

## DEUX APPROCHES COMPLÉMENTAIRES DE LA PERFORMANCE RÉELLE DE DÉTECTION DES CHEPTELS INFECTÉS IBR PAR SÉROLOGIES EN MÉLANGES DE 10\*

Luc Mieli<sup>1</sup>, Jean Pierre Alzieu<sup>2</sup>, Chantal Audeval<sup>3</sup>, Xavier Desclaux<sup>2</sup>,  
Marie Heurtault<sup>3</sup> et Viviane Moquay<sup>4</sup>

### RÉSUMÉ

L'historique de la mise en place du contrôle de l'IBR au plan national français est particulier.

De nombreuses interrogations sur la performance des mélanges de 10 sérums à détecter les cheptels infectés ont été formulées et publiées (rapport Anses 2005 SA 250 par exemple). Les modalités du contrôle IBR ayant évolué très récemment, ces deux approches complémentaires fondées sur le réel ont pour objet de contribuer à l'évaluation de la performance de l'utilisation des mélanges de 10 sérums en situation opérationnelle.

Les deux approches utilisées aboutissent à l'observation convergente d'un défaut de détection de l'ordre de 15% des cheptels infectés IBR.

Une étude sur la taille appropriée des mélanges de sérums aptes à mieux détecter l'infection des cheptels paraît donc incontournable.

**Mots-clés** : virus IBR, détection des cheptels infectés.

### SUMMARY

The history of the development of an IBR national control program in France is unique. Numerous questions regarding the advisability of pooling 10 individual sera samples to detect infected herds have been voiced and published (Afssa report 2005 SA 250 for instance).

Since the last modifications in procedures dating back to September 2010, we implemented 2 different and complementary approaches to contribute to an operational evaluation of pooling sera by ten (approximately a 15% loss in sensitivity in the detection of infected Herds).

A further study on the appropriate degree of sera pooling in order to better detect infected herds is appears highly desirable.

**Keywords**: IBR virus, Infected herd detection.



\* Texte de la communication orale présentée au cours des Journées scientifiques AEEMA, 1<sup>er</sup> juin 2012

<sup>1</sup> Laboratoire de développement et d'analyses des Côtes-d'Armor (LDA22), 7 rue du Sabot, 22440 Ploufragan, France - lmieli@lda22.com

<sup>2</sup> Laboratoire départemental d'analyses et de conseil de la Nièvre (LDAC 58), rue de la Fosse aux Loups, BP 25, 58028 Nevers, France

<sup>3</sup> Laboratoire vétérinaire départemental de l'Ariège (LVD09), rue Las Escoumès, 09008 Foix, France

<sup>4</sup> Laboratoire vétérinaire départemental de la Haute-Garonne (LDA 31), 76 chemin Boudou, 31140 Launaguet, France

---

## I - INTRODUCTION

---

L'historique et les modalités de la mise en place du contrôle de l'IBR au plan français sont particuliers et originaux [Bronner *et al.*, 2010].

De nombreuses interrogations sur la performance réelle de l'approche de la qualification des cheptels utilisant le mélange de dix sérums ont été formulées dès l'élaboration du premier cahier des charges ACERSA.

Ces interrogations ont été reprises, développées et publiées dans la saisine AFSSA 2005 SA 250.

Des données sur la performance réelle d'une telle approche ont été exposées il y a 3 ans lors des journées ADILVA par V. Moquay (LVD 31), renforçant les doutes sur la performance réelle de l'approche en mélange de 10 sérums (non détection de l'ordre de 25% des cheptels

infectés IBR par cette approche en Haute-Garonne).

Pour la campagne de prophylaxie 2010- 2011, les modalités de performance à satisfaire par les trousseaux ELISA IBR pour obtenir l'agrément par le LNR ont été modifiées, ceci devant permettre d'améliorer l'efficacité du système de certification en matière d'IBR.

Certaines publications concluent : « Les simulations *a priori* et *a posteriori* de la performance de qualification IBR amènent à considérer comme fiable l'affectation de la qualification : indemne d'IBR » (Bronner *et al.*, 2010).

Notre étude par deux approches complémentaires a pour objectif d'estimer les performances biologiques réelles des nouvelles dispositions d'analyses IBR mises en place pour la campagne 2010-2011.

---

## II - MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

### 1. DÉFINITIONS RETENUES POUR L'ÉTUDE

Ces définitions, fondées sur des notions biologiques, ne sont pas toutes en accord avec les définitions retenues par l'EFSA.

#### 1.1. ANIMAL REELLEMENT INFECTÉ

Tout animal donnant un résultat individuel positif convergent entre la technique ELISA anticorps totaux **et** la technique ELISA anticorps gB.

(Nota : avec les données actuelles de spécificité individuelle à 99,3%, le risque cumulé d'erreur à tort sur la base de cette définition pour deux tests ELISA convergents est de 5 pour 100 000).

L'EFSA considère tout animal donnant une réponse positive en Elisa IBR anticorps totaux **ou** gB comme infecté [EFSA 2005]. Notre définition est donc beaucoup plus restrictive.

#### 1.2. ANIMAL POTENTIELLEMENT INFECTÉ

Tout animal donnant des résultats individuels

divergents entre les deux techniques ELISA gB et anticorps totaux dans un cheptel.

Le risque de considérer un résultat divergent comme définissant un animal potentiellement infecté à tort est estimé à 0,7% avec les données actuelles (d'après les données de spécificité du premier test, soit 99,3%).

#### 1.3. ANIMAL « SINGLE REACTOR »

Tout animal donnant un résultat individuel positif convergent isolé dans un cheptel.

#### 1.4. ANIMAL « SINGLE REACTOR » DIVERGENT

Tout animal donnant un résultat individuel divergent isolé dans un cheptel.

#### 1.5. CHEPTEL INFECTÉ

Cheptel contenant au moins un animal réellement infecté (noté « pos » dans le tableau 3).

### 1.6. CHEPTTEL POTENTIELLEMENT INFECTE

Cheptel ne contenant pas d'animal réellement infecté et au moins un « single reactor » divergent (noté « ? » dans le tableau 3).

### 1.7. CHEPTTEL INFECTE NON DETECTE

Cheptel non détecté en mélanges de 10 et contenant au moins un animal réellement infecté.

## 2. PREMIÈRE APPROCHE : ANALYSE EN SÉROLOGIES INDIVIDUELLES DE L'ENSEMBLE DES ÉCHANTILLONS COMPOSANT LES MÉLANGES NÉGATIFS (LDAC 58)

### 2.1. ECHANTILLONS

Deux populations d'échantillons de mélanges négatifs (technique ELISA Ac totaux) sont sélectionnées, dont les résultats sont loin du seuil de positivité de la technique (mélanges dits « hypernégatifs ») :

- Une population d'échantillons provenant de cheptels qualifiés A dont tous les mélanges donnent des résultats négatifs loin du seuil (25 cheptels - 2 256 échantillons) ;
- Une population d'échantillons provenant de cheptels non qualifiés dont tous les mélanges donnent des résultats négatifs loin du seuil (23 cheptels - 2 079 échantillons).

### 2.2. PROTOCOLE

Les échantillons contenus dans les mélanges « hypernégatifs » ayant amené à considérer des cheptels comme non infectés sont repris en analyses ELISA individuelles anticorps totaux et anticorps gB à l'aide de trousse agréées par le Laboratoire national de référence IBR (LNR IBR).

## 3. DEUXIÈME APPROCHE : SÉLECTION DE CHEPTELS PROBLÉMATIQUES OU INFECTÉS EN SÉROLOGIE INDIVIDUELLE ET RÉANALYSE EN MÉLANGES DE 10 SÉRUMS (LVD 09)

### 3.1. SÉLECTION D'UNE POPULATION D'ÉCHANTILLONS

Nous avons recherché des cheptels sur la base des résultats obtenus en sérologie individuelle et les avons retenus de manière à

équilibrer au mieux les différentes catégories listées ci-dessous :

- Cheptel contenant un « single reactor » divergent : 12 cheptels (notés ?) ;
- Cheptel infecté contenant un « single reactor » : 32 cheptels (notés pos) ;
- Cheptel infecté contenant entre 2 et 4 échantillons positifs dont au moins un positif dans les 2 techniques : 22 cheptels (notés pos) ;
- Cheptel infecté contenant entre 5 et 7 échantillons positifs dont au moins un positif dans les 2 techniques : 14 cheptels (notés pos) ;
- Cheptel infecté contenant plus de 7 échantillons positifs dont au moins un positif dans les 2 techniques : 17 cheptels (notés pos).

En fonction des possibilités, les cheptels ont été sélectionnés pour avoir un échantillonnage représentatif de la grande diversité de taille des cheptels en Ariège.

Si dans un cheptel, un sérum positif est en quantité insuffisante pour être réanalysé en mélange, il est exclu, et le cheptel correspondant est transféré, si nécessaire, dans la catégorie adéquate (très peu de cas dans cette étude).

### 3.2. PROTOCOLE

#### 3.2.1. Réalisation de mélanges de 10 échantillons à partir des sérums individuels (mélanges intracheptel)

Les sérums utilisés pour la réalisation des mélanges sont **tous** les sérums faisant partie du même cheptel prélevé au même moment, les allotements de sérums dans les mélanges sont réalisés en respectant strictement l'ordre d'identification initial des sérums, quelle que soit la taille du mélange à reconstituer (pour les mélanges incomplets).

S'il s'avère nécessaire de substituer un sérum négatif manquant en sérothèque, il est substitué par un sérum sûrement négatif (soit sérum de fœtus bovin, soit sérum pris dans un cheptel dont l'ensemble des échantillons ont donné un résultat individuel négatif).

#### 3.2.2. Analyse des mélanges constitués

Une trousse ELISA IBR anticorps totaux

agrée par le LNR est utilisée en respectant le seuil du fabricant.

### 3.2.3. Intégration des incertitudes autour du seuil de la technique

Un sérum placé régulièrement dans les microplaques ELISA sert d'indicateur de reproductibilité, la variabilité moyenne observée est intégrée sur le seuil de positivité en respectant les exigences du Guide de

bonnes pratiques Elisa [Norme Afnor NF U 47 019 février 2010 – Annexe informative].

Le CV de reproductibilité observé est de 10%, l'incertitude retenue sur le seuil est donc de 20%.

Deux chiffres seront donc présentés dans les résultats pour cette étude : le pourcentage observé de cheptels infectés non détectés en mélange de 10 et le pourcentage maximal de cheptels non détectés observable en intégrant l'incertitude sur le seuil.

## III - RÉSULTATS

### 1. RÉSULTATS DE LA PREMIÈRE APPROCHE (LDAC 58)

Les résultats sont présentés dans les tableaux 1 et 2 pour chacune des 2 populations :

Pour une facilité de lecture des résultats, seuls les cheptels infectés non détectés sont mentionnés dans la dernière colonne des tableaux 1 et 2.

Tableau 1

Détail du nombre d'échantillons détectés dans chaque cheptel qualifié A

Cheptels qualifiés A	Effectif total analysé	Nombre d'échantillons Pos Ac totaux /pos. Ac gB par analyse individuelle	Nombre d'échantillons Pos Ac totaux /nég. Ac gB par analyse individuelle	Cheptel infecté non détecté en mélange de 10 (par ELISA Ac totaux)
1	89	1	1	Non détecté
2	81	0	0	
3	95	0	0	
4	84	0	0	
5	81	0	2	
6	93	0	0	
7	99	0	2	
8	95	0	0	
9	93	1	0	Non détecté
10	99	0	0	
11	81	0	0	
12	96	0	0	
13	87	0	0	
14	89	0	0	
15	89	0	0	
16	95	4	1	Non détecté
17	91	0	1	
18	97	0	1	
19	92	0	0	
20	86	0	0	
21	97	0	0	
22	83	0	0	
23	86	0	0	
24	94	0	0	
25	84	1	0	Non détecté

*Abréviations utilisées* : Ac totaux : Anticorps totaux contre le virus IBR ; Ac gB : Anticorps dirigés contre la glycoprotéine gB du virus IBR ; Pos Ac gB : Présence d'anticorps gB ; Neg Ac gB : Absence d'anticorps gB

Tableau 2

Détail du nombre d'échantillons détectés dans chaque cheptel non qualifié

Cheptels non qualifiés	Effectif total analysé	Nombre d'échantillons Pos Ac totaux /pos. Ac gB par analyse individuelle	Nombre d'échantillons Pos Ac totaux /Nég Ac gB par analyse individuelle	Cheptel infecté non détecté en mélange de 10 (par ELISA Ac totaux)
1	86	1	0	Non détecté
2	96	0	0	
3	83	0	0	
4	77	0	1	
5	80	0	0	
6	99	0	0	
7	95	0	0	
8	94	0	1	
9	85	3	3	Non détecté
10	80	0	1	
11	98	1	1	Non détecté
12	86	0	0	
13	99	0	0	
14	97	0	2	
15	92	0	0	
16	99	0	0	
17	99	0	0	
18	96	0	1	
19	86	0	0	
20	92	0	0	
21	82	0	3	
22	97	0	1	
23	81	0	0	

*Abréviations utilisées* : Ac totaux : Anticorps totaux contre le virus IBR ; Ac gB : Anticorps dirigés contre la glycoprotéine gB du virus IBR ; Pos Ac gB : Présence d'anticorps gB ; Neg Ac gB : Absence d'anticorps gB

## 2. RÉSULTATS DE LA DEUXIÈME APPROCHE (LVD 09)

Les résultats détaillés sont présentés dans le tableau 3.

Pour une facilité de lecture des résultats, seuls les cheptels infectés non détectés sont

mentionnés dans la dernière colonne du tableau 3.

Aucun cheptel potentiellement infecté (noté ?) n'a été détecté en mélanges de 10 dans l'étude LVD 09.

Tableau 3

Détail du nombre d'échantillons détectés dans chaque cheptel

Cheptel	Statut cheptel	Effectif total analysé	Nombre d'échantillons Pos gB/ Pos Ac totaux	Nombre d'échantillons Pos Ac gB/Nég Ac totaux	Cheptel infecté non détecté en mélange de 10 (analyse Ac totaux)
1	?	37	0	1	
2	?	26	0	1	
3	?	39	0	1	
4	?	19	0	1	
5	pos	73	1		Non détecté
6	?	16	0	1	
7	?	57	0	1	
8	?	69	0	1	
9	pos	68	1		Non détecté
10	?	16	0	1	

Cheptel	Statut cheptel	Effectif total analysé	Nombre d'échantillons Pos/Pos	Nombre d'échantillons Pos/Nég	Cheptel infecté non détecté en mélange de 10
11	pos	71	1		Non détecté
12	pos	28	1		Non détecté
13	?	99	0	1	
14	?	55	0	1	
15	pos	172	1		Non détecté
16	?	15	0	1	
17	?	54	0	1	
18	pos	43	1		Non détecté
19	pos	87	1	0	
20	pos	47	1	0	
21	pos	18	1	0	Non détecté
22	pos	14	1	0	
23	pos	49	1	0	Non détecté
24	pos	20	1	0	
25	pos	17	1	0	
26	pos	102	1	0	
27	pos	60	1	0	
28	pos	26	1	0	
29	pos	27	1	0	
30	pos	61	1	0	
31	pos	18	1	0	
32	pos	12	1	0	Non détecté
33	pos	27	1	0	
34	pos	30	1	0	
35	pos	38	1	0	
36	pos	42	1	0	
37	pos	22	1	0	
38	pos	13	1	0	
39	pos	31	1	0	
40	pos	140	1	0	
41	pos	159	1	0	
42	pos	38	1	0	
43	pos	63	1	0	Non détecté
44	pos	22	1	0	
45	pos	25	3	0	
46	pos	32	4	0	
47	pos	22	2	0	
48	pos	29	2	0	
49	pos	59	3	1	
50	pos	52	4	0	
51	pos	25	1	2	Non détecté
52	pos	31	2	0	
53	pos	44	1	2	
54	pos	36	3	1	
55	pos	40	4	0	
56	pos	26	4	0	
57	pos	37	2	0	
58	pos	27	2	1	
59	pos	22	3	0	
60	pos	54	2	1	
61	pos	25	3	0	
62	pos	57	2	0	

Cheptel	Statut cheptel	Effectif total analysé	Nombre d'échantillons Pos/Pos	Nombre d'échantillons Pos/Nég	Cheptel infecté non détecté en mélange de 10
63	pos	42	2	2	
64	pos	28	2	0	
65	pos	55	3	1	
66	pos	27	1	2	
67	pos	42	4	1	
68	pos	69	3	3	
69	pos	163	7	0	
70	pos	58	6	1	
71	pos	46	4	2	
72	pos	68	4	1	
73	pos	132	5	1	
74	pos	48	5	2	
75	pos	48	7	0	
76	pos	52	4	1	
77	pos	55	2	2	
78	pos	88	3	2	
79	pos	64	5	2	
80	pos	55	6	1	
81	pos	52	8	1	
82	pos	72	6	1	
83	pos	88	14	0	
84	pos	129	29	3	
85	pos	67	5	4	
86	pos	82	10	0	
87	pos	52	7	5	
88	pos	181	25	6	
89	pos	185	47	6	
90	pos	57	7	2	Non détecté
91	pos	105	14	3	
92	pos	69	9	0	
93	pos	212	30	5	
94	pos	88	10	2	
95	pos	85	49	3	
96	pos	74	28	7	
97	pos	68	14	3	

*Abréviations utilisées* : Ac totaux : Anticorps totaux contre le virus IBR ; Ac gB : Anticorps dirigés contre la glycoprotéine gB du virus IBR ; Pos Ac gB : Présence d'anticorps gB ; Neg Ac gB : Absence d'anticorps gB

#### 4. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS DES DEUX APPROCHES (LDAC 58 et LVD 09)

Tableau 4

##### Synthèse des résultats obtenus par les deux approches (trois populations de sérums différentes)

	Nombre de cheptels	Nombre de sérums	Nombre de cheptels infectés non détectés contenant au moins un échantillon Positif/Positif	Taux observé de cheptels infectés non détectés en mélange de 10	Taux maximal de cheptels infectés non détectés en mélange de 10 (par intégration de l'incertitude)
1 <sup>ère</sup> Approche LDAC 58 Cheptels qualifiés A	25	2 256	4	16%	N.C.
1 <sup>ère</sup> Approche LDAC 58 Cheptels non qualifiés	23	2 079	3	13%	N.C.
2 <sup>ème</sup> Approche (LVD 09)	97 (dont 12 à statut ?)	5 589	12	14,1%	17,6%

N.C. : non calculable

Nota : le calcul de taux est fondé uniquement sur le nombre de cheptels réellement infectés, non sur les cheptels contenant un sérum divergent (notés ?)

---

#### IV - DISCUSSION

---

Le taux de cheptels infectés non détectés en appliquant la nouvelle procédure définie pour la prophylaxie 2010-2011 est comparable dans les deux approches ; il est voisin de 15%, malgré des biais différents (sous-estimation dans la première approche, due à la sélection de cheptels dont tous les mélanges de sérums donnaient des résultats hypernégatifs, biais de sélection par un choix orienté des populations dans la deuxième approche). Ce chiffre s'approche donc très vraisemblablement du taux réel moyen de cheptels non détectés par l'approche analytique utilisant les mélanges de 10 sérums.

Bien que la majorité des cheptels non détectés contienne un seul animal réellement infecté (« single reactor »), plusieurs cheptels contenant des animaux réellement infectés sont également non détectés par la procédure actuelle utilisant des mélanges de 10 sérums (3 cheptels dans ces études, contenant respectivement 4, 3 et 7 animaux réellement infectés).

Manifestement, la présence d'un « single reactor » n'est pas liée au nombre d'animaux

présents dans le cheptel (détection aussi bien dans un cheptel de 12 animaux que de 171, voir tableau 3).

Aucune publication n'a établi de lien entre le nombre d'animaux infectés dans un cheptel et la capacité à réactiver l'infection IBR : on ne peut donc préjuger d'un niveau de risque différent à réactiver l'infection ou à contaminer un autre cheptel en fonction du nombre d'animaux infectés identifiés dans un cheptel.

Les approches actuelles de la validité de la certification IBR méconnaissent la validité biologique initiale des données générées par analyses en mélanges de 10 sérums : les données acquises montrent ici que la validité de l'affectation de la qualification « Cheptel indemne d'IBR » est sujette à caution et qu'il n'est pas pertinent d'ignorer les réalités biologiques dans un processus visant à garantir en confiance le statut d'un cheptel ou d'un animal.

L'exploration par le réel de la taille de mélange de sérums apte à permettre une meilleure identification des cheptels infectés paraît donc absolument incontournable.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

Bronner A. - La lutte contre la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) en France : un dispositif original. Présentation, bilan et perspectives. *Bull. épidémiol., santé animale et alimentation*, 2010, **41**, 12-15.

EFSA - Opinion of the Scientific Panel on Animal Health, and Welfare (AHAW) on a request from the Commission on a Definition of a BoHV-1-free animal and a BoHV-1-free holding, and the procedures to verify and maintain this status, 15 décembre 2005.

Mémeteau S - Bilan des mesures de surveillance réglementaires et volontaires de la Rhinotracheite infectieuse bovine (IBR) en 2010 : vers un objectif d'éradication. *Bull. épidémiol., santé animale et alimentation*, 2011, **46**, 18-20.

Mieli L. *et al.* - Guide de Bonnes pratiques Elisa en Immunosérologie animale. AFNOR NF U 47 019 fev 2010.

