

COMPARAISON DES RESULTATS D'UNE TECHNIQUE ELISA REALISEE SUR DES SERUMS, DES LAITS INDIVIDUELS ET DES LAITS INDIVIDUELS ADDITIONNES DE CONSERVATEUR, EN VUE DE LA MISE EN EVIDENCE D'ANTICORPS DIRIGES CONTRE L'ARTHRITE ENCEPHALITE CAPRINE VIRALE

Utilisation pour le dépistage des troupeaux infectés *

C. Benoit¹, G. Perrin¹ et C. Baudry¹

RESUME : Les auteurs comparent les résultats d'une technique ELISA visant à mettre en évidence les anticorps dirigés contre le virus de l'arthrite encéphalite caprine virale (AECV), à partir de prélèvements individuels de sérum, de lait et de lait additionné de conservateur. Par rapport aux résultats obtenus sur les sérums, la spécificité des techniques réalisées sur les laits reste supérieure à 98 p. cent, mais la sensibilité diminue en ne dépassant pas 88,4 p. cent pour les laits et 87,0 p. cent pour les laits additionnés de conservateur. Cet inconvénient est toutefois largement compensé par les avantages liés à la diminution des coûts due, notamment, à l'utilisation de prélèvements destinés, dans de nombreux élevages, au contrôle de performances.

SUMMARY : Individual milks without and with preservative were found to be suitable for serological diagnosis of caprine arthritis encephalitis virus. As compared to individual sera, the relative specificity was over 98 p. cent, but the sensitivity decreases to 88,4 p. cent and 87,0 p. cent respectively. Nevertheless, such disadvantage is corrected according to the advantages of use samples collected for other uses as animal recording.

I - INTRODUCTION

Le virus de l'arthrite encéphalite caprine virale (AECV) est un lentivirus qui provoque une maladie chronique caractérisée principalement par des lésions d'évolution lente d'arthrite, de pneumonie, de mammite et plus rarement d'encéphalite [Adams *et al.*, 1984 ; Dawson, 1987]. L'incidence économique de cette maladie peut être sévère en raison des réformes prématurées qu'elle provoque et des baisses de production laitière consécutives aux mammites chroniques.

Pour prévenir de telles conséquences, des programmes de contrôle et d'éradication ont été développés dans différents pays, et depuis juillet 1994 en France, qui reposent tous sur la détection sérologique et, dans certaines conditions, sur l'abattage des animaux infectés [Ellis *et al.*, 1983 ; East *et al.*,

1987 ; Rowe *et al.* 1992 ; Arrêtés ministériels des 6, 7 et 8 juillet 1994]. Toutefois, l'efficacité de tels programmes dépend en partie de la sensibilité et de la spécificité des techniques sérologiques utilisées pour la détection des animaux infectés.

Différentes techniques ELISA développées à partir d'antigènes constitués soit de virus totaux purifiés soit à partir de protéines recombinantes [Archambault *et al.*, 1988 ; Zaroni *et al.*, 1994] sont aujourd'hui utilisées pour la mise en évidence des anticorps dirigés contre le virus de l'AECV dans le sérum. Ces techniques ELISA sont aujourd'hui utilisées sur le lait pour la mise en évidence d'anticorps dirigés contre d'autres agents infectieux tels que l'herpès virus de type 1

* Texte reçu le 25.09.97, accepté le 15.03.98

¹ Station régionale de pathologie caprine de Niort ; Laboratoire associé au CNEVA, Laboratoire national de référence pour l'arthrite encéphalite caprine virale, B.P. 3081 79012 Niort France

[Perrin *et al.*, 1984], la leucose enzootique bovine [Perrin *et al.*, 1986 ; Florent *et al.*, 1988 ; Kerkhofs *et al.*, 1991], ceci en raison des avantages en terme de facilité de prélèvement et de coût. Les prélèvements de lait qui demandent une moindre technicité que les prélèvements sanguins sont en effet plus faciles à pratiquer ; par ailleurs et surtout, dans la plupart des élevages caprins laitiers, ils sont réalisés sur chaque animal mensuellement tout au long de la lactation dans le cadre des opérations de contrôle laitier de performances. Il est ainsi possible à partir de ces prélèvements existants, de réaliser des investigations complémentaires au même titre que celles faites pour la leucose ou la brucellose bovines. Dans ce contexte, il nous est paru opportun de comparer les résultats obtenus à l'aide

d'une technique ELISA à partir d'une part, de sérums et, d'autre part, de laits sans conservateur et de laits additionnés de conservateur, ceci afin de respecter les modalités correspondant au traitement des prélèvements mis en œuvre dans le cadre du contrôle laitier des performances.

A partir des résultats obtenus, nous avons tenté d'évaluer les conditions dans lesquelles ces prélèvements de lait pouvaient être utilisés en sondages pour identifier les élevages susceptibles de répondre aux exigences du contrôle sanitaire officiel et en particulier ceux dont le niveau de prévalence n'excédait pas 15 p. cent et qui pouvaient par conséquent bénéficier d'aides publiques en vue de leur assainissement.

II - MATERIEL ET METHODES

A. LES ELEVAGES ET LES ANIMAUX

Trois cent soixante huit chèvres laitières ont été sélectionnées dans huit troupeaux. Un d'entre eux (n°3) était qualifié indemne au regard du contrôle sanitaire officiel, un autre (n°4) était en cours d'assainissement, alors que les six autres étaient fortement infectés.

B. LES PRELEVEMENTS DE SANG ET DE LAIT

Sur chacune des 368 chèvres, un prélèvement de sang a été réalisé par ponction à la veine jugulaire et deux prélèvements de lait ont été réalisés et répartis dans deux flacons de 50 ml, l'un ne contenant pas de conservateur, l'autre contenant un conservateur utilisé par les laboratoires interprofessionnels laitiers : le bromopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol ; Bromopol® Aldrich Co., Riedstrasse 2, 89555 Steinheim, Germany) à la dilution de 1/200. Après 24 heures au réfrigérateur à 4°C, et coagulation, les prélèvements de sang ont été centrifugés et le sérum a été récolté. Les sérums ainsi récoltés et les laits sans conservateur ont été traités dans les 24 heures alors que les laits additionnés de conservateur l'ont été après 8 jours de stockage au réfrigérateur à 4°C, ceci pour simuler au mieux les conditions observées couramment sur le terrain.

C. LA METHODE ELISA

La mise en évidence des anticorps anti-AECV a été réalisée à l'aide d'une technique ELISA (Chekit CAEV/MVV © Dr Bommeli AG, Bern, Suisse ; Hoecht Roussel Vétérinaire).

L'antigène est un virus total hautement purifié, préparé à partir d'une culture de virus maëdi-visna (souche ovine Suisse). Deux cent microlitres de sérum préalablement dilué

au 1/10 et 200 µl de lait préalablement dilué au 1/2 sont déposés dans chaque puits et incubés 90 minutes à température ambiante. Après lavage de la microplaque, 100 µl de conjugué marqué à la peroxydase, dilué préalablement au 1/200, sont ajoutés au sérum.

Après une seconde incubation de 90 minutes à température ambiante, l'excès de conjugué est éliminé par un nouveau lavage de la microplaque et 100 µl de chromogène sont déposés sur le complexe antigène-anticorps. Les densités optiques (DO) sont lues sur un lecteur ELISA automatique (Labsystems ; EMS Reader MF) à 405 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage (p. cent ech) et calculés selon la formule suivante en prenant en compte la DO d'un sérum témoin positif (DO pos) et celle d'un sérum témoin négatif (DO neg).

$$\% \text{ échantillon} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO témoin négatif}}{\text{DO témoin positif} - \text{DO témoin négatif}} \times 100$$

Dans l'étude, le seuil de positivité a été fixé à 10 p. cent, ceci pour tenir compte des conclusions des études de validation réalisées dans le cadre de l'évaluation officielle des tests [Saunders *et al.*, 1996].

D. ANALYSE STATISTIQUE

Les tests de concordance ont été réalisés à l'aide du logiciel Episcopo software fonctionnant sur IBM PC [Frankena *et al.*, 1990]. Les valeurs du Kappa supérieures à 0,8 ont été considérées comme hautement significatives [Landis *et al.*, 1977]. La méthode d'échantillonnage permettant d'estimer les effectifs nécessaires pour déterminer le statut sanitaire des troupeaux est celle décrite par Toma *et al.* [1996].

III - RESULTATS

A. ANALYSE GLOBALE DES RESULTATS

Les résultats obtenus à partir des différents échantillons analysés figurent dans le tableau I.

Les résultats bruts enregistrés sur les laits et sur les laits avec conservateur permettent de mettre en évidence une diminution progressive des pourcentages de prélèvements détectés positifs.

B. CONCORDANCE, SENSIBILITE ET SPECIFICITE DU TEST ELISA

Les résultats figurent dans le tableau II.

La valeur du Kappa concernant les résultats obtenus à partir des sérums et des laits d'une part et celle des résultats obtenus à partir des sérums et des laits avec conservateur d'autre part sont respectivement de 0,86 et 0,84.

La concordance globale entre ces tests apparaît hautement significative avec des valeurs de Kappa supérieures à 0,80 ($p < 0,05$). Les résultats de cette étude montrent que la technique ELISA réalisée à partir des sérums s'avère plus sensible qu'à partir des laits et des laits avec conservateur. La sensibilité du test est respectivement de 88,4 p. cent pour les laits sans conservateur et de 87,0 p. cent pour les laits avec conservateur. Pour ce qui concerne la spécificité, elle est respectivement de 99,3 p. cent et 98,7 p. cent.

TABLEAU I

Comparaison des résultats sur les différents échantillons

ELEVAGES	ECHANTILLONS	NOMBRE DE SERUMS POSITIFS		NOMBRE DE LAITS POSITIFS		NOMBRE DE LAITS AVEC CONSERVATEUR POSITIFS	
		N	%	N	%	N	%
1	36	30	83,3	28	77,8	27	75,0
2	56	56	100	54	96,4	53	94,6
3	46	0	0,0	0	0,0	0	0,0
4	46	4	8,7	0	0,0	0	0,0
5	46	43	93,5	36	78,3	39	84,8
6	46	43	93,5	44	95,7	44	95,7
7	46	11	23,9	4	8,7	4	8,7
8	46	29	63,0	26	56,5	23	50,0
Total	368	216	58,7	192	52,2	190	51,6

TABLEAU II

Sensibilité et spécificité comparées

SERUMS	LAITS			LAITS AVEC CONSERVATEUR		
	Négatifs	Positifs	Total	Négatifs	Positifs	Total
Négatifs	151	1	152	150	2	152
Positifs	25	191	216	28	188	216
Total	176	192	368	178	190	368
	Concordance		92,9 %	Concordance		91,8 %
	Sensibilité		88,4 %	Sensibilité		87,0 %
	Spécificité		99,3 %	Spécificité		98,7 %

C. UTILISATION DES TESTS ELISA A PARTIR DE SERUMS ET DE LAITS AVEC CONSERVATEUR

Considérant qu'au terme de cette étude, la sensibilité optimale des tests ELISA réalisés à partir de laits avec conservateur est de 87 p. cent par rapport au même test effectué sur le sérum, nous avons calculé le nombre d'échantillons qu'il était nécessaire d'analyser pour mettre en

évidence avec un niveau de certitude de 95 p. cent la maladie dans un troupeau dont la proportion d'atteinte des animaux était au plus égale à 15 p. cent. Si sur un tel échantillon, tous les résultats sont négatifs, on peut ainsi affirmer que la proportion d'animaux infectés est inférieure à 15 p. cent. En fonction de l'effectif du troupeau, le nombre d'échantillons à analyser figure dans le tableau III.

TABLEAU III

Nombre de prélèvements à examiner pour détecter la maladie au sein d'un élevage dont la prévalence s'élève à 15 %

Effectif de l'élevage	NOMBRE D'ECHANTILLONS A ANALYSER	
	Sérums	Laits avec conservateur
10	8	10
20	12	14
30	14	16
40	15	17
50	15	18
60	16	18
70-80	16	19
90-100	17	19
130-150	17	20
180-250	18	20
270-500	18	21

IV - DISCUSSION

Différentes techniques ELISA ont été utilisées sur le lait pour la mise en évidence d'anticorps dirigés contre certains virus tels que l'herpès virus de type I [Perrin *et al.*, 1984] ou la leucose enzootique bovine [Perrin *et al.*, 1986 ; Florent *et al.*, 1988 ; Kerkhofs *et al.*, 1991], ceci en raison de la plus grande facilité à pratiquer les prélèvements de lait que les prélèvements de sang et, par ailleurs, en raison du fait que dans la plupart des élevages laitiers, ils sont réalisés mensuellement dans le cadre des opérations de contrôle de performances. La présente étude fait apparaître que la sensibilité de la technique réalisée à partir des laits est plus faible que celle réalisée à partir des sérums et que cette sensibilité diminue encore légèrement avec les laits additionnés de conservateur. Si l'intérêt pratique de l'utilisation des laits reste limité, en revanche celui des laits additionnés de conservateur est important et tient au fait que dans les conditions courantes, ces analyses peuvent être

réalisées sur des échantillons existants, destinés au contrôle laitier. Cet intérêt compense largement, en terme de coût, le déficit de sensibilité. Les résultats démontrent que cette technique mise en œuvre sous forme de sondage, peut être avantageusement utilisée pour des opérations d'enquêtes ou de dépistage du statut sanitaire des élevages. Des dépistages systématiques réalisés à partir des prélèvements destinés au contrôle laitier permettraient à moindre coût de repérer des troupeaux dont le niveau de prévalence n'excède pas 15 p. cent. Ils pourraient ensuite être intégrés après contrôle sérologique sur la totalité de l'effectif, dans la catégorie de ceux qui peuvent bénéficier des aides publiques prévues dans le cadre du contrôle sanitaire officiel. Ceci permettrait vraisemblablement d'augmenter le nombre de ces troupeaux qui aujourd'hui sont exclus essentiellement en raison des coûts financiers nécessaires à la connaissance précise de leur statut sanitaire.

V - BIBLIOGRAPHIE

- Adams D.S., Oliver R.E., Ameghino E., DeMartini J.C., Vervoerd D.W., Houvers D.J., Weghela S., Gorham J.R., Hylseth B., Dawson M., Trigo F.J., and McGuire T.C. ~ Global survey of serological evidence of caprine arthritis encephalitis infection. *Vet. Rec.*, 1984, 115, 493-495.
- Archambault D., East N., Perk K. and Dahlberg J.E. ~ Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine arthritis encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26, 971-975.
- Cutlip R.C., Jackson T.A. and Lehmkühl H.D. ~ Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, 1977, 38, 1081-1084.
- Dawson M. ~ Pathogenesis of maëdi-visna. *Vet. Rec.*, 1987, 120, 451-454.
- Ellis T., Robinson W. and Wilcox G. ~ Effects of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. *Aust. Vet. J.*, 1983, 60, 326-329.
- East N.E., Rowe J.D., Madewell B.R. and Floyd K. ~ Serological prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1987, 190, 182-186.
- Florent G., Delgoffe J.C. and Zygraich N. ~ Detection of antibodies to bovine leukemia virus in bovine milk samples with an ELISA involving two monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.*, 1988, 18, 89-93.
- Frankena K., Noordhuizen J.P., Willeborg P., Van Voorthyusen P.F. and Goelena J.O. ~ Episcopes : computer programs in veterinary epidemiology. *Vet. Rec.*, 1990, 126, 573-576.
- Kerkhofs P., Knapen K., Tuytens N., Wullepit J. and Mammericks M. ~ Diagnosis of bovine leukosis by ELISA on milk samples-advantages and disadvantages. *Ann. Méd. Vét.*, 1991, 135, 93-100.
- Landis J.R. and Koch G.G. ~ The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 1977, 33, 159-174.
- Perrin B., Tixier G., Dannacher G., Soula A., Moussa A., Goyon M., Legardinier J.C., Millet A. and Protin P. ~ Infectious bovine rhinotracheitis. Use of an ELISA kit to detect antibodies in serum and milk. *Rec. Méd. Vét.*, 1984, 160, 755-761.
- Perrin B., Perrin M., Fedida M. and Berger B. ~ Enzootic bovine leukosis : study of 11 herds and different diagnostic techniques. *Revue Méd. Vét.*, 1986, 137, 869-845.
- Rowe J.D., East N.E., Thurmond M.C., Franti E., and Petersen N.C. ~ Cohort study of natural transmission and 2 methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *Am. J. Vet. Res.*, 1992, 53, 2386-2395.
- Saunders M., Perrin G., Benoit C. et Baudry C. ~ Evaluation d'une technique immuno-enzymatique (ELISA), Propositions de modification de la réglementation en vigueur. Rapport Ministère de l'Agriculture et de la Pêche ; Direction Générale de l'Alimentation, 1996.
- Toma B., Dufour B., Sanaa M., Bénét J.J., Ellis P., Moutou F. et Louzà A. ~ Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures, 546 pages, Ed. Association pour l'étude de l'épidémiologie des maladies animales AEEMA, 7, avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons Alfort, France, 1996.
- Zanoni R.G., Vogt H.R., Pohl B., Böttcher J., Bommeli W. and Peterhans E. ~ An ELISA Based on Whole Virus for the Detection of Antibodies to Small-ruminant Lentiviruses. *J. Vet. Med. B.*, 1994, 41, 662-669.