la sensibilité des techniques de prélèvement n'a donc pas pu être prise en compte dans notre étude.

Au regard des résultats obtenus, le plus faible niveau de sensibilité pour détecter *M. hyopneumoniae* chez des porcs en élevage est enregistré pour l'écouvillonnage nasal. En effet, dans les trois modèles, tant les estimations moyennes que les intervalles de crédibilité sont inférieurs à ceux obtenus pour les trois autres techniques de prélèvement. Les deux techniques de prélèvement du site trachéo-bronchique présentent les sensibilités moyennes les plus élevées dans tous les modèles, la technique de sondage étant légèrement plus performante que celle du lavage. L'écouvillonnage oro-pharyngé offre une sensibilité moyenne intermédiaire : elle est supérieure à celle de l'écouvillonnage nasal et inférieure à celle des prélèvements au niveau du site trachéo-bronchique. Ces données suggèrent une augmentation graduelle de la capacité à identifier *M. hyopneumoniae* le long des voies respiratoires, la probabilité de détecter le micro-organisme chez des porcs infectés augmenterait avec la profondeur de prélèvement. Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans le cadre d'infections expérimentales visant à comparer plusieurs sites de prélèvement pour détecter *M. hyopneumoniae* chez le porc vivant [Kurth *et al.*, 2002 ; Marois *et al.*, 2007a ; Marois *et al.*, 2010]. Lors d'une étude en élevage, sur 10 porcs positifs par PCR-nichée à partir de lavage trachéo-bronchique, un seul porc a été détecté positif par écouvillonnage des cavités nasales [Verdin *et al.*, 2000]. La meilleure capacité à identifier *M. hyopneumoniae* à partir du site trachéo-bronchique peut s'expliquer par les sites d'adhésion et de multiplication du micro-organisme. En effet, lors du processus infectieux, *M. hyopneumoniae* adhère aux cellules épithéliales de l'appareil respiratoire et se multiplie dans la trachée et les bronches [Blanchard *et al.*, 1992 ; Kurth *et al.*, 2002 ; Marois *et al.*, 2007a]. Bien que généralement *M. hyopneumoniae* ne colonise pas les cavités nasales, le micro-organisme peut y être détecté [Goodwin, 1972].

Compte tenu de sa praticité, l'écouvillonnage nasal est fréquemment utilisé pour apprécier le

statut de contamination des porcs en conditions expérimentales et en élevage. Toutefois, ce type de prélèvement présente le plus faible niveau de sensibilité par rapport aux techniques ciblant les voies respiratoires plus profondes. Cette moindre sensibilité peut s'expliquer par l'intermittence d'excrétion de *M. hyopneumoniae* à partir des cavités nasales et par la quantité de micro-organismes présents dans ce site. En effet, plusieurs études indiquent que *M. hyopneumoniae* peut être détecté dans les cavités nasales pendant une période de temps limitée [Mattsson *et al.*, 1995 ; Calsamiglia *et al.*, 1999b]. Par ailleurs, Otagiri *et al.* [2005] ont montré chez des porcs expérimentalement infectés, que les quantités de *M. hyopneumoniae* évaluées à partir de prélèvements nasaux sont généralement 100 fois inférieures à celles estimées à partir d'échantillons pulmonaires. Marois *et al.* [2010], en utilisant une technique PCR temps-réel quantitative, indiquent que le nombre de cellules de *M. hyopneumoniae* dans la trachée de porcs expérimentalement infectés est supérieur à celui obtenu à partir des cavités nasales et des amygdales. En moyenne, selon la dose infectante et la voie d'inoculation, la quantité de *M. hyopneumoniae* était 10 à 100 fois plus élevée dans la trachée que dans les cavités nasales. De plus, aucune différence en termes de quantité de micro-organisme n'a été mise en évidence entre les prélèvements trachéaux et pulmonaires.

Pour les techniques de prélèvement trachéo-bronchique, Marois *et al.* [2007a] ont indiqué que la réalisation de lavages trachéo-bronchiques successifs sur le même porc pouvait avoir des conséquences sur la sévérité des lésions pulmonaires. Ainsi, afin de limiter les effets de la technique de prélèvement sur l'appréciation des lésions pulmonaires à l'abattoir, le prélèvement par sondage au moyen d'un cathéter stérile doit être privilégié. Toutefois, aucun test n'étant parfait, il est recommandé de prélever plusieurs sites en vue d'augmenter la sensibilité.

Bien que les porcs utilisés dans notre étude aient été vaccinés à quatre et sept semaines d'âge, *M. hyopneumoniae* a été détecté dans les voies respiratoires supérieures chez 70% des porcs. Plusieurs travaux indiquent que la vaccination ne prévient pas la colonisation des voies respiratoires des porcs par *M. hyopneumoniae* et la transmission de *M. hyopneumoniae* [Thacker *et al.*, 1998 ; Meyns *et al.*, 2006 ; Sibila *et al.*, 2007 ; Villarreal *et al.*, 2011]. La vaccination vis-à-vis de *M. hyopneumoniae* permet de réduire l'incidence

des signes cliniques et la sévérité des lésions de pneumonie [Maes *et al.*, 1999b ; Maes *et al.*, 2003].

En conclusion, les résultats de ce travail indiquent que le sondage trachéo-bronchique allié à un test de PCR-nichée, constitue la technique la plus sensible pour détecter *M. hyopneumoniae* chez des porcs en élevage. Au regard des considérations pratiques, le

sondage avec un cathéter stérile se révèle être aussi facile à mettre en œuvre que l'écouvillonnage nasal et nécessite seulement l'utilisation d'un pas d'âne comme équipement supplémentaire. En étant en moyenne 3,5 fois plus sensible que l'écouvillonnage nasal fréquemment utilisé en élevage, le sondage trachéo-bronchique permet d'améliorer la précision du diagnostic.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Andreasen M., Mousing J., Krogsgaard Thomsen L. - No simple association between time elapsed from seroconversion until slaughter and the extent of lung lesions in Danish swine. *Prev. Vet. Med.*, 2001a, **52**, 147-161.
- Andreasen M., Mousing J., Thomsen L.K. - No overall relationship between average daily weight gain and the serological response to *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in eight chronically infected Danish swine herds. *Prev. Vet. Med.*, 2001b, **49**, 19-28.
- Andreasen M., Nielsen J.P., Bækbo P., Willeberg P., Bøtner A. - A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. *Prev. Vet. Med.*, 2000, **45**, 221-235.
- Aubry A., Fablet C., Corrége I., Madec F. - Incidence technico-économique des maladies pulmonaires. In: *Journées de la Recherche Porcine*, Paris, 2010, 53-58.
- Baumeister A.K., Runge M., Ganter M., Feenstra A.A., Delbeck F., Kirchhoff H. - Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 1984-1988.
- Berkvens D., Speybroeck N., Praet N., Adel A., Lesaffre E. - Estimating disease prevalence in a Bayesian framework using probabilistic constraints. *Epidemiology*, 2006, **17**, 145-153.
- Blanchard B., Vena M.M., Cavalier A., Le Lannic J., Gouranton J., Kobisch M. - Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 1992, **30**, 329-341.
- Calsamiglia M., Pijoan C., Bosch G.J. - Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. *J. Swine Health Prod.*, 1999a, **7**, 263-268.
- Calsamiglia M., Pijoan C., Trigo A. - Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1999b, **11**, 246-251.
- Dunson D.B. - Commentary: Practical Advantages of Bayesian Analysis of Epidemiologic Data. *Am. J. Epidemiol.*, 2001, **153**, 1222-1226.
- Enøe C., Georgiadis M.P., Johnson W.O. - Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Prev. Vet. Med.*, 2000, **45**, 61-81.
- Evans M., Hastings N., Peacock B. - Beta Distribution, In: *Statistical Distributions*, 3rd ed. Evans, M., Hastings, N., Peacock, B. (Ed.), Wiley, New York, 2000, 34-42.
- Fano E., Pijoan C., Dee S. - Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Can. J. Vet. Res.*, 2005, **69**, 223-228.
- Fano E., Pijoan C., Dee S., Deen J. - Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. *Can. J. Vet. Res.*, 2007, **71**, 195-200.
- Gelman A., Carlin J., Stern H., Rubin D.B. - Model checking and improvement, In: *Bayesian data analysis*. Gelman, A.E., Carlin, J., Stern, H., Rubin, D.B. (Ed.), Chapman and Hall/CRC, London, UK, 2002, 161-189.
- Goodwin R.F.W. - Isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* from the nasal cavities and

- lungs of pigs affected with enzootic pneumonia or exposed to this infection. *Res. Vet. Sci.*, 1972, **13**, 262-267.
- Grest P., Keller H., Sydler T., Popischil A. - The prevalence of lung lesions in pigs at slaughter in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 1997, **139**, 500-506.
- Kellog D.E., Kwok S. - Detection of human immunodeficiency virus, *In: PCR protocols: A guide to methods and applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (Ed.), Academic Press, San Diego, 1990, 339-343.
- Kurth K., Hsu T., Snook E., Thacker E., Thacker B., Minion F. - Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2002, **14**, 463-469.
- Leneuve P., Robert N., Keita A., Pagot E., Pommier P., Teissier P. - Lung lesions in pigs at slaughter: A 2-year epidemiological study in France. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 2005, **3**, 259-265.
- Leon E., Madec F., Taylor N.M., Kobisch M. - Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. *Vet. Microbiol.*, 2001, **78**, 331-341.
- Maes D., Deluyker H., Verdonck M., Castryck F., Miry C., Vrijens B., De Kruif A. - Risk indicators for the seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae*, porcine influenza viruses and Aujeszky's disease virus in slaughter pigs from fattening pig herds. *J. Vet. Med. B*, 1999a, **46**, 341-352.
- Maes D., Deluyker H., Verdonck M., Castryck F., Miry C., Vrijens B., Verbeke W., Viaene J., de Kruif A. - Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine*, 1999b, **17**, 1024-1034.
- Maes D., Verbeke W., Vicca J., Verdonck M., de Kruif A. - Benefit to cost of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds under Belgian market conditions from 1996 to 2000. *Livest. Prod. Sci.*, 2003, **83**, 85-93.
- Marois C., Dory D., Fablet C., Madec F., Kobisch M. - Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *J. Appl. Microbiol.*, 2010, **108**, 1523-1533.
- Marois C., Le Carrou J., Kobisch M., Gautier-Bouchardon A.V. - Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet. Microbiol.*, 2007a, **120**, 96-104.
- Marois C., Le Devendec L., Fablet C., Dorenlor V., Eono F., Eveno E., Jolly J.P., Madec F., Kobisch M. - Comparaison de la PCR simple et de la PCR nichée pour détecter *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant. *In: Journées de la Recherche Porcine*, Paris, France, 2007b, 435-436.
- Mattsson J., Bergstrom K., Wallgren P., Johansson K. - Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 893-897.
- Meyns T., Dewulf J., de Kruif A., Calus D., Haesebrouck F., Maes D. - Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine*, 2006, **24**, 7081-7086.
- Meyns T., Van Steelant J., Rolly E., Dewulf J., Haesebrouck F., Maes D. - A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *Vet. J.*, 2011, **187**, 388-392.
- Moorkamp L., Hewicker-Trautwein M., Grosse Beilage E. - Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in coughing piglets (3-6 weeks of age) from 50 herds with a history of endemic respiratory disease. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2009, **56**, 54-56.
- Moorkamp L., Nathues H., Spergser J., Tegeler R., Beilage E.g. - Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *Vet. J.*, 2008, **175**, 273-275.
- Otagiri Y., Asai T., Okada M., Uto T., Yazawa S., Hirai H., Shibata I., Sato S. - Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods. *J. Vet. Med. Sci.*, 2005, **67**, 801-805.
- Praud A., Gimenez O., Zanella G., Dufour B., Pozzi N., Antras V., Meyer L., Garin-Bastuji B. - Comparaison de deux méthodes d'évaluation des caractéristiques de cinq tests sérologiques de dépistage de la brucellose porcine. *Epidémiol. et santé anim.*, 2010, **57**, 105-118.

- Rautiainen E., Virtala A.-M., Wallgren P., Saloniemi H. - Varying Effects of Infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* on the Weight Gain Recorded in Three Different Multisource Fattening Pig Herds. *J. Vet. Med. B*, 2000, **47**, 461-469.
- Saporta G. - Variables aléatoires, *In*: Probabilités analyse de données et statistiques. Technip, E. (Ed.), Paris, 1990, 19-63.
- Sibila M., Calsamiglia M., Vidal D., Badiella L., Aldaz A., Jensen J.C. - Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Can. J. Vet. Res.*, 2004, **68**, 12-18.
- Sibila M., Nofrarias M., Lopez-Soria S., Segales J., Valero O., Espinal A., Calsamiglia M. - Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Vet. Microbiol.*, 2007, **122**, 97-107.
- Spiegelhalter D., Thomas A.T., Best N., Gilks W. - BUGS: Bayesian Inference Using Gibbs Sampling Version 0.50, Cambridge, UK, 1996.
- Thacker E. - Mycoplasmal Disease, *In*: Diseases of Swine. Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Ed.), Iowa State University Press, Ames, 2006, 701-717.
- Thacker E., Thacker B., Boettcher T., Jayappa H. - Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *J. Swine Health Prod.*, 1998, **6**, 107-112.
- Toma B., Dufour B., Sanaa M., Bénét J.J., Ellis P., Moutou F., Louza A. - Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures, 696 pages, Ed. AEEMA, Maisons-Alfort, 1996.
- Verdin E., Saillard C., Labbé A., Bové J.M., Kobisch M. - A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Vet. Microbiol.*, 2000, **76**, 31-40.
- Vigre H., Dohoo I.R., Stryhn H., Busch M.E. - Intra-unit correlations in seroconversion to *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Mycoplasma hyopneumoniae* at different levels in Danish multi-site pig production facilities. *Prev. Vet. Med.*, 2004, **63**, 9-28.
- Villarreal I., Meyns T., Dewulf J., Vranckx K., Calus D., Pasmans F., Haesebrouck F., Maes D. - The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. *Vet. J.*, 2011, **188**, 48-52.
- Zhou X.H., Obuchowski N.A., Mc Clish D.K. - Sample Size calculation, *In*: Statistical methods in diagnostic medicine. Balding, D.J., Bloomfield, P., Cressie, N.A.C., Fisher, N.I., Johnstone, I.M., Kadane, J.B., Ryan, L.M., Scott, D.W., Smith, A.F.M., Teugels, J.L. (Ed.), Wiley and Sons, Inc., New York, 2002, 195-221.