

EVALUATION DE LA PREVALENCE ET DE LA DYNAMIQUE DE L'INFECTION BVD EN BRETAGNE A L'AIDE D'UN TEST ELISA SUR LAIT DE GRAND MELANGE*

A. Joly¹, F. Beaudeau² et H. Seegers²

RESUME : En Bretagne (25 000 troupeaux laitiers), la lutte contre la maladie des muqueuses est essentiellement basée sur l'assainissement des élevages infectés : 2 à 3% des élevages sont concernés annuellement. Afin de jeter les bases d'un plan de maîtrise collective de la BVD, l'Union Bretonne des GDS et l'UMR GSA (ENVN-INRA) ont mené une étude sur 2 400 troupeaux laitiers, dont l'objectif était d'évaluer la prévalence et la dynamique de l'infection BVD. La réalisation de trois analyses à quatre mois d'intervalle sur lait de grand mélange à l'aide d'un test ELISA blocking P80 a permis d'attribuer un statut à chaque troupeau. Quatre statuts ont été définis et la prévalence de l'infection BVD évaluée sur deux ans. En moyenne 42% des troupeaux sont probablement indemnes (A), 22% faiblement contaminés (B), 1% en probable séro conversion (C), 32% fortement contaminés (D). Trois p. cent des troupeaux avaient des résultats non interprétables. Les probabilités de survie (proportions de troupeaux ne changeant pas de statut) à 16 mois (d'octobre 1998 à février 2000) étaient de 85% pour les A et 74% pour les D. En considérant l'ensemble des probabilités de survie et de transition (proportion de troupeaux changeant de statut), une simulation par chaîne de Markov sur 15 ans confirme que la situation actuellement observée est proche d'un état d'équilibre entre, d'une part, des troupeaux indemnes dont certains se contaminent plus ou moins rapidement, d'autre part, des troupeaux contaminés dont certains s'assainissent spontanément.

SUMMARY : In Brittany (25,000 dairy herds), control of mucosal disease mainly consists in clearing the infected herds: 2 to 3% of herds are concerned annually. To assess the feasibility of a systematically recommended control scheme on BVDV infection, a survey in 2400 dairy herds was carried out by the Union Bretonne des GDS and the Unit of Animal Health Management (ENVN-INRA) in order to assess the prevalence and the dynamics of BVDV infection. The status of each herd regarding BVDV infection was determined based on three bulk milk results four months apart using a p80 blocking ELISA test. Four statuses were defined and the prevalence of each was assessed on a 2-year basis. On average, the proportion of probably free (A), weakly contaminated (B), probably in sero-conversion (C), and widely contaminated (D) herds were 42, 22, 1 and 32%. 3% of herds had uninterpretable results. Survival probabilities on a 16-month basis were 85 and 74% for A and D herds respectively. A Markov chain simulation based on survival and transition probabilities between statuses suggested that the current situation was close to an equilibrium between free of infection and contaminated herds.



* Texte de l'exposé présenté lors de la Journée AEEMA, 18 mai 2001

¹ UBGDS, GDS 56, 6 avenue Edgar Degas BP110, 56003 Vannes cedex, France

² UMR ENVN-INRA, Gestion de la Santé Animale, BP 40706, 44307 Nantes cedex 03, France

I - INTRODUCTION

Le virus de la BVD/MD est un virus universellement répandu. Il provoque des manifestations cliniques diverses (avortements, retours en chaleur, maladies néonatales, maladie des muqueuses au sens strict). Les connaissances sur ce virus ont considérablement évolué lors des 20 dernières années, tant sur le plan

fondamental que sur le terrain. Dès le début des années 80, des programmes de maîtrise, basés sur l'assainissement et/ou la vaccination ont été proposés aux éleveurs. Les GDS bretons ont participé activement à ces programmes et suivent régulièrement entre 1 500 et 2 000 élevages laitiers.

II - CADRE GENERAL DE L'ETUDE

Au début des années 1980, les GDS Bretons ont mis en place, dans les élevages atteints de manifestations cliniques dues au virus BVD, des plans d'assainissement : la détection et l'élimination vers l'abattoir des animaux infectés permanents immunotolérants (IPI) en était le principal outil. Dans les années 91-92, l'apparition de techniques d'antigénémie P80 a largement diminué les contraintes de prélèvements, de transport des échantillons au laboratoire et d'analyse, et par conséquent contribué à populariser les plans d'assainissement. La motivation et une meilleure sensibilisation des éleveurs et des vétérinaires ont également été, dans les années 92-95, des facteurs favorisant une augmentation du nombre de suivis. Ainsi, les GDS Bretons ont géré progressivement une centaine de plans BVD dans les années 85-90 (les critères d'appel étant essentiellement la maladie des muqueuses *sensu stricto*) puis environ 600 plans annuellement dans les années 95 (croissance exponentielle) pour atteindre un plateau (600-700 plans par an depuis 95). Les motifs d'appel sont également plus variés ; par exemple, en 1996, 40% des plans étaient initiés par une maladie des muqueuses, 40% par des avortements ou retours tardifs, le solde par des motifs divers (retard de croissance, maladies néonatales). Le taux d'incidence clinique apparent (2 à 3%) était relativement stable dans les années 95. Toutefois, d'autres observations nous montraient la difficulté de maîtriser les nouvelles infections ; de nombreux élevages, assainis à un instant, étaient à nouveau contaminés quelques années plus tard. Par exemple, sur 77 plans BVD mis en place sur les 8 premiers mois de l'année 2000 dans le Morbihan, 7 d'entre eux concernaient les élevages assainis 3 ou 4 ans plus tôt. Les schémas de recontamination étaient relativement classiques : pendant un à deux ans, l'éleveur dont le cheptel vient d'être assaini, vaccine son pré troupeau ; l'impression d'amélioration, le coût

de la vaccination font rapidement « baisser la garde » ; les lères génisses non vaccinées sont mises en pâture après 40-60 jours de gestation (deux ou trois retours en chaleur non vus) où elles sont contaminées au contact d'animaux à statut inconnu. Le retour en stabulation et la naissance d'un animal IPI s'accompagne de troubles de la reproduction sur des vaches en première lactation sensibles.

Ces observations suscitaient bien entendu de nombreuses questions de la part des éleveurs concernés (« Que faites-vous pour empêcher la diffusion du virus ? »), des administrateurs des GDS (« Le coût de la maladie ne diminue pas ; jusqu'à quand devons-nous indemniser ou aider ces éleveurs concernés ? ») et des techniciens des GDS (« Comment maîtriser (diminuer) le taux apparent d'incidence clinique ? »)

Dès 1996, une ébauche de réponse a été donnée. Les GDS ont élaboré un référentiel BVD, diffusé à l'ensemble des partenaires (vétérinaires, ...) et aux éleveurs, qui proposait notamment à chacun, en fonction des caractéristiques de son élevage des modalités de protection et de prévention. Une autre réponse pouvait être la mise en œuvre, à l'image des actions entreprises dans les pays du Nord de l'Europe, d'un plan d'assainissement de la BVD en Bretagne. Cette réponse, séduisante sur le papier et en théorie, ne pouvait être envisagée qu'après une étude initiale des caractéristiques de l'infection BVD dans notre région : si le taux apparent d'incidence clinique était relativement bien connu (2 à 3% annuellement), la proportion des cheptels indemnes était estimée à 30 à 50%, et la dynamique de l'infection était, quant à elle, une inconnue majeure. Or la connaissance de la prévalence et de la dynamique était nécessaire avant d'envisager une action collective. Par ailleurs, le rapport coût/bénéfice d'une telle action devait être évalué.

Les GDS Bretons ont donc, en 1996, choisi de mettre en place une étude destinée à connaître ces éléments clés. Pour connaître les caractéristiques épidémiologiques, le choix de la Bretagne s'est alors porté sur l'utilisation de techniques ELISA (analyses faciles à mettre en œuvre et peu coûteuses, adaptées à

de grandes séries) sur lait de grand mélange (la Bretagne est une région essentiellement laitière) pour suivre, pendant deux ans, un échantillon de troupeaux. L'objectif de cette étude était d'évaluer la prévalence et la dynamique de l'infection par le virus de la BVD dans les troupeaux laitiers bretons.

III - MATERIEL METHODES

1. CHOIX DE L'ECHANTILLON DE L'ETUDE

Sur un total de 25 000 troupeaux laitiers bretons, 2 400 troupeaux de plus de 20 vaches laitières ont été tirés au sort. Ils étaient répartis aléatoirement sur toute la Bretagne à l'exception de deux secteurs de l'Ille-et-Vilaine concernant des producteurs dont les analyses de lait sont effectuées dans des laboratoires interprofessionnels situés en dehors de la région. Les 2 400 troupeaux représentent un échantillon suffisant pour estimer une prévalence de troupeaux négatifs de 40% (précision relative 33%). Les éleveurs concernés n'étaient pas informés du prélèvement.

2. CHOIX DU CALENDRIER

Des prélèvements de lait de grand mélange (LGM), plus communément appelés « lait de tank » ont été effectués tous les 4 mois de février 1998 à février 2000. L'échantillon utilisé était celui collecté dans le cadre des prélèvements effectués pour les analyses déterminant le prix du lait. Les prélèvements étaient triés par ces laboratoires interprofessionnels laitiers puis testés à l'aide d'un kit ELISA.

3. CHOIX DE L'ANALYSE

En février 98, le seul kit commercial disponible en France était un kit commercialisé par la société LSI (kit ELISA BVD/BD p80 compétition, LSI, Lissieu, France). Une grille d'interprétation de type semi quantitative était jointe par la société LSI ; elle donnait, en fonction du pourcentage d'inhibition mesuré dans le lait de tank, une évaluation de la prévalence des animaux séropositifs au sein du troupeau. Toutefois, cette grille n'ayant pas été validée à grande échelle, une étude complémentaire a été conduite dans le but d'évaluer la relation entre le pourcentage d'inhibition du lait de tank et la prévalence des animaux positifs dans le troupeau [Beaudeau *et al.*, 2001]. Cette étude a permis de fournir une grille de classement des troupeaux en fonction du pourcentage d'inhibition du lait de tank (voir annexe).

4. DETERMINATION DU STATUT DU TROUPEAU

Un statut vis-à-vis de l'infection par le virus de la BVD a été attribué à chaque troupeau. Il est basé sur trois résultats consécutifs de pourcentage d'inhibition du lait de grand mélange. Le choix de trois était motivé par plusieurs éléments : limiter les effets frontières ; améliorer la prédiction en cas de résultats en code 1 (pourcentage d'inhibition compris entre 35 et 60) ou 2 (pourcentage d'inhibition ≥ 60) : deux prélèvements consécutifs en code 2 correspondent à des troupeaux où en moyenne, 80% des vaches étaient positives (voir annexe) ; enfin, l'intervalle entre la première et la dernière analyse (8 mois) correspond approximativement à la durée d'une gestation et pouvait nous laisser entrevoir la possibilité d'anticiper sur le statut des jeunes animaux conçus pendant cet intervalle.

Quatre statuts (codés A, B, C, D) ont ainsi été définis en regroupant les 27 (3^3) combinaisons de trois résultats (dont le premier chiffre représente le résultat de l'analyse la plus ancienne, et le dernier la plus récente) (tableau I). Une cinquième classe (E) regroupait les troupeaux à statut non caractérisé (avec séquence de résultats en « dent de scie », par exemple trois classes successives de pourcentage d'inhibition de type 020).

5. EVOLUTION DES STATUTS

Ayant bénéficié de sept analyses, chaque troupeau a été caractérisé par cinq statuts consécutifs dans le temps (tableau II). Par exemple, la séquence n° 1 correspond au statut attribué par les analyses de février, juin et octobre 98, la séquence n° 2 par celles de juin, octobre 98 et février 99, etc. (tableau II).

TABLEAU I

Définition des statuts des troupeaux vis-à-vis de l'infection par le virus de la BVD

Code	Prévalence	Exemples	Qualificatif
A	Très faible ou nulle persistante	000	Probablement indemne
B	Faible persistante	111, 101, 011	Circulation stoppée ?
C	En augmentation rapide	002	En séro conversion ?
D	Forte persistante	222, 212, 221	Contaminé
E	Diminution brutale	120	?

TABLEAU II

Dates d'attribution des statuts en fonction des séquences d'analyse

		Date d'analyse						
		02/98	06/98	10/98	02/99	06/99	10/99	02/00
N° Séquence		1						
		2						
		3						
		4						
		5						

6. ESTIMATION DE LA PREVALENCE ET DE LA DYNAMIQUE DE L'INFECTION

La prévalence est mesurée par la proportion de troupeaux dans chaque statut. Cinq mesures de prévalence instantanée correspondant aux cinq séquences préalablement définies ont été calculées.

La dynamique de l'infection est définie par la proportion de troupeaux changeant ou non de statut. L'analyse des taux de survie (troupeaux ne changeant pas de statut) et de transition (élevages changeant de statut) permet d'évaluer la dynamique de l'infection, d'une séquence à l'autre (soit sur quatre mois) ou en considérant les statuts initiaux et finaux de chaque troupeau sur l'ensemble de l'étude (16 mois).

IV - RESULTATS ET DISCUSSION

Sur les 2 400 troupeaux initialement tirés au sort, 2 135 ont bénéficié des sept analyses prévues. Les 265 perdus de vue sont généralement des élevages ayant cessé leur activité ou des troupeaux pour lesquels une (ou plusieurs) analyse(s) n'a pu être effectuée (difficulté des laboratoires interprofessionnels à trier des laits lors de changement de tournée de collecte, voire de laiterie).

La prévalence des troupeaux probablement indemnes est de 42% en moyenne ; cette proportion est stable sur la période d'étude. Il en est de même pour les autres statuts : 22% de B, 1% de C et 32% de D (tableau III).

La proportion de troupeaux E est faible (3% en moyenne).

Quatre vingt quatre pour cent des A restent A sur une période de 16 mois (tableau IV). Au total donc, environ 35% des troupeaux laitiers bretons semblent bénéficier d'un statut « indemne » de BVD et le conservent sur cette période (incluant deux saisons de stabulation). A l'inverse, seuls 3% des A deviennent D (soit 1% du total environ).

Le statut B apparaît être un statut transitoire : si près de la moitié restent B, 31% deviennent A (7% du total) alors que 19% d'entre eux deviennent D (4% du total).

La circulation virale initiale semble donc s'être traduite dans certains cas par une fabrication d'IPI lesquels induisent une deuxième vague de circulation virale importante se traduisant par une contamination massive de l'ensemble des vaches. Le devenir des C est également très variable. Si, dans un tiers des cas, il semble s'agir d'une fausse alerte, dans un tiers des cas également il semble s'agir d'une réelle circulation

virale avec contamination de l'ensemble des vaches. Compte tenu de la faible proportion de C, des investigations complémentaires méritent d'être entreprises dès la connaissance du statut C afin d'essayer de maîtriser la circulation du virus. Enfin, les D restent D pour la majorité d'entre eux (75% soit 20% du total environ). Seulement 2% d'entre eux semblent s'assainir spontanément.

TABLEAU III

Prévalence de l'infection BVD dans les troupeaux laitiers bretons (n = 2 135)

Statut Séquence	A Probablement indemne	B Circulation stoppée ?	C En séro conversion ?	D Contaminé	E Non caractérisable
1	39,4%	19,6%	1,9%	33,7%	5,3%
2	44,5%	23,5%	0,3%	28,0%	3,8%
3	44,4%	23,2%	1,3%	27,8%	3,3%
4	46,1%	24,2%	0,9%	28,0%	0,8%
5	42,1%	23,4%	0,9%	32,2%	1,4%

TABLEAU IV

**Dynamique de l'infection BVD dans les troupeaux laitiers bretons :
taux de survie et de transitions observés sur 16 mois**

Séq. 1 \ Séq. 5	A	B	C	D	E
A	84%	11%	1%	3%	1%
B	31%	45%	2%	19%	2%
C	27%	34%	0%	34%	5%
D	2%	22%	1%	74%	2%
E	44%	37%	1%	17%	1%

V - PERSPECTIVES

Une simulation sur 15 ans par chaîne de Markov (figure 1) (application des taux de survie et de transition observés sur 11 périodes de 16 mois) montre que, toutes choses restant égales par ailleurs, la situation actuellement observée est proche d'un état d'équilibre entre les différents statuts de troupeaux, notamment entre, d'une part, des troupeaux indemnes dont certains se contaminent plus ou moins rapidement, d'autre part, des troupeaux contaminés dont certains s'assainissent spontanément. Cet équilibre correspond à celui observé depuis des années et dont la traduction est le taux apparent d'incidence clinique, qui est probablement la face émergée de l'iceberg. Il est donc probable, voire quasi certain que, si aucune action n'est

entreprise, ce taux apparent ne diminuera pas ; les questions posées par les éleveurs et les administrateurs seront les mêmes dans 15 ans !

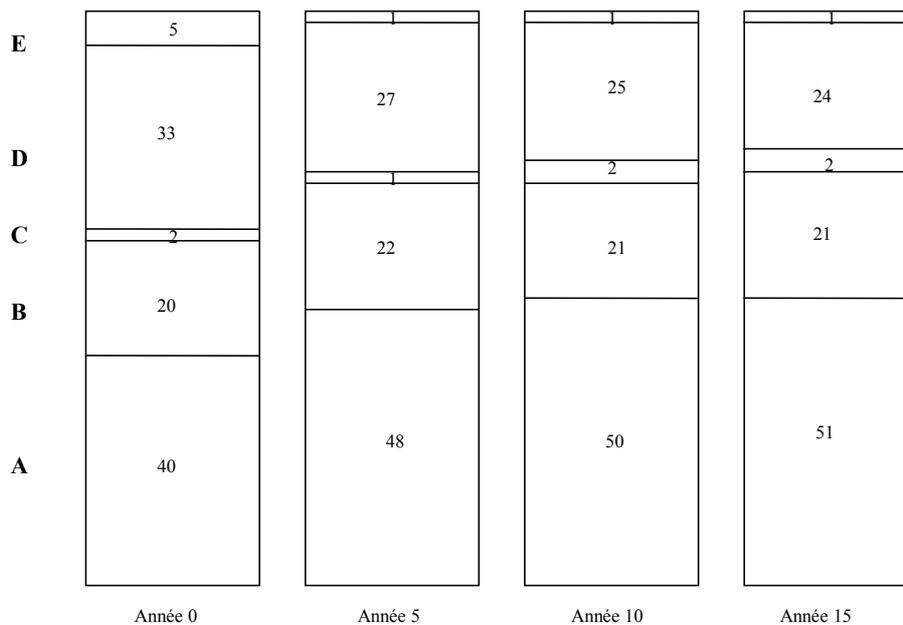
D'un point de vue théorique, une analyse de sensibilité (visant à évaluer l'effet de variations des probabilités de transition entre statuts) montre également que limiter le risque pour un troupeau d'évoluer d'un statut B à un statut D (20% des cas actuellement) serait favorable à terme à l'augmentation de la proportion de troupeaux probablement indemnes (A).

La réponse passe donc par la mise en place d'une réelle et effective maîtrise collective de la BVD dont plusieurs axes peuvent déjà être élaborés :

- protection des A (contrôle à l'introduction, maîtrise des contaminations de voisinage) ;
- réduction de la diffusion du virus à partir des foyers repérés ou contaminés (garanties individuelles avant la vente) ;
- suivi renforcé des élevages changeant de statut.

FIGURE 1

Simulation par chaîne de Markov de l'évolution des statuts des troupeaux vis-à-vis de l'infection BVD sur 15 ans



VI - CONCLUSION

L'utilisation d'un test ELISA sur lait de grand mélange permet d'attribuer un statut BVD, en 8 mois (trois analyses à quatre mois d'intervalle) aux troupeaux laitiers. Ces statuts peuvent varier dans le temps et le suivi individualisé des élevages permet de déterminer les évolutions.

A l'échelle de la Bretagne, sur la base de la situation actuelle, un équilibre dynamique semble installé pour

de nombreuses années. Cette étude nous conforte dans la volonté de mettre en place un plan de maîtrise collective de la BVD, basé sur la connaissance exhaustive des statuts de troupeau selon les modalités décrites ci-dessus et la mise en place de plans personnalisés, adaptés au statut et aux pratiques de chacun, dans l'objectif de diminuer le taux d'incidence clinique apparent.

VII - BIBLIOGRAPHIE

Beaudeau F., Assié S., Seegers H., Belloc C., Sella E. and Joly A. ~ Assessing the within-herd prevalence of antibody-positive cows to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) using a blocking ELISA on bulk tank milk. *Vet. Rec.*, 2001, 149, 236-240.

ANNEXE

Evaluation de la relation entre le pourcentage d'inhibition du lait de grand mélange et la prévalence des animaux positifs dans le troupeau.

MATERIEL ET METHODES

Dans 153 troupeaux tirés au sort parmi les 2 400 troupeaux concernés par l'étude, un prélèvement de lait de grand mélange (LGM) ainsi qu'un prélèvement de lait individuel (LI) chez toutes les vaches dont le lait entrant dans la composition du LGM a été réalisé le même jour. De plus, des prélèvements sanguins ont été réalisés chez 1 189 vaches de ces troupeaux pour évaluer la sensibilité et la spécificité du kit ELISA appliqué au LI en référence à la séroneutralisation. Les LGM, LI et sérums individuels ont été testés à l'aide du kit ELISA BVD/BD p80 compétition (LSI, Lissieu, France). Les sérums individuels ont également été soumis à une analyse par séroneutralisation (cellules de rein de veau ; souche de référence : C24V). L'ensemble des prélèvements ont été anonymisés. Les analyses ont été effectuées en aveugle.

La relation entre le pourcentage d'inhibition du lait de tank et la prévalence des animaux positifs dans le troupeau a été évaluée à l'aide de la méthode ROC (Receiver-Operating Characteristics). Des classes de pourcentage d'inhibition du LGM associées à des variances de la prévalence des animaux positifs minimum intra-classe et maximum entre classes ont été déterminées.

PRINCIPAUX RESULTATS ; DISCUSSION

CARACTERISTIQUES DU KIT ELISA BVD/BD p80 COMPETITION APPLIQUE AU LAIT INDIVIDUEL

La valeur de cut off permettant de discriminer avec les meilleures sensibilité et spécificité combinées les laits individuels (LI) considérés positifs des laits considérés négatifs a été fixé à 30% d'inhibition. L'interprétation pour un LI est donc la suivante :

- pourcentage d'inhibition < 30% = Négatif
- pourcentage d'inhibition > 30% = Positif

Les sensibilité et spécificité du kit ELISA BVD/BD p80 compétition appliqué au lait individuel (en comparaison à la séroneutralisation sur sérum des mêmes vaches) étaient de 96,9 et 97,3% [Beaudeau *et al.*, 2001a].

RELATION ENTRE LE POURCENTAGE D'INHIBITION DU LAIT DE GRAND MELANGE ET LA PREVALENCE DES ANIMAUX POSITIFS DANS LE TROUPEAU

L'analyse ROC a conduit à répartir les troupeaux dans trois classes de pourcentage d'inhibition (0 : [0,35[; 1 : [35, 60[; 2 : [60, 100%]) qui correspondent à des niveaux attendus de prévalence des animaux porteurs d'anticorps anti-BVD intra-troupeau respectivement compris entre 0 et 10% (moyenne 5%), 10 et 30% (moyenne 22%) et 30 à 100% (moyenne 66%) (tableau I, figure 1) [Beaudeau *et al.*, 2001b].

TABLEAU I

Prévalence attendue des animaux positifs dans le troupeau en fonction du pourcentage d'inhibition d'un prélèvement de LGM (kit ELISA BVD/BD p80 compétition)

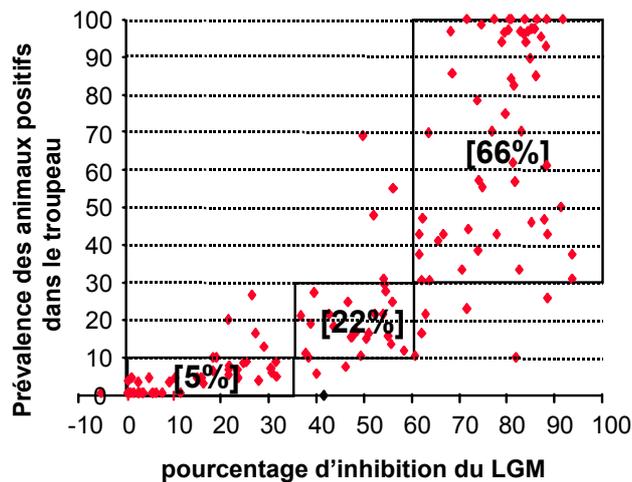
Résultat Pourcentage d'inhibition du LGM	Prévalence attendue (moyenne observée)	Code
0-35%	0-10% (5%)	0
35-60%	10-30% (22%)	1
≥ 60%	30-100% (66%)	2

La prédiction de la prévalence des animaux positifs intra-troupeau apparaît bonne pour des pourcentages d'inhibition inférieurs à 35, alors que cette prévalence est très variable pour des pourcentages d'inhibition supérieurs à 60 (figure 1).

Cependant un troupeau avec deux pourcentages d'inhibition consécutifs (à quatre mois d'intervalle) en code « 2 » (supérieurs à 60%) est caractérisé par une forte prévalence des animaux positifs en son sein (moyenne = 80% ; médiane = 93%).

FIGURE 1

Relation entre pourcentage d'inhibition du LGM et prévalence des animaux positifs dans le troupeau [prévalence moyenne intra-classe] (134 troupeaux)



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beaudeau F., Belloc C., Seegers H., Assié S., Sellal E. and Joly A. - Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. *Vet. Microbiol.*, 2001a, **80**, 329-337.
- Beaudeau F., Assié S., Seegers H., Belloc C., Sellal E. and Joly A. - Assessing the within-herd prevalence of antibody-positive cows to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) using a blocking ELISA on bulk tank milk. *Vet. Rec.*, 2001b, **149**, 236-240.

