

Evaluering for sygdomsfrihed

Fagdyrlægeogave Kjetil Johansen
FD-2006

Formål med opgaven: At forstå nogle af de epidemiologiske begreber og værktøjer der bruges til at evaluere diagnostiske tests. At evaluere de årlige statusprøver i blå SPF-besætninger for *Mycoplasma hyopneumoniae* og PRRS. At evaluere det kontrolprogram SPF opstiller for status efter medicinsk sanering for myc. og PRRS. At designe et kontrolprogram efter endt sanering for *Lawsonia*.

Baggrund: SPF stiller krav om årlige statusprøver for at dokumentere frihed for en række SPF-sygdomme. For *Mycoplasma hyopneumoniae* og PRRS drejer det sig om 20 negative blodprøver. Efter endt medicinsk sanering for Myc og PRRS opstiller SPF et kontrolprogram:

Myc: 20 negative blodprøver udtaget 6 gange med 1 måneds interval. Første sæt fra dyr over 4 mdr. født efter endt sanering. Omprøve af reagenter og omkringstående dyr (20 prøver) tidligst 14 dage efter. Tolkning af omprøve: Negativ: ingen reagenter eller ingen stigning på fundne reagenter og ikke flere reagenter ved omprøvningen. Evt. obduktion af dyr over 5 uger eller USK.

PRRS: 30 negative blodprøver udtaget 2 gange med 6 måneders interval. Første sæt fra dyr over 4 mdr. født efter sanering. En positiv reagent (Elisa) godkendes ved negativ IPT. Ved 2 positive Elisa foretages omprøve af reagenter samt omkringstående dyr (20 prøver) tidligst 14 dage efter. Tolkning af omprøve: Negativ: ingen reagenter (Elisa) eller 1 reagent (Elisa) ved negativ IPT.

Lawsonia: Regional ileitis er ikke en SPF-sygdom, og der er derfor ingen krav om statusprøver. Medicinsk sanering for *Lawsonia* er gennemført flere gange ved opstart af nye besætninger. Det kunne derfor være relevant at vide, om de diagnostiske tests der findes til at screene for *Lawsonia* kan dokumentere sygdom eller sygdomsfrihed med en rimelig sikkerhed.

Før jeg evaluerer testprogrammerne vil jeg gennemgå nogle epidemiologiske grundbegreber vedrørende diagnostik og diagnostiske tests.

Den diagnostiske proces:

- Forståelse af sygdommen og dens dynamik
- Klinisk vurdering
- Diagnostisk test
- Vurdering/ tolkning af testresultat
- Konklusion/ diagnose; ofte sandsynligheder frem for enten/ eller.

For at kunne evaluere et overvågningsprogram må man have kendskab til infektionsdynamik på enkeltdyrniveau og på besætningsniveau. Når en del af overvågningen foregår i besætningerne,

skal vi have vores kliniske viden med, og medinddrage vores kliniske observationer i den diagnostiske proces. Dernæst skal laboratorietestene gerne være så gode, at sikkerheden for sygdom eller sygdomsfrihed vitterlig er høj. Tolkning af testresultaterne beror på vores viden om diagnostiske tests, og vores konklusion/ diagnose beror på en samlet helhedsvurdering af de trin der indgår i den diagnostiske proces.

Den diagnostiske test:

Tests kan bruges og vurderes på enkeltdyrsniveau eller gruppeniveau (besætningsniveau). På besætningsniveau bruges ofte stikprøveundersøgelser.

En tests respons kan være dichotomt (enten/eller) eller kontinuert. I sidstnævnte tilfælde defineres et cut-off, der angiver grænsen mellem et positivt og negativt testresultat.

- Ingen test er perfekt
- Diagnostiske tests kan bl.a. beskrives med sensitivitet, specificitet samt positive og negative prædiktive værdier (Se, Sp, PPV, NPV).

Det kan anskueliggøres i 2x2-tabeller.

		Tilstand		
		syg	rask	
Test	pos	a	b	a+b
	neg	c	d	c+d
		a+c	b+d	N

Se = $a/a+c$	Sand prævalens = $a+c/N$	Tilsyneladende prævalens = $a+b/N$
Sp = $d/b+d$	PPV = $a/a+b$	NPV = $d/c+d$

Fig 1 Testresultater opsat i 2x2 tabel. Definitioner af Se, Sp, PPV, NPV (Helle Stege, 2006)

Sensitiviteten defineres som sandsynligheden for test-positiv givet sandt syg.

Specificiteten defineres som sandsynligheden for test-negativ givet sandt rask.

Positiv prædiktiv værdi defineres som sandsynligheden for sandt syg givet test-positiv.

Negativ prædiktiv værdi defineres som sandsynligheden for sandt rask givet test-negativ.

Fastlæggelse af en tests sensitivitet og specificitet kræver at man kender eller antager noget om den sande prævalens af sygdommen i den population man bruger ("Gold- standard"). Der findes også metoder til at bestemme Se og Sp uden kendskab til sand prævalens (Enoe et al. 2001, Enoe, Georgiadis & Johnson 2000)

De prædiktive værdier viser testens evne til korrekt at udpege syge hhv. raske, når man tester ukendte individer eller besætninger der indgår i en population af individer eller besætninger med kendt prævalens.

Individniveau/ individtesten:

Se og Sp regnes typisk for konstante på individniveau. Forhold som smittetryk, antistofhenfald, maternelle antistoffer og krydsreaktioner kan dog påvirke Se og Sp på individniveau. Ved at ændre på Cut-off værdien kan man ændre testens Se og Sp. Ved at udføre multiple tests, enten parallelt eller i serie, ændres Se og Sp også.

PPV og NPV er variable på individniveau. Værdierne er en funktion af prævalensen af sygdommen i den population individet befinder sig i (TP) samt af Se og Sp:

$$PPV = \frac{a}{a+b} = \frac{TP \times Se}{TP \times Se + (1-TP) \times Sp}$$

$$NPV = \frac{d}{c+d} = \frac{(1-TP) \times Sp}{TP \times (1-Se) + (1-TP) \times Sp}$$

Fig 2 PPV samt NPV som funktion af TP, Se og Sp (Helle Stege, 2006)

Dette kan udtrykkes grafisk:

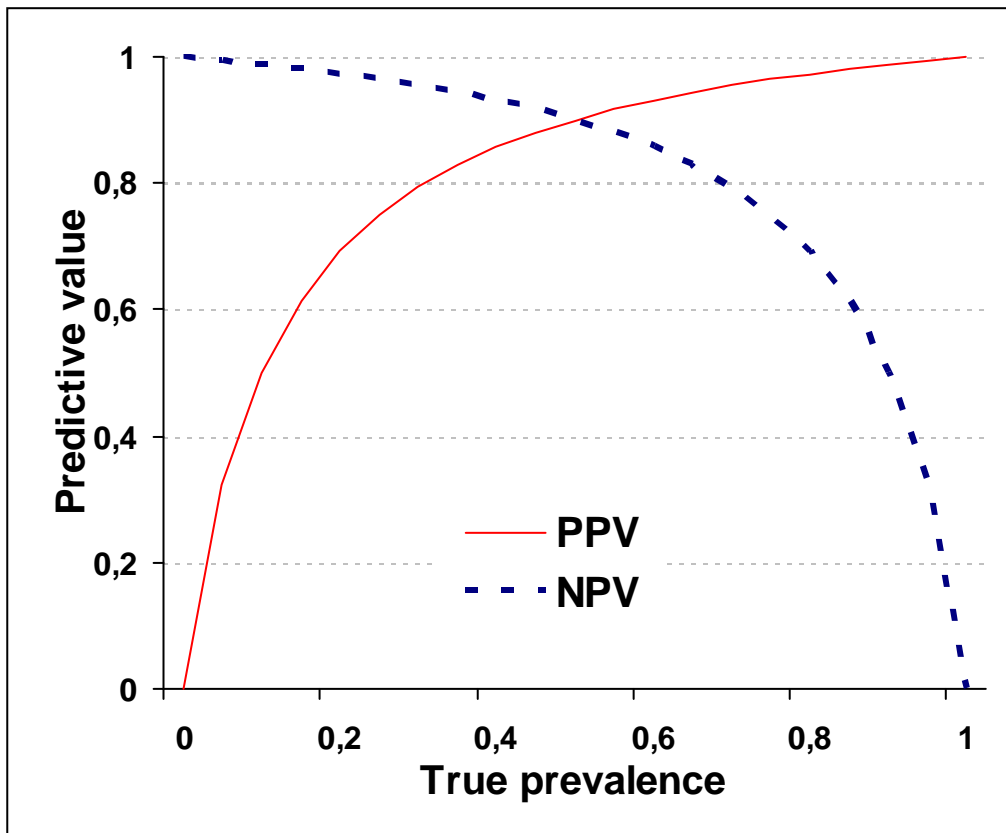


Fig 3 Grafisk fremstilling af fig 2 (Helle Stege, 2006)

Som det fremgår, vil PPV typisk være lav ved lave sygdomsprævalenser, medens den er høj ved høje sygdomsprævalenser. Det modsatte gør sig gældende for NPV.

Besætningsniveau/ besætningstesten:

Her er Se og Sp variable. Besætningstesten performer forskelligt fra besætning til besætning afhængigt af en række variable i besætningen og i testdesign.

Se og Sp på besætningsniveau afhænger af :

- Se og Sp på individniveau
- Besætningsstørrelse
- Indenfor-besætningsprævalens
- Stikprøvestørrelse
- Cut-point

Cut-point defineres som det antal positive reagerer der mindst skal være til stede i stikprøven for at testen betegnes som positiv. Der findes software (Herdacc) der kan beregne Se og Sp på besætningsniveau.

Prædiktive værdier på besætningsniveau: På besætningsniveau er de prædiktive værdier afhængige af alle de variable der bestemmer Se og Sp på besætningsniveau samt prævalensen af positive besætninger blandt de besætninger man udfører sin test i (HTP).

$$HPV+ = \frac{HSe \times HTP}{HSe \times HTP + (1 - HTP) \times (1 - HSp)}$$

$$HPV- = \frac{(1 - HTP) \times HSp}{(1 - HTP) \times HSp + HTP \times (1 - HSe)}$$

Fig 4 Prædiktive værdier på besætningsniveau (Christensen, Gardner 2000)

Det kunne være interessant at beregne hvor god en besætningstest er til korrekt at udpege en ukendt besætning som smittet eller ej. Des mere detaljeret viden man har om de besætninger der danner grundlag for besætningstesten, des mere sikkert kan man beregne testens prædiktive værdier. Vidste man eksempelvis hvor mange SPF-besætninger der var på 3000 individer og hvor mange af disse der var positive for Mycoplasma hyopneumoniae kunne man ret sikkert beregne prædiktive værdier for en given besætningstest i denne besætningskategori. Under praktiske forhold er regnestykket vanskeligt, da to besætninger ikke er ens og Se og Sp dermed varierer fra besætning til besætning. Hvis man kender prævalensen af smittede besætninger blandt de besætninger man udfører sin test i, og man definerer en "gennemsnitsbesætning" i besætningsgrundlaget, kan man dog danne sig et billede af besætningstestens prædiktive værdier.

I tilfældet hvor en besætning overvåges efter endt medicinsk sanering udføres den samme besætningstest x antal gange over tid. Besætningen skal så at sige vise, at den er fri for sygdom x antal gange. Et sådant set-up vil øge sensitiviteten i forhold til blot en enkelt besætningstest (på bekostning af specificiteten) og dermed øge den negative prædiktive værdi. Ved omprøvning af en besætning efter et positivt resultat af besætningstesten vil man øge specificiteten og dermed den positive prædiktive værdi og på denne måde med større sikkerhed erklære besætningen for smittet.

En besætningstests prædiktive værdier er altså en måde at evaluere en test på. En anden måde er at vurdere confidensen for sygdomsfrihed ved en given stikprøveundersøgelse.

Stikprøver:

Når man udfører en besætningstest er den ofte baseret på stikprøveundersøgelser. Man vil typisk gerne vide, hvor stor en stikprøve der skal tages og hvor mange reagenter der må være for at man med en given sandsynlighed kan betegne besætningen som smittet eller ej. Der findes software til disse beregninger (FreeCalc). Programmet tager i sine beregninger hensyn til testens Se og Sp på individniveau. Programmet kan også evaluere en stikprøvebaseret besætningstests værdi ved forskellige indenfor-besætningsprævalenser.

Materiale og metoder:

For de sygdomme jeg har beskæftiget mig med (Mycoplasma, PRRS og Lawsonia) har jeg søgt oplysninger om relevante diagnostiske tests.

De værdier for Se og Sp jeg anvender i mine beregninger er oplyst fra DVI (personlige meddelelser) eller søgt fundet i litteraturen (Feld et al. 1992, Sørensen et al. 1997, Sørensen et al. 1998, Sørensen et al. 1993).

Jeg har i beregningerne brugt følgende værdier på individniveau:

Mycoplasma hyopneumoniae: Elisa-test: Se=99, Sp=97 (Brugerhåndbog DVI 2008)

PRRS: Elisatest: Se=94, Sp=99

Lawsonia: Elisatest: Se= 70, Sp=90 (mundtlig meddelelse, Gregers Jungersen, DVI)

PCR: Se=97, Sp=100 (meddelelse Tim Jensen, DVI)

I beregninger af prædiktive værdier for besætningstest har jeg anvendt prævalenser for de forskellige relevante sygdomme som jeg har fået oplyst fra SPF/SUS (meddelelse Bjørn Lorentzen) om SPF-systemets besætninger. I SPF-systemet er der ca. 3500 besætninger (2008). 64,1% af dem er positive for mycoplasma hyopneumoniae. 31,5% af dem er positive for PRRS-DK. Når jeg forsøger at beregne prædiktive værdier for en besætningstest for Lawsonia, antager jeg, at 95% af alle SPF-besætninger er positive.

For at vurdere confidens for sygdomsfrihed ved en given stikprøveundersøgelse har jeg brugt programmet FreeCalc. Eksempelvis har jeg for Mycoplasma hyopneumonias vedkommende taget udgangspunkt i 20 prøver med 0 reagenter (årlige statusprøver). Confidensen er beregnet ved forskellige forventede minimum-indenfor-besætningsprævalenser.

Resultaterne er indsat i et Excel regneark og visualiseret i dette programs kurve/diagramfunktion.

I beregningerne af prædiktive værdier for besætningstest har jeg brugt programmet Herdacc til at beregne Se og Sp på besætningsniveau. Disse værdier har jeg brugt til at beregne prædiktive værdier i programmet WinEpiscope under tests, advanced. Dette program er også brugt til beregning af prædiktive værdier ved multiple tests (efter medicinsk sanering og ved omprøver). Igen er resultaterne indsat i Excel og visualiseret i dette program.

Resultater:**Stikprøver:**

Beregningerne tager udgangspunkt i en besætning på 4000 grise, som jeg anser som en "gennemsnits SPF-besætning". Confidensberegningerne er ikke særligt afhængige af besætningsstørrelsen. Laver man tilsvarende beregninger for en besætningsstørrelse på 8000 individer, er kurverne stort set identiske.

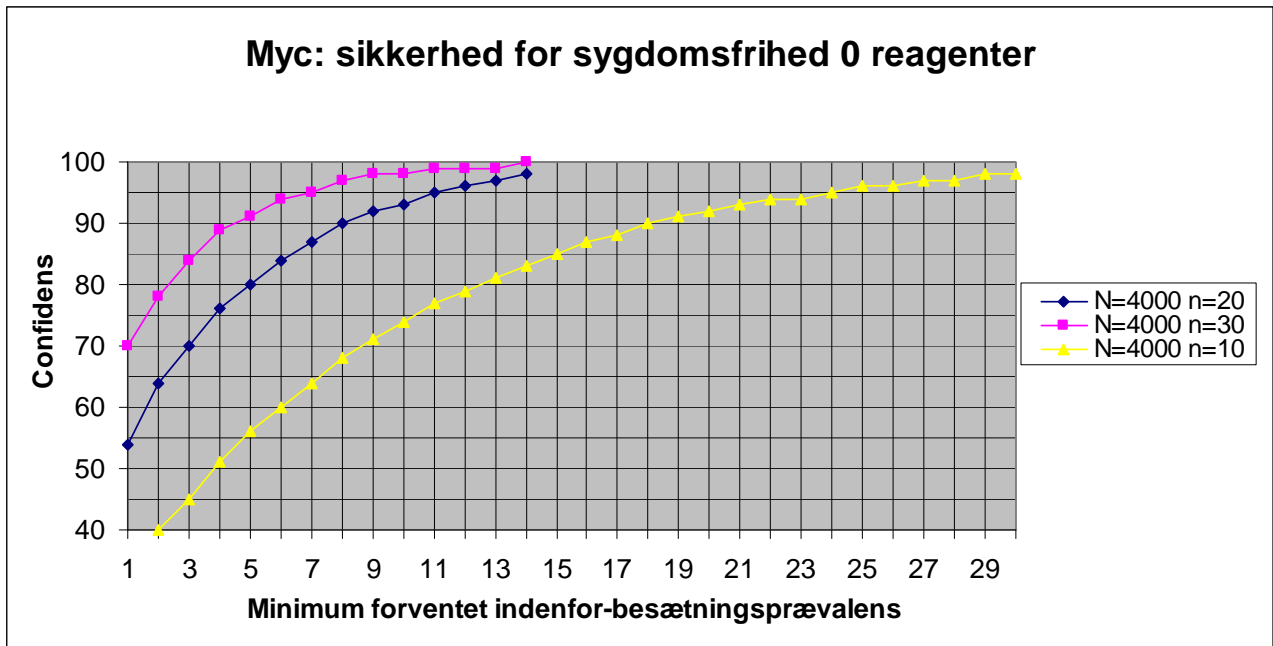


Fig 5 Sandsynlighed for sygdomsfrihed, stikprøveundersøgelse, Mycoplasma hyopneumoniae

20 negative prøver er nok til at erklære besætninger på 4000 individer sygdomsfri med 95% sikkerhed, hvis man ikke forventer lavere indenfor-besætningsprævalenser end ca. 11%
 30 negative prøver er nok til at erklære besætninger på 4000 individer sygdomsfri med 95% sikkerhed, hvis man ikke forventer lavere indenfor-besætningsprævalenser end ca. 7 %
 10 negative prøver er nok til at erklære besætninger på 4000 individer sygdomsfri med 95% sikkerhed, hvis man ikke forventer lavere indenfor-besætningsprævalenser end ca. 24%

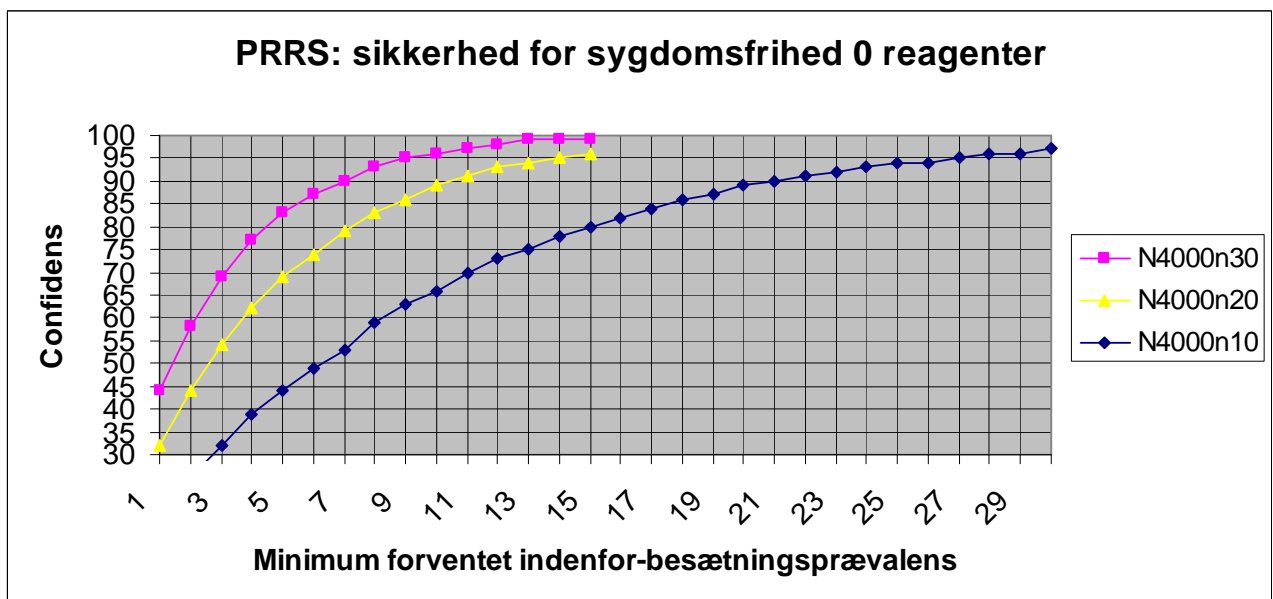


Fig 6 Sandsynlighed for sygdomsfrihed, stikprøveundersøgelse, PRRS

Som for Mycoplasma ses, at stigende stikprøvestørrelse giver større sikkerhed for sygdomsfrihed ved lave indenfor-besætningsprævalenser. Kommer man under en indenfor-besætningsprævalens på ca. 15% er 20 negative blodprøver ikke nok til at erklære besætningen sygdomsfri med 95% sikkerhed.

Prædiktive værdier besætningstest.

I tilfældet SPF-besætningerne og de årlige statusprøver vides blot, at der er ca. 3500 besætninger af meget varierende størrelse og vi kender prævalensen af SPF-sygdomme blandt disse besætninger. For at kunne beregne de prædiktive værdier for de årlige statusprøver har jeg defineret en "gennemsnits SPF-besætning" på 4000 grise. Jeg antager altså, at alle 3500 besætninger er på 4000 individer.

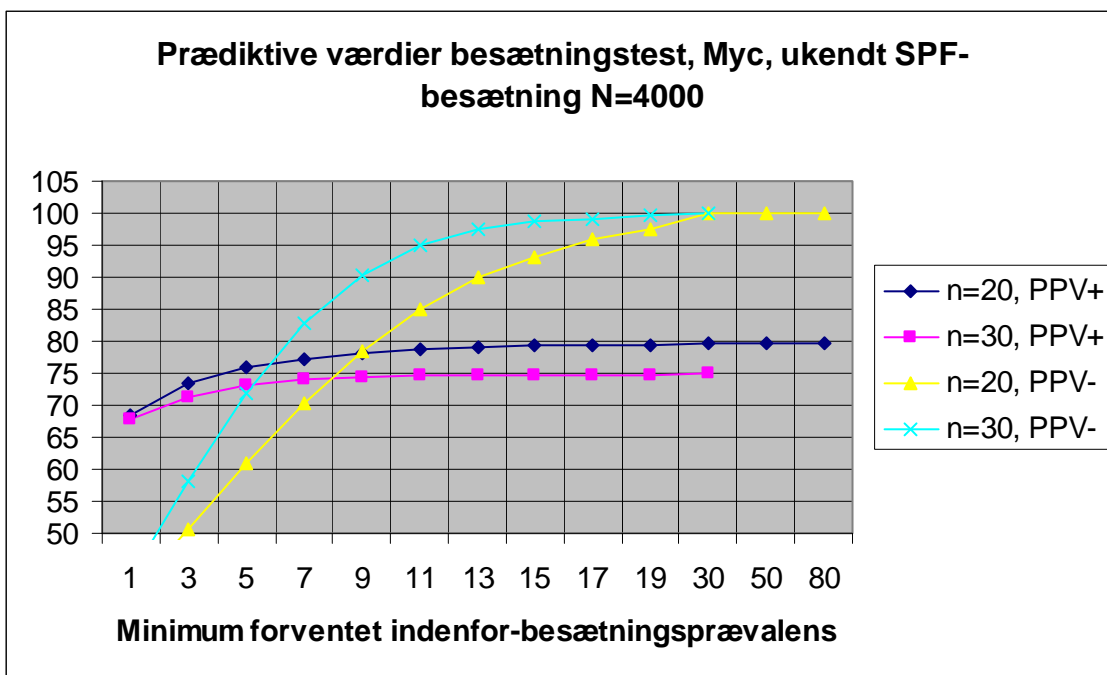


Fig 7 Prædiktive værdier, besætningstest, Mycoplasma hyopneumonia, "gennemsnits SPF-besætning" Cut-point=1

Den negative prædiktive værdi for besætningstesten (årlige statusprøver n=20) er over 95, når minimum forventet indenfor-besætningsprævalensen blandt positive besætninger er over ca. 16%. Den positive prædiktive værdi når ikke over 80.

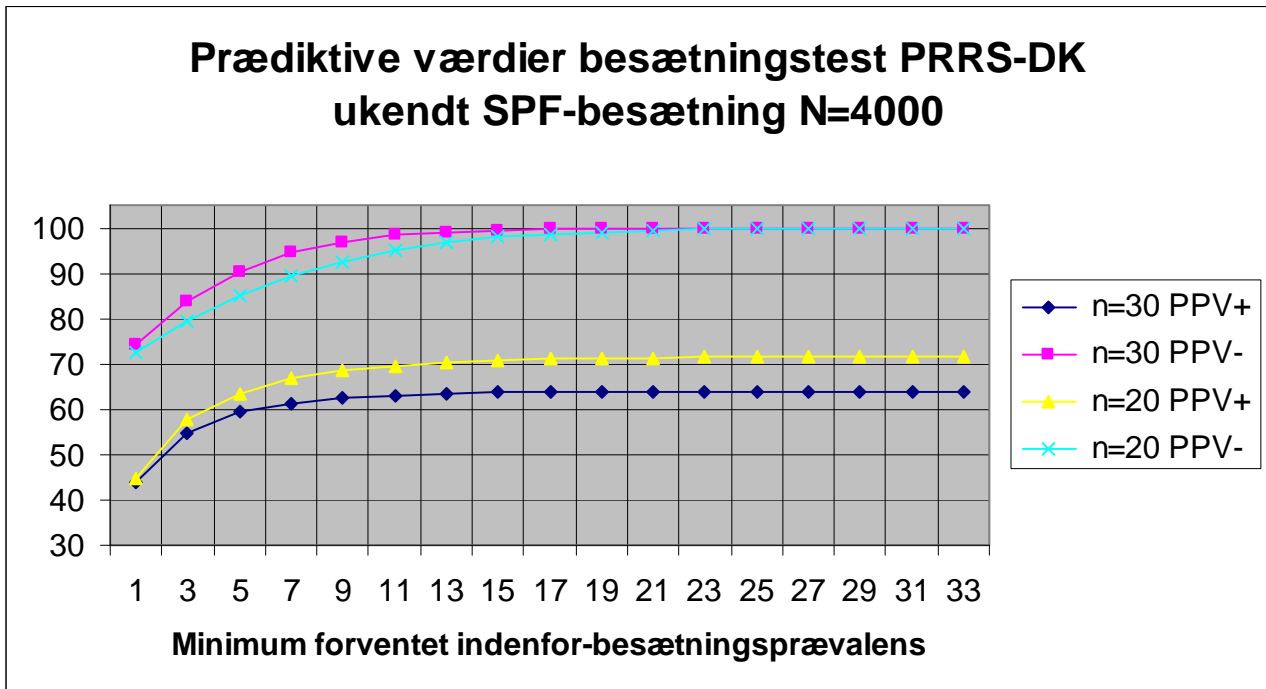


Fig 8 Prædiktive værdier besætningstest PRRS-DK. "Gennemsnits SPF-besætning". Cut-point=1

Den negative prædiktive værdi er over 95, når indenfor-besætningsprævalensen kommer over ca. 11% (n=20).

Den positive prædiktive værdi når ikke over 71.

**Overvågning efter endt medicinsk sanering:
Mycoplasma hyopneumoniae:**

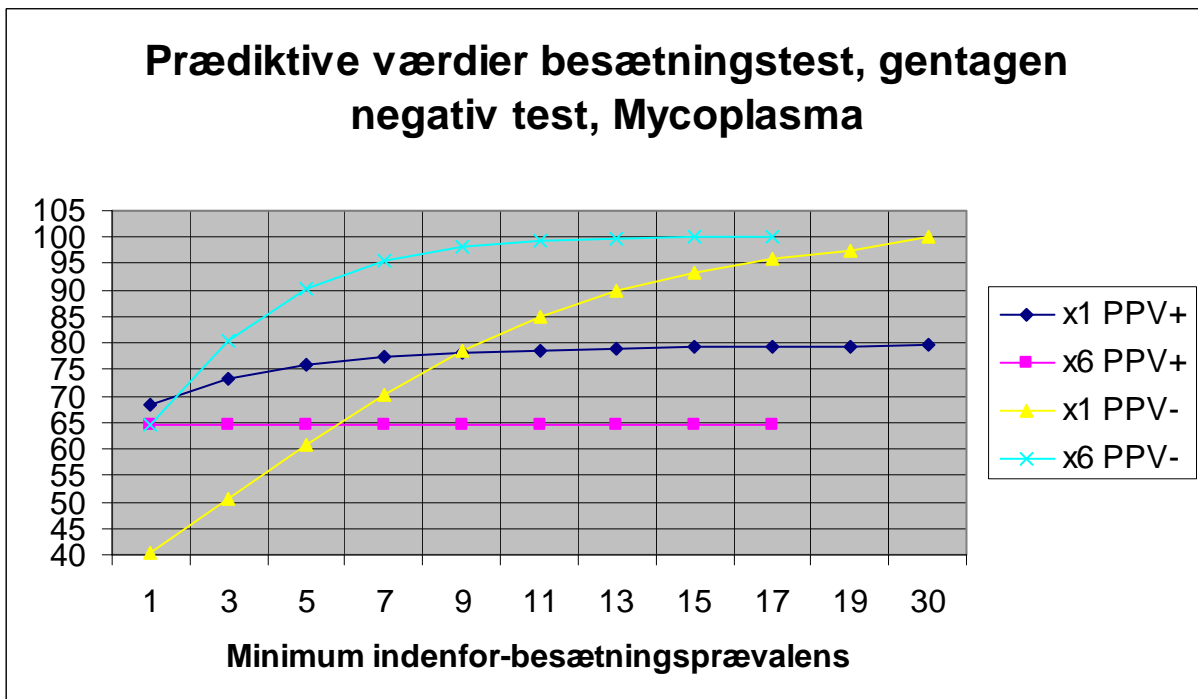


Fig 9 Prædiktive værdier besætningstest. Effekt af gentagen negativ test. Mycoplasma hyopneumoniae

Det fremgår, at gentagen negativ test øger den negative prædiktive værdi ved lave indenfor-besætningsprævalenser. Således er NPV over 95, når indenfor-besætningsprævalensen kommer over ca. 7%. Den positive prædiktive værdi falder i forhold til en enkelt besætningstest. Den når ikke over 65.

PRRS:

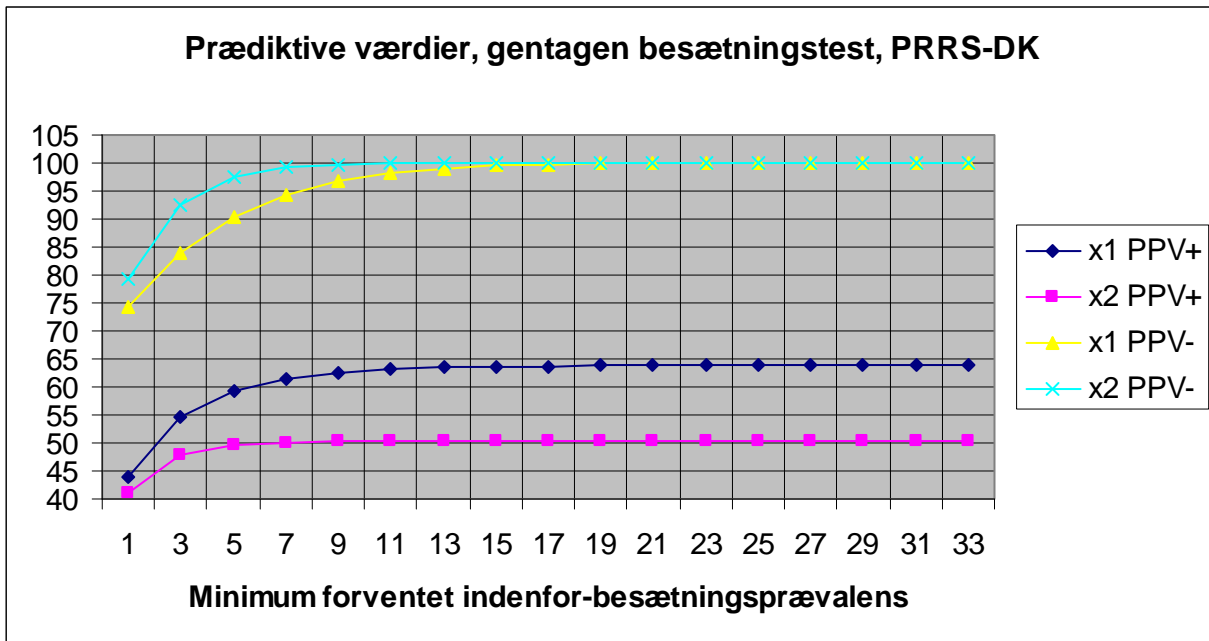


Fig 10 Prædiktive værdier, effekt af gentagen negativ besætningstest. PRRS-DK

Også her øges NPV ved lave indenfor-besætningsprævalenser. Den er over 95, når indenfor-besætningsprævalensen kommer over ca. 4%. Til gengæld når PPV ikke over 51.

Lawsonia Intracellularis:

Hvis jeg beregner confidens ved en stikprøvestørrelse på 20 med 0 reagerer (Elisa-test) i en besætning på 4000 individer fremkommer følgende kurve

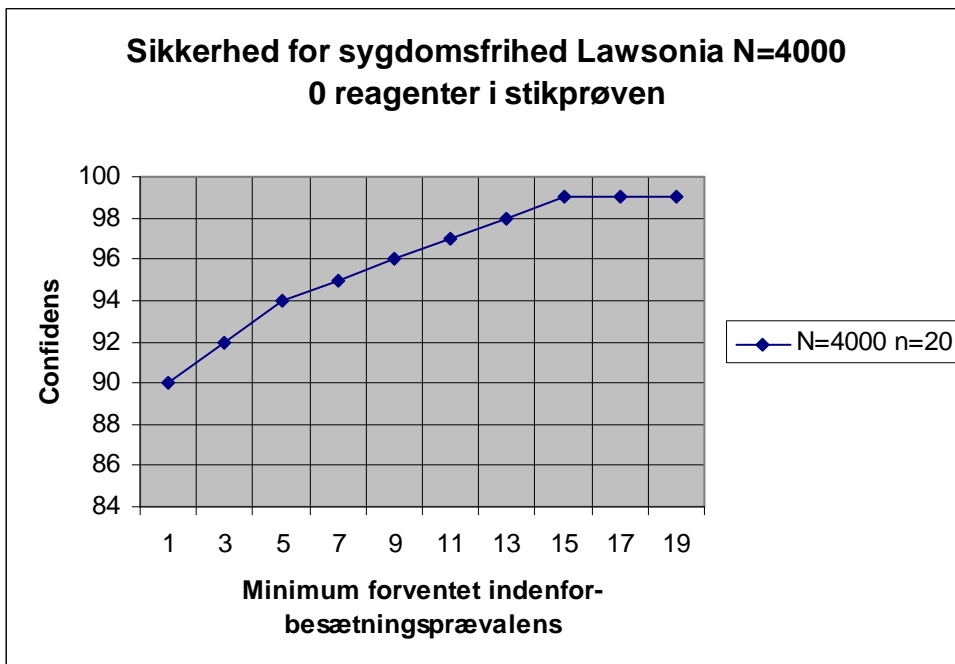


Fig 11 Sandsynlighed for sygdomsfrihed, stikprøveundersøgelse, Lawsonia intracellularis

20 negative blodprøver er altså nok til med 95% sikkerhed at erklære en besætning på 4000 individer sygdomsfri ned til en indenfor-besætningsprævalens på ca. 7%

Bruger man prædiktive værdier som et mål for besætningstesten fremkommer følgende kurver

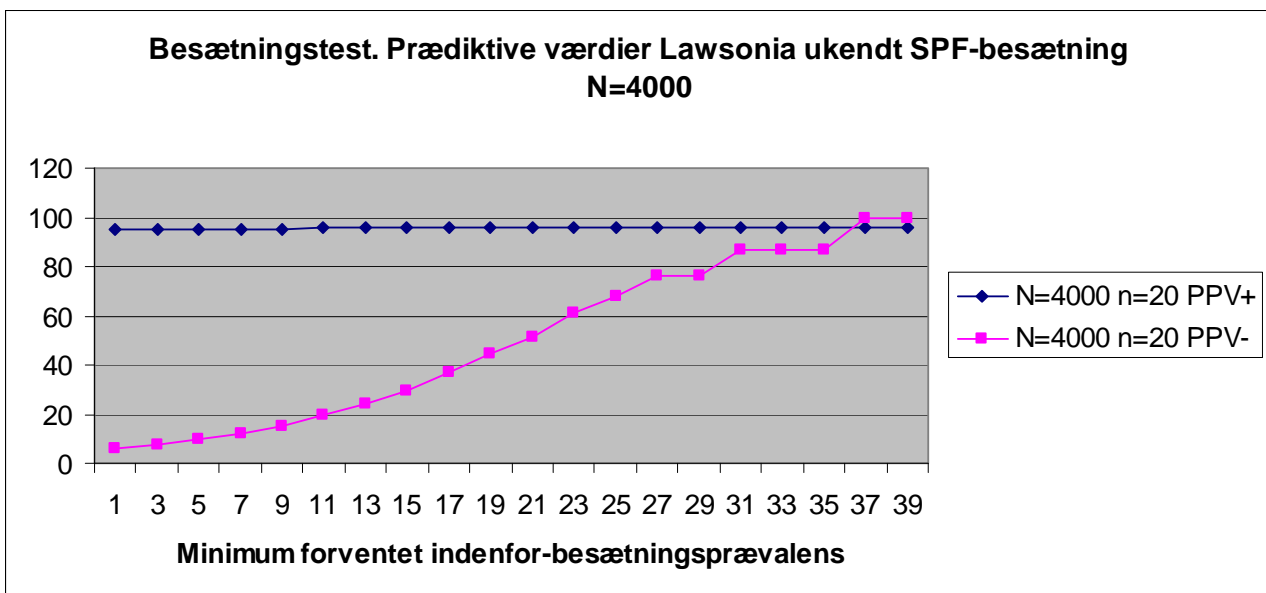


Fig 12 Prædiktive værdier, besætningstest, Lawsonia intracellularis.

Som det fremgår af kurverne når den negative prædiktive værdi først en værdi på over 95, når vi kommer over en indenfor-besætningsprævalens på ca. 37%

Den positive prædiktive værdi er over 95 helt ned til meget lave indenfor-besætningsprævalenser.

Diskussion:

Mine resultater er baseret på en række værdier for Se og Sp på de enkelte tests. Man kan altid diskutere om de er de sande værdier. At bestemme Se og Sp for en individtest er både vanskeligt og tidskrævende og kan variere fra gang til gang. Man kan også sagtens argumentere for, at de kan have en værdi i et laboratorium under kontrollerede forhold og en anden værdi, når de bruges på individer fra en broget virkelighed ude i besætningerne. Derfor skal de numeriske værdier af resultaterne i denne opgave også tages med forbehold. Tendenserne mener jeg dog er anvendelige.

Jeg har valgt to metoder til at evaluere en besætningstest. Dels sandsynlighed for sygdomsfrihed ved stikprøveundersøgelse og dels prædiktive værdier af en besætningstest. Når man beregner prædiktive værdier tages der hensyn til den sammenhæng individet eller besætningen befinder sig i – altså prævalensen. Man kan kalde det sandsynligheden for positiv før test. Det gør man ikke når man isoleret undersøger en besætning ved hjælp af en stikprøveundersøgelse. Forholdet bliver tydeligt i tilfældet Lawsonia, hvor en stikprøveundersøgelse på 20 med 0 reagerer i en tilfældig besætning isoleret set kan sandsynliggøre sygdomsfrihed på 95% confidensniveauet ned til indenfor-besætningsprævalens på ca. 7%. Den negative prædiktive værdi på en tilsvarende besætningstest, hvor der tages hensyn til prævalensen af positive besætninger i besætningsgrundlaget (antaget 95% positive i SPF-systemet) bliver først over 95, når indenfor-besætningsprævalensen i positive besætninger er over ca. 37%. En positiv besætningstest for Lawsonia har en høj prædiktiv værdi.

Tendensen i resultaterne viser, hvad der også var forventeligt, at sikkerhed for sygdomsfrihed er lavest, og betydeligt lavere end 95%- confidensniveauet ved lave indenfor-besætningsprævalenser. Det store spørgsmål er, om dette har nogen praktisk betydning, altså om vi i virkelighedens verden kommer ned på indenfor-besætningsprævalenser, hvor sikkerheden bliver lav. Man kan forestille sig, at noget sådant kunne være tilfældet i nysmittede besætninger eller hvis man ikke sørger for at prøve de dyr, hvor der er størst sandsynlighed for sygdom og serokonvertering. En stikprøvestørrelse på 10 i samdriftbesætninger forekommer mig i visse tilfælde at være lav set i dette lys. Her spiller ens kendskab til infektionsdynamikken ind. Hver besætning har sin egen profil mht. antistoffer. Forskellige besætningstyper og produktionsformer giver forskellige profiler. Man har forsøgt at lave sådanne prævalensundersøgelser og profileringer (Calsamiglia, Pijoan & Bosch 1999, Sibila et al. 2004).

Jeg mener, at det er vigtigt at fortsætte dette arbejde, så grundlaget for at evaluere sikkerheden ved overvågning for sygdomsfrihed i besætningerne bliver bedre. Des større detailviden vi har om prævalenser des mere sikkert kan vi evaluere for sygdom eller sygdomsfrihed.

Det fremgår også af resultaterne, at gentagen testning (eksempelvis efter medicinsk sanering) af negative besætninger øger sikkerheden for sygdomsfrihed ved lave indenfor-besætningsprævalenser.

Resultaterne viser, at de positive prædiktive værdier for besætningstesten for Mycoplasma og PRRS ikke er specielt høje. Det er derfor berettiget, at der foretages omprøver og i øvrigt igangsættes øvrige specifikke tests for at sikre, at besætningen vitterlig er smittet, hvis den tester positivt i overvågningsprogrammet.

PCR-teknikken åbner mulighed for hurtigere at påvise smitte end ved de gængse Elisa-tests der typisk påviser antistoffer efter serokonvertering. Det åbner mulighed for netop at kunne påvise

nysmitte. Ulempen er, at smitstoffer ofte udskilles intermitterende og helt kan ophøre, hvorfor teknikken alene ikke er egnet til screening for sygdomsfrihed.

Referencer

Stege, Helle 2006, Forelæsning FD-2006

Calsamiglia, M., Pijoan, C. & Bosch, G.J. 1999, "Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique.", *Swine Health and Production*, vol. 7, no. 6, pp. 263-268.

Christensen, J. & Gardner, I.A. 2000, "Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases.", *Preventive veterinary medicine*, vol. 45, no. 1/2, pp. 83-106.

Enoe, C., Andersen, S., Sorensen, V. & Willeberg, P. 2001, "Estimation of sensitivity, specificity and predictive values of two serologic tests for the detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in the absence of a reference test (gold standard).", *Preventive veterinary medicine*, vol. 51, no. 3/4, pp. 227-243.

Enoe, C., Georgiadis, M.P. & Johnson, W.O. 2000, "Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown.", *Preventive veterinary medicine*, vol. 45, no. 1/2, pp. 61-81.

Feld, N., Qvist, P., Ahrens, P., Friis, N.F. & Meyling, A. 1992, "A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*.", *Veterinary microbiology*, vol. 20, no. 1, pp. 35-46.

Sorensen, K., Bentzen, A., Smedegaard Madsen, E., Strandbygaard, B. & Nielsen, J. 1997, "Evaluation of a blocking ELISA for screening of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus.", *Veterinary microbiology*, vol. 56, no. 1/2, pp. 1-8.

Sorensen, K., Strandbygaard, B., Bentzen, A., Madsen, E., Nielsen, J. & Have, P. 1998, "Blocking ELISAs for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.", *Veterinary microbiology*, vol. 60, no. 2/4, pp. 169-177.

Sorensen, V., Barfod, K., Feld, N.C. & VraaAndersen, L. 1993, "Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the surveillance of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs.", *Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties*, vol. 12, no. 2, pp. 593-604.

Sibila, M., Calsamiglia, M., Vidal, D., Badiella, L., Aldaz, A. & Jensen, J.C. 2004, "Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems.", *Canadian Journal of Veterinary Research. Canadian Veterinary Medical Association, Ottawa, Canada*, vol. 68, no. 1, pp. 12-18.

