

COMPARAISON DES DEPISTAGES DE LA RHINOTRACHEÏTE INFECTIEUSE BOVINE PAR ANALYSES INDIVIDUELLES DE SERUMS ET PAR ANALYSES DE MELANGES DE SERUMS DANS LE CADRE DU PROTOCOLE D'ACQUISITION DE L'APPELLATION NATIONALE "CHEPTEL CONTROLE EN I.B.R." (DITE "B")

E. Petit¹, S. Erimund², M. Blondet³, P. Very³
et Géraldine Harly-Gerster²

RESUME : Deux cents cheptels de Côte-d'Or et de Saône-et-Loire ont été sélectionnés parce qu'ils détenaient des bovins séropositifs à l'IBR exclusivement âgés de plus de 48 mois. Dans ces cheptels, tous les bovins âgés de moins de 48 mois ont été analysés par un kit ELISA gB par mélanges de 10 sérums tous négatifs, puis réanalysés par sérologie individuelle. Dans ce contexte épidémiologique particulier, 3,1 pour mille des bovins âgés de moins de 48 mois issus de mélanges séronégatifs étaient malgré cela individuellement séropositifs. Cependant, les analyses complémentaires par d'autres kits ELISA et la séroneutralisation, associées aux données épidémiologiques, font sérieusement douter de la réelle positivité de la majeure partie de ces sérums. Diverses hypothèses sont envisagées pour expliquer les différences de résultats observées entre les deux départements.

SUMMARY : Two hundred herds of Côte-d'Or and Saône-et-Loire departments were selected because they had IBR seropositive heads of cattle only older than 48 months. Within these herds, all cattle younger than 48 months were tested by a gB ELISA kit, first by 10 pooled sera, all negative, then by individual serology. In this specific epidemiological context, 3,1 ‰ of cattle younger than 48 months, coming from negative pooled sera, were, however, positive as single sera. Nevertheless, additional analysis through other ELISA kits and seroneutralisation, linked to epidemiological data, bring some doubt about the reality of the most part of these data. Different hypotheses are developed to explain the results differences observed between the two departments.



I - INTRODUCTION

La mise en place d'appellations nationales relatives à la rhino-trachéite infectieuse bovine (IBR) pour les cheptels français dans le cadre de l'Association nationale pour la certification en santé animale (ACERSA) a instauré, entre autres, la création d'un statut original, le "cheptel contrôlé en IBR", dont la particularité est de détenir des animaux âgés de plus de 48 mois séropositifs en IBR, sous réserve de certaines conditions complémentaires qui visent à assurer

une bonne fiabilité à ce statut. L'une de ces conditions est une série de contrôles individuels sur les animaux de moins de 48 mois lors de la phase d'acquisition de ce statut. Par rapport aux autres protocoles qui font exclusivement appel à des analyses de mélanges de sérums ou de laits, cette mesure est lourde de conséquences pratiques et économiques dans sa réalisation. L'objet de cette étude est d'en vérifier l'intérêt technique en évaluant le risque qui serait

¹ F.R.G.D.S. Bourgogne, 42 rue de Mulhouse, 21000 Dijon, France

² Laboratoire départemental de Côte-d'Or, 2 ter rue Hoche, 21000 Dijon cedex, France

³ Laboratoire vétérinaire départemental de Saône-et-Loire, 267 rue des Epinoches, 71000 Mâcon, France

pris par un protocole n'utilisant que des analyses de mélanges par rapport à un protocole qui comporte une série d'analyses individuelles. Ce risque correspond au défaut de valeur prédictive négative d'une méthode qui procède par

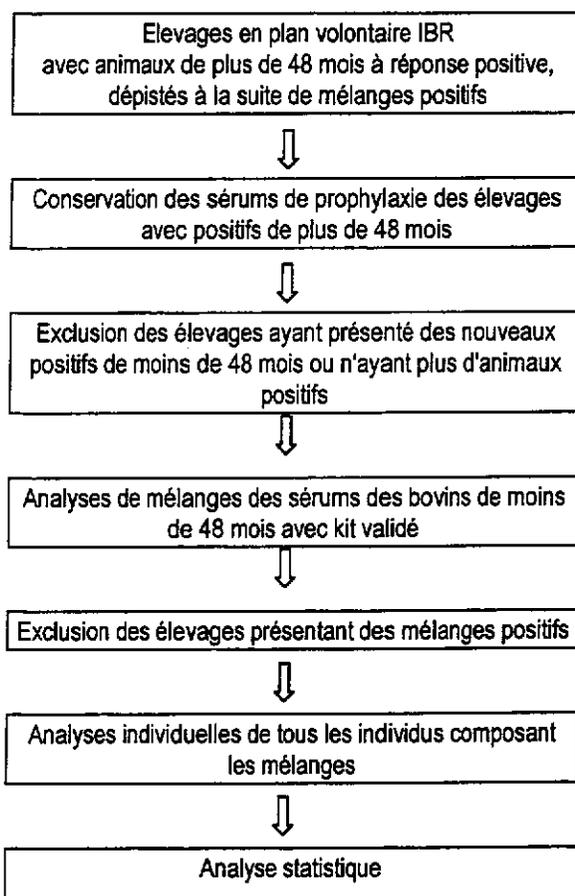
analyses de mélanges par rapport à une méthode de référence qui procède par analyses individuelles, dans le contexte particulier des élevages prétendant à l'appellation "B".

II – MATERIEL ET METHODE

Un résumé des principales étapes de l'étude est présenté sur la figure 1.

FIGURE 1

Résumé des étapes de l'étude



PRESELECTION DES ELEVAGES

En région Bourgogne, dans le cadre du plan volontaire de dépistage de l'IBR, les cheptels sont dépistés par des analyses de mélanges de 10 sérums. Si elles sont positives, ces analyses sont reprises immédiatement par des analyses individuelles. Les numéros d'identification des bovins positifs ainsi dépistés sont enregistrés dans les fichiers informatiques de gestion des G.D.S. de Bourgogne.

On a pu ainsi identifier des élevages qui détenaient des individus positifs exclusivement âgés de plus de 48 mois. Ces élevages sont donc des candidats à l'étude, et il a été demandé aux laboratoires vétérinaires départementaux de Côte-d'Or et de Saône-et-Loire de conserver par congélation

les sérums individuels issus de la prophylaxie annuelle de ces élevages présélectionnés.

A l'issue de la prophylaxie annuelle, les cheptels présélectionnés qui ont connu l'apparition de nouveaux positifs âgés de moins de 48 mois, ont été exclus de la présélection.

Deux campagnes de prophylaxie, 95/96 et 96/97, ont été nécessaires pour obtenir le nombre prévu (200) de cheptels à inclure dans l'étude.

Les sérums des animaux de moins de 48 mois au moment du prélèvement, repérés par le millésime figurant dans le numéro d'identification ont été séparés des autres pour l'étude.

REALISATION DES ANALYSES

Les analyses ayant servi à la présélection des élevages étaient réalisées avec un kit "gB", fourni par la société L.S.I.

La réalisation des analyses a dû attendre la validation des kits de diagnostic qui a eu lieu en juillet 97 pour commencer.

Le même lot du même kit a été utilisé dans les deux départements pour les analyses de mélanges et les analyses individuelles. Il s'agit du kit ELISA Pourquoiier gB, lot DEV 027, qui a été validé par le CNEVA Lyon le 18 juillet 1997.

• Analyses des mélanges

A partir des sérums des animaux de moins de 48 mois des élevages présélectionnés, ont été constitués des mélanges de 10 sérums qui ont été analysés.

Les élevages ayant présenté au moins un mélange positif ont été exclus de l'étude.

• Analyses individuelles

Tous les sérums des individus ayant constitué les mélanges des élevages n'ayant présenté que des analyses négatives sur tous les bovins de moins de 48 mois sont analysés individuellement.

TECHNIQUE UTILISEE

La technique utilisée a été identique dans les deux départements et conforme aux indications du fournisseur.

Une différence apparaît sur le traitement des sérums à leur arrivée au laboratoire :

- en Côte-d'Or, les sérums sont centrifugés et séparés de leur caillot dès leur arrivée ;
- en Saône-et-Loire les sérums sont mis en exsudation.

Par la suite le protocole est identique dans les deux départements.

Pour mémoire :

- Les sérums ont été dilués au demi.
- L'incubation a été de 16 à 18 heures à 4°C (incubation longue).
- Le conjugué a été déposé pendant 30 mn à 37°C.
- La révélation s'est faite à la suite d'une incubation de 20 mn à température ambiante (en Côte-d'Or : salle climatisée à 22°C, en Saône-et-Loire : étuve à 20°C).

- La lecture a été monochromatique à 450 nm dans les 2 laboratoires.

ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

Les résultats des analyses ont été enregistrés par le logiciel WINEISnd, puis extraites par le logiciel GBDOWINnd sous forme de fichiers compatibles avec le logiciel Microsoft EXCELnd, qui a servi à leur traitement. Les informations concernant les bovins positifs ou douteux proviennent des archives des laboratoires ou des G.D.S., ainsi que de la consultation du logiciel de gestion de l'identification pérenne généralisée.

III - RESULTATS

Les tableaux I à IV fournissent les résultats bruts et comparés, département par département, et campagne par campagne.

Ces analyses n'ont été effectuées que sur des bovins de moins de 48 mois présentant tous des analyses de mélange négatives, mais issus de cheptels comportant tous au moins un bovin de plus de 48 mois connu positif.

TABLEAU I
 Les analyses effectuées

		CAMPAGNE		
		95/96	96/97	TOTAL
Côte-d'Or	Cheptels	38	39	77
	Mélanges	173	203	376
	Bovins	1542	1874	3416
Saône-et-Loire	Cheptels	85	38	123
	Mélanges	401	155	556
	Bovins	3627	1377	5004
Total	Cheptels	123	77	200
	Mélanges	574	358	932
	Bovins	5169	3251	8420

TABLEAU II
 Les cheptels présentant des résultats individuels positifs ou douteux

		CAMPAGNE					
		95/96		96/97		TOTAL	
		POSITIFS ⁽¹⁾	DOUTEUX ⁽²⁾	POSITIFS ⁽¹⁾	DOUTEUX ⁽²⁾	POSITIFS ⁽¹⁾	DOUTEUX ⁽²⁾
Côte-d'Or	Cheptels	8	2	10	2	18	4
	%	21%	5%	26%	5%	23%	5%
Saône-et-Loire	Cheptels	5	7	2	4	7	11
	%	6%	8%	5%	11%	6%	9%
Total	Cheptels	13	9	12	6	25	15
	%	11%	7%	16%	8%	13%	8%
Différence (p)		0,01	NS(3)	0,01	NS(3)	0,0002	NS(3)

(1) cheptels comportant au moins un bovin positif

(2) cheptels comportant au moins un bovin douteux, mais sans bovin positif

(3) différence non significative au risque de 5%

Ainsi 13% des cheptels entièrement négatifs sur analyses de mélange réalisées sur les bovins de moins de 48 mois, comportent au moins un bovin qui présente une réaction individuelle positive et 8% contiennent un bovin douteux à l'analyse individuelle.

TABLEAU III
Les mélanges présentant des résultats individuels positifs ou douteux

		CAMPAGNE					
		95/96		96/97		TOTAL	
		POSITIFS (1)	DOUTEUX (2)	POSITIFS (1)	DOUTEUX (2)	POSITIFS (1)	DOUTEUX (2)
Côte-d'Or	Mélanges	8	4	10	3	18	7
	%	5%	2%	5%	1%	5%	2%
Saône-et-Loire	Mélanges	5	7	2	5	7	12
	%	1%	2%	1%	3%	1%	2%
Total	Mélanges	13	11	12	8	25	19
	%	2,3%	1,9%	3,4%	2,2%	2,7%	2,0%
	Différence (p)	0,01	NS (3)	0,06	NS (3)	0,001	NS (3)

(1) mélanges comportant au moins un bovin positif

(2) mélanges comportant au moins un bovin douteux, mais sans bovin positif

(3) différence non significative au risque de 5%

2,7% des mélanges négatifs hébergent au moins un bovin positif en plus des 2,0% de mélanges qui contiennent un sérum douteux.

TABLEAU IV
Les résultats individuels des bovins issus des mélanges négatifs

		CAMPAGNE					
		95/96		96/97		TOTAL	
		POSITIFS	DOUTEUX	POSITIFS	DOUTEUX	POSITIFS	DOUTEUX
Côte-d'Or	Bovins	9	5	10	3	19	8
	%	0,6%	0,3%	0,5%	0,2%	0,6%	0,2%
Saône-et-Loire	Bovins	5	7	2	5	7	12
	%	0,1%	0,2%	0,1%	0,4%	0,1%	0,2%
Total	Bovins	14	12	12	8	26	20
	%	0,27%	0,23%	0,37%	0,25%	0,31%	0,24%
	Différence (p)	0,005	NS (1)	0,07	NS (1)	0,0007	NS (1)

(1) différence non significative au risque de 5%

Sur la population des 8420 bovins qui ont tous appartenu à des mélanges négatifs, 0,31% présentent une réaction individuelle positive et 0,24% une réaction douteuse.

Ces résultats ne montrent pas de différence significative entre les 2 campagnes, mais présentent une différence significative pour les analyses positives entre les 2 départements.

Pour affiner ces données brutes, il a paru intéressant de comparer les distributions des pourcentages d'inhibition observés dans les différentes populations d'analyses.

Le pourcentage d'inhibition d'un sérum est le rapport multiplié par 100 de sa densité optique sur la moyenne des densités optiques des sérums de référence négatifs de la plaque.

Cette comparaison figure dans les tableaux V et VI.

Lorsque ce rapport est inférieur à 50%, le sérum est considéré comme positif.

TABLEAU V
Comparaison des moyennes des % d'inhibition des analyses de mélanges

		CAMPAGNE		MOYENNE	DIFFERENCE
		95/96	96/97	GENERALE	p
Côte- d'Or	Moyenne	98,6	109,5	104,5	10,9
	Ecart-type	11,5	13,1	13,5	< 10 ⁻¹⁰
Saône- et-Loire	Moyenne	89,8	90,6	90,1	0,8
	Ecart-type	12,2	12,9	12,4	NS (1)
Total	Moyenne	92,5	101,4	95,9	8,9
	Ecart-type	12,6	16,0	14,7	< 10 ⁻¹⁰
Différence		8,8	18,9	14,5	
p		< 10 ⁻¹⁰	< 10 ⁻¹⁰	< 10 ⁻¹⁰	

(1) différence non significative au risque de 5%

TABLEAU VI
Comparaison des moyennes des % d'inhibition des analyses individuelles

		CAMPAGNE		MOYENNE	DIFFERENCE
		95/96	96/97	GENERALE	SIGNIFICATIVITE
Côte- d'Or	Moyenne	104,4	104,5	104,5	0,1
	Ecart-type	16,5	15,7	16,1	NS (1)
Saône- et-Loire	Moyenne	95,8	95,0	95,5	-0,8
	Ecart-type	16,3	17,7	16,7	NS (1)
Total	Moyenne	98,3	100,5	99,2	2,1
	Ecart-type	16,8	17,3	17,0	< 10 ⁻⁷
Différence		8,7	9,6	9,0	
Significativité		< 10 ⁻¹⁰	< 10 ⁻¹⁰	< 10 ⁻¹⁰	

(1) différence non significative au risque de 5%

Ces résultats montrent des différences très significatives entre les 2 départements ainsi qu'entre les 2 campagnes pour les mélanges réalisés en Côte-d'Or.

Elles s'illustrent sur les figures 2 à 5, qui présentent les distributions départementales des résultats sérologiques, d'une part des analyses de mélanges, et d'autre part des analyses individuelles. Les résultats des analyses de mélanges de Côte-d'Or ont été présentés par campagne pour illustrer la variabilité intercampagnes.

Les graphiques présentant les analyses de mélange font apparaître les mélanges qui contenaient soit un sérum

douteux, soit au moins un sérum positif (dans un élevage un deuxième sérum positif a été trouvé dans le mélange, dans un autre élevage un autre sérum douteux a été trouvé en plus d'un positif).

Sur les graphiques présentant les analyses de mélanges, on constate que la majeure partie des mélanges négatifs ayant contenu un sérum positif ou douteux se situent sur la partie gauche de la distribution, c'est-à-dire celle qui s'approche du seuil de positivité, qui est fixé à 50%.

FIGURE 2

Distribution des % d'inhibition des analyses de mélanges : Côte-d'Or, campagne 95-96

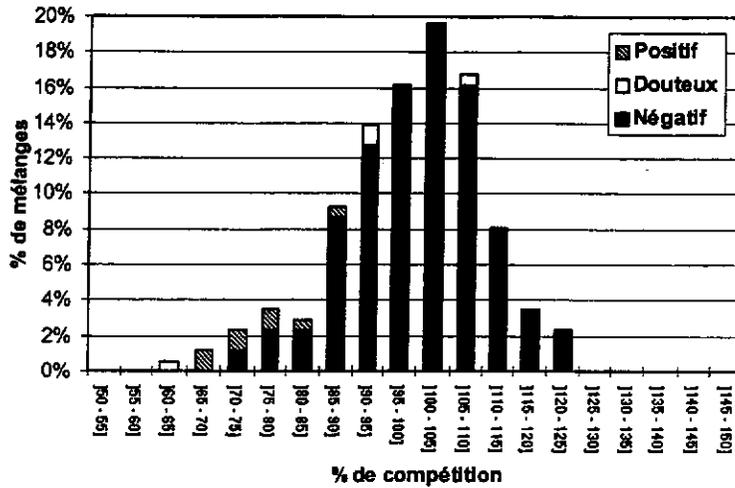


FIGURE 3

Distribution des % d'inhibition des analyses de mélanges : Côte-d'Or, campagne 96-97

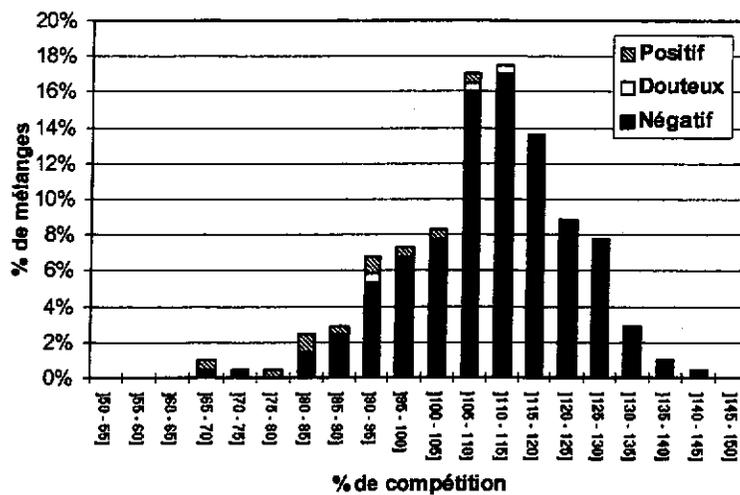
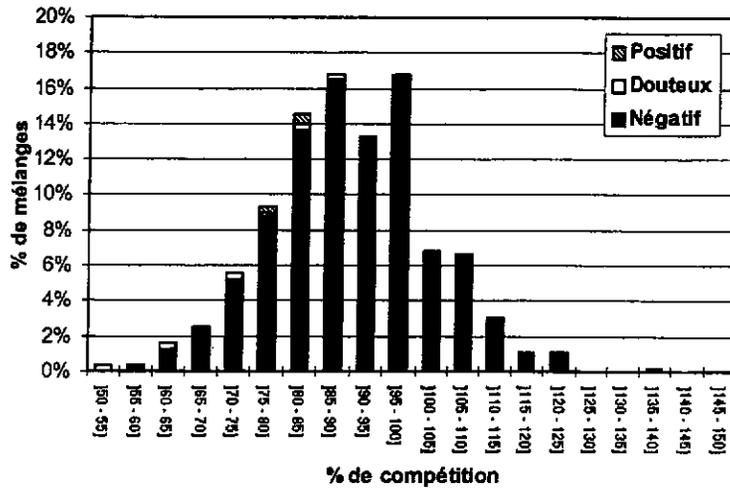
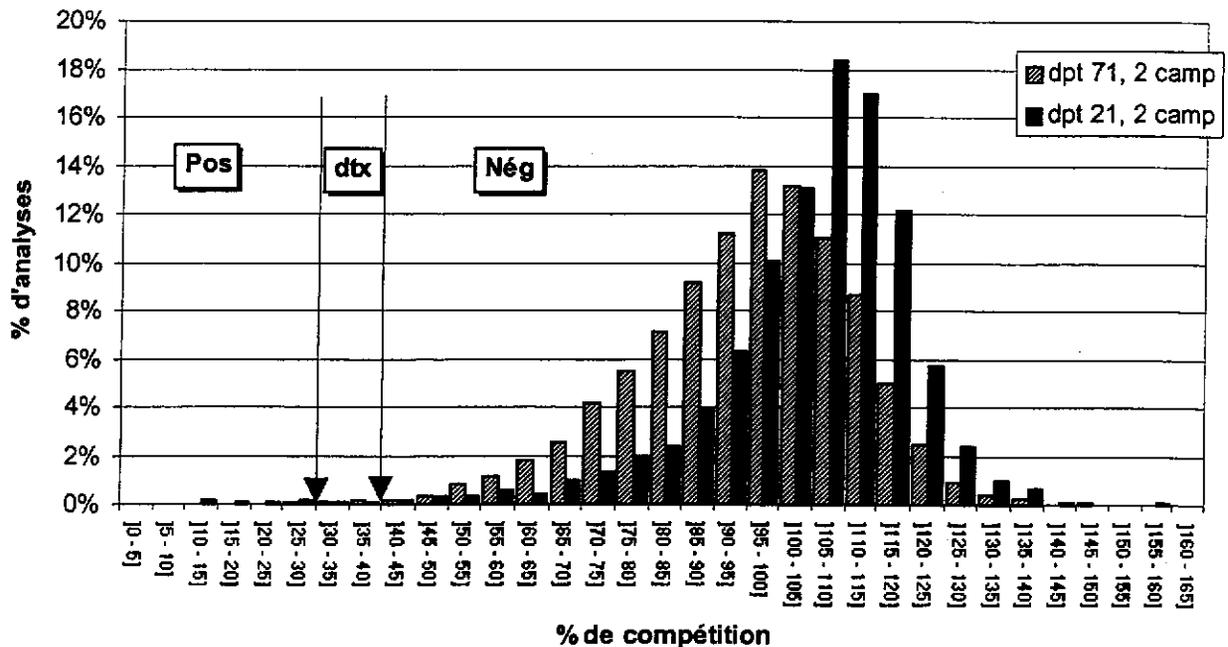


FIGURE 4
 Distribution des % d'inhibition des analyses de mélanges : Saône-et-Loire ,
 campagnes 95-96 et 96-97



La figure 5 présente pour les 2 campagnes cumulées les distributions comparées des % d'inhibition des sérums individuels. La distribution des résultats de Côte-d'Or est moins étalée, et décalée vers la droite, vers les valeurs plus négatives, par rapport à celle de Saône-et-Loire .

FIGURE 5
 Comparaison des distributions des % d'inhibition des sérums individuels.



En Saône-et-Loire , 18 mélanges de sérums, négatifs, ayant présenté un sérum individuel positif ou douteux ont été réanalysés avec 2 autres kits gB (LSI et Idexx). Seul un

mélange a été retrouvé positif à la limite de positivité par le kit Idexx.

Les 18 sérums provenant des 18 mélanges cités ci-dessus, ont également été réanalysés par les 2 autres kits. Les résultats figurent dans le tableau VII.

Dix sept sérums ont été également réanalysés par séroneutralisations réalisées au CNEVA de Lyon. Aucun

sérum ne s'est révélé positif, à l'exception d'un sérum retrouvé positif à la dilution 1/1. Ce sérum avait été décelé douteux par le kit Pourquoiier, mais négatif avec les 2 autres kits.

TABLEAU VII

Sérums positifs ou douteux issus de mélanges négatifs, recontrôlés avec 2 autres kits "gB"

	NOMBRE DE SERUMS RECONTROLES 2 FOIS	RETROUVES 2 FOIS POSITIFS	RETROUVES 1 SEULE FOIS POSITIF	RETROUVES 0 FOIS POSITIF
Positifs à l'origine	7	4	1	2
Douteux à l'origine	11	1	3	7
Total	18	5	4	9

L'étude de la corrélation entre les différentes valeurs obtenues par les 3 kits est présentée dans les figures 6 à 8.

Par ailleurs en Côte-d'Or, 6 sérums positifs et 2 sérums douteux ont également été adressés au CNEVA Lyon pour une analyse en séroneutralisation : 5 sérums positifs ont été confirmés, les 3 autres ont été retrouvés négatifs.

En Côte-d'Or également, 11 bovins ont été réanalysés dans le cadre de la prophylaxie 97/98 : 1 positif a été retrouvé positif, 1 douteux a été retrouvé douteux, 6 positifs ont été trouvés négatifs par mélange sans que le statut individuel ait été connu, 2 positifs et 1 douteux ont été trouvés négatifs par analyse individuelle.

FIGURE 6
Etude de la corrélation
POURQUIER - LSI

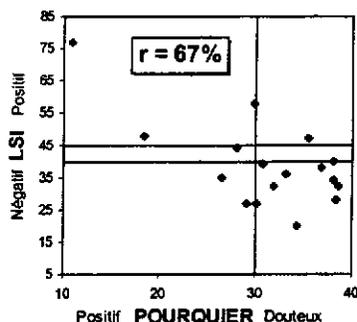


FIGURE 7
Etude de la corrélation
POURQUIER - IDEXX

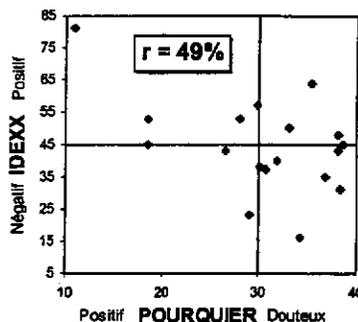
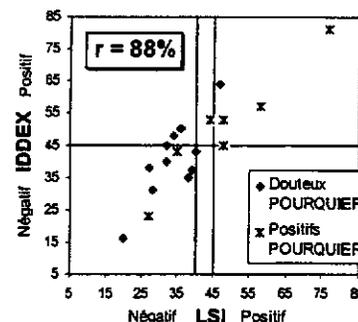


FIGURE 8
Etude de la corrélation
IDEXX - LSI



On observe une bonne corrélation entre les kits LSI et IDEXX, mais moins bonne avec le kit Pourquoiier, qui peut montrer jusqu'à 5 points de discordance.

L'âge au moment du prélèvement des animaux révélés positifs ou douteux a été également étudié. La distribution des âges par tranches de 6 mois est indiquée dans la figure 9.

Le phénomène semble toucher également toutes les tranches d'âges, à l'exception des animaux de moins de 18 mois qui sont peu prélevés.

La répartition sur les différentes classes d'âge entre 12 et 48 mois est similaire à celle de la population générale des bovins, comme le montre le tableau VIII.

FIGURE 9

Distribution des âges des bovins positifs ou douteux au moment du prélèvement

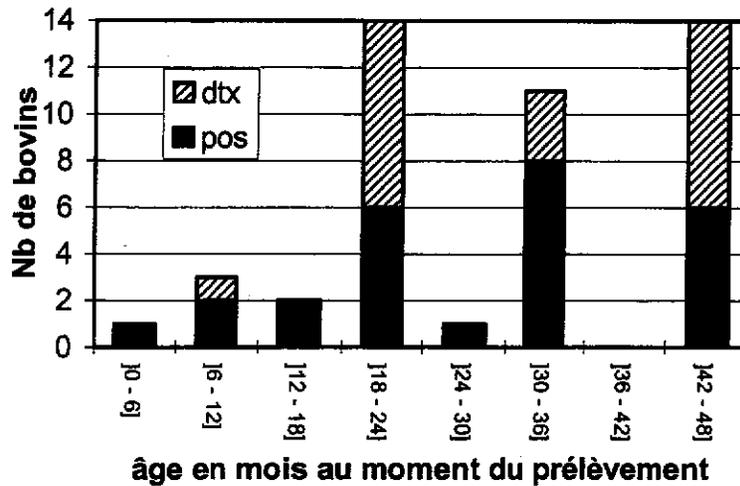


TABLEAU VIII

Comparaison de la distribution selon les classes d'âge des bovins positifs et de la population générale

TRANCHE D'ÂGE (MOIS)	POSITIFS OU DOUTEUX	POPULATION GÉNÉRALE (CÔTE-D'OR)
]12 - 24]	38%	47%
]24 - 36]	29%	31%
]36 - 48]	33%	22%

La présence d'un bovin positif ou douteux a été également étudiée en fonction du nombre de bovins de moins de 48 mois analysés, ainsi qu'en fonction du nombre de bovins positifs de plus de 48 mois présents. Les figures 10 et 11 illustrent ces relations.

La proportion d'élevages concernés par la présence d'un animal positif ou douteux semble augmenter avec le nombre

de bovins analysés. Cependant le test du χ^2 ne révèle pas une liaison significative ($p = 0,22$).

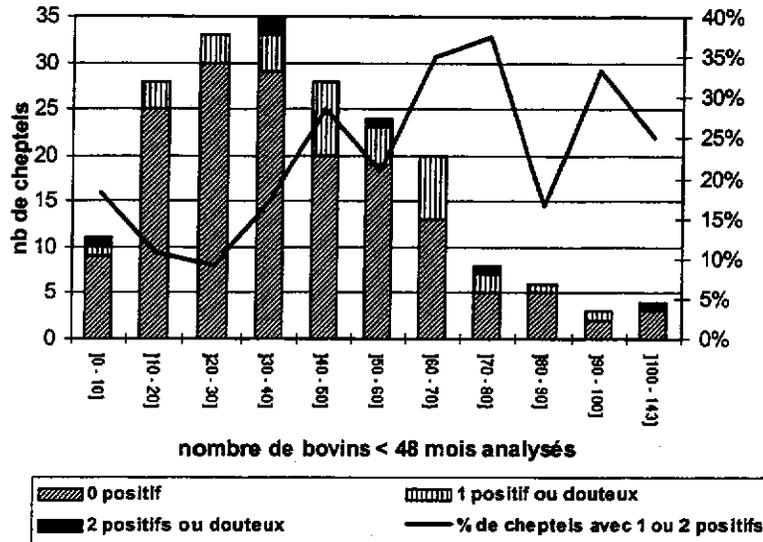
La proportion d'élevages comportant un bovin positif ou douteux peut malgré tout être ajustée à une loi binomiale de probabilité 0,0055 avec la formule :

$$p(\text{cheptel positif}) = 1 - (1 - 0,0055)^{\text{taille du cheptel}}$$

La probabilité du χ^2 de cet ajustement est de 0,78.

FIGURE 10

Distribution du nombre de bovins de moins de 48 mois analysés et % de cheptels comportant au moins un positif ou douteux

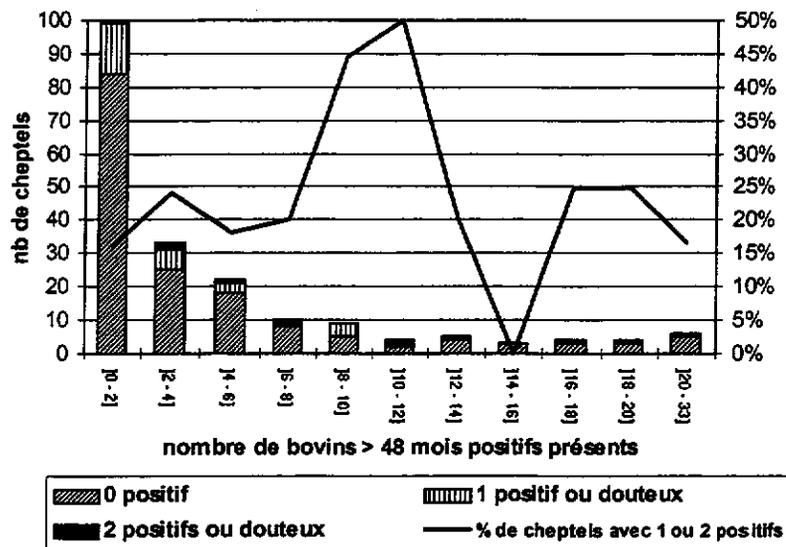


Le nombre de bovins âgés de plus de 48 mois positifs présents dans les élevages est relativement faible en moyenne : 5 bovins positifs par élevage.

A l'exception de quelques classes comptant moins de 10 élevages, le nombre de positifs âgés de plus de 48 mois ne semble pas en rapport avec la proportion d'élevages concernés par la présence d'un bovin positif âgé de moins de 48 mois. Un test de χ^2 appliqué à cette distribution ne montre pas de liaison significative avec les différentes classes de nombre de bovins positifs ($p = 0,29$).

FIGURE 11

Distribution du nombre de bovins de plus de 48 mois positifs présents et % de cheptels comportant au moins un positif ou douteux



IV - DISCUSSION

- L'objectif de cette étude était d'évaluer le risque pris par un protocole n'utilisant que des analyses de mélange par rapport à un protocole utilisant une série d'analyses individuelles. Pour les cheptels, le risque de ne pas dépister un bovin positif est de 13% ; il est de 0,31% pour les bovins, si l'on ne considère pas le cas des résultats douteux.
- Les résultats du recontrôle par d'autres kits de diagnostic (négatifs avec deux autres kits 9 fois sur 18) et par une technique de séroneutralisation (négatifs 19 fois sur 25) interrogent cependant sur la réalité de la positivité de ces sérums. De même, l'apparente distribution aléatoire des bovins trouvés individuellement positifs, sans lien avec leur âge ou avec le risque épidémiologique constitué par les bovins positifs de plus de 48 mois, conforte ce doute. Les résultats des 9 recontrôles négatifs sur 11 de la prophylaxie 97/98 vont dans le même sens.
- On peut également remarquer que la proportion de bovins trouvés ainsi positifs est du même ordre de grandeur du défaut de spécificité admis pour la validation des kits commerciaux de diagnostic (0,3%). Dans l'hypothèse d'un tel défaut de spécificité dans des cheptels analysant 42 bovins en moyenne, on arriverait à déclasser $1 - (1 - 0,003)^{42} = 0,118$, soit 12% des élevages vraiment négatifs, à tort.
- La question se pose donc pour une bonne partie de ces quelques sérums positifs ou douteux, s'ils ne sont pas dus à la limite de spécificité du kit.
- Cette étude illustre la difficulté de statuer sur la valeur d'un seul résultat, et montre la nécessité de disposer d'une méthode de référence, combinant éventuellement plusieurs analyses pour permettre une décision définitive sur le statut d'un sérum.
- Malgré tout, il reste probable qu'une partie d'entre eux soient de vrais positifs qui n'ont pas été dépistés par l'analyse de mélange. Si l'on admet que la positivité confirmée par séroneutralisation est un diagnostic de certitude (spécificité = 100%), on peut déduire que leur proportion se situe entre une hypothèse basse qui serait la proportion de positifs trouvés (0,31%) multipliée par la proportion de sérums positifs confirmés par la séroneutralisation (5 sérums confirmés sur 13 positifs), soit $0,31\% \times 5 / 13 = 0,12\%$ soit 1,2 pour 1 000 et une hypothèse haute de 3,1 pour 1 000.
- Si l'on intègre les sérums douteux, on obtient une fourchette comprise entre 1,3 pour 1 000 ($= 0,55\% \times 6 / 25$) et 5,5 pour 1 000.
- Pour apprécier l'acceptabilité de ce risque, il est intéressant de le resituer sur la chaîne des facteurs de risque qui peuvent produire un bovin positif malgré une garantie "contrôlé en IBR". Cette chaîne est illustrée dans le tableau IX. Bien entendu on ne connaît pas ou très peu le niveau des autres risques, mais on réalise que le risque entraîné par la perte d'informations due aux analyses de mélange au lieu d'analyses individuelles sur le premier contrôle sérologique est vraisemblablement faible par rapport aux autres risques rencontrés, et que sa maîtrise n'apporte que très peu de garanties sur les événements ultérieurs à la première série d'analyses. La maîtrise de ce risque reste pourtant d'un coût élevé : à titre d'illustration moyenne, 40 analyses individuelles à 25 FF au lieu de 4 analyses de mélanges à 35 FF entraînent un surcoût de 860 FF par élevage.
- La comparaison des résultats montre des différences significatives entre les deux départements, tant sur la proportion des bovins, mélanges et cheptels présentant des réactions positives, que sur la réponse sérologique moyenne des sérums de l'étude. Paradoxalement, cette réponse moyenne est plus négative en Côte-d'Or, alors que la proportion de bovins positifs y est sensiblement plus élevée.
- On a vu que la différence majeure dans l'application du protocole d'analyse entre les deux laboratoires tenait à la centrifugation des sérums. Le laboratoire de la Côte-d'Or centrifuge ses sérums dès leur arrivée et les sérums sont expédiés par la poste, tandis que celui de la Saône-et-Loire laisse décanter les sérums qui sont ramassés lors de tournées dans les cabinets vétérinaires. Pour mesurer l'effet de ces deux facteurs, une étude complémentaire menée avec un kit ELISA Idexx a été réalisée en Saône-et-Loire sur une série de 91 sérums qui ont été aliquotés, centrifugés d'un côté et décantés de l'autre, avant d'être analysés. L'effet de la durée de la décantation a été également évalué sur une série de 66 sérums aliquotés, dont un aliquot a été analysé immédiatement et l'autre après 7 jours de décantation. Les résultats présentés dans le tableau X montrent significativement que l'absence de centrifugation ainsi qu'une décantation de 7 jours induisent une réponse sérologique moyenne plus importante par rapport au pourcentage d'inhibition. Ces effets sont plus marqués pour les sérums négatifs que pour les sérums positifs. Cependant, cette différence altère peu l'interprétation de l'analyse puisqu'au total un seul résultat discordant a été observé sur un sérum proche du seuil de positivité entre l'aliquot centrifugé qui était positif et son homologue non centrifugé négatif. Cette discordance ne semble pas être due à l'effet de la centrifugation qui présente en moyenne un effet "négatif".
- Ces observations complémentaires permettent d'expliquer vraisemblablement la différence sur la réponse moyenne des sérums, mais elles ne permettent pas de comprendre la différence sur les proportions d'animaux positifs entre les deux départements. Il y a peu de différences entre les deux populations de cheptels de chaque département : respectivement en Côte-d'Or et en Saône-et-Loire, il y a 41 contre 44 bovins de moins de 48 mois en moyenne et 5,2 contre 4,6 bovins de plus de 48

mois positifs présents. On peut remarquer que 5 sur 6 sérums trouvés positifs en Côte-d'Or ont été confirmés par la séroneutralisation contre 0 sur 7 en Saône-et-Loire. Cela conforte la présomption de réelle positivité sur les sérums de Côte-d'Or. Peu d'explications peuvent éclairer ce phénomène. Seule une hypothèse a pu être envisagée sur le tri des sérums des bovins déjà connus positifs et présumés négatifs au sein de l'élevage. En Saône-et-Loire, les sérums sont triés par les vétérinaires au moment du prélèvement en deux lots distincts; en

Côte-d'Or, les sérums des bovins connus positifs sont signalés sur la liste des bovins prélevés adressée au laboratoire. Dès lors, le risque d'inversion lors de l'inscription sur la fiche entre deux bovins est sans doute plus élevé en Côte-d'Or. Sur les 5 sérums confirmés positifs par la séroneutralisation, 3 avaient un "voisin" immédiat identifié comme ancien positif sur la liste des bovins prélevés, alors qu'aucun des 3 bovins retrouvés négatifs n'avait de "voisin" positif.

TABLEAU IX

Chaîne des risques de production d'un bovin positif issu d'un cheptel « Contrôlé en IBR »

POINTS A RISQUE	NATURE DU RISQUE	MESURES DE CONTROLE
1er contrôle sérologique	<ul style="list-style-type: none"> • limite de sensibilité des analyses (individuelles ou mélanges) • effectif non intégralement contrôlé 	<ul style="list-style-type: none"> • validation des kits diagnostics • vérification des effectifs prélevés
2ème contrôle sérologique	<ul style="list-style-type: none"> • limite de sensibilité des analyses de mélange • effectif non intégralement contrôlé 	<ul style="list-style-type: none"> • validation des kits diagnostics • vérification des effectifs prélevés
Contact avec les bovins > 48 mois positifs présents	<ul style="list-style-type: none"> • réexcrétion des bovins > 48 mois positifs présents, contamination intracheptel 	<ul style="list-style-type: none"> • (*) <i>séparation des bovins positifs</i> • vaccination certifiée des bovins positifs
Introductions et retours de rassemblements de bovins	<ul style="list-style-type: none"> • défaut de contrôle à l'introduction • limite de sensibilité de l'analyse individuelle • risque de contamination lors du transport 	<ul style="list-style-type: none"> • vérification systématique des contrôles à l'introduction • validation des kits diagnostics • (*) <i>possibilité de reconstrôler les bovins plus de 15 jours après leur introduction</i>
Contacts extérieurs (pâtures)	<ul style="list-style-type: none"> • contamination interélevages 	<ul style="list-style-type: none"> • (*) <i>précautions usuelles : état des clôtures, surveillance du troupeau, gestion sanitaire des pâtures</i>
Transport suite à vente	<ul style="list-style-type: none"> • contamination lors du transport 	<ul style="list-style-type: none"> • (*) <i>transport direct vendeur-acheteur</i> • (*) <i>Gestion sanitaire des lots de transports</i>
Contrôle d'introduction à l'arrivée	<ul style="list-style-type: none"> • limite de sensibilité de l'analyse individuelle • analyse réalisée avant la séroconversion 	<ul style="list-style-type: none"> • validation des kits diagnostics • (*) <i>possibilité de reconstrôler le bovin plus de 15 jours après son introduction</i>

(*) Mesures qui ne sont pas imposées par le cahier des charges des appellations nationales.

TABLEAU X

Différence moyenne de pourcentages d'inhibition des sérums selon leur traitement à leur arrivée au laboratoire

TRAITEMENT DES SERUMS	SERUMS NEGATIFS	SERUMS POSITIFS	MOYENNE
Non centrifugé / centrifugé	2,8	0,6	2,2
Décanté 7 jours / décanté 0 jour	4,1	3,2	3,8

V - CONCLUSION

- L'objectif primaire de cette étude était d'évaluer le risque de trouver négatifs par analyses de mélange tous les bovins de moins de 48 mois d'un cheptel qui comportait quelques animaux de plus de 48 mois positifs, alors que certains des animaux âgés de moins de 48 mois étaient individuellement positifs.
- Ce risque touche en apparence 13% des cheptels et 0,31% des bovins. En apparence car vraisemblablement, la majeure partie de ces bovins positifs non dépistés par les analyses de mélange est due à la limite de spécificité de l'analyse individuelle. En plus de son coût, l'utilisation du protocole individuel risque donc d'entraîner des déqualifications abusives. Il convient donc de peser les avantages et les inconvénients de cette méthode, surtout en regard des autres risques rencontrés dans le processus général de qualification des élevages, mais également en regard des autres protocoles qui ont accepté ce risque de perte d'information.
- Ces difficultés d'interprétation soulignent la nécessité de disposer d'une méthode de référence utilisable en pratique pour statuer sur le statut sérologique d'un bovin douteux ou positif "contesté". Une solution pragmatique pourrait consister à faire analyser un sérum douteux par un nombre impair d'analyses réalisées avec des kits différents mais validés. Le statut définitif serait alors désigné par la majorité de résultats identiques. Une autre approche pourrait se raisonner sur une combinaison d'analyses dont les sensibilités et spécificités sont précisément connues.
- Une des hypothèses pour expliquer la différence des moyennes des réponses sérologiques de Côte-d'Or et de Saône-et-Loire peut être la différence de traitement des sérums : le laboratoire de Côte-d'Or centrifuge les sérums et le laboratoire de Saône-et-Loire les met à exsuder. Cependant, cette différence n'altère pas l'interprétation des résultats et n'explique en rien la différence observée sur la proportion plus importante de bovins positifs en Côte-d'Or. Cette dernière différence reste ininterprétable avec les seules informations fournies par l'étude.



REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier la D.G.A.L., qui a financé cette étude, ainsi que toutes les personnes des Laboratoires et des G.D.S. de Côte-d'Or et de Saône-et-Loire qui y ont participé activement.