

## **APPORT DE LA SEROLOGIE DE MELANGE DANS LE DEPISTAGE DE LA BVD DANS UN TROUPEAU ALLAITANT**

R.VERMESSE(\*), B.SAUTEREAU(\*\*), F.BAURIER(\*\*\*)

(\* ) GDS du Cher 216, rue Louis Mallet 18000 BOURGES

(\*\* ) Etudiant ENVN

(\*\*\*) Laboratoire d'analyses départemental du Cher 216, rue Louis Mallet 18000 BOURGES

Que ce soit dans le cadre de l'aide au diagnostic ou d'une action collective de dépistage, la question des moyens de diagnostic de la BVD et de leur coût est régulièrement posée en cheptel allaitant.

L'objet de l'étude présentée est de discuter de l'intérêt de l'utilisation de sérologies de mélange sur sérums.

### **I. CONTEXTE**

Les résultats présentés sont issus d'un travail plus large d'analyse et d'enquête réalisé par Benjamin SAUTEREAU (Thèse ENVN 2005 «Épidémiologie descriptive de la Diarrhée Virale Bovine (BVD) en cheptel allaitant dans le Cher»). Ne seront ici discutées que les données analytiques,

Dans le cadre de l'étude, 30 cheptels allaitants adhérents au GDS du Cher ont été tirés au sort en 2002. En 2005, il n'en restait que 26 encore en activité et l'effectif moyen prélevé était de 76 bovins.

Dans les 22 élevages étudiés en 2005 et n'utilisant pas de vaccin atténué, la séroprévalence moyenne est de 41%.

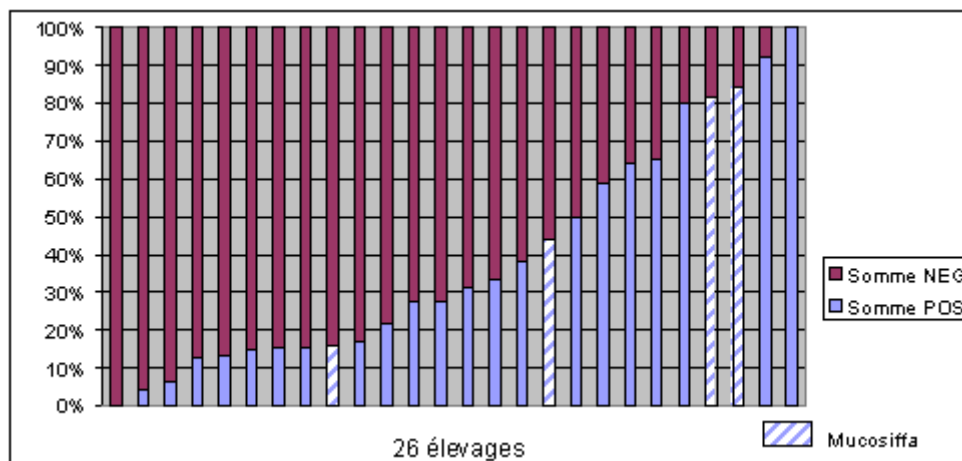


Figure 1: Distribution des séroprévalences en 2005

Deux bovins IPI ont été dépistés dans un élevage (une primipare et son veau) où la séroprévalence est de 58,7%. On a dépisté également dans un élevage où la séroprévalence est de 92,5% en 2005, trois animaux positifs en PCR dont un infecté transitoire et deux qu'il n'a pas été possible de reconstrôler.

### **Corrélation sérologie de mélange et prévalence**

Depuis 1992, les pays d'Europe du Nord (Norvège, Suède, Danemark, Finlande) ont été les premiers à mettre en place une démarche systématisée pour déterminer le statut d'un élevage vis-à-vis de la BVD à partir d'analyses sérologiques sur laits de grand mélange. En France, une telle démarche en trois étapes a été mise en place en Bretagne. Les résultats obtenus en pourcentage d'inhibition permettent de classer les élevages en 3 classes (A.JOLY 2004).

Tableau 1: relation entre le pourcentage d'inhibition et la séroprévalence dans le cheptel

Pourcentage d'inhibition	Classes	Séroprévalence dans le cheptel
< 35%	0	0-10%
35 < 60%	1	10-30%

> 60%	2	>30%
-------	---	------

Une première question posée est de savoir si des analyses sérologiques de mélange sur sérums permettent de dégager des profils infectieux similaires en production allaitante.

## ***Valeur explicative des résultats sérologiques et virologiques des jeunes générations***

De manière générale, la fréquence des bovins IPI décroît très rapidement avec l'âge, ce qui fait que la grande proportion des bovins IPI est âgée de moins de 2 ans. Aussi, il semble logique qu'une action ciblée sur les jeunes générations permette de les mettre en évidence dans la grande majorité des cas.

Une enquête menée en région Rhône-Alpes (Simon et al 1994) a montré que l'interprétation du taux de sérologies positives chez les jeunes est difficile en dessous d'un certain effectif qui se situe autour de 25 bovins. Par contre, du moment que l'effectif est suffisant, il semble que la séroprévalence au sein des jeunes animaux reflète l'absence ou la présence de bovins IPI : un taux de séropositivité faible chez les jeunes (< 30%) semble être un bon indicateur de l'absence d'un bovin IPI; par contre un taux de séropositivité forte parmi les jeunes (> 50%) semble être un bon indicateur de la présence d'un bovin IPI.

Nous avons donc cherché à savoir si une catégorie de bovins pouvait assurer une bonne valeur prédictive sur le statut du cheptel, et pouvait de ce fait faire l'objet de dépistages par sérologies de mélange.

## ***Persistance des résultats sérologiques dans le temps***

Peu de données expérimentales existent sur la persistance des résultats sérologiques individuels. Or c'est une variable importante dans l'interprétation des prévalences sérologiques.

## **II. MATERIEL – METHODES**

Les prélèvements effectués sur les animaux étaient une prise de sang sur tube sec.

En 2005, les animaux analysés étaient ceux prélevés lors de la campagne de prophylaxie de la brucellose (tous les bovins de plus de 2 ans le jour de la prophylaxie), ainsi que les génisses de 2 ans et celles de 1 an : 388 génisses de 1 an et 1817 adultes, dont 701 bovins déjà analysés en 2002, ont été prélevés.

Les broutards (bovins mâles nés à la saison de vêlage précédente (2004)) n'ont pas été prélevés bien qu'il s'agisse de la même génération que les laitonnnes. Il s'agit d'un choix délibéré car, en prélevant « les laitonnnes », l'objectif était d'analyser la représentativité des jeunes bovins vis-à-vis du troupeau. A ce titre, les « laitonnnes » correspondent à la jeune génération conservée pour la reproduction alors que les broutards sont bien souvent vendus rapidement après le sevrage (à 9 mois pour l'obtention des primes).

Une partie des génisses de 2 ans n'a pas été prélevée non plus. En effet, pour les élevages où les prises de sang de prophylaxie ont été réalisées tôt dans la saison, les génisses de 2 ans n'avaient pas 2 ans le jour de « la prophylaxie » et n'ont donc pas été faites. Ce cas de figure n'a été que réalisé trop tard pour être rectifié.

Les analyses ont été réalisées par le Laboratoire Départemental D'analyse du Cher.

Tous les bovins prélevés en 2002 et en 2005 ont été analysés en sérologies individuelles et en sérologies de mélange de 20 prélèvements maximum (*les mélanges réalisés au sein d'un même élevage, certains mélanges inférieurs à 10 sérums n'ont pas été inclus dans l'analyse statistique*). Pour les laitonnnes prélevées en 2005, des sérologies de « petit » mélange de 5 ont été effectuées en plus des « grands » mélanges de 20.

Une PCR de mélange de 20 a été réalisée sur tous les prélèvements. En cas de résultat positif, l'échantillon positif est analysé en pool de 5 puis, si celui-ci est positif, les 5 prélèvements sont analysés individuellement.

Le kit utilisé est commercialisé par le laboratoire LSI : Kit LSI BVD/BD p80 Blocking One Step Serum® (kit ELISA NS3 compétition). Il s'agit d'une technique ELISA basée sur la compétition vis-à-vis de l'antigène NS3 (anciennement p80) du virus de la BVD entre les échantillons à tester et une solution contenant des anticorps monoclonaux marqués (annexe).

Cette technique détecte les anticorps dirigés contre la NS3, protéine non structurale qui n'est exprimée que lors de la réplication virale. De ce fait, les vaccins inactivés n'induisent pas ou pratiquement pas de réaction positive envers ce test. De plus, la NS3 présente le grand avantage d'être fortement conservée dans les différentes souches de virus de la BVD.

La lecture des résultats est basée sur la réaction colorée entre les anticorps monoclonaux (le conjugué) et du substrat. Un échantillon positif ne donne pas ou peu de coloration. A partir de la densité optique, le pourcentage d'inhibition est calculé pour chaque échantillon.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{DO moyenne du contrôle négatif} - \text{DO échantillon}) \times 100}{\text{DO moyenne du contrôle négatif}}$$

(DO = Densité Optique)

En sérum individuel

**Tableau 2: Interprétation des résultats sérologiques individuels (données fabricant)**

	Interprétation	
%inh. < 50	-	Négatif
50 ≤ %inh. < 80	+	Faible positif
% inh. ≥ 80	+++	Fort positif

*Résultats sérologiques.* Les résultats sérologiques individuels sont de nature qualitative. Si le résultat est «+++» ou «++», le bovin est considéré positif et si le résultat est «NEG», il est considéré négatif.

*Séroprévalences.* Les séroprévalences en 2002, en 2005, des génisses de 1 an, des génisses de 2 ans, des génisses de 3 ans ont été calculées. On a regroupé les séroprévalences de 2002 et 2005 en 3 catégories : faible (< 30%), moyen (30% < < 60%), élevé (> 60%).

$$\text{Séroprévalence} = \frac{\text{Nombre de bovins positifs}}{\text{Nombre total de bovins analysés}} \times 100$$

## III. RESULTATS

### A) Persistance des anticorps

Sur les 319 bovins positifs en 2002 et ré-analysés en 2005, 17 se sont négativés (5,3 %). Il s'agit, en proportion, surtout de bovins en 2002 qualifiés de «+» (8 sur 44 soit 18%) que de bovins qualifiés de «+++» (9 sur 275 soit 3,3%).

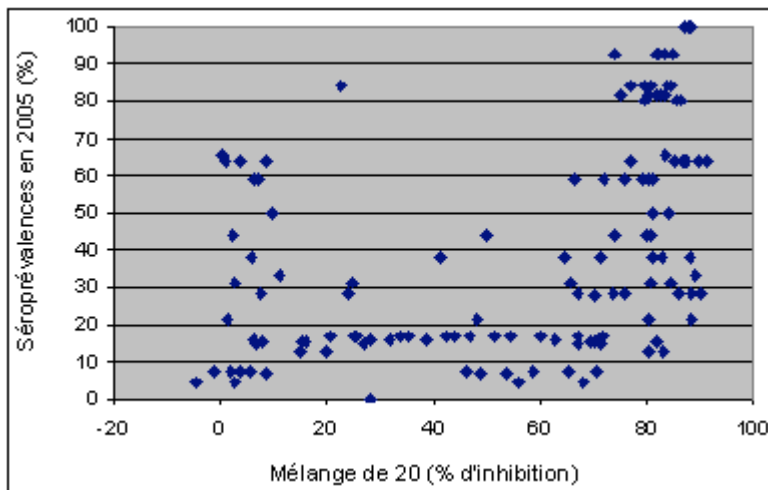
La persistance d'un résultat faible négatif est donc un peu moindre que celle d'un fort positif (*test khi deux*,  $p < 0,05$ ).

Mais globalement les résultats séropositifs sont très stables à l'échelle de 3 ans et permettent bien d'envisager une analyse historique des profils sérologiques des cheptels observés par classe d'âge.

### B) La valeur des sérologies de mélange

#### (1) Les mélanges de 20

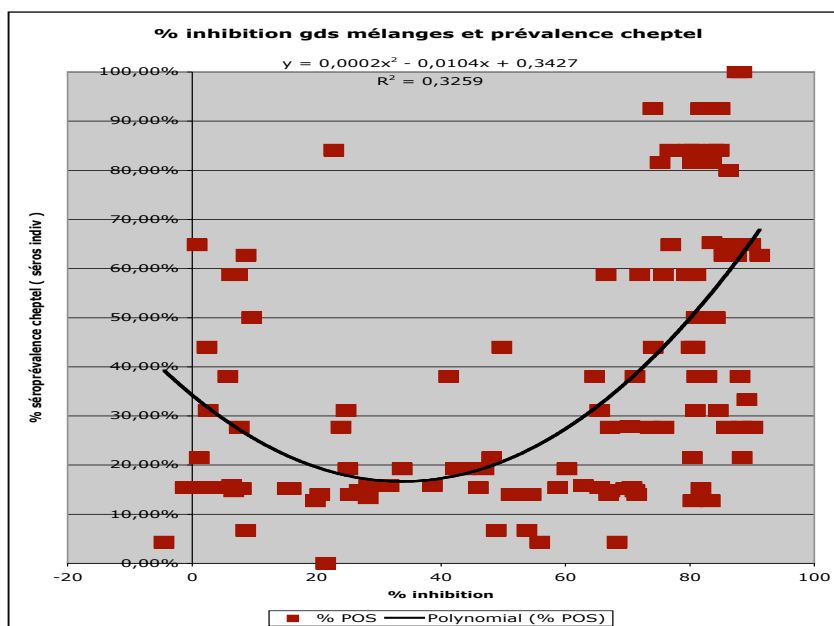
Si l'on compare les résultats de sérologies de mélange de 20 sur tous les animaux avec les séroprévalences du cheptel en 2005, on constate qu'il n'y a pas de corrélation nette.



**Figure 2: Absence de corrélation entre les sérologies de mélange sur tous les individus et la séroprévalence en 2005**

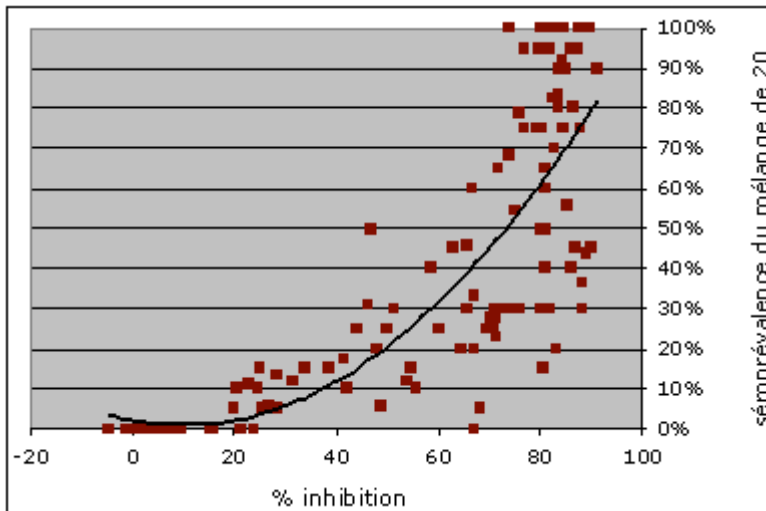
Il est de ce fait illusoire de penser prédire la prévalence du cheptel à partir de mélanges de 20 réalisés sur tout le troupeau par sondage□

Il faudra donc chercher à repérer si l'étude spécifique et ciblée d'une catégorie de bovins peut avoir une bonne valeur explicative ou prédictive du statut infectieux de l'élevage.



**Figure 3 : Absence de corrélation entre le % d'inhibition de grands mélanges (117 mélanges de 10 à 20 sérums) et la séroprévalence globale du cheptel.**

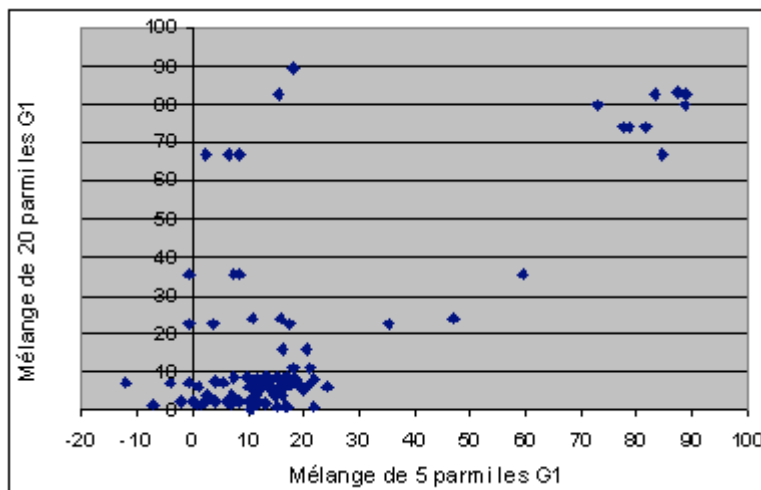
Par contre, le résultat de sérologie de mélange de 20 est corrélé à la séroprévalence intragroupe.



**Figure 4: Corrélation dans les mélanges de 20 entre la séroprévalence intragroupe et le pourcentage d'inhibition**

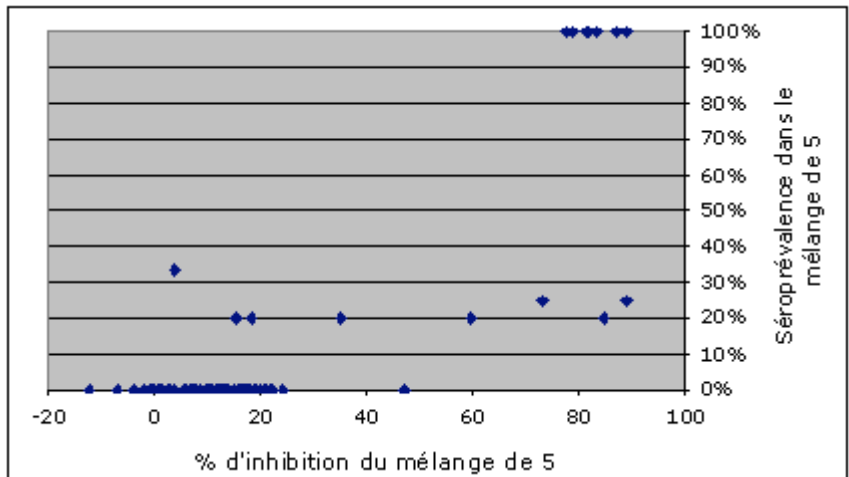
**(2) Les mélanges de 5 (sur les génisses d'un an)**

Les résultats de sérologie de mélange de 5 et ceux de 20 ne sont pas corrélés:



**Figure 5: Absence de relation entre les résultats de mélange de 5 et de 20 sur les G1**

De plus, le résultat de sérologie de mélange de 5 n'est pas corrélé à la séroprévalence intragroupe □



**Figure 6: Absence de relation dans les mélanges de 5 entre le pourcentage d'inhibition et la séroprévalence intragroupe**

Un seul bovin fortement positif dans le lot de 5 suffit à faire fortement augmenter le pourcentage d'inhibition du mélange (et ceci même si les autres bovins sont négatifs).

**C) Valeur explicative de l'étude spécifique d'une catégorie de bovin sur le statut infectieux de l'élevage**

**(1) Les jeunes générations**

Dans près de la moitié des élevages, la conduite en lots des génisses de première année (G1) et de deuxième année (G2) est différente de celle du reste du troupeau.  
 Dans l'élevage où les 2 bovins IPI ont été dépistés, les G1 n'ont pas été infectées. Lorsque la séroprévalence des G1 est supérieure à 0%, on peut fortement suspecter une forte circulation virale, par contre, lorsqu'elle est nulle, il est difficile de conclure. Ainsi, la valeur prédictive positive de la présence de G1 infectés dans les élevages à forte circulation virale est bonne, par contre la valeur prédictive négative est mauvaise car elle ne permet pas distinguer les différents profils infectieux.  
 Si l'on s'intéresse aux sérologies de mélange, les résultats sur les mélanges de 5 et de 20 G1 ne sont pas liés à la séroprévalence du cheptel .

Il est difficile d'évaluer la valeur prédictive des G2 étant donné que pour des raisons pratiques, elles n'ont pas pu être prélevées dans 9 élevages dont 2 à circulation virale intense.  
 Dans les élevages où les G2 ont été prélevées, la relation entre la séroprévalence des G2 et le séroprévalence du cheptel est la suivante:

On constate que pour les élevages à circulation virale intense, la séroprévalence des G3 est élevée. Au delà d'une séroprévalence dans le cheptel d'environ 55%, la séroprévalence des G3 est supérieure à 60%:

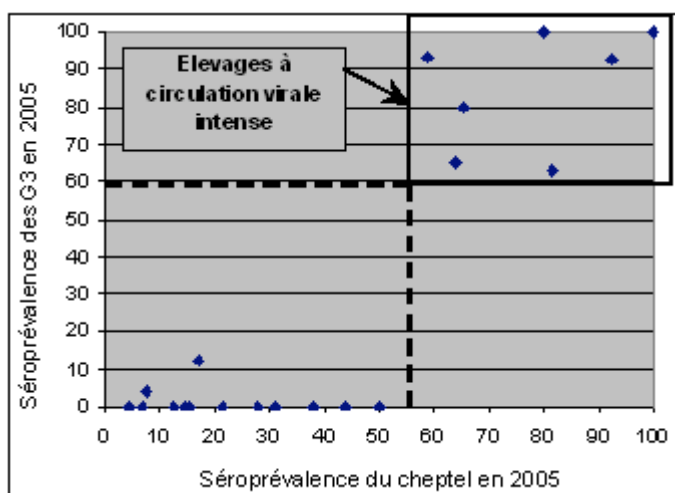


Figure 7: Relation entre la séroprévalence des G3 et la séroprévalence du cheptel

## (2) Les vaches

Si l'on s'intéresse uniquement aux résultats de mélange de 20 sur les bovins de 3 ans ou plus (génisses de 3 ans et vaches), on remarque que la séroprévalence en 2005 est corrélée aux résultats de mélange. Par contre, il ne s'agit pas d'une corrélation linéaire—ceci s'explique par la saturation du kit LSI à partir d'une certaine séroprévalence.

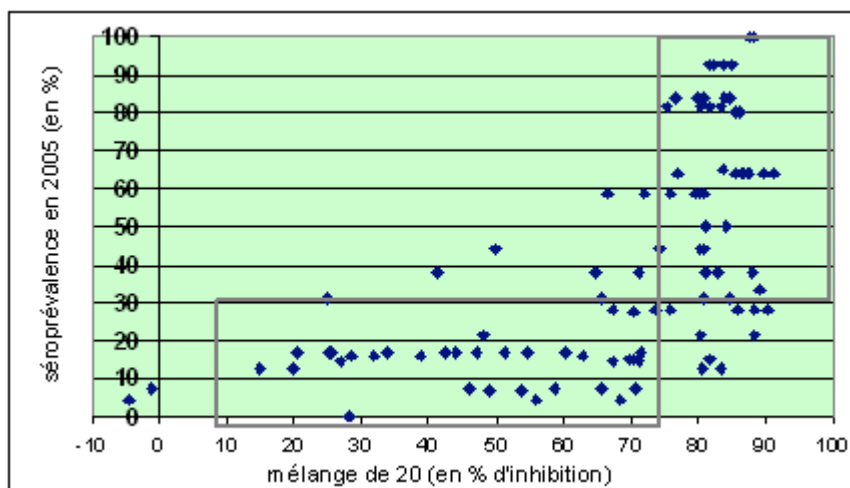


Figure 8: Corrélation entre les sérologies de mélange de 20 sur les bovins de 3 ans ou plus et les séroprévalences en 2005

Tous les élevages (au nombre de 13) avec une séroprévalence supérieure à 30% ont au moins la moitié de leurs résultats de sérologie de mélange > 75%. Il y a 4 élevages (sur 11) avec une séroprévalence inférieure à 30% pour lesquels c'est aussi le cas.

Finalement, les élevages se répartissent de la manière suivante:

Tableau 3: Répartition des élevages en fonction des résultats de sérologie de mélange de 20 sur les vaches en 2005 et les séroprévalences du cheptel en 2005

		Au moins la moitié des mélanges de 20 avec un résultat en % d'inhibition		Nombre d'élevages
		< 75%	> 75%	
Séroprévalences 2005	> 30%	3	13	13
	< 30%	9	3	11

Sur l'ensemble des résultats de sérologie de mélange de 20, le fait d'avoir au moins la moitié des résultats > 75% (pour les sérologies de mélange de 20 sur les vaches, en % d'inhibition) pour mettre en évidence une séroprévalence dans le cheptel > 30% présente de bonnes valeurs prédictives  
 VPP = 81% (=13/16) et VPN = 75% (=9/12) .

Si l'on s'intéresse à un seul résultat de sérologie de mélange de 20, on a

**Tableau 4: Répartition des différents résultats de sérologies de mélange de 20 sur les vaches**

		Au moins un mélange de 20 avec un résultat en % d'inhibition	
		< 75%	> 75%
Séroprévalences 2005	> 30%	9	39
	< 30%	37	9

Soit VPP = 81% (= 39/48) et VPN = 80% (= 37/46).

Les résultats de sérologie de mélange de 20 sur les vaches présentent une bonne valeur prédictive des séroprévalences dans le cheptel inférieures ou supérieures à 30%. Par contre, au-delà d'une séroprévalence dans le cheptel de 30%, les résultats de sérologie de mélange de 20 ne permettent pas de différencier les élevages à séroprévalence moyenne de ceux à séroprévalence élevée.

## IV. DISCUSSION

Une des premières difficultés est la persistance des anticorps qui rend délicate l'interprétation des résultats sérologiques chez les bovins âgés. Dans l'étude, seuls 5,3% des bovins se sont négativés sur 3 ans. Par contre cela renforce l'intérêt de l'interprétation à posteriori des profils infectieux (*taux de séropositifs par classes d'âge*). L'identification du profil infectieux fournit une information assez complète sur le statut infectieux du cheptel à partir d'une seule analyse sur tous les bovins. Il permet de décrire assez précisément ce qui se passe pour chaque classe d'âge et ainsi, à partir d'une analyse à un moment donné, d'avoir une estimation globale de la dynamique d'infection (et même d'identifier des périodes clés, comme l'élimination d'un bovin IPI). Cela permet de faire le lien entre les résultats sérologiques par classes d'âge et la conduite en lots. De la même manière, il est possible d'interpréter plus finement les résultats dans les élevages qui vaccinent.

En quoi les sérologies de mélange peuvent-elles se substituer à cette analyse individuelle qui est coûteuse ? Le pourcentage d'inhibition des sérologies de mélange de 20 est corrélé à la séroprévalence intragroupe à l'inverse des sérologies de mélange de 5. Cette corrélation n'est pas linéaire du fait du phénomène de saturation du kit ELISA utilisé.

De plus, les résultats de sérologie de mélange de 20 sur tous les animaux ne sont pas corrélés à la séroprévalence du cheptel. Donc, cela signifie que réaliser des mélanges de 20 sur tous les bovins n'a pas beaucoup de sens mais qu'il faut cibler l'échantillon à prélever.

Toutefois, il faut nuancer ce jugement selon l'objectif que l'on se fixe. Si le but d'un tel dépistage, mené à très grande échelle, est de dégrossir le travail, les exigences en matière de précision des conclusions peuvent être relativisées.

Ainsi si l'on simule le risque de conclusions aberrantes établies à partir d'un dépistage en aveugle, on peut établir que le risque de se tromper lourdement - c'est à dire par exemple de ne pas mettre en évidence le risque de présence d'un IPI - est en fait très faible. De la même façon, un résultat faible en mélange peut permettre d'exclure la présence d'un animal IPI dans le lot concerné, si ce lot a bien une pertinence épidémiologique.

L'intérêt de la valeur prédictive des sérologies de mélange est aussi à comparer à celle d'analyses individuelles effectuées sur un petit sondage d'animaux (*calcul de probabilité de trouver k bovins positifs dans un échantillon de n bovins pour chaque cheptel*). On a déjà noté toutefois que le choix des animaux est important il s'agit de réaliser un véritable tirage aléatoire pour ne pas risquer de privilégier un lot d'animaux.

Les génisses d'un an sont conduites dans des lots séparés du reste du troupeau dans plus de la moitié des élevages et ainsi ne rentrent pas en contact avec les vaches, ni au pâturage, ni au bâtiment. Elles ne sont donc pas de bonnes sentinelles de ce qui se passe dans le cheptel, contrairement à ce que l'on pourrait penser.



De plus, les génisses d'un an sont la catégorie de bovins la plus difficile à prélever pour plusieurs raisons. Elles sont assez sauvages car elles n'ont pas l'habitude d'être attrapées et, bien souvent, les éleveurs ne disposent pas d'un matériel de contention adéquat.

Au final, dans le cadre d'un dépistage du BVDV à l'échelle du troupeau, les génisses d'un an ne sont pas la catégorie de bovin à prélever en priorité, sauf peut-être à les prélever très tôt, au moment du sevrage.

De la même manière les génisses de deux ans sont conduites isolément du reste du troupeau dans presque la moitié des élevages. A ce titre, on peut aussi remettre en question leur valeur sentinelle.

Par contre, les résultats sérologiques des génisses de 3 ans sont un très bon indicateur de la présence ou de l'absence d'une forte circulation virale dans l'ensemble du cheptel.

Les génisses de 3 ans semblent être la catégorie de bovin à privilégier pour dépister une circulation virale intense et ainsi suspecter la présence d'un bovin IPI dans les élevages.

Une sérologie de mélange de 20 parmi l'ensemble des bovins de plus de 3 ans permet de distinguer les élevages ayant une séroprévalence inférieure à 30% des autres, avec une très bonne valeur prédictive. Toutefois, du fait du phénomène de saturation du kit ELISA, elle ne permet pas de faire la distinction entre les élevages à séroprévalence moyenne de ceux à séroprévalence élevée.

Ainsi, on peut penser qu'une sérologie de mélange de 20 parmi l'ensemble des bovins de plus de 3 ans, associée à des sérologies individuelles sur une partie des génisses de 3 ans, permette d'évaluer la circulation virale dans le cheptel.

## V. CONCLUSION

L'utilisation des sérologies de mélange peut permettre une économie non négligeable dans le dépistage de la BVD en troupeau allaitant.

Toutefois, l'interprétation des résultats est tributaire de la précision des informations épidémiologiques disponibles : constitution des lots, classe d'âge des animaux, historique de vaccination ...

Contrairement à ce que l'on pouvait penser, les génisses de l'année n'ont pas une bonne valeur descriptive de la situation récente de l'infection. On peut proposer une sérologie de mélange de 20 parmi l'ensemble des bovins de plus de 3 ans, qui semblent constituer les meilleures sentinelles. En fonction du résultat, elle pourra être associée à des sérologies individuelles sur un petit échantillon des femelles de 3 ans, surtout lorsque le résultat du ou des mélange(s) n'est pas univoque.

Enfin en fonction de l'objet de la recherche, le couplage sérologie de mélange / PCR de mélange peut aussi augmenter la valeur des conclusions diagnostiques.

## Résumé

**Les résultats séropositifs sont très stables à l'échelle de 3 ans et permettent bien d'envisager une analyse historique des profils sérologiques des cheptels observés par classe d'âge. Le résultat d'une sérologie de mélange de 20 reflète bien le statut infectieux du lot analysé. Par contre, le résultat d'une sérologie de mélange de 5 est trop sensible aux écarts individuels. Les résultats de sérologie de mélange de 20 sur tous les animaux ne sont pas corrélés à la séroprévalence du cheptel. Dans le cadre d'un dépistage organisé, il faut donc faire appel à un panachage de plusieurs techniques d'analyses.**

## Remerciements

Les auteurs remercient les éleveurs et les vétérinaires qui ont participé à l'enquête, l'Etablissement Départemental d'Elevage (EDE) du Cher pour l'extraction des données et le Conseil Général du Cher pour sa participation financière.

## Références bibliographiques

Thèse B.SAUTERAU (ENVN 2005)

SIMON J.-L., BEZILLE P., TOURATIER A.: Enquête Rhone-Alpes. *GDS-info* 115: 15-24, 1994

JOLY A., BEAUDEAU F.: Intérêt des tests de mélange pour la maîtrise de l'infection par le virus de la B.V.D. dans les troupeaux laitiers bretons. *Bulletin des GTV* 25: 475-479, 2004

HOUE H. : Sero logical analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. *Res Vet Sci* 53: 320-323, 1992

PETIT E.: BVD et maladie néonatale □ Enquête menée en Bourgogne. *GDS-info 118*, 1994