

**MISE EN EVIDENCE PAR LA TECHNIQUE ELISA  
DES ANTICORPS DIRIGES CONTRE LE VIRUS  
DE LA RHINOTRACHEITE BOVINE INFECTIEUSE  
A PARTIR DE MELANGES DE SERUMS :  
UN SONDAGE DANS LA REGION RHONE-ALPES.**

*B. PERRIN [1], J.L. ARDEEFF [2], M. PERRIN [1] et J. BRUNET [2]*

**RESUME :** Une enquête épidémiologique a été réalisée pour évaluer le taux de prévalence de la rhinotrachéite bovine infectieuse par la technique ELISA sur des mélanges de sérums dans les élevages de la Région Rhône-Alpes. Environ 25 p.cent des élevages ont été estimés infectés ; 2/3 d'entre eux renfermaient moins de 10 p. cent d'animaux infectés. L'étude a permis de mesurer l'efficacité des analyses sur les mélanges de sérums montrant qu'une augmentation de la sensibilité des réactifs commerciaux utilisés est nécessaire pour détecter les élevages peu infectés.

**SUMMARY :** An epidemiological survey has been carried out to evaluate the prevalence rate of infectious bovine rhinotracheitis by ELISA tests on pooled sera in the Rhône-Alpes area. About 25 p. cent of herds were estimated infected. In 2/3 of these herds, less than 10 p. cent of animals were infected. The study led to the evaluation of the efficacy of pool sera analysis, showing that the sensitivity of commercial reagents must be increased for the detection of low infected herds.

\*  
\* \*

La rhinotrachéite bovine infectieuse ou IBR est une maladie virale des bovins à tropisme essentiellement respiratoire. Une enquête nationale [Perrin et coll. 1981] réalisée en 1978 avait montré des taux de prévalence individuelle et d'élevage variables suivant les départements sondés. Il apparaît de plus en plus souhaitable que les responsables sanitaires de notre pays connaissent la prévalence actuelle de l'infection des élevages de façon à pouvoir envisager une stratégie pour positionner au mieux l'élevage français dans le contexte européen.

La mise en évidence des animaux infectés est classiquement réalisée en sérologie en particulier par la technique ELISA [Payment et coll., 1979 ; Solsona et coll., 1980 ; Perrin et coll., 1984].

-----  
\* Article reçu le 15 juin 1991, accepté le 18 septembre 1992.

[1] CNEVA, Laboratoire de Pathologie Bovine, 31 avenue Tony Garnier, BP 7033, 69342 Lyon Cédex 07.

[2] F.R.G.D.S. Rhône-Alpes - Actipole, 5 rue Hermann Frenkel, 69364 Lyon Cédex 07.

Pour des raisons de coût, il est intéressant d'envisager les sondages et les dépistages des élevages à partir de mélanges de sérums, encore faut-il que la sensibilité de la technique ELISA mise en oeuvre soit suffisante. Nous présentons ici les résultats d'un sondage réalisé dans la Région Rhône-Alpes avec des mélanges de sérums pour déterminer les taux de prévalence d'élevage et de l'infection des animaux dans les élevages. Dans le même temps on a évalué le test ELISA utilisé dans le sondage pour déterminer sa détectabilité lorsqu'il est appliqué aux mélanges de sérums.

## I - MATERIEL ET METHODES

### 1. CHOIX DES ELEVAGES ET DES ANIMAUX

Les élevages retenus font partie des départements de la région Rhône-Alpes à l'exception du département de la Haute-Savoie qui n'a pas participé au sondage. Suite à une enquête préalable (résultats non publiés) la taille de l'échantillon pour chaque département a été évaluée à 150 élevages qui ont été retenus au hasard (échantillon systématique) parmi les arrivées pour la prophylaxie de la brucellose.

Au total 1018 élevages ont été retenus se répartissant suivant les départements :

- 153 élevages dans l'Ain
- 148 élevages dans l'Ardèche
- 140 élevages dans la Drôme
- 120 élevages dans l'Isère
- 155 élevages dans la Loire
- 154 élevages dans le Rhône
- 148 élevages dans la Savoie

Pour tous les élevages, le sérum de tous les animaux de plus d'un an a été recueilli et les analyses ont été réalisées sur des mélanges d'un maximum de 10 sérums (de 7 à 10 sérums suivant les élevages)

Afin d'évaluer la prévalence de l'infection des animaux dans les élevages nous avons retenu 52 élevages parmi ceux trouvés infectés par les mélanges de sérums dans les départements de l'Ain et de la Loire où nous avons effectué des analyses individuelles avec le test ELISA.

Afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité du test ELISA nous avons comparé les résultats de ce test à ceux de la méthode de référence (HAP) en appliquant les deux tests sur 1337 sérums provenant de 50 élevages tirés au sort parmi ceux du sondage des départements de l'Ain et de la Loire.

Afin d'évaluer la détectabilité du test ELISA appliqué au mélange de sérums nous avons titré les sérums des animaux trouvés infectés lors de l'évaluation de la fiabilité de ce test sur les sérums individuels. Les titrages ELISA en dilution finale ont été réalisés en diluant les sérums dans un sérum négatif.

### 2. LES TECHNIQUES SEROLOGIQUES UTILISEES

La technique (HAP) décrite précédemment [Dannacher et coll., 1979] a été utilisée pour l'analyse des sérums individuels. Le réactif commercial Pourquier a été utilisé pour tous les tests ELISA à l'exception du sondage des élevages de l'Ain réalisé avec le réactif commercial Rhône-Mérieux. Celui-ci a également été utilisé en double avec le réactif Pourquier pour les titrages.

## II - RESULTATS

### 1. EVALUATION DE LA TECHNIQUE ELISA

#### 1.1. Sensibilité et spécificité de la technique ELISA Pourquoiier sur sérums individuels

Les résultats obtenus sur les 1337 sérums recueillis dans 50 élevages prélevés au hasard sont portés dans le tableau I de contingence qui montre une bonne spécificité et une sensibilité faible de la technique ELISA Pourquoiier par rapport à la technique de référence HAP.

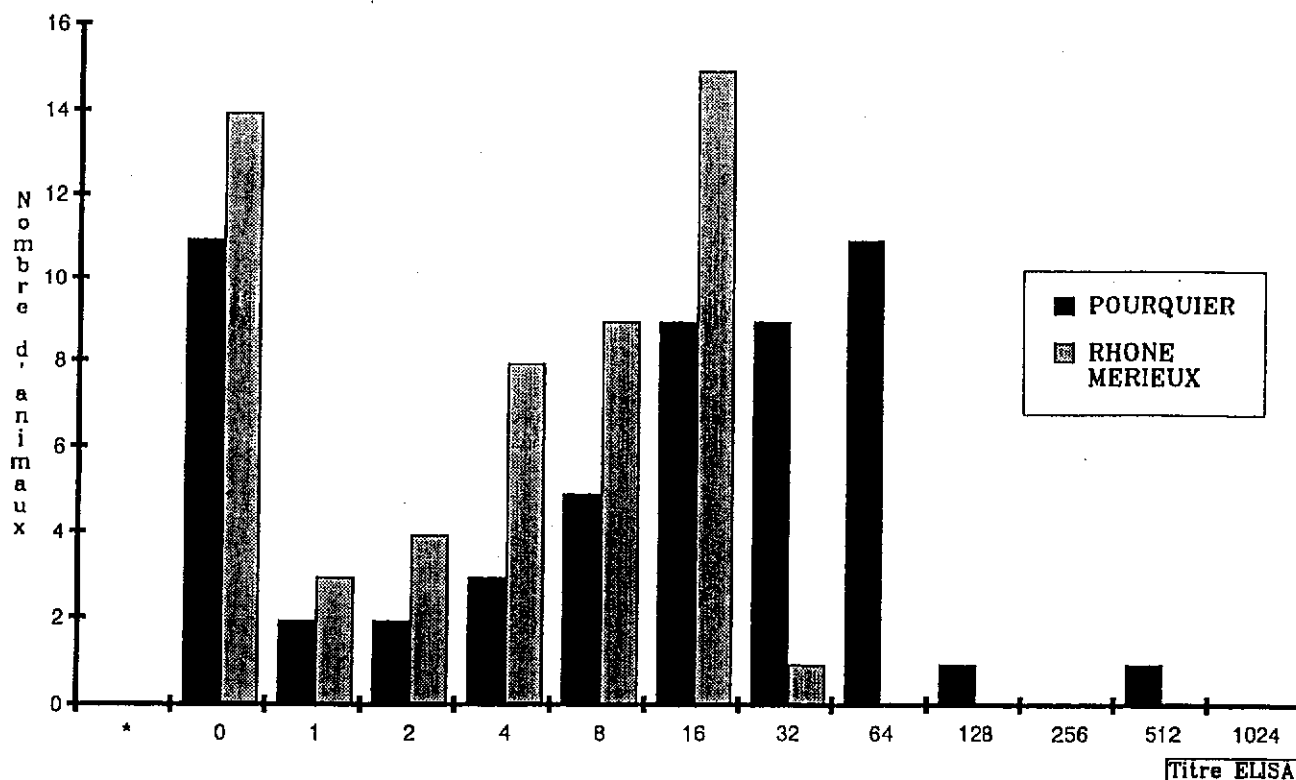
Tableau I : Tableau de contingence des résultats obtenus sur sérums individuels

		HAP	
		+	-
ELISA POURQUIER	+	43	1
	-	11	1.282
Spécificité = 0,999 Sensibilité = 0,80			

#### 1.2. Détectabilité des techniques ELISA Pourquoiier et Rhône-Mérieux sur les sérums individuels et application au mélange de sérums

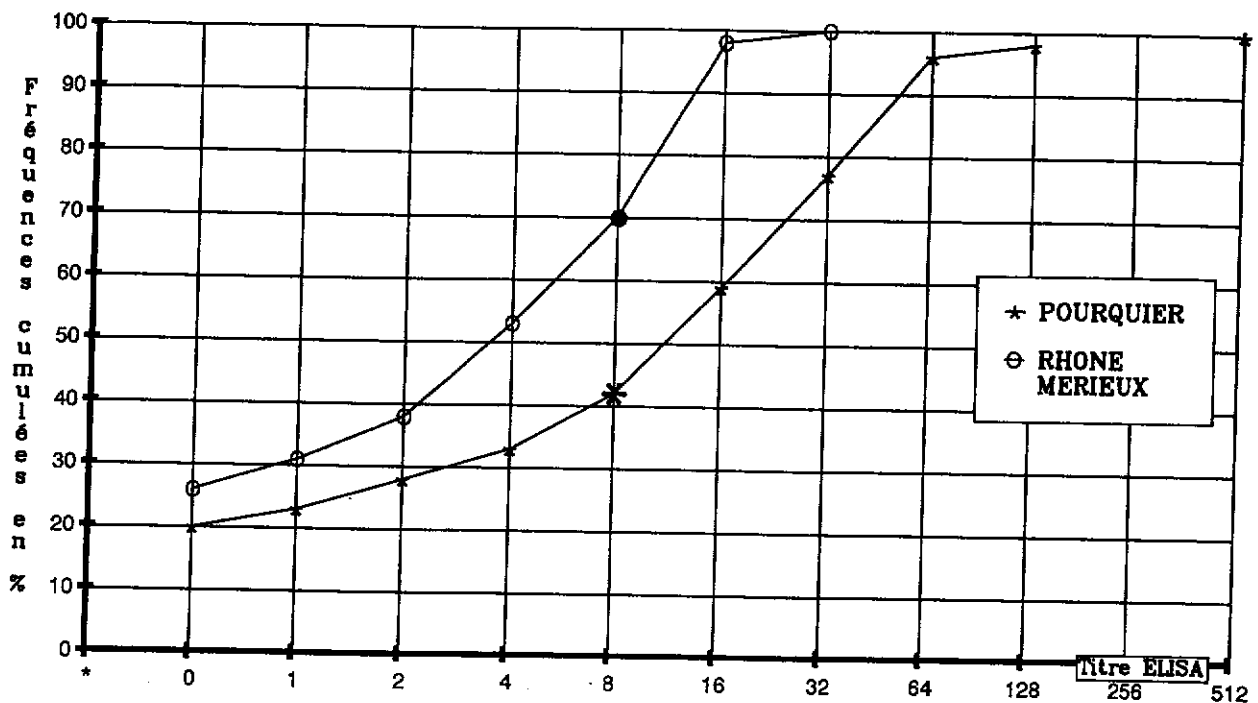
La répartition des titres ELISA, obtenus avec les techniques Pourquoiier et Rhône-Mérieux, des sérums reconnus infectés par la technique HAP est présentée sur l'histogramme de la figure 1. Parmi les 54 sérums positifs en HAP, 11 sérums étaient négatifs en technique Pourquoiier et 14 étaient négatifs en technique Rhône-Mérieux (comprenant les 11 sérums précédents). Parmi les 14 sérums, 9 ont pu être analysés avec un autre réactif commercial (Norden) qui a montré 7 résultats positifs.

Figure 1 : Histogramme des titres ELISA des 54 sérums positifs en HAP.



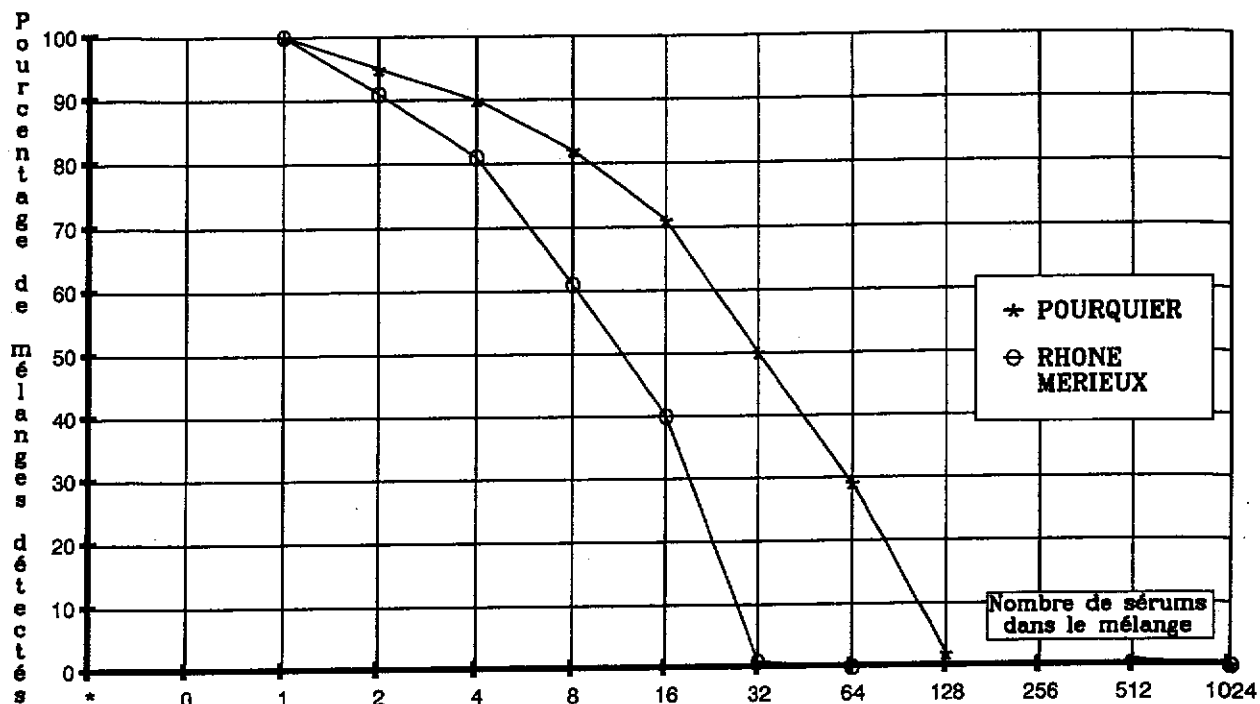
La courbe des fréquences cumulées des titres présentée sur la figure 2 indique que lorsqu'ils sont mélangés à 7 sérums d'animaux indemnes, 40 p. cent des sérums des animaux infectés ne sont pas détectés avec le réactif Pourquoiier et 70 p.cent ne sont pas détectés avec le réactif Rhône-Mérieux.

Figure 2 : Fréquence cumulée en fonction des titres ELISA de 54 sérums positifs en HAP. Pourcentages de sérums non détectés dans un mélange de 8 (1 seul sérum positif dans le mélange).



La diminution de la détectabilité résultant de l'utilisation de la technique ELISA sur des mélanges de sérums par rapport aux résultats des analyses réalisées avec la même technique sur les sérums individuels est illustrée sur la figure 3 pour laquelle seuls les sérums positifs en technique ELISA individuelle ont été pris en compte. Les titres des sérums (représentant le nombre de sérums du mélange) associés à l'inverse des fréquences cumulées (représentant le pourcentage de mélanges détectés) permettent d'évaluer les chances de détecter un seul sérum positif dans le mélange. Environ 20 p.cent des animaux infectés ne sont pas détectés dans un mélange de 8 sérums avec le réactif Pourquoiier et près de 40 p.cent ne sont pas détectés avec le réactif Rhône-Mérieux.

Figure 3 : Pourcentage de mélanges détectés en ELISA en fonction de la taille du mélange de sérums (1 seul sérum positif dans le mélange).



## 2. TAUX DE PREVALENCE APPARENTE DES ELEVAGES INFECTES

Les résultats obtenus lors des sondages sur les mélanges de sérums dans les différents départements sont portés dans le tableau II où le taux de prévalence apparente moyenne pour la Région approche 20 p. cent.

Tableau II : Taux de prévalence des élevages infectés

Département	Nombre d'élevages sondés	Nombre d'élevages infectés	Taux de prévalence
Ain	153	18	11,8 + 5 %
Ardèche	148	34	23 + 6,6 %
Drôme	140	23	16,4 + 5,8 %
Isère	120	10	8,3 + 4,9 %
Loire	155	40	25,8 + 6,8 %
Rhône	154	18	11,7 + 5 %
Savoie	148	54	36,5 + 7,6 %
Région	1.018	197	19,4 + 2,4 %

## 3. TAUX DE PREVALENCE DE L'INFECTION DES ANIMAUX DANS LES ELEVAGES A REPONSE POSITIVE SUR TEST DE MELANGE

La répartition des pourcentages d'élevages infectés en fonction du nombre d'animaux infectés est présentée dans le tableau III. 69 p. cent des élevages ont 1 ou 2 animaux infectés.

La répartition du pourcentage d'élevages infectés en fonction du pourcentage d'animaux infectés est présentée dans le tableau IV. 65 p. cent des élevages ont au plus 10 p. cent de leur animaux infectés.

Tableau III : Répartition des élevages infectés en fonction du nombre d'animaux infectés

	Nombre d'animaux infectés					Total
	1	2	3 à 5	6 à 10	> 10	
Nombre d'élevages	23	13	6	7	3	52
Pourcentage d'élevages	44	25	12	12	6	100

Tableau IV : Répartition des élevages infectés en fonction du pourcentage d'animaux infectés

	Pourcentage d'animaux infectés						Total
	0 à 5	6 à 10	11 à 20	21 à 30	31 à 40	> 40	
Nombre d'élevages	19	15	7	4	6	1	52
Pourcentage d'élevages	36	29	13	8	12	2	100

#### 4. TAUX DE PREVALENCE REELLE DES ELEVAGES INFECTES

Les résultats des analyses individuelles en HAP réalisées pour les 50 élevages de la phase d'évaluation de la fiabilité de la technique ELISA et les résultats obtenus pour ces élevages sur des mélanges de 10 sérums par la technique ELISA Pourquier nous permettent de dresser le tableau V de contingence.

En tenant compte de la sensibilité et de la spécificité de la technique ELISA Pourquier sur les mélanges de sérums nous pouvons calculer la prévalence réelle suivant la relation :

$$Pa = \text{sensibilité} \times P + (1 - \text{spécificité}) \times (1 - P)$$

Pa = prévalence apparente

P = prévalence réelle

Soit dans notre cas, puisque la spécificité est égale à 1 :

$$P = \frac{19,4}{0,8} = 24,5$$

Tableau V : Tableau de contingence réunissant les résultats obtenus avec la sérologie individuelle (HAP) et la sérologie ELISA Pourquier sur des des mélanges de 10 sérums.

		Nombre d'élevages étudiés en sérums individuels	
		Elevages infectés	Elevages non infectés
Nombre d'élevages à mélanges de sérums	+	12	0
	-	3	35

### III - DISCUSSION

#### 1. EVALUATION DE LA TECHNIQUE ELISA

##### 1.1. En analyses individuelles

La technique HAP utilisée en routine dans notre laboratoire et comme référence dans notre étude avait montré une très bonne concordance, tant du point de vue qualitatif que quantitatif, avec différentes techniques de séroneutralisation [Dannacher et coll., 1979].

La sensibilité des réactifs ELISA s'est révélée inférieure à celle de l'HAP et parmi les techniques ELISA, la sensibilité de la technique Rhône Mérieux inférieure à celle de la technique Pourquier. En raison de quantités insuffisantes, les 14 sérums qui ont donné des résultats divergents entre la technique HAP et les 2 techniques ELISA, n'ont pas pu être contrôlés en séroneutralisation ; les résultats obtenus avec le réactif ELISA Norden confirment le manque de sensibilité des 2 réactifs utilisés dans l'enquête.

La spécificité de l'ELISA Pourquier par rapport à l'HAP est excellente.

##### 1.2. En analyses de mélange

L'étude de la sensibilité de la technique ELISA pour les échantillons de mélange repose sur la répartition des titres en ELISA des sérums positifs que nous avons choisis. La méthode de choix des sérums des animaux infectés a été mise en place de façon à avoir la répartition la plus exacte possible des titres des sérums des animaux des départements de l'Ain et de la Loire. Une taille plus grande de l'échantillon aurait peut être permis une exactitude plus importante mais elle ne pouvait pas être mise en oeuvre pour des raisons de coût. Nous considérons notre échantillonnage comme suffisamment représentatif pour souligner la différence de sensibilité entre l'analyse individuelle HAP et l'analyse de mélange en ELISA. Dans le cas des mélanges de 10 sérums qui sont souvent utilisés dans les laboratoires d'analyse le risque de ne pas détecter un animal infecté lorsque son sérum est mélangé à 9 sérums provenant d'animaux non infectés est grand : environ 1 fois sur 2 avec le réactif Pourquier et 8 fois sur 10 avec le réactif Mérieux. Si on compare les performances de la technique ELISA, sur les sérums individuels et de la technique ELISA sur les mélanges de sérums le résultat obtenu est divisé environ par un facteur deux, mais il ne tient pas compte du manque de sensibilité de la technique ELISA individuelle qui doit être améliorée.

#### 2. TAUX DE PREVALENCE DES ELEVAGES INFECTES DANS LA REGION RHONE-ALPES

La taille de l'échantillon utilisé a été calculée pour être représentative de l'ensemble des élevages de la région Rhône-Alpes. Le taux de prévalence apparente de l'IBR trouvé pour les élevages de la Région Rhône-Alpes (environ 20 p.cent) s'appuyant sur des analyses de mélange de sérums est sous-estimé. De plus, il est quelque peu biaisé à cause de l'utilisation dans l'Ain du réactif Rhône-Mérieux ayant montré une sensibilité inférieure à celle du réactif Pourquier utilisé dans les autres départements.

Le taux de prévalence réelle d'environ 25 p.cent calculé en tenant compte des résultats obtenus sur sérums individuels en HAP et sur les mélanges des mêmes sérums en ELISA Pourquier doit être considéré avec prudence en raison du faible nombre d'élevages retenus (50 élevages) parmi lesquels seulement 15 étaient infectés.

Pour une raison identique la sensibilité du test ELISA Pourquoiier pour les analyses de mélange (sensibilité : 80 p. cent donc 20 p.cent des élevages infectés ne sont pas détectés avec des mélanges de 10 sérums) correspond simplement à une indication.

En revanche, les calculs théoriques réalisés avec le titrage des sérums des animaux infectés retenus au hasard permettent d'envisager les limites de la technique en fonction du taux moyen d'infection des élevages et du nombre de sérums présents dans le mélange.

Il n'est pas exclu que pour quelques animaux nous ayons mesuré des anticorps d'origine vaccinale. Les différences de taux observées entre les départements sont parfois importantes : nous n'avons pas d'explications précises pour expliquer ces variations.

### **3. UTILISATION DES MELANGES DE SERUMS DANS LE CADRE D'UNE PROPHYLAXIE**

Le recours à des mélanges de sérums permet de réaliser à moindre coût des dépistages et des sondages. Notre étude montre que (au moins dans les départements de l'Ain et de la Loire) pour la plupart les élevages sont très peu infectés (valeurs sous-estimées puisqu'elles ne tiennent pas compte des élevages infectés négatifs en ELISA de mélange) et que tous ne seront pas détectés avec des mélanges de sérums, la taille du mélange et la détectabilité du réactif étant prépondérantes. La technique utilisant les échantillons de mélange permet de détecter les élevages renfermant plusieurs animaux infectés. Si on considère que les élevages renfermant un petit nombre d'animaux infectés sont peu dangereux, elle peut être alors utilisée pour apprécier grossièrement l'état sanitaire d'un département ou d'une région, mais en aucun cas elle ne peut, dans l'état actuel de la sensibilité des réactifs ELISA, conduire à une qualification d'élevage, de département ou de région indemne.

Les résultats que nous avons obtenus n'ont de valeur que pour les lots de réactifs que nous avons mis en pratique, la plus grande partie des analyses étant intervenues en 1990 et début 1991. L'évolution de la qualité des réactifs (notamment en matière de sensibilité) devrait permettre une utilisation plus sûre des échantillons de mélange et pose le problème du contrôle des réactifs proposés en fonction de leur utilisation sur le terrain.

Dans ce cadre nous avons proposé en octobre 1991 à l'ensemble des producteurs de réactifs un sérum de référence pour étalonner la sensibilité des réactifs sous une forme analogue à ce qui est réalisé actuellement pour ceux destinés au dépistage de la leucose bovine enzootique. En considérant que nous avons trouvé des sérums avec des titres très faibles et qu'il existe des élevages très peu infectés, les résultats obtenus pour ce sérum avec les différentes techniques sérologiques disponibles indiquent la détectabilité minimale que devrait montrer un réactif ELISA pour dépister un sérum positif parmi 10 et un lait positif parmi 50. Dans le cas où les producteurs pourront relever ce défi méthodologique, nous validerons la qualité des nouveaux réactifs à l'aide d'une étude sur le terrain. Dans le cas contraire, il sera nécessaire de privilégier les analyses individuelles.

Dans notre étude nous n'avons pas abordé l'évaluation des résultats qui pourraient être obtenus par la technique ELISA sur les laits de tank des élevages laitiers. Les performances des réactifs mis en oeuvre avec ces laits doivent être étudiées. On peut penser que l'on retrouvera une situation analogue à celle obtenue avec des mélanges de sérums : les analyses révéleront les élevages les plus infectés.



## REMERCIEMENTS

Nous remercions les Directeurs des Laboratoires Vétérinaires Départementaux de la Région Rhône-Alpes, Mrs J.J. Bénet et M. Eloit de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort et Mmes P. Bettas-Begalin, M.F. Montagne et M. Ruin du Laboratoire de Pathologie Bovine pour l'aide apportée à la réalisation de ce travail.

## BIBLIOGRAPHIE

- DANNACHER G., PERRIN M. et PERRIN B.- Utilisation d'une technique d'hémagglutination passive pour la détection des anticorps contre le virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse. *Rec. Méd. Vét.*, 1979, **155**, 633-637.
- PAYMENT P., ASSAF R., TRUDEL M. and MAROIS P.- Enzyme-linked immunosorbent assay for serology of infectious Bovine Rhinotracheitis virus infections. *Clin. Microbiol.*, 1979, **10**, 633-636.
- PERRIN M., DANNACHER G., COUDERT M. et FEDIDA M.- La rhinotrachéite bovine infectieuse : résultats de l'enquête nationale 1978. *Rec. Méd. Vét.*, 1981, **157**, 485-490.
- PERRIN B., TIXIER G., DANNACHER G., SOULA A., MOUSSA A., GOYON M., LEGARDINIER J.C., MILLET A. et PROTIN P.- Rhinotrachéite bovine infectieuse, utilisation d'un "Kit ELISA" pour la détection des anticorps dans les sérums et dans les laits. *Rec. Méd. Vét.*, 1984, **160**, 755-761.
- SOLSONA M., PERRIN B., PERRIN M. et MOUSSA A.- Recherche des anticorps contre le virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse par la méthode ELISA. *Bull. Acad. Vét. France*, 1980, **53**, 215-225.

\*  
\* \*