



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 5181](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/5181)

To cite this version :

Bernardin, Elise. *Utilisation du lait de tank pour l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau vis-à-vis de la border disease en élevage ovin lait : une étude pratique en Aveyron*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2011, 93 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

UTILISATION DU LAIT DE TANK POUR L'ÉVALUATION DE LA SÉROPRÉVALENCE INTRA-TROUPEAU VIS-À-VIS DE LA BORDER DISEASE EN ÉLEVAGE OVIN LAIT : UNE ÉTUDE PRATIQUE EN AVEYRON

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BERNARDIN Elise
Née, le 25 Janvier 1986 à TOUL (54)

Directeur de thèse : M. Fabien CORBIERE

JURY

PRESIDENT :
M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :
M. Fabien CORBIERE
M. Renaud MAILLARD

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE

M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
M. SAUTET Jean, *Anatomie*
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1°
CLASSE

M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2°
CLASSE

Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*
M. DUCOS Alain, *Zootechnie*
M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
M. PICALET Dominique, *Pathologie infectieuse*
M. SANS Pierre, *Productions animales*

Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**N. PROFESSEURS CERTIFIES DE
L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**O. MAITRES DE CONFERENCES HORS
CLASSE**

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe
normale)**

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

**P. MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS
CONTRACTUELS**

M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
M. **DASTE Thomas**, *Urgences-soins intensifs*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
CONTRACTUELS**

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur Henri DABERNAT

Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Bactériologie et virologie

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.
Hommages respectueux et sincères remerciements.*

A notre Jury de thèse

Monsieur le Professeur Fabien CORBIERE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie du bétail

*Qui nous a confié ce travail et nous a guidée dans son élaboration.
Pour sa disponibilité sans réserve, et son aide inestimable lors de la
rédaction de ce manuscrit.*

*En témoignage de notre plus profonde gratitude et de notre plus grand
respect.*

Sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Renaud MAILLARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie du bétail

*Qui nous a fait le plaisir de participer à ce jury de thèse.
Qu'il soit assuré de notre grande reconnaissance.*

A tous les membres de la commission ovine de la Fédération des Organismes de Défense Sanitaire de l'Aveyron, Céline Pouget, tous les vétérinaires impliqués, et Aveyron Labo

*Qui sont à l'origine de ce projet.
Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et le désir de rendre hommage à leurs propres travaux.*

A ma famille,

Mes parents, pour votre soutien sans faille, durant ces longues années studieuses, malgré la distance qui nous sépare. **Maman**, la plus douce des mamans, pour tes petites attentions réconfortantes. **Papa**, le plus grand des papas, pour m'avoir guidée dans les moments d'égarement. Merci pour tout.

Mes sœurs, Julie, la plus sportive des grandes sœurs, tes prouesses athlétiques m'épateront toujours. Mais au-delà de ton énergie, c'est la gentillesse et la simplicité qui te caractérise le mieux. **Marie**, le plus joli des petits bouts, grâce à toi j'ai la chance de pouvoir vivre ma seconde passion par procuration. Merci pour ça, et pour ce bon caractère qui me fait parfois défaut...

Mes grands-parents, Mémère Jeannette, pour nos petites confidences qui symbolisent beaucoup pour moi. **Pépère Loulou** et ta mobylette. **Mémère Jo**, pour ces vacances en Meuse, où est sans doute née ma vocation.

« **ma reine** » **Sylvie, Alain et les cousins**, à nos repas de famille gargantuesques, et à votre porte toujours ouverte. C'est rassurant de savoir que je peux compter sur vous.

A Ben, pour ta personnalité bouleversante, ta générosité débordante, pour m'avoir offert ta sensibilité, et pour ce lien indicible qui nous unit. Tu émousses ma vie...

A mes amis de prépa,

Aurore, pour m'avoir accompagnée tout au long de cette aventure, de Nancy à Spincourt, en passant par Paris ! Et pour cette amitié passionnelle qui nous unit. **A Rémi, Gillou** et tes tracteurs, **Guillaume, Sandra** chérie, merci pour cette année formidable en votre compagnie.

A nos années de châtelains,

Manon, mon inséparable... Pour ton élégance, et cette exceptionnelle capacité d'être perfectionniste et insouciant à la fois. Et pour nos voyages qui font aussi la richesse de notre amitié. **Julie**, pour ta délicatesse et ta bienveillance, pour nos confidences partagées, ton écoute inestimable et tes mots justes. Merci d'avoir toujours été là pour moi... **Germain**, pour ta galanterie, pour ta complexité, pour ces discussions captivantes où l'on partageait nos interrogations sur l'avenir. Une amitié émouvante... **Gaston**, pour ta subtilité et pour m'avoir fait partager ta philosophie de la vie. Merci pour cette bonne influence. **Fabien**, le coloc parfait : fin cuisinier, maniaque de la propreté et mannequin de lingerie... Ce fut un délice de partager cette maison avec toi ! **Jean Da, Antoine, Steve** et **Antonio**, merci de m'avoir supportée...

A ces précieuses rencontres,

Manon, la grande, pour ta pétillante spontanéité, et tes histoires hilarantes. Pardonne-moi d'avoir préféré Schelch à l'Argentine... **Aurélie F**, la plus fêtarde des copines, pour ta bonne humeur, et ta sérénité. Et pour nos parties de handball, quel plaisir d'avoir été ta coéquipière ! **Aurélie M**, je dirais même plus : pour nos petites discussions qui font beaucoup de bien ! Et pour ton coaching de dernière minute qui m'a évité bien des déboires à l'imprimerie... **Emilie**, pour ta louable honnêteté, et pour ton sens aigu de la perfection. **Lili**,

ma poulotte préférée, pour ta personnalité hors du commun, ton humour et ton amitié fidèle. **Evence**, pour ton ironie décapante qui contraste avec ton savoir vivre. Merci pour ces séances de psychologie salvatrice. **Camille**, ma copie conforme, version blonde !

Aux copains de promo, Laura, pour tes talents de danseuse, tu m'apprendras un jour ??!
Aline, pour ton look parfait que je jalouse, et pour ta franchise qui me fait marrer. **Morgane**, pour nos racines communes. **Mumu**, pour ton amabilité. **Jérôme**, le plus charmant des partenaires de TD, ce fut un plaisir de travailler à tes côtés. **Michou**, pour ton charisme. **Julien**, parce que tu as toujours un petit mot gentil quand on se croise. **Pierre, Edouard, Martin, Fixou, Laurie...** Merci pour tous ces bons moments passés ensemble.

A mes docteurs, Brice, pour m'avoir prise sous ton aile, et pour m'avoir convaincu que les Setters Anglais étaient les plus beaux chiens du monde ! **Majida**, en souvenir de ce séjour en Crète où j'ai découvert une fille admirable, et pour nos rêves d'arc en ciel. **Mado**, pour ta gentillesse. **Aude**, pour ta motivation. Et à tous les autres, pour nous avoir transmis avec brio les valeurs de cette école.

A mes poulots, tonton Clém et Sophie, parce que je peux compter sur vous, **Julien** et tes massages de ouf, **Alexia**, pas mal la meuf ! **Arnold, Maxou, Hugues, Mailys, Vincent, Matthieu, Jérémie...**

Aux buiatres, Florent, pour m'avoir transmis ton enthousiasme, et surtout pour m'avoir trouvé un sujet de thèse ! A mes acolytes : **Arnaud**, le rigolo. **Etienne**, le sage. **Thomas**, le gentil étourdi. **Nico, Françou, Ximun...** les plus lourds mais non moins attachants. Et **Alex**, le geek, pour le p'tit coup de pouce à la mise en page de cette thèse !

A F. Schelcher, pour la rigueur, la cohérence, et le savoir, et surtout pour me permettre d'en profiter une seconde année. Incommensurable merci...

A toute **l'équipe de patho. bét.** qu'il fait bon côtoyer.

A tous les vétérinaires, qui ont contribué à mon épanouissement professionnel : **Hubert**, le meusien, merci pour ta confiance. **Pr J.R. Farnier**, le légendaire. **Anne Catherine**, la déterminée. **Dr Rives**, le passionnant passionné. **Ian Beverdige**, le chercheur flegmatique.

A la plus attachante des insupportables infidèles créatures, ma **Cambell**, la plus belle...

A Pépère Jo...

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	13
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION.....	17
Première partie : LES PESTIVIROSES.....	19
I. LES PESTIVIRUS	21
I.1. Taxonomie.....	21
I.2. Caractéristiques structurales et organisation génomique	21
I.3. Propriétés biologiques	22
I.3.1. Notion de biotype	22
I.3.2. Variabilité génétique	23
I.3.3. Spectre d'hôte et transmission interspécifique	24
I.3.4. Sensibilité du virus	24
II. LA MALADIE CHEZ LES OVINS	25
II.1. Infection post-natale, transitoire, hors gestation.....	25
II.1.1. Pathogénèse	25
II.1.2. Expression clinique	25
II.1.2.1. Forme subclinique	25
II.1.2.2. Petega ovina	25
II.2. Infection fœtale, permanente, pendant la gestation	26
II.2.1. Pathogénèse	26
II.2.2. Signes cliniques associés.....	27
II.3. Bilan des troubles observés	29
II.4. Conséquences épidémiologiques.....	30
II.4.1. Sources de l'infection	30
II.4.1.1. Sources animales	30
II.4.1.2. Environnement	30
II.4.2. Matières virulentes	30

II.4.3.	Modes de transmission	31
II.4.3.1.	Transmission entre animaux	31
II.4.3.2.	Transmission entre élevages	31
III.	DIAGNOSTIC	32
III.1.	Diagnostic épidémio-clinique et nécropsique	32
III.2.	Diagnostic de laboratoire.....	32
III.2.1.	Méthodes de détection virale.....	33
III.2.1.1.	Isolement viral en culture cellulaire	33
III.2.1.2.	Détection des antigènes viraux (ELISA Ag).....	34
III.2.1.3.	Détection des acides nucléiques (PCR).....	35
III.2.1.4.	Interprétation des tests virologiques	36
III.2.2.	Méthodes de détection des anticorps.....	36
III.2.2.1.	Test de séroneutralisation.....	36
III.2.2.2.	Tests Immunoenzymatiques.....	37
III.2.2.3.	Interprétation des tests sérologiques	39
III.3.	Diagnostic lors de suspicion clinique	40
III.4.	Diagnostic lors de dépistage.....	40
III.4.1.	Dépistage individuel.....	40
III.4.2.	Dépistage collectif.....	41
IV.	MESURES DE MAITRISE.....	43
IV.1.	Prophylaxie médicale : la vaccination.....	43
IV.1.1.	Objectifs de la vaccination	43
IV.1.2.	Arsenal vaccinal disponible.....	43
IV.1.2.1.	Chez les bovins	43
IV.1.2.2.	Chez les ovins	46
IV.2.	Prophylaxie sanitaire (modèle bovin).....	46
IV.2.1.	Dépistage et élimination des IPI.....	46
IV.2.2.	Suivi des statuts infectieux des cheptels.....	47
IV.2.3.	Contrôle à l'introduction et biosécurité.....	49
IV.2.4.	Garantie « non IPI » (exclusivité bovine).....	49
IV.3.	Les différentes stratégies de lutte contre le virus BVD	50
IV.3.1.	Echelle individuelle.....	50
IV.3.2.	Echelle collective	51

V.	LA BORDER DISEASE EN FRANCE	52
V.1.	Petega ovina	52
V.2.	Dispositif d'épidémiosurveillance.....	53
V.2.1.	Présentation	53
V.2.2.	Modalité.....	53
	Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE	57
I.	OBJECTIFS DE L'ETUDE	59
II.	MATERIEL ET METHODES.....	59
II.1.	Constitution de l'échantillon	59
II.2.	Réalisation des prélèvements	60
II.3.	Critères d'exclusion de l'échantillon.....	60
II.4.	Choix de l'analyse	61
II.5.	Analyses des données.....	62
II.5.1.	Interprétation de la séroprévalence à partir des résultats de sérologie sur petits mélanges de sérum	62
II.5.2.	Relation entre pourcentage d'inhibition sur lait de tank et séroprévalence intra-troupeau	63
II.5.3.	Evaluation des performances intrinsèques du test POURQUIER ELISA BVD/MD/BD P80 Antibody Screening sur lait de tank	63
III.	RESULTATS	64
III.1.	Exactitude des résultats de sérologie sur petits mélanges de sérums	64
III.2.	Précision et exactitude théorique de l'information fournie par les résultats de sérologie sur petits mélanges	65
III.3.	Relation entre le nombre de mélanges positifs et la séroprévalence observée	66
III.4.	Relation entre le pourcentage d'inhibition du lait de tank et la séroprévalence observée.....	68
III.5.	Définition des seuils de décision	70
III.6.	Estimation des performances intrinsèques	72
III.6.1.	Estimation brute	72
III.6.2.	Estimation par simulations Monte-Carlo.....	74
III.7.	Evolution des élevages	76

IV. DISCUSSION	78
IV.1. Intérêts et limites de l'étude	78
IV.2. Evaluation de la séroprévalence à partir des résultats de sérologie des petits mélanges	79
IV.3. Relation entre pourcentage d'inhibition et séroprévalence observée	79
IV.4. Définition de seuils de décision.....	80
 CONCLUSION.....	 81
 BIBLIOGRAPHIE	 83
 ANNEXES	 89

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques synthétiques des infections transitoires et permanentes par les <i>Pestivirus</i> chez les Ruminants.....	29
Tableau 2 : Interprétation des tests sérologiques	39
Tableau 3 : Interprétation des couplages sérologie-virologie (Brock, 1995).....	40
Tableau 4 : Vaccins commercialisés contre le virus BVD en France	45
Tableau 5 : Définition de classes à partir des relations taux d'anticorps p80 dans le lait de grand mélange et séroprévalence BVD	47
Tableau 6 : Appellation des cheptels selon les résultats sur lait de grand mélange.....	48
Tableau 7 : Appellation des cheptels selon les résultats sur lait de grand mélange.....	48
Tableau 8 : Prévalence apparente des troupeaux séropositifs vis-à-vis de la Border disease en Aveyron entre 2006 et 2008 et cas incidents.....	54
Tableau 9 : Récapitulatif des élevages prélevés et des statuts établis en 2009 et 2010	55
Tableau 10 : Seuil de décision.....	61
Tableau 11 : Performances intrinsèques obtenues à l'aide du test Pourquoier Elisa Bvd/Md/Bd P80 Antibody Screening® appliqué au lait de tank en fonction de différents seuils de séroprévalence et de seuils de pourcentage d'inhibition (les valeurs en gras correspondent aux seuils optimums retenus par l'analyse ROC)	72
Tableau 12 : Estimation par simulations Monte-Carlo des performances intrinsèques obtenues à l'aide du test appliqué au lait de tank en fonction de différents seuils de séroprévalence	74

Listes des figures

Figure 1 : Phylogénèse et classification des <i>Pestivirus</i> (56 isolats, 5'NT, Npro, E2) (Liu <i>et al.</i> , 2009).....	23
Figure 2 : Conséquences cliniques et virologiques de l'infection des brebis par le BDV, selon le stade de gestation.....	29
Figure 3 : Distribution des élevages retenus dans l'étude selon le nombre de mélanges positifs en 2009 et 2010	66
Figure 4 : Relation entre nombre de mélanges positifs (sur 9) et séroprévalence observée à partir d'un échantillon de 45 analyses individuelles (chaque point peut représenter plusieurs élevages, jusqu'à 101 pour les coordonnées 0,0).....	67
Figure 5 : Relation entre le pourcentage d'inhibition du lait et la séroprévalence observée en 2009 (n=77).....	69
Figure 6 : Relation entre le pourcentage d'inhibition du lait et la séroprévalence observée en 2010 (n=80).....	69
Figure 7 : Relation entre le pourcentage d'inhibition du lait et la séroprévalence observée en 2009 et 2010	70
Figure 8 : Résultat de l'analyse par courbes ROC pour 5 seuils de séroprévalence (les courbes correspondant aux seuils de 6.66% et 8.88% sont confondues).....	71
Figure 9 : Exemple de densité de probabilité de la prévalence vraie simulée pour un élevage ayant une séroprévalence observée nulle (aucun résultat sérologique positif sur 45 animaux testés) (10000 répétitions)	75
Figure 10 : évolution de la séroprévalence estimée dans 59 troupeaux suivis en 2009 et 2010 (chaque point peut représenter plusieurs élevages, jusqu'à 38 pour les coordonnées 0,0)	76
Figure 11 : Evolution du pourcentage d'inhibition sur le lait de tank dans 49 troupeaux suivis en 2009 et 2010	77

LISTE DES ABREVIATIONS

- ❖ BD : Border Disease
- ❖ BVD-MD : Diarrhée Virale Bovine - Maladie des Muqueuses
- ❖ CSF : Peste Porcine Classique ou Classical Swine Fever
- ❖ IPI : Infecté Permanent Immunotolérant
- ❖ IT : Infecté Transitoire
- ❖ CP : cytopathogène
- ❖ NCP : non cytopathogène
- ❖ Ac : Anticorps
- ❖ Ag : Antigène
- ❖ ELISA : Enzym Linked Immuno-Sorbent Assay
- ❖ PCR : Polymerase Chain Reaction
- ❖ LGM : Lait de Grand Mélange
- ❖ AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
- ❖ OIE : Office International des Epizooties
- ❖ FODSA : Fédération des Organismes de Défense Sanitaire de l'Aveyron
- ❖ GDS : Groupement de Défense Sanitaire
- ❖ UMT : Unité Mixte Technologique

INTRODUCTION

La Border Disease (BD, « maladie des frontières ») désigne une maladie des petits ruminants observée pour la première fois en 1959 à la « frontière » du Pays de Galles et de l'Angleterre. Il s'agit d'une affection congénitale, virulente et contagieuse, causée par un virus de la famille des *Flaviviridae* et du genre *Pestivirus*.

Si la Border Disease a été décrite initialement dans les îles britanniques, dès lors sa présence a été confirmée dans la plupart des pays d'Europe dont la France, l'Amérique du Nord, l'Australie et la Nouvelle Zélande.

La maladie se caractérise par une pathogénie complexe, des symptômes polymorphes et une importance économique non négligeable. Elle se traduit cliniquement par de l'infertilité chez les brebis, des avortements et de la mortinatalité. Elle s'exprime donc durant la période d'agnelage, où il devient apparent qu'un grand nombre de brebis est non gravide. Les agneaux affectés naissent chétifs, et certains ont été décrits comme des « trembleurs hirsutes ».

Le bassin du Roquefort a connu de 1983 à 1986 une forme grave de cette affection, dénommée « Petega Ovina » ou « Aveyronite ». Depuis 2008, l'Aveyron est confronté à un nouvel épisode virulent de Border Disease. Par conséquent, le système d'épidémiosurveillance mis en place dans ce département a été renforcé, en proposant un suivi du statut infectieux des cheptels. Pour des considérations économiques, ce dépistage est à l'heure actuelle réalisé par la mise en évidence d'anticorps anti- P80 sur petits mélanges de 5 sérums.

Afin d'adapter au mieux le dispositif de surveillance à la conduite d'élevage, la FODSA et l'ensemble de ces partenaires ont souhaité mettre en œuvre un test de détection des anticorps sur le lait de grand mélange, à l'image de ce qui est réalisé dans l'espèce bovine pour une maladie virologiquement proche de la Border Disease, la BVD (Bovine Viral Diarrhea). Avant de pouvoir être appliqué à grande échelle, il convient d'évaluer les performances intrinsèques de ce test (sensibilité, spécificité, exactitude) afin de vérifier la pertinence d'une telle approche et d'en connaître les limites.

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer, au travers des données collectées dans des troupeaux ovins laitiers de l'Aveyron, les performances intrinsèques, sur lait de grand mélange, d'un Kit ELISA, déjà utilisé chez les bovins et d'en déterminer les seuils optimums de décision. Il paraissait par ailleurs intéressant d'évaluer, à partir des données de cette étude,

l'information fournie par la sérologie sur petit mélange en comparaison de la sérologie individuelle.

Après une synthèse bibliographique sur les Pestivirus des ruminants orientée sur le diagnostic de la Border Disease, nous présenterons l'étude menée par le GDS de l'Aveyron en collaboration avec l'ENVT.

Première partie
LES PESTIVIROSES

I. LES PESTIVIRUS

I.1. Taxonomie

Les *Pestivirus* constituent un genre appartenant à la famille des *Flaviridae* (Collett *et al.*, 1988). Parmi les espèces de *Pestivirus* proposées, seules 3 sont officiellement reconnues et jouent un rôle important en pathologie du bétail :

- le virus responsable du complexe « diarrhée virale bovine / maladie des muqueuses » appelé Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV type 1 et 2),
- le virus de la Border Disease (BDV),
- le virus de la Peste Porcine Classique ou Classical Swine Fever (CSFV).

Ces trois *Pestivirus*, bien qu'ils engendrent chez leur hôte respectif des tableaux cliniques contrastés, sont étroitement apparentés sur le plan structural et antigénique.

I.2. Caractéristiques structurales et organisation génomique

Les *Pestivirus* sont des petits virus sphériques de 40 à 60 nm de diamètre. Ils sont constitués d'une nucléocapside à symétrie icosaédrique, entourée d'une enveloppe lipoprotéique (Gardiner *et al.*, 1972). Leur génome est composé d'un unique fragment d'ARN monocaténaire, de polarité positive, d'environ 12 à 13 kb (Vilcek & Nettleton, 2006).

L'expression des gènes se traduit par la synthèse d'une glycoprotéine de près de 4000 acides aminés (Vantsis *et al.*, 1980). Celle-ci sera ensuite clivée en 4 protéines structurales et 8 protéines non structurales. Les protéines de structures sont codées par le premier tiers à gauche du génome (extrémité 5'), tandis que les protéines non structurales sont codées par les deux tiers restants (extrémité 3').

- Protéines structurales

La protéine C est l'unité constitutive de la nucléocapside. Les trois autres glycoprotéines de structure (E0, E1 et E2) participent à la composition de l'enveloppe des virions. La glycoprotéine E2 induit une forte réponse en anticorps neutralisants lors d'infection naturelle ou suite à l'utilisation de vaccins. Elle est à l'origine de la variabilité antigénique des *Pestivirus*.

- Protéines non structurales

Les protéines non structurales sont mieux conservées. Parmi elles, la protéine NS2-3 joue sans doute le rôle le plus important. Elle possède un site de clivage et peut être scindée en deux protéines dérivées, NS2 et NS3, lors d'infection par une souche cytopathogène. La structure de NS3 (p80 avec l'ancienne nomenclature) est très stable et cela fait d'elle la protéine la mieux conservée au sein du genre *Pestivirus*. Elle est également très immunogène mais les anticorps produits n'ont pas d'activité neutralisante, contrairement à ceux dirigés contre les protéines de l'enveloppe virale.

I.3. Propriétés biologiques

I.3.1. Notion de biotype

Les *Pestivirus* se caractérisent par l'existence de deux biotypes différenciables en culture cellulaire :

- un biotype cytopathogène (CP), qui induit l'apparition de lésions lytiques,
- un biotype non cytopathogène (nCP), avec lequel aucun effet cytopathique n'est observé sur les cultures cellulaires infectées.

Ces caractéristiques biologiques sont détectables seulement *in vitro* et ne sont pas la traduction d'un pouvoir pathogène chez l'animal.

A l'échelle moléculaire, les souches cytopathogènes se distinguent par l'existence de deux petites protéines NS2 et NS3. Elles proviennent du clivage de la protéine non structurale NS2-3 de 125 kDa qui est présente mais jamais hydrolysée dans les cellules infectées par des souches de type non cytopathogènes.

D'un point de vue épidémiologique, le biotype nCP apparaît comme le biotype prédominant. Il est le seul responsable des infections persistantes (Brownlie *et al.*, 1989), que ce soit avec le BVDV, le BDV ou le CFSV. En revanche si une souche CP surinfecte un bovin infecté de manière persistante par une souche nCP, elle provoque chez lui une maladie des muqueuses (forme MD) rapidement mortelle, où l'équivalent chez les ovins.

I.3.2. Variabilité génétique

Communément aux virus à ARN, les *Pestivirus* se caractérisent par une variabilité génétique considérable. La fréquence des mutations par substitution de bases s'élève à 1 erreur pour 1000 à 10000 nucléotides, selon les virus (Domingo *et al.*, 1985) et s'explique par l'absence de mécanisme correcteur (absence d'exonucléase = enzyme de réparation des erreurs de réplication/transcription) suite aux erreurs de la polymérase RNA-dépendante. Cette diversité est nettement marquée pour les protéines structurales (C, E0, E1, E2) alors qu'elle est très faible pour la protéine non structurale NS3.

L'analyse de la variabilité génétique de différents isolats de *Pestivirus* permet de dresser des arbres phylogéniques distinguant différentes « espèces » (figure 1). Notons, en particulier, la distinction manifeste existant entre les virus associés au BVD (BVDV-1, BVDV-2 et BVDV-3) et ceux associés à la Border Disease des petits ruminants (BDV-1, BDV-2, BDV-3 et BDV-4).

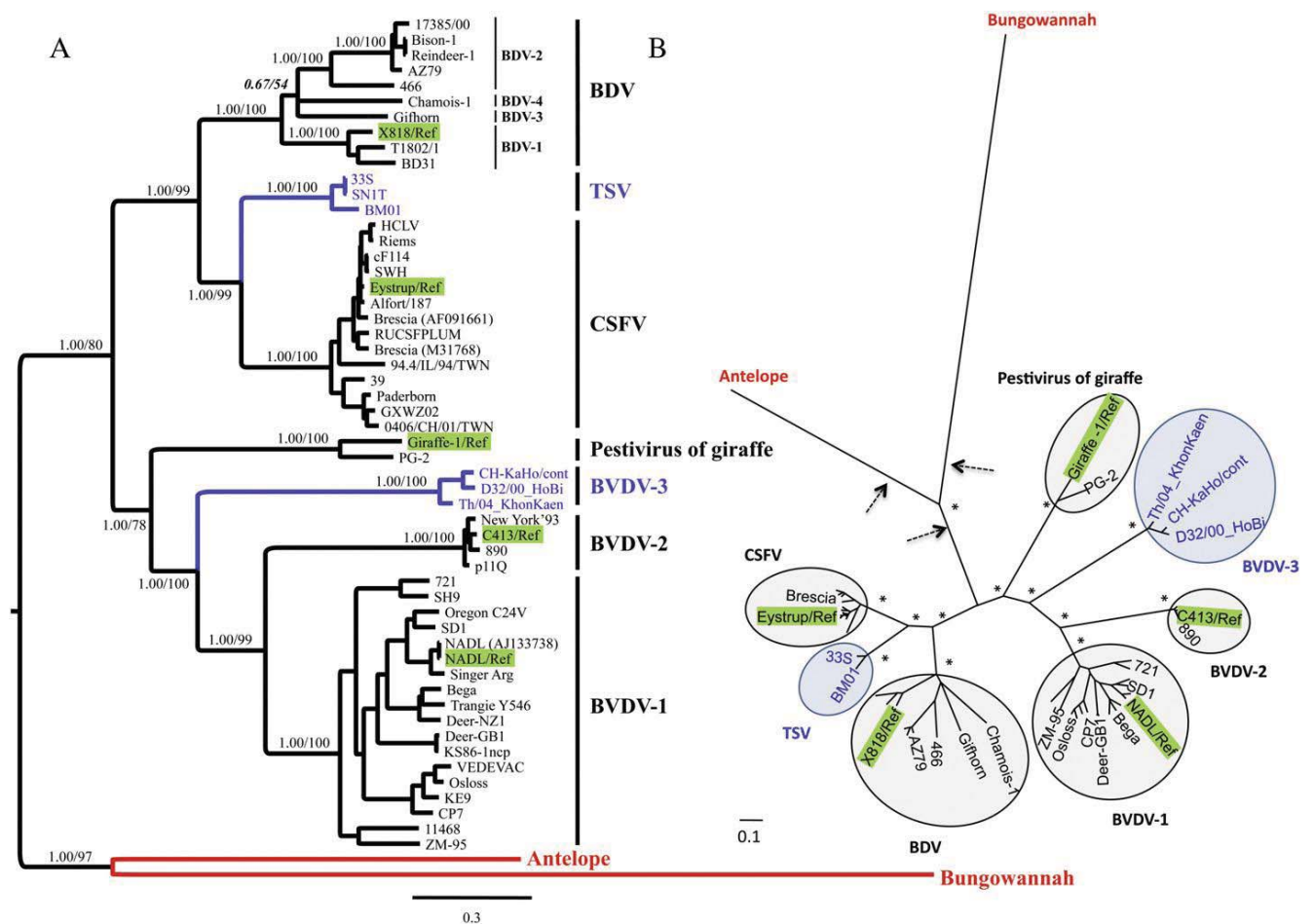


Figure 1 : Phylogénèse et classification des *Pestivirus* (56 isolats, 5'NT, Npro, E2) (Liu *et al.*, 2009)

1.3.3. Spectre d'hôte et transmission interspécifique

Dans les conditions naturelles, le BVDV infecte préférentiellement les bovins, la Border Disease est décrite chez les ovins et les caprins, et le CSFV est inféodé aux porcins. Mais cette spécificité d'hôte reste très relative. Chacun des *Pestivirus* est capable d'initier une infection dans une espèce hétérologue. En effet BVD1 et BVD2 ont été retrouvés chez les ovins (Vilcek *et al.*, 1997). On obtient des anomalies de reproduction sur des brebis inoculées avec le BVDV (Ward, 1971) et réciproquement. Les porcs peuvent également être infectés par le BDV et des anticorps contre ce virus peuvent entraîner des interférences lors du diagnostic de la peste porcine classique (Oguzoglu *et al.*, 2001).

Les transmissions interspécifiques sont donc très courantes et à l'origine de confusion sur le plan diagnostique et épidémiologique. Elles concernent également des espèces sauvages : des *Pestivirus* ont été mis en évidence chez le cerf, le sanglier, le buffle (Nettleton, 1990; Zaghawa, 1998) ou encore chez l'isard (Frolich *et al.*, 2005).

1.3.4. Sensibilité du virus

La résistance des *Pestivirus* dans le milieu extérieur est faible : ils persisteraient à peine 10 jours dans le fumier. La litière d'animaux contaminés n'infecterait pas un lot sain (Vaast, 1986). Ils sont très sensibles aux détergents usuels, du fait de la structure lipidique de leur enveloppe (Gardiner *et al.*, 1972), à la dessiccation et aux ultra-violets.

Ils sont rapidement inactivés par la chaleur (températures supérieures à 56°C). En revanche, ils peuvent rester virulents après 6 jours à 4°C, dans les tissus infectés par exemple. Ils ne sont pas détruits par la congélation (Gardiner & Barlow, 1972). En pratique cela permet de conserver les virus, afin de différer les analyses laboratoires. En revanche, une attention particulière doit être portée lors de la confection des paillettes de semence destinées à l'insémination artificielle car, le virus résistant à la congélation, le risque infectieux persiste.

II. LA MALADIE CHEZ LES OVINS

II.1. Infection post-natale, transitoire, hors gestation

II.1.1. Pathogénèse

Dans le cas d'une infection horizontale, la pénétration du virus BD se fait principalement au niveau de la muqueuse nasopharynée.

Après une phase de multiplication initiale, le virus dissémine dans l'organisme par voie sanguine, à la fois libre dans le compartiment sanguin ou associé aux cellules mononuclées sanguines (Stober, 1990). Cette phase de virémie, détectable 3 à 14 jours après la contamination, est brève (10-15 jours, bien que de l'ARN viral puisse être détecté au-delà de 60 jours dans certains cas, sans association avec de l'infectiosité). L'apparition des anticorps sériques neutralisants coïncide avec l'élimination apparente du virus (Thabti *et al.*, 2002). On parle alors d'infection transitoire (IT).

II.1.2. Expression clinique

II.1.2.1. Forme subclinique

Les agneaux et les ovins adultes exposés au BDV ne souffrent habituellement que d'une affection bénigne passant souvent inaperçue.

Les animaux présentent une hyperthermie modérée et une leucopénie transitoire (due à une baisse des lymphocytes B et T), observées durant la phase de virémie. La guérison a lieu en quelques jours grâce au développement rapide d'une réponse immune protectrice. La mortalité est rare. Ceci constitue le tableau classique car les souches les plus courantes sont hypovirulentes.

II.1.2.2. *Petega ovina*

Des souches hypervirulentes peuvent produire de graves infections aiguës associées à une mortalité élevée. Les animaux présentent une forte hyperthermie (41°C), des lésions d'entérite hémorragique, des hémorragies sur les muqueuses (œil, vulve), des urines plus ou moins sanguinolentes. Les temps de saignement sont allongés, les manifestations hématologiques sont une leucopénie sévère et prolongée et une thrombocytopénie expliquant les hémorragies.

En 1983, l'un de ces virus a été isolé au cours d'une sévère épizootie de Petega Ovina déclarée chez des brebis laitières d'Aveyron (Chappuis *et al.*, 1986). Lors d'infection expérimentale chez des agneaux de 3 à 5 mois, une de ces souches a été à l'origine d'un taux de mortalité de 50%.

II.2. Infection fœtale, permanente, pendant la gestation

II.2.1. Pathogénèse

Les conséquences les plus sérieuses de la Border Disease surviennent lorsque le BDV infecte pendant la gestation une brebis n'ayant jamais eu de contact avec le BDV.

La principale voie d'infection fœtale est la voie transplacentaire. Si l'infection survient avant la formation du « pont placentaire » où caroncule et trophoblaste s'unissent fermement par des villosités (du 1^{er} au 15^{ième} jour d'une période de gestation d'approximativement 150 jours), l'embryon peut échapper à la maladie. La virémie cesse avant de pouvoir infecter le fœtus.

A tous les stades postimplantatoires, le virus traverse aisément la barrière placentaire qui demeure imperméable aux anticorps maternels neutralisants. L'issue de cette infection dépend principalement du développement fœtal au moment de l'infection et, en particulier, du degré de maturité du système immunitaire du fœtus.

- Infection avant 60 jours de gestation

L'exposition des brebis gestantes sensibles au BDV provoque une virémie qui transporte le virus au placenta. La placentite qui en résulte peut être suffisamment sévère pour provoquer la mort fœtale précoce suivie de la résorption ou de l'expulsion du fœtus.

Si le fœtus résiste à l'infection avant l'acquisition de l'immunocompétence, son système immunitaire accepte à tort le virus comme faisant partie du « soi ». Après la naissance, il n'y a toujours pas de réponse immune spécifique à l'égard de la souche virale infectante, et l'excrétion du virus persiste toute la vie durant. Concrètement, du sang prélevé avant la prise de colostrum contiendra du virus, mais pas d'anticorps neutralisants spécifiques du BDV. Ces agneaux sont qualifiés « infecté permanent immunotolérant » (IPI).

Les agneaux IPI peuvent naître viables. Leur sort diffère selon la virulence de la souche virale à l'origine de l'infection. Les souches très virulentes provoquent un défaut de production de myéline aux étapes fondamentales du développement du système nerveux central (à l'origine des tremblements) et une augmentation du nombre de follicules pileux

primaires (responsable de l'aspect hirsute). Les souches peu virulentes sont associées à une infection persistante sans signes cliniques.

Les agneaux nés IPI sont condamnés à le rester toute leur vie. Ce mécanisme est associé au biotype nCP et ne semble pas être observé avec le biotype CP. S'ils sont surinfectés par une souche cytopathogène antigéniquement identique à la souche non-cytopathogène hébergée, ces animaux développeront un syndrome en tous points similaire à la maladie des muqueuses chez les bovins.

- Infections aux alentours de 60 à 80 jours de gestation

L'issue de l'exposition du fœtus au virus est moins prédictible sur cette période, alors que le système immunitaire est en cours d'acquisition.

Les avortements deviennent plus rares. Certains agneaux naissent IPI et sont séronégatifs, avec plus ou moins de signes cliniques associés selon la virulence de la souche virale. D'autres agneaux naissent séropositifs et présentent souvent des anomalies congénitales.

- Infection après 80 jours de gestation

A ce stade plus avancé de la gestation, le fœtus ovin est capable de répondre à une stimulation antigénique. L'infection fœtale est contrôlée par une réponse immunitaire active et stérilisante.

Par conséquent les fœtus infectés tardivement naissent non porteurs du virus mais séropositifs. Ils sont pour la plupart normaux et en bonne santé, mais certains peuvent apparaître faibles et mourir prématurément.

II.2.2. Signes cliniques associés

Les brebis gestantes surmontent généralement l'infection sans symptômes apparents. Au sein des troupeaux naisseurs, la principale répercussion est une dégradation des résultats de reproduction avec des signes d'infertilité et des avortements. Les taux de réussite en insémination artificielle sont médiocres.

Le fœtus ne surmontant pas une infection en début de gestation peut être résorbé, momifié ou expulsé. Les résorptions fœtales et avortements précoces peuvent passer inaperçus, c'est au moment de l'agnelage qu'un grand nombre de brebis apparaissent non

gravides. Les avortements sont constatés principalement en début et milieu de gestation. La mortinatalité est consécutive à une infection en fin de gestation.

Selon le stade de gestation lors de l'infection intra-utérine, les signes cliniques chez les agneaux nouveau-nés rescapés seront variables. Les agneaux IPI présentent les signes les plus caractéristiques de la maladie, néanmoins certains d'entre eux peuvent apparaître normaux. Ils naissent relativement petits, de faible constitution, hirsutes et trembleurs. Certains présentent des malformations osseuses de la tête, du dos ou des membres. Ces agneaux sont particulièrement sensibles aux infections intercurrentes et meurent au cours des premières semaines de vie. Le nombre d'agneaux atteints peut atteindre 100%. Quel que soit le statut (IPI ou non) des agneaux naissant, la mortalité néonatale est marquée à sévère (de 5 à 95%, source FODSA).

Dans les élevages d'agneaux sevrés, les signes du passage de la BD apparaissent généralement 3 semaines après l'entrée en bergerie d'engraissement. Les principaux symptômes sont de l'ecthyma, de la diarrhée et des pneumonies associés à une forte augmentation de la mortalité.

II.3. Bilan des troubles observés

La figure 2 résume les principales conséquences cliniques et virologiques de l'infection par le virus de la Border Disease, selon la période de gestation où le fœtus a été infecté. Le tableau 1 résume les caractéristiques des deux types d'infection, permanente ou transitoire.

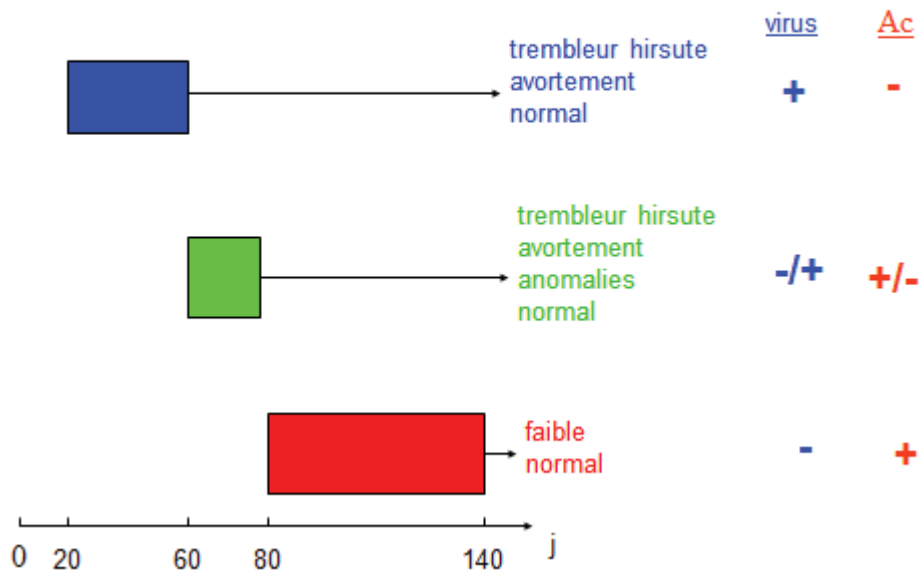


Figure 2 : Conséquences cliniques et virologiques de l'infection des brebis par le BDV, selon le stade de gestation

	Permanente (IPI)	Transitoire (IT)
Durée de la virémie	toute la vie	quelques jours (sauf exception)
Intensité de la virémie	élevée (variable)	modérée à faible
Durée de l'excrétion	toute la vie	quelques jours (sauf exception)
Intensité de l'excrétion	élevée	faible à modérée
Statut sérologique	pas d'anticorps NS3 (sauf en néonatal)	séroconversion (0 → +)
Expression clinique	. baisse de la longévité . aucune . chez les Bovins : maladie des muqueuses	. aucune . symptômes variés . Pétégüe

Tableau 1 : Caractéristiques synthétiques des infections transitoires et permanentes par les *Pestivirus* chez les Ruminants

II.4. Conséquences épidémiologiques

II.4.1. Sources de l'infection

II.4.1.1. Sources animales

A l'instar de la situation qui prévaut chez les bovins infectés par le BVDV, les moutons IPI sont les principaux disséminateurs de virus. Les animaux IPI infectés par des souches peu virulentes représentent un risque majeur pour le reste du troupeau, car ils peuvent apparaître en bonne santé, sont sérologiquement négatifs donc difficiles à dépister, mais restent excréteurs du virus toute leur vie (Terpstra, 1981). Il a été démontré que des bovins infectés permanents par le BVDV peuvent être la cause d'apparition de cas de Border Disease s'ils sont introduits dans un troupeau de moutons sains (Carlsson, 1991).

Le virus est également excrété par les ovins infectés transitoires pendant une durée limitée (moins de 8 jours en moyenne (Brownlie *et al.*, 1987)) et en moindre quantité par rapport aux IPI. Néanmoins, certaines études ont montré la possibilité d'isoler le virus dans certains liquides biologiques sur des périodes plus longues : écouvillon nasale, sperme...

En dehors des petits ruminants, le BDV a été isolé chez plusieurs espèces animales domestiques (bovins, porc) mais aussi chez les ruminants sauvages (Cabezon *et al.*) : ces espèces sont considérées comme sources potentielles de virus (Carlsson, 1991).

II.4.1.2. Environnement

L'environnement représente une source de virus limitée étant donné la faible résistance des *Pestivirus* dans le milieu extérieur. Quelques cas de transmission indirecte, par la litière, le matériel d'élevage ou et le sol ont été décrits.

II.4.2. Matières virulentes

En raison de la présence du virus de la BD dans les organes à fonction exocrine, les matières virulentes sont constituées par toutes les sécrétions et excréments des individus virémiques (par ordre d'importance) : jetage, sperme, sang, lait, larmes, salive, urine, fèces (Sawyer *et al.*, 1986).

Dans le cas d'une infection durant la gestation, le virus se distribue largement dans les tissus du fœtus. L'avorton constituera une source considérable de virus.

II.4.3. Modes de transmission

II.4.3.1. Transmission entre animaux

- Transmission horizontale directe

Le contact entre ovins est le principal mode de transmission du BDV. La propagation du virus sera plus rapide et plus efficace en présence d'un individu IPI que d'un infecté transitoire. Elle dépend également de l'intimité des contacts entre les ovins. Dans les troupeaux ou l'infection est enzootique, les vieilles brebis sont immunisées et leurs filles primipares sont le plus souvent affectées.

La transmission de la maladie par voie sexuelle est aussi possible, le sperme et les sécrétions vaginales étant des matières virulentes.

- Transmission verticale directe

Tous les animaux IPI sont produits par transmission verticale lorsque l'infection de la femelle naïve gravide survient avant l'acquisition de l'immunocompétence fœtale. Le placenta est perméable au virus et la contamination du fœtus est systématique.

- Transmission horizontale indirecte

La transmission peut se réaliser par l'intermédiaire des litières, du matériel d'élevage, du sol. En théorie, elle est possible par certains insectes piqueurs (Mollot, 1992).

II.4.3.2. Transmission entre élevages

La maladie se déclare souvent à la suite de l'introduction d'animaux IPI dans les cheptels préalablement indemnes et donc particulièrement vulnérables (animaux séronégatifs). De simples contacts aux pâturages (BVDV et BDV) peuvent également favoriser l'introduction du virus.

Les *Pestivirus* d'autres ruminants et du porc sont transmissibles expérimentalement au mouton, provoquant la maladie de la frontière. Néanmoins, en conditions habituelles d'élevage, le danger provient essentiellement des bovins.

Lorsque les ovins sont élevés en condition extensives en compagnie de ruminants sauvages comme des cervidés, une contamination interspécifique ne peut être exclue.

Certains vaccins vivants atténués, produits sur cultures cellulaires ovines, bovines, porcines ou caprines, peuvent également être contaminés par des souches virales non cytopathogènes. Cette modalité de transmission est mineure.

III. DIAGNOSTIC

III.1. Diagnostic épidémio-clinique et nécropsique

Les éléments épidémio-cliniques seuls ne permettent pas d'établir un diagnostic de certitude. Cependant l'observation de certains signes doit faire suspecter la maladie : baisse de fertilité, augmentation du taux de mortalité périnatale, augmentation du nombre d'avortements, agneaux malformés ou à toison anormale... Notons cependant que dans un certain nombre de cas, en fonction de la conduite d'élevage et en particulier du stade physiologique des brebis, l'infection d'un troupeau peut être asymptomatique.

Le diagnostic différentiel se fera avec l'ataxie enzootique, due à une carence en cuivre et provoquant anomalies de la toison et troubles nerveux, et les autres maladies abortives telles que brucellose, chlamydie, fièvre Q, toxoplasmose.

Ces éléments ne permettent d'établir qu'une suspicion qui ne pourra être confirmée qu'après avoir recours aux examens de laboratoire.

III.2. Diagnostic de laboratoire

Il n'existe pas de laboratoire de référence reconnue par l'OIE (Office International des Epizooties) pour la Border Disease. Ce sont les laboratoires de référence de la Diarrhée Virale Bovine et de la Peste Porcine Classique qui sont mis à contribution.

Les examens de laboratoire disponibles permettent de détecter soit le virus, soit les anticorps produits suite à l'infection.

III.2.1. Méthodes de détection virale

Historiquement la détection virale des Pestivirus était réalisée sur culture cellulaire. C'est la méthode qui s'est avérée la plus sensible pour identifier les animaux infectés.

Actuellement ce sont les techniques immuno-enzymatiques de détection de protéines virales (ELISA Ag) ou les techniques d'amplification génique (RT-PCR) qui sont utilisées.

III.2.1.1. Isolement viral en culture cellulaire

La technique consiste à inoculer une culture de cellules-cibles à l'aide de l'échantillon à tester. L'identification du virus est par la suite confirmée par des techniques immunologiques (immunofluorescence, immunoperoxydase).

Le virus de la Border Disease peut être isolé sur de nombreuses cellules ovines, primaires ou secondaires, telles que des cellules de rein, de testicules ou de poumons.

Pour la détection du virus sur animal vivant, on prélève du sang total. La présence du BDV peut être également recherchée dans le sperme. Cependant le sperme complet est fortement cytotoxique et doit donc être dilué dans le milieu de culture cellulaire, en général à 1/10 au moins. Sachant que le sperme infecté le plus dangereux est celui des IPI, il est plus sûr de prélever le sang de ces derniers que leur sperme pour les identifier. Pour analyse sur animal mort, les organes à partir desquels le virus est le plus facile à isoler sont la rate, la thyroïde, les reins, l'encéphale, les nœuds lymphatiques et les intestins.

L'isolement viral en culture de cellules est généralement considéré comme la méthode de référence pour le diagnostic virologique. Il s'agit de la seule méthode permettant de l'identification du biotype CP.

La méthode est moins sensible que la PCR et risque de fournir des résultats faussement positifs si le virus est inactivé par des anticorps colostraux par exemple. Cependant elle reste très sensible et peut s'appliquer *ante* ou *post-mortem*. L'isolement viral est adapté à la recherche des IPI mais déconseillé pour la recherche des IT et des bovins et ovins de moins de 3 mois d'âge. En effet, l'isolement est habituellement négatif à partir d'échantillons sanguins, quelle que soit la technique de mise en culture, sur les bovins IPI porteurs d'anticorps neutralisants d'origine colostrale (Brock *et al.*, 1998; Zimmer *et al.*, 2004).

Il s'agit d'un examen de principe simple mais d'exécution fastidieuse et limité par le délai de réponse (6 à 8 jours si le résultat est positif, le double s'il est négatif).

III.2.1.2. Détection des antigènes viraux (ELISA Ag)

ELISA est l'acronyme de « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay », littéralement « dosage d'immunoabsorption par une enzyme liée ».

Les tests ELISA sont couramment employés pour détecter rapidement les antigènes viraux. Cependant, ils ne permettent pas de faire la distinction entre une virémie transitoire et une virémie persistante.

Avec le développement des anticorps monoclonaux spécifiques des *Pestivirus*, les ELISA de capture ont été mises au point : les échantillons à tester sont déposés sur les puits d'une plaque de microtitrage tapissée d'un mélange d'anticorps monoclonaux. D'autres anticorps monoclonaux conjugués à la peroxydase assurent la capture de l'antigène viral en « sandwich » et servent d'anticorps révélateurs (Entrican *et al.*, 1994). Les antigènes recherchés sont principalement NS2-3/p80-125, E0/gp48 ou E2/gp53.

La sensibilité de cette épreuve est très bonne et proche de celle de l'isolement viral pour les animaux IPI dont les titres viraux sont très élevés (Schelcher *et al.*, 1993). Lors d'infection transitoire, la sensibilité est médiocre, les titres viraux étant plus faibles. En présence d'anticorps colostraux, l'ELISA est plus efficace que l'isolement viral mais reste peu fiable en période néonatale, c'est-à-dire sur des animaux virémiques âgés de moins de 2 mois (les anticorps colostraux masquent la virémie).

Il s'agit donc d'une méthode d'exécution simple, rapide, peu coûteuse et pratique pour trier un grand nombre de prélèvements de sang.

III.2.1.3. Détection des acides nucléiques (PCR)

PCR est l'abréviation de l'expression anglaise Polymerase Chain Reaction ou réaction en chaîne par polymérase. La technique consiste à obtenir rapidement, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment du génome spécifique et de longueur définie.

Les produits d'amplification sont révélés par des méthodes telles que l'électrophorèse. Avec la variante actuelle, les produits d'amplification sont révélés au cours même de la phase d'amplification : c'est la RT-PCR ou PCR en temps réel (système TaqMan). La mise en évidence du virus par PCR s'effectue à partir d'échantillons acellulaires (sérum, plasma, surnageant de culture cellulaire) ou de sang total prélevé sur tube EDTA. Les échantillons cellulaires (lait, leucocytes sanguins, organes, cellules, biopsies auriculaires, etc.) peuvent également servir de matrice de détection. La plupart des kits commerciaux permettent la détection du BVDV et du BDV sur l'ensemble des ruminants (bovins, petits ruminants et ruminants sauvages).

La PCR constitue une technique plus sensible (10 à 1000 fois supérieure) et plus spécifique que l'isolement viral (Hamers *et al.*, 2000). Permettant de détecter des quantités infimes d'acide nucléique viral, ce test est utilisé dans la détection de l'ARN viral dans les organes du fœtus ou dans les cultures cellulaires utilisées pour produire les vaccins. Ce test est indiqué pour la recherche du statut des jeunes animaux en dépit de l'immunité colostrale puisqu'il n'interfère pas avec les anticorps colostraux. Il permet également la distinction entre les IPI et les animaux virémiques transitoires (Zimmer *et al.*, 2004). En outre, ses performances intrinsèques permettent son application sur des mélanges de 20 prélèvements de lait ou de sang.

Ce test est donc très intéressant pour l'identification et la caractérisation des Pestivirus. En revanche le coût du test et l'équipement sont des contraintes non négligeables. Cependant la sensibilité de la technique rend possible la réalisation d'analyse en mélange, permettant une réduction très significative des coûts.

III.2.1.4. Interprétation des tests virologiques

Les animaux IPI, non soumis à l'immunité maternelle (cas général des animaux de plus de 6 mois d'âge), excrètent continuellement du virus infectieux dans le milieu extérieur à des titres très élevés. A l'opposé, les animaux infectés transitoires présentent une virémie de courte durée et faible.

Un test virologique positif signifie que le virus est excrété en quantité suffisante pour être détecté : soit il s'agit d'un animal IPI soit d'un infecté transitoire.

En règle générale, un test négatif signifie qu'il s'agit d'un animal qui n'est ni IPI, ni virémique transitoire et ne présente donc aucun danger pour ses congénères.

La réalisation d'un nouveau test 3 à 4 semaines après détection de la virémie chez un animal infecté transitoire révèle quasi systématiquement un résultat négatif (Edwards *et al.*, 1991) tandis qu'un animal IPI reste viropositif. Cette particularité permet de différencier les 2 cas.

III.2.2. Méthodes de détection des anticorps

Actuellement, les anticorps dirigés contre le BVDV ou le BDV sont quasi exclusivement détectés dans les sérums bovins ou ovins par des méthodes immunoenzymatiques. La séroneutralisation reste le test de référence mais son recours sur le terrain est obsolète. La fixation du complément, l'épreuve d'immunodiffusion en gélose et l'immunofluorescence sont des techniques qui ont été abandonnées car elles étaient moins sensibles.

Le dépistage sérologique permet de détecter la présence d'une circulation virale dans un cheptel par la mise en évidence d'animaux porteurs d'anticorps spécifiques. Il ne permet cependant pas de détecter directement d'éventuels individus IPI.

III.2.2.1. Test de séroneutralisation

La séroneutralisation est une méthode quantitative qui permet de déterminer le titre en anticorps neutralisants du sérum testé. Une quantité constante et titrée de virus d'épreuve est mise en contact avec des dilutions croissantes de sérum à tester. Le virus résiduel, non neutralisé, sera révélé sur des cellules sensibles.

En général on utilise une souche CP afin de détecter facilement la neutralisation du virus : si l'inoculation du mélange virus/sérum entraîne la destruction de ces cellules, cela

signifie que le virus n'a pas été neutralisé et donc que le sérum à tester ne contient pas d'anticorps. Si au contraire les cultures présentent le même aspect que les lots témoins, le virus a été neutralisé par les anticorps du sérum. Dans le cas où l'on utilise des souches NCP on doit avoir recours à des méthodes d'immunofluorescence direct ou indirect. Plusieurs types cellulaires sont utilisés : NADL, Singer et Oregon C24V, mais il n'y a pas de souche de référence.

La séroneutralisation est considérée comme sensible et spécifique et à juste titre utilisée comme technique de référence. Cependant elle présente quelques inconvénients qui ont rendu son recours en pratique obsolète : elle est coûteuse et compliquée à mettre en œuvre. L'obtention des résultats nécessite un délai de 5 à 7 jours. L'absence de technique standardisée compromet les comparaisons des résultats d'un laboratoire à l'autre. De fortes contraintes de laboratoire existent pour éviter la contamination des lignées cellulaires et des milieux de croissance par des *Pestivirus* exogènes.

III.2.2.2. Tests Immunoenzymatiques

- ELISA indirecte

Le sérum à tester est versé sur une microplaque tapissée d'antigènes. S'il contient des anticorps, ceux-ci se fixent sur les antigènes. Après rinçage, les anticorps recherchés sont révélés par des antiglobulines spécifiques d'espèces, conjuguées à une enzyme qui agit sur un substrat chromogène. On obtient un signal lumineux. La lecture se fait au spectrophotomètre : la densité optique est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon. La méthode fournit une réponse qualitative, positive ou négative sans donner de valeur chiffrée.

- ELISA compétition ou « Blocking ELISA »

Cette technique ELISA est plus couramment utilisée. Elle est basée sur un principe de compétition entre les anticorps de l'animal et un anticorps monoclonal « WB112 » anti-P80 marqué à la peroxydase.

Le principe est le suivant :

- 1) La protéine P80 est fixée sur les parois de tous les puits des microplaques.
- 2) Les échantillons à tester sont mis à incuber dans les puits. S'il existe des anticorps spécifiques dans l'échantillon, il se forme des complexes P80-anticorps bovins (ovins) par lesquels la P80 se trouve masquée.
- 3) Après lavage, deux anticorps monoclonaux détectant différents épitopes de la protéine immunodominante non structurale NS 2/3 couplés à une enzyme sont mis à incuber. En présence d'anticorps spécifiques du virus BVDV dans l'échantillon, la protéine P80 est masquée et le conjugué ne peut pas se fixer sur l'épitope correspondant. Dans le cas contraire, le conjugué peut se fixer sur la P80.
- 4) Après lavage, le substrat de l'enzyme est mis en présence de l'enzyme qui assure sa transformation en un composé bleu devenant jaune après blocage. L'intensité de la coloration est une mesure de l'inverse du taux en anticorps anti-BVDV/BDV dans l'échantillon. La limite de positivité est calculée par rapport à un échantillon de contrôle négatif n'induisant aucune extinction et qui doit être introduit sur chaque plaque. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition.

Les performances en termes de sensibilité et de spécificité ne peuvent être appréciées globalement, tant les résultats publiés apparaissent variables d'un test à l'autre.

Concernant l'ELISA simple, la corrélation avec la séroneutralisation est toujours élevée, les résultats divergents étant attribuables à un défaut de spécificité de l'ELISA. La sensibilité paraît souvent meilleure dans le cas de l'ELISA (Chu *et al.*, 1987).

Concernant l'ELISA compétition, la sensibilité et la spécificité de ce test comparativement à la séroneutralisation sont bonnes (Beaudeau *et al.*, 2001b). Il apparaît également que les ELISA compétition présentent une spécificité analytique plus élevée que la technique non compétition. La majorité des ELISA disponibles en France sont de type compétition.

La spécificité est fonction entre autres du choix de l'antigène viral. Selon les techniques, cet antigène peut être une particule virale purifiée (Chu *et al.*, 1987) un extrait de culture de cellules infectées par le BVD (Howard *et al.*, 1985), une protéine recombinante ou des anticorps totaux. Des antigènes simples, comme la protéine NS2-3, fixée grâce à des anticorps monoclonaux (Moenning, 1990) ou des protéines recombinantes produites par des bactéries (Kwang *et al.*, 1995) permettent la détection d'anticorps spécifiques.

Pour évaluer le degré d'immunité humorale, naturelle ou post vaccinale, seuls les tests utilisant des anticorps « totaux », sous réserve d'une bonne concordance avec la séroneutralisation, sont utiles. En effet, les anticorps anti NS2-3/p80-125 n'ont aucun rôle protecteur et ne peuvent donc servir à évaluer l'immunité humorale.

Pour le dépistage des bovins IPI, les tests détectant les anticorps NS2-3 sont plus adaptés que les tests détectant les anticorps « totaux ». En effet, un bovin IPI (en dehors de la période colostrale) surinfecté par une souche hétérologue développera des anticorps contre les déterminants antigéniques présents sur la souche de surinfection (ou vaccinale) et absente sur la souche dont il est porteur chronique. Ce bovin sera détecté séronégatif avec un test ELISA détectant spécifiquement les anticorps NS2-3/p80-125 et pourra être séropositif avec un test ELISA anticorps « totaux » ou en séroneutralisation.

En conclusion, cette méthode est de mise en œuvre rapide, peu coûteuse, fiable et se prête particulièrement bien à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. De plus elle ne nécessite pas de mise en culture cellulaire, évitant ainsi les problèmes mentionnés par la séroneutralisation. Son automatisation est possible, ce qui permet l'élimination des erreurs et variations dépendantes de l'opérateur.

III.2.2.3. Interprétation des tests sérologiques

La réponse immunitaire est à la fois cellulaire et humorale. Aucune méthode de routine n'utilise la réponse humorale pour le diagnostic de la Border Disease.

Les anticorps neutralisants apparaissent en moyenne dès les deux premières semaines post-infection et atteignent un plateau vers la dixième semaine. Ces anticorps peuvent persister jusqu'à trois ans (Loken *et al.*, 1991), ce qui permet de considérer qu'un animal reste séropositif toute sa vie économique

L'interprétation des tests sérologiques est résumée au sein du tableau 2. Cette interprétation est générale à toutes les méthodes.

SEROLOGIE NEGATIVE	SEROLOGIE POSITIVE
<ul style="list-style-type: none"> ~ Animal sain, jamais contaminé ~ Animal en cours de séroconversion ~ Animal IPI non recontaminé 	<ul style="list-style-type: none"> ~ Animal immunocompétent ou contaminé ~ Animal vacciné par un vaccin vivant ~ Présence d'anticorps colostraux ~ (IPI recontaminé par une souche différente de la souche d'origine)

Tableau 2 : Interprétation des tests sérologiques

III.3. Diagnostic lors de suspicion clinique

Lors de suspicion clinique d'animal IPI ou d'avortement, la recherche du virus est à privilégier. Le diagnostic peut s'effectuer par une unique prise de sang quel que soit l'âge de l'animal par analyse PCR. Sur les animaux de moins de 6 mois, le prélèvement de sang doit se faire impérativement sur tube EDTA, pour les animaux plus âgés sur tube EDTA ou sur tube sec. Ce diagnostic peut s'effectuer post-mortem. Il convient d'expédier de préférence la rate congelée ou sous couvert du froid positif le plus rapidement possible.

III.4. Diagnostic lors de dépistage

III.4.1. Dépistage individuel

On peut avoir recours à un dépistage individuel lors d'achat ou de vente d'un animal, lors de volonté d'assainissement ou en cas de certification non IPI (bovin). Le dépistage en cas de vente diffère en fonction de l'animal : s'il s'agit d'une femelle gravide, on recherche les anticorps ou le virus. S'il s'agit d'un animal de moins de 6 mois, on réalise une virologie par RT-PCR. Enfin pour les cas restants, on réalise une antigénémie ou une RT-PCR. Afin de différencier un animal IT ou IPI sur un animal positif en virémie, il convient de le prélever de nouveau 1 mois après et de le tester en anticorps et en virologie.

SEROLOGIE	NEGATIF		POSITIF	
VIROLOGIE	NEGATIF	POSITIF	NEGATIF	POSITIF
INTERPRETATION	sain ou en incubation	début d'infection (IT) IPI	animal immunisé IPI de moins de 6 mois ayant bu du colostrum de vaches séroconverties (rare)	animal infecté transitoire, IPI vacciné ou surinfecté (accotiaux), IPI de moins de 6 mois ayant bu du colostrum de vaches séroconverties
2^{ème} TEST	sain	IPI	infecté transitoire	si sérologie faiblement positive : IPI

Tableau 3 : Interprétation des couplages sérologie-virologie (Brock, 1995)

III.4.2. Dépistage collectif

Le diagnostic de troupeau constitue soit un dépistage rétrospectif lors de suspicion de passage viral (circulation passée), soit un dépistage d'une infection en cours lors de diagnostic d'un animal IPI au sein d'un élevage témoin d'une circulation actuelle. On a le choix entre sérologie et / ou virologie.

Dans un élevage de statut inconnu, il est utile d'analyser un échantillon en sérologie afin d'évaluer la séroprévalence. Si les animaux jeunes, nés dans l'élevage, sont séropositifs, il est probable qu'un animal IPI soit présent dans le troupeau. Plus précisément, dans le cas des bovins, si 2 animaux sur 5 prélevés sont positifs dans la tranche d'âge 6-18 mois, la probabilité qu'il y ait un IPI dans l'élevage est supérieure à 97% (Veterinary medicine 9th Edition). Chez les ovins la mise en évidence d'animaux séropositifs au-delà de 6 mois permet de mettre en évidence une circulation virale, sans que celle-ci soit systématiquement associée à la présence d'IPI.

Chez les bovins, il existe plusieurs stratégies pour réduire le nombre d'animaux à contrôler :

- 1) ne faire une recherche des IPI que sur les jeunes (6 mois – 1^{er} vêlage) ainsi que sur :
 - les mères des IPI trouvés
 - les vaches dont la descendance n'a pu être testée
- 2) déterminer la période de circulation initiale du BVD sur l'élevage et ne contrôler que les animaux en gestation à compter de cette date.

Dans tous les cas, il ne faut pas oublier de dépister les bovins à naître au cours des 6 mois qui suivent l'arrêt de la circulation du virus sur l'exploitation.

Généralement on réalise d'abord une sérologie. Une antigénémie / PCR est réalisée sur les animaux dont la sérologie est négative et sur les mères d'animaux porteurs de virus. Une seconde virologie est réalisée sur ces animaux dont la première virologie est positive.

Les mâles reproducteurs sont également testés sérologiques et virologiquement si nécessaire.

Les animaux dont les deux virologies sont positives sont des IPI. Par contre la présence d'au moins une sérologie positive montre un passage récent du virus avec peut-être de nouveaux IPI à naître donc à contrôler ultérieurement.

Désormais la possibilité de réaliser des PCR de mélange réduit de beaucoup les coûts associés au diagnostic virologique. Ainsi la stratégie précédente, préconisant la réalisation de sérologies en première intention afin de réduire le nombre d'animaux à tester en virologie n'est plus nécessairement appliquée. La réalisation de PCR de mélange en première intention permet en effet de statuer sur le caractère IPI ou non d'un grand nombre d'animaux à coût réduit (équivalent au coût d'une sérologie).

Chez les ovins, la démarche appliquée chez les bovins est en théorie possible, mais n'est que très rarement mise en œuvre, compte tenu des effectifs en présence. En général, le diagnostic est réalisé à l'échelle collective et vise à mettre en évidence une circulation virale et la présence d'animaux IPI, sans rechercher l'exhaustivité. Dès lors les mesures de maîtrise sont principalement basées sur la vaccination (cf infra).

IV. Mesures de maîtrise

IV.1. Prophylaxie médicale : la vaccination

IV.1.1. Objectifs de la vaccination

La vaccination contre l'infection par les *Pestivirus* a plusieurs objectifs :

- éviter l'apparition de formes cliniques (troubles de la reproduction, diarrhées néonatales, problèmes respiratoires, syndrome hémorragique, etc.) en protégeant contre les infections transitoires ;
- réduire l'excrétion virale, consécutive aux infections transitoires (même asymptomatique) ou due à la formation d'IPI ;
- empêcher, ou à défaut limiter, la naissance de nouveaux animaux IPI en protégeant le fœtus contre une infection transplacentaire en début de gestation.

En outre, les vaccins doivent avoir prouvé leur innocuité. Les principaux dangers liés à la vaccination concernent les vaccins vivants modifiés, en raison de leur virulence. Un vaccin doit démontrer qu'il ne risque pas de provoquer ou de faciliter la propagation d'un virus pathogène et évidemment de ne pas être pathogène en lui-même.

Enfin, la vaccination doit idéalement être en mesure de ne pas interférer avec les dépistages sérologiques dans le cadre des plans de prophylaxie.

IV.1.2. Arsenal vaccinal disponible

IV.1.2.1. Chez les bovins

Les premiers vaccins contre le virus BVD ont été produits aux Etats-Unis dans les années 1960. Il s'agissait de vaccins vivants modifiés. Les vaccins actuellement disponibles dans cette catégorie contiennent généralement une souche de biotype CP atténuée par passages successifs sur des cultures cellulaires homologues (exemple : souche Oregon C24V contenue dans le Mucosiffa®) ou mutés par thermosensibilisation (exemple : souche thermosensible RIT 4350 contenue dans le Rispoval BVD®).

La réponse humorale induite par les vaccins vivants modifiés est rapide, durable et ne nécessite qu'une injection de primovaccination. Cependant ces vaccins représentent un risque pour les femelles gravides du fait de la réplication virale dans l'organisme. De ce fait, ils sont contre-indiqués durant les 6 premiers mois de gestation par crainte d'infection fœtale, bien que la formation d'IPI soit improbable puisque ces vaccins renferment des souches CP dont la capacité à traverser la barrière placentaire est nulle.

Par souci d'innocuité, des vaccins inactivés ont été développés ultérieurement. Leurs souches vaccinales sont plus diverses et ont été inactivées à l'aide d'agents chimiques divers. L'immunité induite par les vaccins inactivés est plus longue à se mettre en place, et entraîne une protection de courte durée (parfois moins d'un an). La primovaccination nécessite deux injections, contraignant à une manipulation supplémentaire des animaux et augmentant le coût de revenu. Leur efficacité en terme de protection fœtale a été prouvée pour trois d'entre eux : Bovilis BVD®, Pregsure® et Bovidec® (produit par Novartis mais non autorisé en France).

Le cas de la souche thermosensible RIT 4350 du vaccin vivant Rispoval BVD® représente un cas intermédiaire. La souche thermosensible n'est pas capable de se répliquer à la température corporelle d'un bovin (au-dessus de 37°C). Le vaccin est donc fiable pendant la gestation. Mais ses performances vis-à-vis de la protection fœtale n'ont pas été évaluées.

Notons que l'AMM du Pregsure® a été suspendue en France par décret de 26 août 2010, en raison de son implication très probable dans la genèse de la Pancytopénie Néonatale Bovine (Journal officiel, 19 octobre 2010). Par ailleurs la fabrication du Mucobovin® a été suspendue par Merial lors de l'été 2010.

Vaccin	Type	Génotype, Souche, Biotype	Schéma Vaccinal (bovin)			Protection fœtale
			Primo	Rappel	Contre-indication	
Bovilis BVD® (Intervet)	Inerte	BVD type I, C86, cp	2 inj	0,5 an		AMM
Mucobovin® (Merial)	Inerte	BVD type I, new York, ncp BDV Aveyron ncp	2 inj	1 an		Non
Mucossifa® (Merial)	Vivant modifié	BVD type I, Oregon, cp	1 inj	1 an	0 à 6 mois de gestation	Oui
Pregsure® (Pfizer)	Inerte	BVD type 1, 5960, cp	2 inj	1 an		AMM
Risposal BVD® RS BVD® (Pfizer)	Vivant modifié	RIT 4350, type I, cp	2 inj	1 an		Non
Risposal 3, BVD, RS, PI3®	BVD inerte (RS et PI3 vivants modifiés)	5960, type I, cp 6309, type x, ncp	2 inj	0.5 an (RSV)		Non

Tableau 4 : Vaccins commercialisés contre le virus BVD en France

IV.1.2.2. Chez les ovins

Actuellement, les seuls vaccins disponibles sur le marché sont des vaccins contre les Pestivirus bovin. Par conséquent il existe peu de retombées des campagnes de vaccination car l'utilisation des vaccins chez les ovins est hors AMM.

Le recours à un vaccin destiné à une autre espèce soulève plusieurs questions concernant le choix du schéma vaccinal et l'efficacité : doit-on prescrire la dose bovine, ou bien une dose réduite (mais dans ce cas à quel point) ? Quelle est la population cible, toutes les cohortes ou juste les agnelles ? Pendant combien de temps doit-on maintenir le programme vaccinal (comme chez les bovins, c'est-à-dire pendant la durée du plan de dépistage soit durant 2 à 4 ans) ? Un tel vaccin est-il efficace vis-à-vis des différentes souches ovines et bovines ?

Le vaccin le plus couramment utilisé dans l'espèce ovine est le Mucosiffa®, en raison de son fort pouvoir immunogène ne nécessitant qu'une seule injection de primovaccination. Il est le seul qui a par ailleurs fait l'objet d'essai permettant de définir la dose minimale assurant une protection vis-à-vis d'une infection transitoire (1/2 dose bovine) et de démontrer une efficacité vis-à-vis de la protection fœtale dans cette espèce. Cependant, la forte réponse sérologique anti-P80 qu'induit ce vaccin constitue un désavantage majeur puisque cela limite l'utilisation de la sérologie comme outil de surveillance de la circulation virale aux seuls jeunes agneaux âgés de plus de 4 mois (disparition des anticorps colostraux) non vaccinés.

L'utilisation de vaccins inactivés, pour lesquels la réponse humorale anti-P80 est faible à nulle, n'a cependant pas fait, à l'heure actuelle, l'objet d'essais permettant de vérifier leur efficacité vis-à-vis d'une épreuve virulente dans l'espèce ovine.

IV.2. Prophylaxie sanitaire (modèle bovin)

IV.2.1. Dépistage et élimination des IPI

La rupture du cycle d'infection est essentielle pour diminuer au plus vite l'incidence de la maladie au sein du troupeau. En pratique cela consiste à détecter et éliminer les principaux excréteurs, c'est-à-dire les animaux IPI, préférentiellement avant qu'ils ne présentent des signes cliniques. Cette éradication nécessite un diagnostic fiable compte tenu du préjudice financier causé par l'élimination à tort d'un animal indemne (faux positif) ou, à l'inverse, des conséquences sanitaires au sein d'un troupeau suite à la conservation par erreur d'un IPI (faux négatif). En outre, ces tests doivent permettre la réduction des coûts de mise en

œuvre, d'où le développement des tests sur lait de grand mélange en élevages laitiers. Pour les jeunes animaux, les tests doivent permettre de s'affranchir des anticorps maternels qui peuvent masquer la virémie persistante des IPI. Le développement récent de la PCR en temps réel (Sellal, 2003a) semble répondre à ces exigences. Elle permet un dépistage du virus sur du lait individuel ou de grand mélange (jusqu'à quatre cent vaches) ou sur des sérums individuels ou de mélange (jusqu'à vingt sérums) (Sellal, 2003b).

La détection des IPI sera suivie de leur élimination. Selon leur valeur marchande, ils seront soit euthanasiés soit envoyés à la boucherie.

IV.2.2. Suivi des statuts infectieux des cheptels

Après l'élimination des IPI, il est indispensable de poursuivre le contrôle du statut infectieux du troupeau afin de s'assurer qu'il ne soit pas soumis à une nouvelle contamination. Cette certification n'est pas reconnue par l'Etat. Cependant, elle a été mise en place dans quelques départements français, dans le cadre d'une stratégie de maîtrise collective, à l'image des pays d'Europe du nord. En élevage bovin laitier, ce statut est évalué par dépistage successif des anticorps dans le lait de grand mélange (lait de tank) à raison d'au moins trois prélèvements négatifs successifs à 4 mois d'intervalle. En élevage allaitant on analyse des sérologies sur des petits mélanges de sang de 5 à 10 animaux (une fois par an au cours de la prophylaxie).

Ac p80 Lait de grand mélange : % d'inhibition	% Vaches séropositives	Ac Lait de grand mélange : Classe
> 60	> 30	2
35 << 60	10 << 30	1
< 35	< 10	0

Tableau 5 : Définition de classes à partir des relations taux d'anticorps p80 dans le lait de grand mélange et séroprévalence BVD

Appellation	Résultats Ac Lait de grand mélange (3 prélèvements / 4 mois d'intervalle)				Interprétation
A	000 010		001 100		Non infecté Probablement indemne
B	011 012 021	101 110 111	112 121	210 211	Infection limitée et stoppée ?
C	002	102			Séroconversion
D	122	212	221	222	Contaminé
E	020 120	200 201	202 220		Cas particuliers (achats, nb vaches...)

Tableau 6 : Appellation des cheptels selon les résultats sur lait de grand mélange

Appellation	Résultats : nombre de mélanges positifs	Interprétation
A	0	Non infecté
B	1	confirmer
D	2	Suspicion d'infection

Tableau 7 : Appellation des cheptels selon les résultats sur lait de grand mélange

IV.2.3. Contrôle à l'introduction et biosécurité

Le contrôle à l'introduction consiste à vérifier le statut en BVDV ou en BDV lors de chaque échange d'animaux. Ces contrôles sont systématiques dans les départements ayant adoptés une stratégie de maîtrise collective, mais il s'agit plus souvent d'une initiative individuelle. En pratique on effectue une sérologie couplée d'une virologie si la sérologie se révèle négative. Ainsi on peut déterminer si les animaux sont sains, infectés transitoires ou IPI (dans le cas où la sérologie est négative mais la virologie positive). S'il s'agit d'une vache ou d'une brebis gravide, il est impératif de contrôler le produit dès sa naissance avec une méthode virologique appropriée comme la PCR.

Il est recommandé de renforcer ces précautions par une mise en quarantaine de l'animal d'au moins 3 semaines à chaque introduction.

Ces mesures (sérologie +/- virologie + quarantaine) peuvent être étendues à chaque animal participant à un regroupement (concours, foires...).

Concernant le pâturage commun ou les contaminations de voisinage, les mesures de biosécurité sont plus difficiles à appliquer. Il est préconisé de mettre en place des doubles clôtures (clôtures électrifiées composées de deux fils séparés de quelques mètres entre deux pâtures juxtaposées) ou encore d'isoler les femelles en gestation sur des pâturages exempts de contact avec d'autres cheptels. Enfin, des mesures d'hygiène strictes sur le matériel d'injection et d'insémination doivent être respectées afin d'éviter les risques liés à la contamination par les produits biologiques (sperme, embryon, vaccins, colostrum) ou à la contamination indirecte vectorielle (équipements, vêtements...).

IV.2.4. Garantie « non IPI » (exclusivité bovine)

Par définition le statut « non IPI » se conserve toute la vie de l'animal. Certains départements de Bretagne et Pays de Loire ont eu l'idée de créer une base de données regroupant des bovins garantis non IPI afin de faciliter les échanges d'animaux en limitant les dépistages. Les critères permettant d'établir le statut non IPI d'un bovin reposent sur l'ensemble des analyses, sérologiques et/ou virologiques dont il a pu faire l'objet à l'échelle individuelle ou collective. Toutefois, ces animaux ne sont pas protégés contre une infection transitoire et par conséquent ne doivent pas être dispensés d'une mise en quarantaine à leur introduction.

IV.3. Les différentes stratégies de lutte contre le virus BVD

IV.3.1. Echelle individuelle

- Cas des foyers infectés

Les plans de lutte contre l'infection des bovins par le virus BVD-MD sont fondés sur l'identification et l'élimination des IPI associées ou non à la vaccination (et surtout la protection contre l'infection fœtale). Il s'agit des troupeaux où des cas cliniques sont présents ou au sein desquels une circulation virale a été démontrée (bovins à virémie ou sérologie positives). Dans ce cas la stratégie la plus pertinente consiste à associer les deux types de mesures sanitaires décrites précédemment : élimination des IPI et vaccination. Le but de cette vaccination est de renforcer la protection clinique des animaux encore séronégatifs et également de protéger les fœtus des femelles encore séronégatives en début de gestation afin de limiter la naissance de nouveaux IPI et de rompre ainsi le cycle infectieux.

Les stratégies vaccinales varient selon le plan de dépistage choisi. Si tous les IPI ont été dépistés et que le statut sérologique est connu pour tous les individus (dans le cas où le dépistage se fait par sérologie suivie d'une virologie sur animaux séronégatifs) on peut envisager de ne vacciner que les séronégatifs. En effet, la durée des anticorps neutralisants est d'au moins trois ans, dans des conditions naturelles et en dehors de toutes nouvelles expositions au virus, et la vaccination des séropositifs suite à une infection sauvage ne semble pas nécessaire. Si les statuts sérologiques individuels ne sont pas connus (dans le cas où le dépistage des IPI se fait par PCR) il est plus économique de vacciner tout le troupeau. On se dispense ainsi du coût des analyses. On vaccine avant la période à risque, avec rappel régulier. C'est très souvent la stratégie adoptée en élevage ovin compte tenu des effectifs en présence.

- Cas des élevages sains

Dans ce cas, il faut insister sur le respect des mesures sanitaires classiques (contrôle à l'introduction, certification des cheptels, garantie d'animaux non IPI) et de bonnes pratiques en matière de biosécurité.

Un recours à la vaccination est envisageable si la pression d'infection est trop élevée (troupeau avec de nombreuses introductions non contrôlées, élevages avec de nombreux contacts avec d'autres bovins ou ovins, foire, concours, pâturage,).

IV.3.2. Echelle collective

Les stratégies adoptées par les différents pays se ressemblent plus ou moins, le choix étant motivé par des raisonnements du type coût bénéfice.

Les Suédois ont été les premiers à avoir adopté un plan d'éradication du virus BVD sans vaccination, en 1993 (Lindberg & Alenius, 1999). Ce modèle suédois repose sur 3 grandes directives : la distinction entre cheptels infectés ou non infectés par analyses sérologiques, la surveillance continue et la certification des cheptels indemnes, et enfin le dépistage et l'élimination des IPI. Cette stratégie est très coûteuse, et donc adaptée à des pays où la séroprévalence est relativement basse et la densité d'élevage faible. C'est le cas pour la Norvège et le Danemark. Cette voie de contrôle est aussi facilitée par le faible nombre de contact entre élevages, particulièrement au pâturage.

Dans des pays où la séroprévalence et la densité d'élevages sont élevées, l'objectif est d'abord de minimiser les pertes économiques liées au virus BVD-MD, en réduisant la circulation virale et le nombre d'IPI. Pour tenir ces objectifs, le modèle germanique s'appuie sur la vaccination à grande échelle. Le recours à une vaccination apparaît donc d'autant plus justifié et rentable que la prévalence est forte et que le coût ou le risque de pertes économiques liées au BVD sont élevés.

En France il n'existe pas encore de stratégie sur le plan national. Les programmes de maîtrise de l'infection par le virus BVD sont mis en œuvre à l'échelle individuelle de l'élevage ou à une échelle collective de populations d'élevages en s'inspirant des modèles européens développés. Ces stratégies sont souvent mises en place par les groupements d'éleveurs. Elles ont pour objectifs de protéger les élevages acheteurs supposés indemnes, et de faciliter les échanges d'animaux pour les élevages vendeurs supposés indemnes.

En Bourgogne la vaccination est l'outil principal de la lutte, sans que le dépistage ne soit automatisé. A l'inverse en Bretagne et Pays de Loire, le recours à la vaccination n'est pas systématique. Certaines régions ont choisi la combinaison des deux méthodes.

V. LA BORDER DISEASE EN FRANCE

V.1. Petega ovina

Un épisode virulent de Border Disease a sévèrement affecté le bassin de Roquefort dans les années 1980. Cette forme aiguë de la maladie a été dénommée Petega Ovina.

D'après une enquête menée par UNICOR, les premiers cas ont été observés chez un négociant ovin dans le sud de l'Aveyron en décembre 1983. Puis, de janvier à juillet 1984, des cas similaires sont apparus dans d'autres troupeaux du sud, tant laitiers que producteurs de viande. En six mois, cette épizootie a atteint 112 troupeaux (28 naisseurs, 10 naisseurs engraisseurs, 74 ateliers d'engraissement) causant la mort de 1 501 brebis et 23 908 agneaux.

Les commémoratifs chez la brebis mentionnent de façon constante un aspect ébouriffé (laine hérissé sur la tête) et une entérite hyperthermisante (41 à 42°C) avec diarrhée très liquide souvent noirâtre, parfois hémorragique. Des saignements, une baisse de l'appétit et de la production laitière, des troubles respiratoires et des avortements (qui semblaient se produire lorsque l'infection avait lieu aux environs du 3^{ième} mois de gestation) ont aussi été rapportés. Une leucopénie était également caractéristique. A l'autopsie des lésions congestivo-hémorragiques de la caillette, de l'intestin grêle et du colon ont été observées. La mortalité a atteint 5 à 20% selon les élevages. Les symptômes disparaissaient en 4 à 12 semaines. Les mêmes manifestations cliniques furent observées chez les agneaux, ainsi que des lésions nécropsiques comparables mais beaucoup moins nettes. Cependant, le taux de mortalité était supérieur (50% en cas d'infection postnatale expérimentale).

Aucun traitement spécifique ne s'est révélé efficace : antibiotiques (terramycine, sulfamides), substances immunostimulantes (lévamisole, isoprinosine). Seuls les traitements symptomatiques ont permis de limiter les pertes (antidiarrhéiques par exemple).

Rappelons qu'à ce stade, la nature de l'agent infectieux était inconnue.

V.2. Dispositif d'épidémiosurveillance

V.2.1. Présentation

Cet épisode de « Pétèga Ovina » incita l'instauration d'un suivi sérologique en Aveyron. Il s'agit du seul département français dans lequel une surveillance de la Border Disease est organisée à l'échelle collective. La gestion du plan de surveillance est réalisée par la Fédération des Organismes de Défense Sanitaire de l'Aveyron (FODSA-GDS 12) en partenariat avec la filière ovine.

Ce dépistage permet de repérer les cheptels infectés et de leur proposer un plan de maîtrise de la maladie. Il fournit aux adhérents de précieux renseignements sur le statut immunitaire de leur cheptel et permet par exemple aux engraisseurs d'allouer les agneaux en fonction du statut des élevages d'origine afin d'éviter la contamination des animaux sains.

V.2.2. Modalité

Au départ les sélectionneurs et les cheptels fournisseurs d'agneaux d'engraissement étaient testés annuellement par analyse sérologique. Suite à cette surveillance, le nombre de cheptels atteints a fortement diminué passant de 20% en 1998 et de 11% en 1994, à une prévalence de 4% en 2005. Cette diminution de la prévalence a conduit la filière à modifier le système de surveillance, face à la démobilisation de cheptels à tester et des groupements acheteurs d'agneaux d'engraissement.

Ainsi dès 2006, suite à la décision de la section ovine de la FODSA et de l'ensemble des partenaires, le statut sérologique des cheptels de plus de 130 brebis a été évalué par alternance tous les 4 ans. Par ailleurs, les cheptels sélectionneurs, les cheptels figurant sur une liste fournie par les opérateurs commerciaux acheteurs d'agneaux d'engraissement et les cheptels positifs à la prophylaxie de l'année précédente (2007 et 2008) faisaient l'objet d'une surveillance annuelle. Ainsi, en 2008, sur les 1909 cheptels de plus de 130 ovins que comptait l'Aveyron, 1097 cheptels ont été programmés (348 cheptels ont été programmés dans le cadre du suivi départemental quadriennal Border Disease, 410 cheptel à la demande d'un groupement ou d'un opérateur commercial, 59 cheptels car ils étaient positifs en 2007, et 280 cheptels sélectionneurs).

Le suivi sérologique consistait en l'analyse de 30 sérums issus de la campagne de prophylaxie réglementaire pour la brucellose. Les antenaises (brebis de 1 an) devaient être prélevées de préférence. L'analyse sérologique était effectuée sur 6 petits mélanges de 5 sérums. La présence de mélanges positifs, sur les jeunes animaux, signait une circulation virale récente.

Les résultats selon ce modèle pour la période de 2006 à 2008 sont présentés dans le tableau 8. Précisons toutefois que, pour 2007 et 2008, les cheptels testés positifs l'année précédente ont été reprogrammés ce qui augmente le nombre de positifs.

	Prévalence apparente	Nombre de cheptels nouvellement dépistés positifs (cas incidents)
2006	5.1 %	26 (dont 17 avec 2 mélanges ou plus positifs)
2007	7.7 %	26 (dont 10 avec 2 mélanges ou plus positifs)
2008	8 %	38 (dont 20 avec 2 mélanges ou plus positifs)

Tableau 8 : Prévalence apparente des troupeaux séropositifs vis-à-vis de la Border disease en Aveyron entre 2006 et 2008 et cas incidents.

Ainsi, entre 2006 et 2008, 123 élevages ont été testés positifs (dont 68 avec 2 mélanges positifs ou plus).

Fin 2008, une reprise de la circulation virale de la Border Disease a été observée (augmentation du nombre de cas incidents). Ce constat a été confirmé en 2009, par la présence de formes cliniques de la maladie et d'une augmentation significative de la mortalité sur les agneaux dans quelques élevages naisseurs et dans certains ateliers d'engraissement.

Compte tenu de ce nouvel épisode virulent de Border Disease, il a été décidé le 04 mars 2009, d'élargir les recherches sérologiques, afin de détecter au plus tôt les cheptels infectés, en évaluant le statut de la moitié des cheptels ovins de plus de 50 ovins tout en continuant de tester les cheptels positifs l'année précédente et les cheptels sélectionneurs. Ajoutée à cette programmation, les opérateurs commerciaux ont fourni une nouvelle liste de

troupeaux dont ils souhaitent connaître le statut. Grâce à ce suivi biennal entre 2009 et 2010, l'ensemble des cheptels aveyronnais de plus de 50 ovins a donc été analysé au moins une fois. En outre une augmentation du nombre d'animaux testés par troupeau a été convenue (9 mélanges de 5 sérums individuels). Par ailleurs, il a été conseillé de prélever des animaux « tout venant » si aucune circulation du virus n'était connue dans le troupeau, et des antenaises ou des jeunes brebis si une circulation virale est déjà connue. Enfin lorsqu'un seul mélange se révélait positif, une reprise en analyse individuelle des 5 sérums le constituant a été réalisée, afin de limiter l'impact des résultats faussement positifs.

Au total ce sont 1700 cheptels sur 2160 de plus de 50 ovins qui ont été programmés en 2009 et environs 1700 cheptels ovins laitiers et allaitants testés en 2010.

	Année 2009	Du 01/01 au 30/09 2010
Nombre de cheptels testés	1698	1688
Nombre de cheptels dépistés positifs	143	151
Nombre de cheptels nouvellement détectés positifs	84	63
Incidence annuelle (%)	1.9	2.64
Prévalence (%)	8.42	8.94

Tableau 9 : Récapitulatif des élevages prélevés et des statuts établis en 2009 et 2010

63 cheptels aveyronnais ont été nouvellement détectés positifs en 2010 (moitié cheptels laitiers, moitié cheptels allaitants). Au total, entre 2009 et 2010, sur l'ensemble des cheptels aveyronnais testés, 209 cheptels sont connus comme étant positifs positifs soit environ 10% des cheptels, dont 6.5% avaient 1 mélange positif ou plus. Les cheptels sont inégalement touchés en fonction de leur production : 6% des éleveurs cheptels lait sont séropositifs contre 21% des cheptels ovins viande.

La circulation virale a un impact clinique dans les élevages naisseurs. Sont constatés de l'infertilité, des avortements, des agneaux chétifs des retards de croissance, des diarrhées néo-natales, de l'ecthyma, des pneumonies. Le nombre d'agneaux malades est très important (jusqu'à 100% !) ainsi que la mortalité d'agneaux. Dans les ateliers bergeries d'engraissement, l'impact est lui aussi majeur. En effet, le rassemblement d'agneaux issus de

cheptels négatifs et d'agneaux issus de cheptels positifs permet une circulation virale extrêmement rapide.

A ce jour, le dépistage sérologique permet d'établir le statut des troupeaux entre le printemps et l'été (lors de la programmation de la campagne de prophylaxie réglementaire), et de proposer un plan de maîtrise de la maladie avant la mise à la reproduction. Ce calendrier, difficilement modifiable, réduit la pertinence temporelle du plan (statut connu 3 à 6 mois avant la période massive de mises-bas et de vente des agneaux), et diminue ainsi le caractère informatif du statut des élevages. En effet, des cheptels avec des résultats négatifs au printemps ont pu se contaminer au cours de l'été et représentent un danger ignoré au moment de la vente des agneaux.

Chez les bovins, le dépistage des anticorps anti-P80 / NS3 sur le lait de grand mélange pour la définition du statut sérologique vis-à-vis de la maladie des muqueuses a montré son efficacité (Niskanen et al 1991 ; Niskanen 1993 ; Beaudeau et al 2001 ; Valle et al 2001). Cet outil est désormais utilisé en routine dans les pays scandinaves (Lindberg and Alenius 1999) et en Bretagne - Pays de Loire (Beaudeau 2002) pour établir et suivre le statut sérologique des élevages bovins laitiers dans le cadre de programmes de maîtrise et d'éradication de l'infection.

En élevage ovin laitier, il n'existe à l'heure actuelle aucune étude permettant de connaître la valeur informative de la détection d'anticorps anti-P80 / NS3 à partir de prélèvements de lait de grand mélange.

Dans ce cadre, et afin de renforcer le dispositif de surveillance, la FODSA a souhaité mettre en place un dépistage sur le lait de grand mélange, à l'image de ce qui est réalisé en élevage bovin laitier en Bretagne - Pays de Loire. Outre la réduction significative des coûts, cette modalité de dépistage permettrait une plus grande fiabilité dans la définition du statut des troupeaux, compte tenu de la répétition possible des analyses sur l'ensemble de la campagne laitière et de la réalisation d'analyses en période d'intérêt maximal (mises-bas). Cependant une telle approche n'avait jamais été rigoureusement évaluée en élevage ovin laitier.

Avant le déploiement d'un tel dispositif à grande échelle, une étude préliminaire d'évaluation était nécessaire, et a été menée en collaboration avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse et Aveyron Labo.

Deuxième partie
ETUDE EXPERIMENTALE

I. OBJECTIFS DE L'ETUDE

En 2009, les seuls kits commerciaux ELISA Ac p 80 disponibles en France n'étaient pas validés pour le lait de mélange ovin. L'objectif général de la présente étude était d'évaluer la possibilité de remplacer la sérologie de mélange par un test ELISA Ac p80 compétition sur le lait de tank, pour détecter les troupeaux ovins séropositifs vis-à-vis de la Border Disease.

Le premier objectif était d'évaluer l'existence d'une relation entre la valeur du pourcentage d'inhibition du lait de tank fournie par le test et la proportion des animaux considérés positifs évaluée par diagnostic sérologique à partir d'un échantillon représentatif des animaux en production. Le second objectif était de déterminer des seuils de décision pour ce test sur le lait de tank et d'évaluer ces performances intrinsèques en calculant sa sensibilité, sa spécificité et son exactitude.

Par ailleurs il paraissait intéressant, à partir des données de cette étude, d'évaluer l'information fournie par la sérologie de petits mélanges, système d'épidémiosurveillance actuellement mis en place dans ce département, en comparaison à la sérologie individuelle.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Constitution de l'échantillon

Depuis 2006, la moitié des cheptels aveyronnais de plus de 50 brebis, les cheptels fournisseurs d'agneaux d'engraissement figurant sur une liste fournie par les opérateurs commerciaux, les cheptels sélectionneurs et les cheptels positifs l'année précédente ont été programmés par la FODSA pour un suivi sérologique de la Border Disease. Tous les cheptels de plus de 150 brebis figurant sur la précédente base de données ont été recrutés pour l'étude à condition d'avoir été contrôlés positifs à la prophylaxie de l'année précédente. Afin de compléter l'échantillon, une cinquantaine d'élevages séronégatifs a été choisie en plus au hasard de cette liste. Au total, 86 élevages ont été étudiés en 2009 et 98 en 2010 dont 74 issus de l'année 2009.

Tous les éleveurs étaient volontaires pour participer à cette étude, leur vétérinaire consentant pour la réalisation des prélèvements. Par conséquent les troupeaux n'étaient pas répartis de manière aléatoire sur l'ensemble du département mais regroupés autour des cliniques vétérinaires attitrées.

II.2. Réalisation des prélèvements

Au sein de ces troupeaux, des prélèvements sanguins ont été réalisés sur 8905 brebis au total. De plus, pour chaque élevage, un prélèvement de lait de grand mélange, plus communément appelé « lait de tank », a été effectué afin d'être comparé aux résultats obtenus par la sérologie. Toutes les données ont été collectées de mars 2009 à juillet 2010.

Les prélèvements de sang étaient réalisés au cours de la prophylaxie annuelle par le vétérinaire sanitaire. Les effectifs initialement inclus étaient les suivants :

- en 2009 : 86 élevages inclus, 9 mélanges de 5 ovins par élevage ;
- en 2010 : 98 élevages inclus, avec comme nombre de mélanges par élevage : 6 mélanges (1/98 élevages), 9 mélanges (87/98 élevages), 12 mélanges (2/98 élevages) et 13 mélanges (8/88 élevages).

Les prélèvements de lait de tank ont été réalisés par différents opérateurs selon les élevages : la FODSA (en 2009 : n = 59, en 2010 : n = 52), les vétérinaires de Saint Afrique (en 2009 : n = 28 + 24, en 2010 : n = 20) ou d'autres vétérinaires (en 2010 : n = 2).

En 2009, il y avait environ 337 [160 ; 580] brebis présentes à la traite le jour du prélèvement et 329 [130 ; 550] brebis en 2010. Le nombre de traites dans le tank variait de 1 à 3 (en 2009 : 1 (28%), 2 (71%), 3 (1%) ; en 2010 : 1 (20%), 2 (79%), 3 (1%)).

Le délai entre la réalisation des prélèvements sanguins et le prélèvement de lait était en moyenne de +13 jours en 2009 ([-77 ; +79]) et de -10 jours en 2010 ([-102 ; +79]).

II.3. Critères d'exclusion de l'échantillon

Connaissant le statut vaccinal de chaque exploitation, les troupeaux vaccinés avec Mucosiffa® ont été exclus de l'échantillon d'étude. Les vaccins vivants modifiés induisent une séroconversion marquée chez les animaux vaccinés et rendent impossible la différenciation, sur la base d'une ELISA Ac p80, entre troupeaux vaccinés et troupeaux infectés naturellement. Ainsi 3 troupeaux ont été évincés en 2009, et 6 troupeaux en 2010.

En outre, les élevages pour lesquels l'échantillon d'animaux prélevés lors de la prophylaxie n'était pas représentatif de la structure en âge du troupeau en lactation n'ont pas été retenus. Seul 1 élevage était concerné en 2009. En 2010, ce sont 15 élevages qui ont été exclus, car seules les cohortes « 9000 » (brebis nées d'août 2008 à août 2009) et / ou « 8000 » (brebis nées d'août 2007 à août 2008) avaient été prélevées.

II.4. Choix de l'analyse

Le lait de tank et les sérums ont été analysés au laboratoire Aveyron Labo. La détection d'anticorps anti-BDV a été réalisée au moyen d'un test ELISA Ac p80 compétition. Le kit utilisé est commercialisé par le laboratoire Pourquier (désormais racheté par IDEXX) sous le nom « POURQUIER ELISA BVD/MD/BD P80 Antibody Screening® » validé uniquement pour le sérum et le plasma (individuel ou de mélange) bovin et ovins. L'ensemble des prélèvements avait été préalablement rendu anonyme. Les analyses ont été effectuées en aveugle. Le sérum a été obtenu après centrifugation des prélèvements de sang et conservé à -20°C jusqu'à analyse.

Pour chaque échantillon à tester le pourcentage d'inhibition est calculé de la façon suivante :

% d'inhibition = (DO. 450 de l'échantillon analysé / DO. 450 moyenne de l'échantillon de contrôle négatif) x 100

Les seuils de décision, fournis par le fabricant, sont précisés dans le tableau 11. Notons que les seuils d'interprétation sur le lait de grand mélange n'ont, à l'heure actuelle, été validés que pour les bovins vis-à-vis du BVD.

Matrice	% d'inhibition	Interprétation
Sérum individuel (BVD et Border-Disease)	≥ 50%	Négatif
	40% - 50%	Douteux
	≤ 40%	Positif
Mélange de 5 sérums (BVD et Border-Disease)	≥ 60%	Négatif
	50% - 60%	Douteux
	≤ 50%	Positif
Lait (BVD uniquement)	≥ 80%	Troupeau négatif
	≤ 80%	Troupeau positif
	≥ 80%	Séroprévalence < 10%
Lait (BVD seulement)]45%-80%[Séroprévalence comprise entre 10 et 30%
	≤ 45%	Séroprévalence > 30%

Tableau 10 : Seuil de décision

L'ensemble des sérums individuels issus de troupeaux ayant au moins un mélange positif a été analysé (151 mélanges en 2009 et 245 en 2010). De même 150 mélanges négatifs issus de troupeaux négatifs ont été soumis à analyse individuelle en 2009. Pour des raisons de coût et compte-tenu des résultats obtenus (cf. infra) cette analyse n'a pas été reconduite en 2010. Ces résultats individuels nous ont permis d'évaluer la présence de mélanges faussement positifs ou faussement négatifs, d'estimer la séroprévalence intra-troupeau à partir de l'échantillon de 45 animaux prélevés et enfin de confronter l'information obtenue à partir des mélanges et des analyses individuelles quant à la séroprévalence intra-troupeau.

II.5. Analyses des données

Afin de répondre aux différents objectifs de l'étude, différentes méthodes statistiques ont été mises en œuvre.

II.5.1. Interprétation de la séroprévalence à partir des résultats de sérologie sur petits mélanges de sérum

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer la prévalence théorique attendue (et son intervalle de confiance) en fonction du nombre de mélanges positifs. A partir d'un fichier simulant de 1 à 45 animaux positifs sur 45, nous avons réalisé, pour chaque niveau de séroprévalence ainsi créé, 1000 tirages au sort sans remise, de 9 mélanges de 5 animaux, à l'aide d'une loi hypergéométrique. Sous l'hypothèse d'une sensibilité et d'une spécificité parfaite du test sur petits mélanges de sérums, chaque mélange était considéré comme positif dès lors qu'il comprenait au moins un animal positif. Ainsi selon la prévalence simulée, de 1 à 9 mélanges pouvaient être considérés comme positifs. A partir de ces données, la densité de probabilité des prévalences possibles en fonction du nombre de mélanges positifs a été calculée.

Inversement, à partir des mêmes données, nous avons calculé la densité de probabilité du nombre de mélanges positifs attendus en fonction d'une prévalence théorique variant de 0% à 100%.

Finalement, les données obtenues dans les élevages aveyronnais retenus dans l'étude ont été confrontées aux distributions théoriques

II.5.2. Relation entre pourcentage d'inhibition sur lait de tank et séroprévalence intra-troupeau

Les résultats obtenus en 2009 et 2010 ont été regroupés. L'évaluation de la relation entre le pourcentage d'inhibition sur lait de tank et la séroprévalence intra-troupeau estimée à partir d'un échantillon représentatif de 45 animaux a été effectuée graphiquement.

II.5.3. Evaluation des performances intrinsèques du test POURQUIER ELISA BVD/MD/BD P80 Antibody Screening sur lait de tank

Cette évaluation a été réalisée pour différents seuils de séroprévalence. Pour chaque seuil, une analyse par courbe ROC (Receiving Operator Curves) a été effectuée. Cette analyse permet de calculer la sensibilité et la spécificité associée à chaque valeur de pourcentage d'inhibition obtenue sur le lait de tank. Les intervalles de confiance à 95% de la sensibilité, de la spécificité et de l'exactitude (proportion d'échantillons correctement classés) ont été calculés à l'aide d'une loi binomiale exacte.

L'estimation de la séroprévalence intra-troupeau a été réalisée à partir d'un échantillon de 45 animaux, représentatif de la distribution en âge du troupeau en lactation. Cette estimation, bien qu'exacte, souffre cependant d'une imprécision liée à la taille restreinte de l'échantillon prélevé au regard de la taille des troupeaux. Les performances intrinsèques calculées en utilisant l'estimateur de la séroprévalence intra-troupeau ne tiennent pas compte de cette imprécision. Afin de parvenir à une évaluation plus juste, une étude par simulation Monte Carlo a été menée. Pour chaque élevage, les résultats de sérologie individuelle ont été utilisés afin de générer dix mille valeurs de séroprévalence selon une loi beta (a, b), où a = nombre d'animaux séropositifs sur 45 et b = 45 – nombre de positifs +1. Cette distribution a la particularité d'être centrée sur l'estimateur de la séroprévalence et de se superposer à son intervalle de confiance à 95%. Pour chacun des 10 000 fichiers aléatoires ainsi créés, les performances intrinsèques du test sur le lait et leurs intervalles de confiance exacts à 95% ont été calculés. Finalement les estimateurs de la sensibilité, de la spécificité et de l'exactitude ont été définis comme la moyenne des estimateurs de 10 000 valeurs obtenues.

L'ensemble des analyses a été réalisé sous SAS 9.1

III. RESULTATS

III.1. Exactitude des résultats de sérologie sur petits mélanges de sérums

Sur 151 mélanges positifs en 2009 (151/217 mélanges, soit 70%) et 245 en 2010 (245/268 mélanges, soit 91%), 3 (0.75%) se sont révélés être faussement positifs après analyse individuelle de l'ensemble des animaux les composant (aucun ovin individuellement séropositif).

A l'inverse, sur les 150 mélanges négatifs (150/597 mélanges, soit 25%), 5 (3.33%) se sont révélés contenir au moins 1 animal individuellement positif (mélanges faux négatifs). Pour 4 mélanges, un seul animal sur 5 s'est révélé positif, et 2 pour le mélange restant. Notons que 3 des 5 mélanges faussement positifs étaient issus de troupeaux pour lesquels les 7 ou 8 autres mélanges étaient positifs (vrais positifs). Pour un élevage, tous les mélanges étaient négatifs et pour le dernier 4 mélanges sur 9 étaient positifs.

En considérant les résultats des analyses individuelles comme le gold standard, la sensibilité de l'analyse sur petits mélanges de sérums est estimée à 96.67% [IC95% = 93.80 – 99.54] et sa spécificité à 99.24% [IC95% : 98.38 – 100.00]

Sur la base de ces résultats et par simplicité, il a été convenu dans la suite des analyses, que les mélanges négatifs non repris en analyse individuelle seraient considérés comme réellement négatifs. L'erreur induite par cette décision est dans tous les cas faible, compte tenu à la fois du faible nombre de mélanges faussement négatifs (3.33%) et du faible nombre d'animaux individuellement positifs dans ces mélanges. L'information relative aux mélanges faussement positifs et faussement négatifs détectés a été corrigée dans la suite des analyses.

III.2. Précision et exactitude théorique de l'information fournie par les résultats de sérologie sur petits mélanges

Les résultats des calculs théoriques sont présentés en intégralité en annexe 1 et 2. Les principales conclusions pouvant en être tirées sont les suivantes, sous l'hypothèse de la représentativité de l'échantillon d'animaux prélevés :

- L'absence de mélange positif ne correspondrait à une séroprévalence vraie inférieure à 1% que dans 55.40% des cas, inférieure à 5% dans 90.94% des cas et inférieure à 10% dans 99.25% des cas.
- Lorsqu'un seul mélange (de 5 sérums) sur 9 est positif, la probabilité qu'il ne contienne qu'un seul animal positif est de 91.66% et de 7.70% pour 2 animaux. L'intervalle de confiance binomial exact à 95% le plus probable (91.66%) de la séroprévalence est [0.00 – 7.87]. Dans tous les cas, la prévalence vraie ne dépassera 20% que dans moins de 8 cas sur dix mille. Les élevages pour lesquels un seul mélange positif sur 9 a été obtenu sont donc des élevages avec une très faible séroprévalence intra-troupeau et sont difficilement différenciables des élevages pour lesquels tous les mélanges sont négatifs.
- A l'inverse, lorsque 9 mélanges sont positifs, la probabilité qu'il n'y ait qu'un animal positif par mélange est très faible, proche de 1%. La probabilité que la prévalence observée soit supérieure à 50% (23 animaux positifs sur 45 testés) est de 83.17%, correspondant à une borne inférieure de l'intervalle de confiance de la séroprévalence intra-troupeau de 33.70%. Dans environ 0.5% des cas la prévalence vraie peut être inférieure à 30%.
- Entre ces deux extrêmes, il apparaît un large recouvrement des séroprévalences théoriques attendues. Cependant lorsque le nombre de mélanges positifs est inférieur ou égal à 4, la probabilité que la borne supérieure de l'intervalle de confiance à 95% (IC95%) de la séroprévalence vraie soit inférieure à 30% (26.19% exactement), demeure supérieure à 95%. A l'inverse seule l'obtention de 9 mélanges positifs sur 9 permet d'être certain (au seuil d'erreur de 5%) que la borne inférieure de l'IC95% de la séroprévalence vraie est supérieure à 25%. En effet pour 8 mélanges sur 9 positifs, la borne inférieure de l'IC95% de la séroprévalence vraie sera inférieure à 25% avec une probabilité de plus de 65% !

Il apparait ainsi que l'information basée sur les résultats de sérologie de 9 mélanges de 5 animaux permet de statuer, avec une certitude élevée, sur l'absence de circulation virale dans un troupeau (0 et 1 mélange positif). Cependant la précision de l'information quant à la séroprévalence vraie demeure faible. Une précision supérieure nécessiterait l'augmentation du nombre de mélanges et donc du nombre d'animaux prélevés. Notons cependant que les calculs ont été effectués sous la loi des grands nombres, qui fait l'hypothèse que l'échantillon analysé est de petite taille au regard de l'effectif des troupeaux (moins de 10%). Pour les petits troupeaux, l'intervalle de confiance de la prévalence vraie est en réalité plus resserré.

III.3. Relation entre le nombre de mélanges positifs et la séroprévalence observée

La figure 3 présente la distribution des élevages retenus dans l'étude selon le nombre de mélanges positifs en 2009 et 2010. Pour la majorité d'entre eux (46 soit 56.10% en 2009 et 55 soit 69.62% en 2010), l'ensemble des résultats était négatif. Alors qu'en 2009 la proportion d'élevages dans lesquels un seul mélange positif était détecté n'était pas négligeable (n=12 soit, 14.63%), cette situation ne s'est que rarement rencontrée en 2010 (n=1, soit 1.22%).

Le nombre d'élevage ayant de 2 à 7 mélanges positifs était faible les deux années consécutives (10 en 2009 et 11 en 2010). Enfin 14 élevages en 2009 et 11 en 2010 avaient 8 mélanges positifs ou plus.

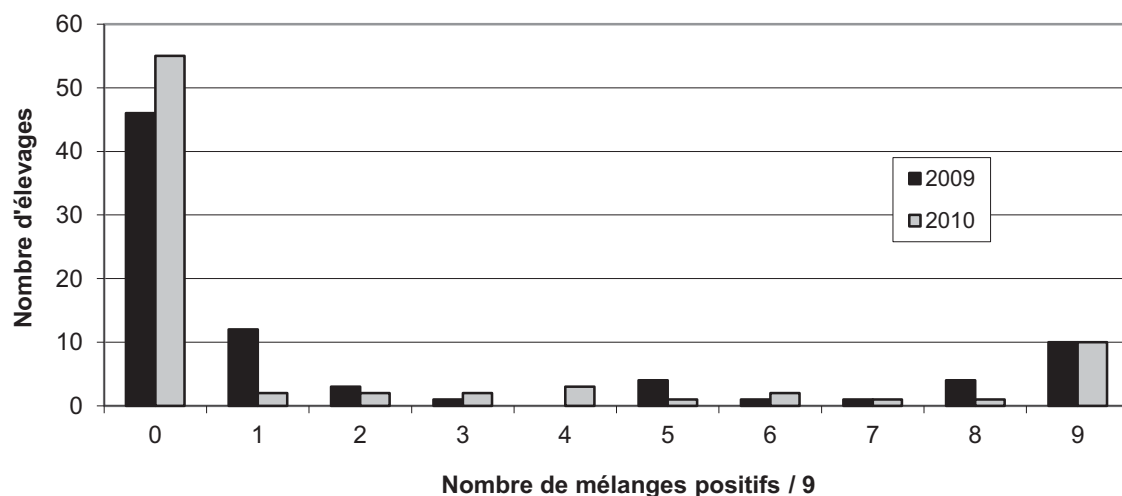


Figure 3 : Distribution des élevages retenus dans l'étude selon le nombre de mélanges positifs en 2009 et 2010

L'estimation de la séroprévalence observée à partir des résultats d'analyses individuelles, disponible pour l'ensemble des mélanges positifs et pour une grande partie des mélanges négatifs, a été confrontée aux résultats de sérologie de petits mélanges (figure 4). Les mélanges négatifs non repris en analyse individuelle ont été considérés comme réellement négatifs (5 animaux séronégatifs sur 5).

Une forte corrélation apparaît clairement entre le nombre de mélanges positifs et la séroprévalence observée. Cette relation n'est cependant pas linéaire. La variabilité de la séroprévalence intra-troupeau estimée apparaît plus importante pour les élevages avec 8 et 9 mélanges positifs.

La distribution des séroprévalences observées est dans l'ensemble conforme aux distributions théoriques : ainsi dans l'ensemble des élevages avec un seul mélange positif, un seul animal sur 45 s'est révélé séropositif (séroprévalence observée 2.22%) et dans les 25 élevages ayant entre 1 et 4 mélanges positifs au maximum 6 animaux sur 45 étaient séropositifs (séroprévalence observée 13.33%), correspondant à une borne supérieure de l'IC95% de la séroprévalence vraie de 24.05 %. Notons que pour un élevage ayant 9 mélanges positifs, un seul animal positif par mélange a été détecté, phénomène en théorie rare (probabilité d'environ 1%). Pour cet élevage, l'interprétation des résultats de sérologie de mélanges conduit à surestimer de beaucoup la prévalence observée (20.00%).

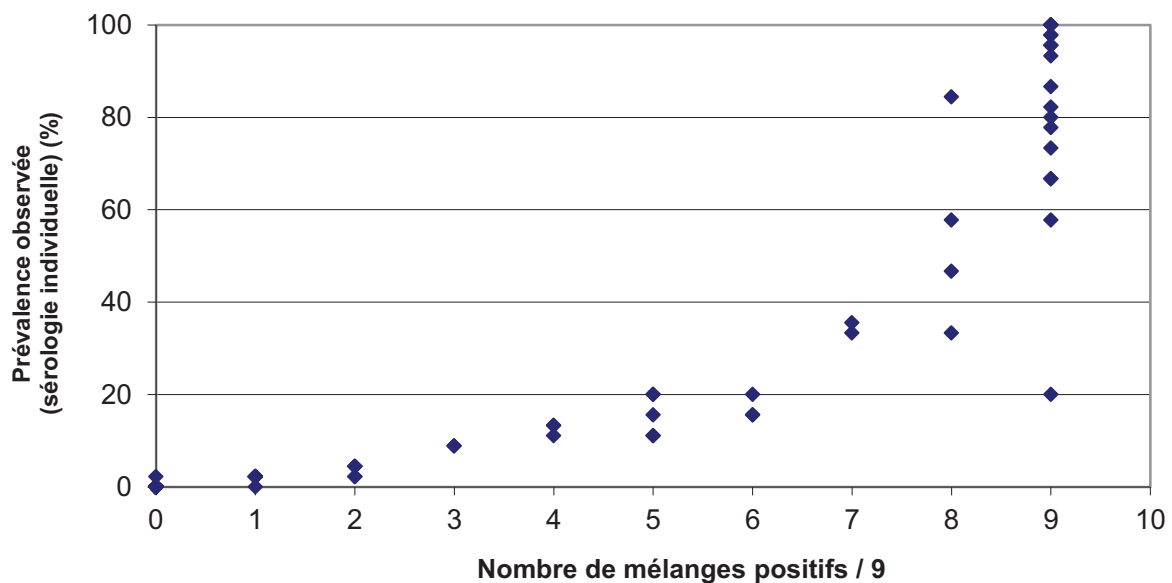


Figure 4 : Relation entre nombre de mélanges positifs (sur 9) et séroprévalence observée à partir d'un échantillon de 45 analyses individuelles (chaque point peut représenter plusieurs élevages, jusqu'à 101 pour les coordonnées 0,0)

III.4. Relation entre le pourcentage d'inhibition du lait de tank et la séroprévalence observée

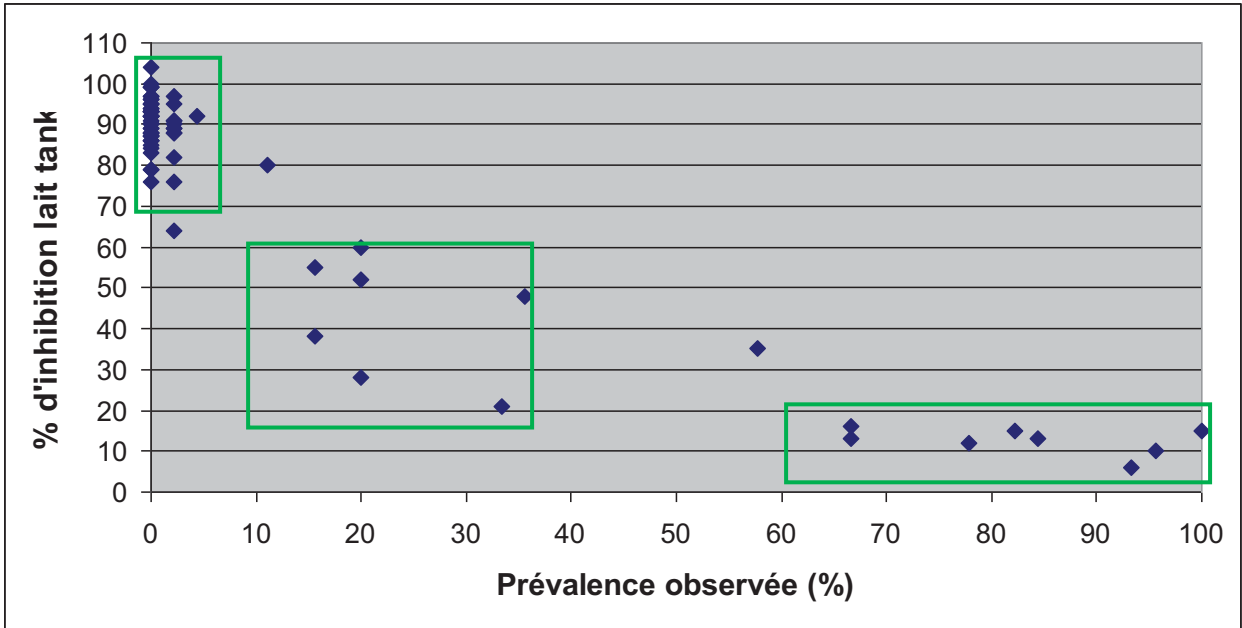
La relation entre le pourcentage d'inhibition du lait et la séroprévalence observée est présentée à la figure 5 pour 2009 (77 mesures) et 2010 (80 mesures). L'allure générale de la courbe est en faveur d'une augmentation des animaux positifs inversement proportionnelle au pourcentage d'inhibition.

En 2009, pour des pourcentages d'inhibition supérieurs à 70%, la proportion des animaux considérés comme positifs était, à une exception près, inférieure à 10% (figure 5). Cette proportion était à l'inverse très variable (2 à 100%) pour les pourcentages d'inhibition inférieurs à 70%. Ainsi, les troupeaux ont été répartis dans 3 classes de pourcentage d'inhibition (1 : [0,20] ; 2 : [20,70] ; 3 : [70,100]) qui correspondent à une séroprévalence estimée respectivement comprise entre 0 et 10%, 10 et 40% et 40 à 100%. Sur la base de cette classification, seulement 3 élevages (3.9%) de l'échantillon étaient mal classés, c'est-à-dire présentaient une séroprévalence observée qui n'était pas prédite par la valeur du pourcentage d'inhibition de leur lait de tank.

En 2010, pour des pourcentages d'inhibition supérieurs à 70%, la proportion des animaux considérés comme positifs était à une exception inférieure à 8% (figure 6). Ainsi, les troupeaux ont été répartis dans 3 classes de pourcentage d'inhibition (1 : [0,35] ; 2 : [35,70] ; 3 : [70,100]) qui correspondent à une séroprévalence estimée respectivement comprise entre 0 et 8%, 8 et 45% et 45 à 100%. Sur la base de cette classification, seulement 2 élevages (2.5%) de l'échantillon étaient mal classés.

Lorsque les données des 2 années sont regroupées, trois classes peuvent être distinguées selon le pourcentage d'inhibition : (1 : [0,35] ; 2 : [35,70] ; 3 : [70,100]) qui correspondent à une séroprévalence observée respectivement comprise entre 0 et 8%, 8 et 30% et 30 à 100%. Sur la base de cette classification, seulement 6 mesures (3.8%) étaient mal classées (figure 7).

Notons cependant que l'imprécision de l'estimation à la séroprévalence, liée à la taille de l'échantillon prélevé (45 animaux), rend difficile l'établissement définitif de ces seuils. Il apparaît cependant que les valeurs de pourcentage d'inhibition permettant de réaliser cette classification diffèrent légèrement de celles retenues dans l'espèce bovine (80% et 45%).



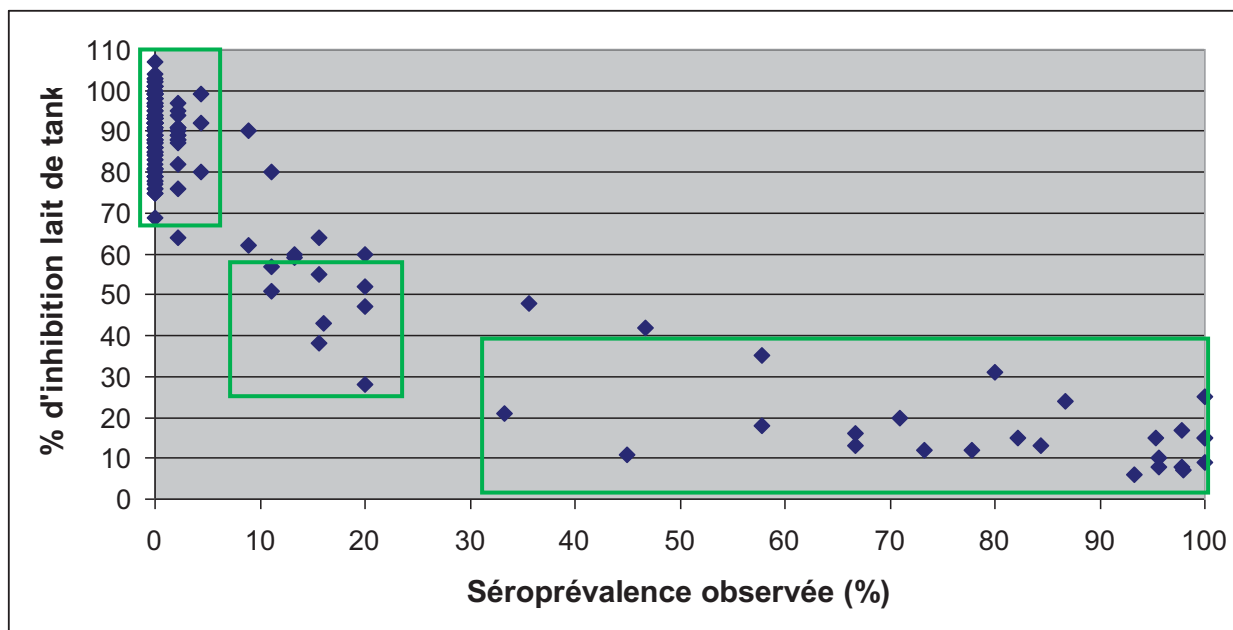


Figure 7 : Relation entre le pourcentage d'inhibition du lait et la séroprévalence observée en 2009 et 2010

III.5. Définition des seuils de décision

Les résultats se sont fondés sur 162 mesures composés des 77 mesures de 2009, des 80 mesures de 2010 et de 5 élevages pour lesquels une circulation virale a été détectée en 2010 à partir des résultats sérologiques obtenus sur les brebis de 1 an.

L'analyse par courbes ROC a été réalisée pour 4 seuils de séroprévalence observée : 2% (1 animal positif sur 45), 4% (2+/45), 6% (3+/45), 8% (4/45) et 10% (5+/45). Pour chaque seuil, les élevages ont été classés comme « positifs » (séroprévalence observée supérieure ou égale au seuil) ou « négatifs » (séroprévalence observée inférieure au seuil). L'analyse par courbe ROC a permis de déterminer les valeurs de sensibilité et de spécificité associées à chaque valeur de pourcentage d'inhibition (figure 8) pour l'identification des élevages « positifs » ou « négatifs ». Ainsi les résultats s'interprètent comme la capacité du test sur le lait à bien classer, pour un seuil de pourcentage d'inhibition donné, les élevages ayant ou non une séroprévalence observée supérieure à un seuil fixé. La valeur seuil de pourcentage d'inhibition permettant de discriminer les troupeaux considérés comme positifs et négatifs dépend de la séroprévalence seuil que l'on cherche à mettre en évidence. Cette valeur était de 80% pour une séroprévalence de 2% (1 animal positif sur 45) et de 65% pour les séroprévalence supérieures.

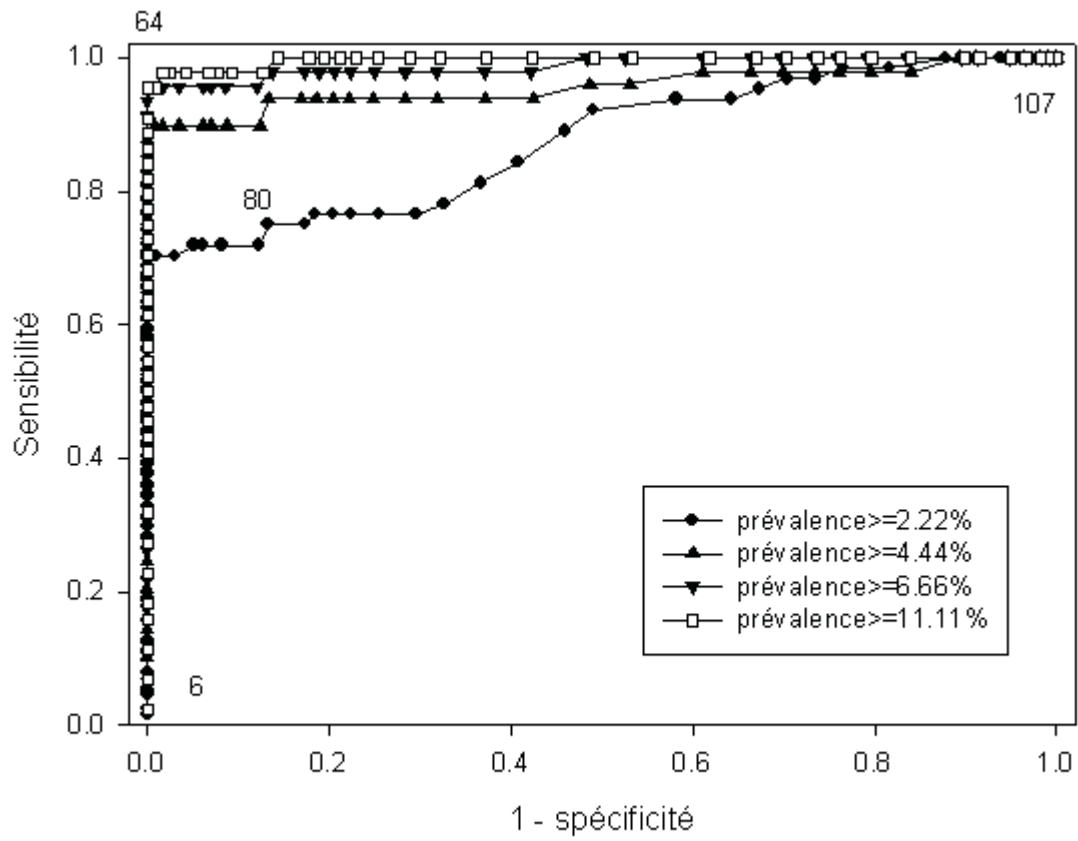


Figure 8 : Résultat de l'analyse par courbes ROC pour 5 seuils de séroprévalence (les courbes correspondant aux seuils de 6.66% et 8.88% sont confondues)

III.6. Estimation des performances intrinsèques

III.6.1. Estimation brute

Les estimateurs de la sensibilité, de la spécificité et de l'exactitude sont fournis dans le tableau 12, pour les pourcentages d'inhibition « optimums » pour chaque seuil de séroprévalence et pour les seuils de 70% (retenu précédemment) et de 80% (retenu chez les bovins).

Séro prévalence (%)	% inhib. lait	Sensibilité lait	Spécificité lait	Exactitude
>2	<80	75.0 [62.6 – 85.0]	86.7 [78.3 – 92.7]	82.1 [75.3 – 87.7]
	< 70	70.3 [57.6 – 81.1]	99.0 [94.5 – 100.0]	87.6 [81.6 – 92.3]
	< 65	70.3 [57.6 – 81.1]	100.0 [96.3 – 100.0]	88.3 [82.3 – 92.8]
>4	< 80	93.88 [83.1 – 98.7]	86.7 [79.1 – 92.4]	88.9 [83.0 – 93.3]
	< 70	89.8 [77.8 – 96.6]	98.2 [93.8 – 99.8]	95.7 [91.3 – 98.2]
	< 65	89.8 [77.8 – 96.6]	99.1 [95.2 -100.0]	96.3 [92.1 – 98.6]
>6	< 80	97.8 [88.5 – 99.9]	86.2 [78.6 – 91.9]	89.5 [83.7 – 93.8]
	< 70	95.6 [85.2 – 99.5]	98.3 [93.9 – 99.8]	97.5 [93.8 – 99.3]
	< 65	95.6 [85.2- 99.5]	99.1 [95.3 -100.0]	98.1 [94.7 – 99.6]
>8	< 80	97.8 [88.5 – 99.9]	86.2 [78.6 – 91.9]	86.2 [78.6 – 91.91]
	< 70	95.7 [85.2 – 99.5]	98.3 [93.9 – 99.8]	97.5 [93.8 – 99.3]
	< 65	95.6 [85.2- 99.5]	99.1 [95.3 -100.0]	98.1 [94.7 – 99.6]
>10	< 80	100.0 [92.0 – 100.0]	85.6 [77.9 – 91.4]	89.5 [83.7 – 93.8]
	< 70	97.7 [88.0 – 99.9]	97.5 [92.7 – 99.5]	97.5 [93.8 – 99.3]
	< 65	97.7 [88.0- 99.5]	98.31 [94.0 -99.8]	98.1 [94.7 – 99.6]

Tableau 11 : Performances intrinsèques obtenues à l'aide du test Pourquier Elisa Bvd/Md/Bd P80 Antibody Screening® appliqué au lait de tank en fonction de différents seuils de séroprévalence et de seuils de pourcentage d'inhibition (les valeurs en gras correspondent aux seuils optimums retenus par l'analyse ROC)

Pour une prévalence donnée, plus les valeurs seuils de décision pour le lait de tank sont basses, plus la spécificité est élevée, au détriment de la sensibilité. L'identification des troupeaux avec une séroprévalence très faible (1 animal positif sur 45) n'apparaît pas très performante si l'on souhaite conserver une spécificité acceptable (sensibilité de 70.3% et spécificité de 100.0% au seuil de 65%). Pour des séroprévalences plus élevées, le seuil optimal sur le lait reste le même (65%) et est associé à de meilleures performances intrinsèques. Il apparaît que l'exactitude est la même pour des seuils de séroprévalence compris entre 6.66% (3 animaux positif sur 45) et 11.11% (5 animaux positifs sur 45), même si la sensibilité et la spécificité varient très légèrement. Au seuil de 65% sur le lait, les performances du test peuvent être considérées comme très bonnes (>95%). Il n'existe que peu de différence entre les performances obtenues au seuil de 65% et de 70%. En revanche le seuil de 80%, retenu chez les bovins, n'apparaît pas être le plus satisfaisant dans notre étude : s'il est associé à une sensibilité toujours élevée (entre 75 et 100%), la spécificité est dans l'ensemble médiocre (autour de 86%).

III.6.2. Estimation par simulations Monte-Carlo

Les résultats de l'estimation par simulations Monte-Carlo des performances intrinsèques du test ELISA sur le lait sont présentés dans le tableau 13. Les performances intrinsèques du test sont globalement moins bonnes, en particulier la sensibilité, pour des seuils de séroprévalence faible (moins de 8%), mais demeurent bonnes à très bonnes pour les seuils de séroprévalence de 8 et 10%.

Séro prévalence (%)	% inhib lait	Sensibilité lait	Spécificité lait	Exactitude
>2	<80	53.1 [48.1 - 58.9]	85.3 [80.0 - 90.8]	66.1 [59.9 - 72.2]
	< 70	45.7 [41.3 - 50.6]	97.1 [95.1 - 98.6]	66.7 [59.9 - 72.2]
	< 65	45.4 [41.0 - 50.6]	98.4 [96.6 - 98.7]	66.7 [60.5 - 72.8]
>4	< 80	69.7 [62.3 - 77.8]	85.6 [82.8 - 88.8]	79.0 [74.1 - 84.0]
	< 70	64.2 [56.6 - 72.1]	97.1 [95.9 - 98.9]	83.3 [77.8 - 88.3]
	< 65	63.8 [56.6 - 71.7]	98.0 [96.9 - 99.0]	84.0 [78.4 - 88.3]
>6	< 80	83.0 [75.0 - 91.7]	85.3 [83.3 - 87.6]	84.6 [80.9 - 88.3]
	< 70	78.6 [70.5 - 87.8]	97.2 [96.0 - 98.2]	90.7 [87.0 - 94.4]
	< 65	78.6 [70.5 - 87.5]	98.1 [96.5 - 99.1]	91.4 [87.7 - 95.1]
>8	< 80	91.5 [84.0 - 97.8]	84.8 [82.9 - 86.7]	86.4 [84.0 - 88.9]
	< 70	87.8 [80.8 - 95.5]	96.6 [94.9 - 98.2]	93.8 [91.4 - 96.9]
	< 65	87.8 [80.8 - 95.5]	97.4 [95.7 - 99.1]	94.4 [92.0 - 96.9]
>10	< 80	95.6 [89.4 - 100.0]	84.0 [82.1 - 85.8]	87.0 [84.6 - 88.9]
	< 70	93.3 [87.2 - 100.0]	95.8 [94.1 - 97.4]	95.1 [92.6 - 97.5]
	< 65	93.3 [87.2 - 100.0]	96.6 [95.0 - 98.3]	95.7 [93.2 - 98.2]

Tableau 12 : Estimation par simulations Monte-Carlo des performances intrinsèques obtenues à l'aide du test appliqué au lait de tank en fonction de différents seuils de séroprévalence

Cette baisse des performances par rapport à l'estimation précédente s'explique par le fait que certaines séroprévalences observées à partir de l'échantillon de 45 animaux, classées précédemment en dessous d'un seuil, peuvent correspondre en réalité à une séroprévalence vraie supérieure à ce seuil. Par exemple une séroprévalence observée de 0% (absence de résultat positif sur 45 animaux testés), correspondant, dans nos données simulées, à une séroprévalence vraie supérieure à 2% dans environ 35 % des cas (figure 9).

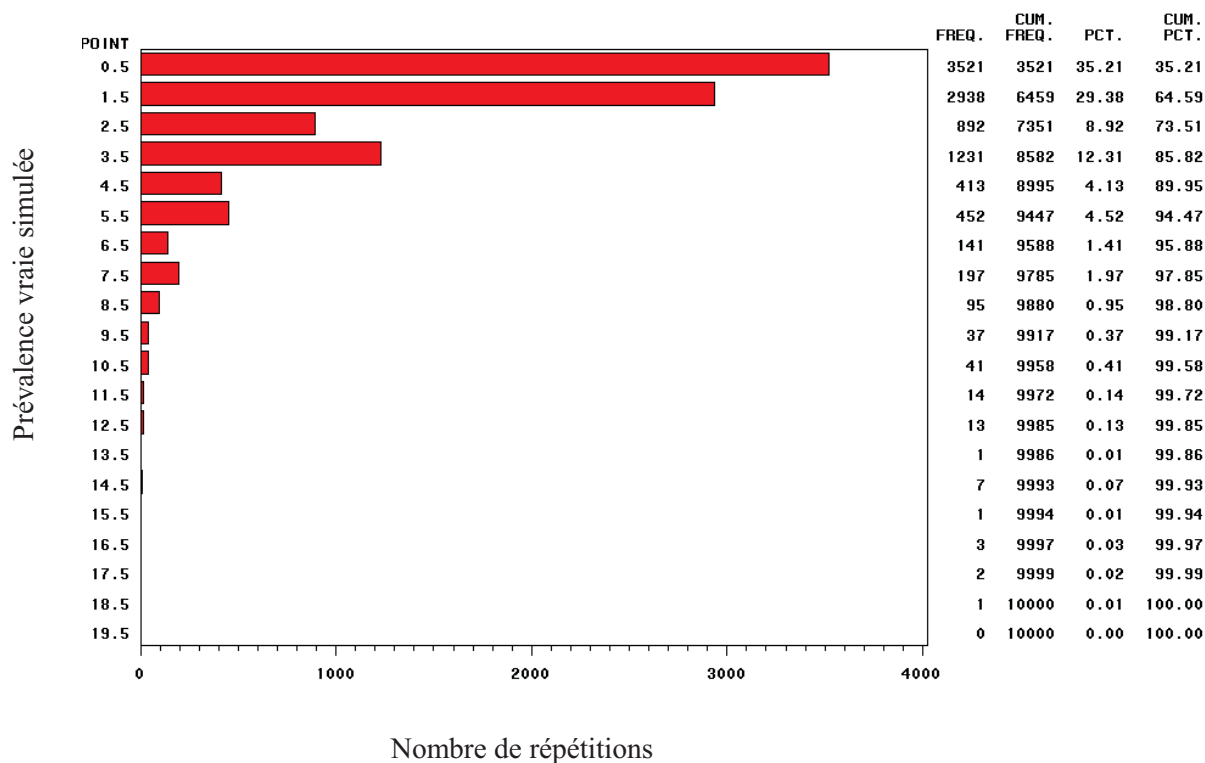


Figure 9 : Exemple de densité de probabilité de la prévalence vraie simulée pour un élevage ayant une séroprévalence observée nulle (aucun résultat sérologique positif sur 45 animaux testés) (10000 répétitions)

III.7. Evolution des élevages

L'analyse de l'évolution de la séroprévalence intra-élevage, observée entre 2009 et 2010 pour les 59 élevages suivis les deux années consécutives et pour lesquels l'échantillon d'animaux prélevés était représentatif de la structure en âge, n'indique pas de grosses variations (figure 10). Il n'a donc pas été possible d'évaluer si une séroconversion, dans des proportions variables, des animaux d'un élevage à la suite d'une circulation virale, est suivie d'une variation des résultats sur le lait.

En revanche, notons que les 47 élevages pour lesquels le pourcentage d'inhibition sur le lait de tank était supérieur aux seuils et 65% et 70% en 2009 n'ont pas connu d'augmentation de leur séroprévalence en 2010, tout du moins au travers de l'estimation réalisée dans notre étude.

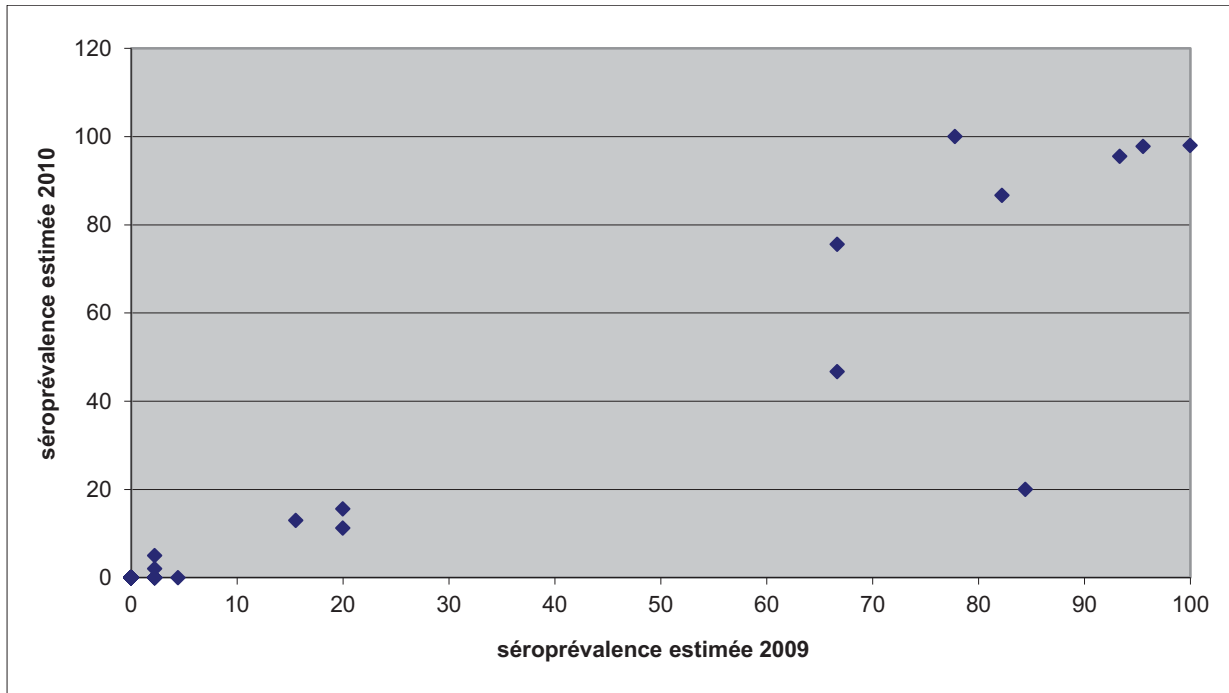


Figure 10 : évolution de la séroprévalence estimée dans 59 troupeaux suivis en 2009 et 2010 (chaque point peut représenter plusieurs élevages, jusqu'à 38 pour les coordonnées 0,0)

Il apparait par ailleurs que les résultats sur le lait sont demeurés relativement stables entre les 2 années de l'étude (figure 11). Pour deux élevages seulement (4.1%) (points encadrés sur la figure 11), un changement de statut aurait été prononcé sur la base du seuil de décision de 65% passant de « positifs » en 2009 à « négatifs » en 2010.

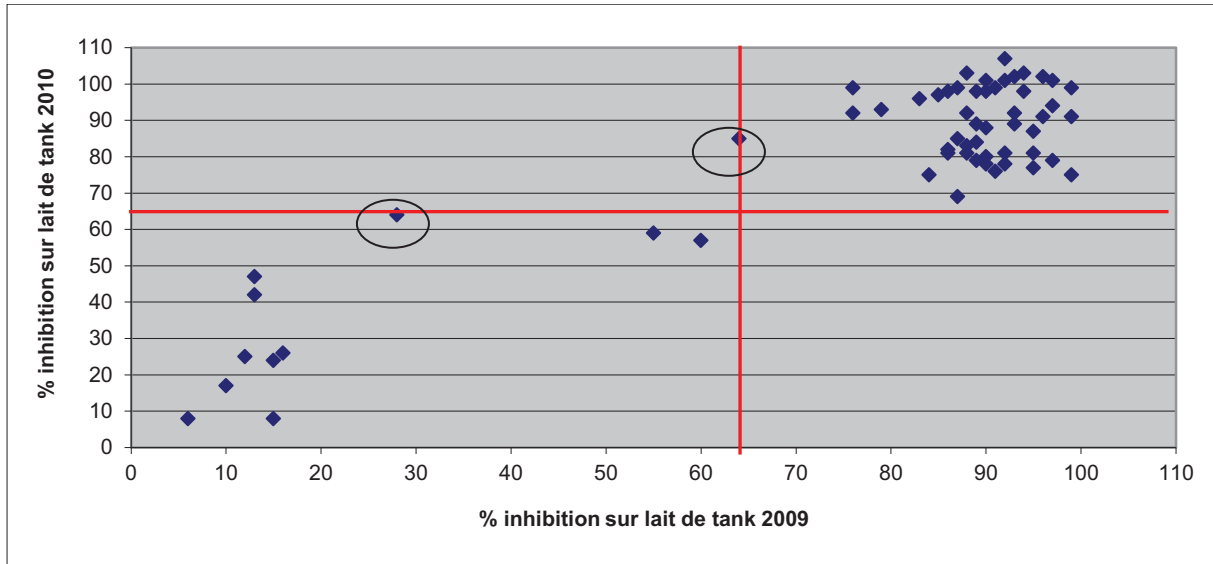


Figure 11 : Evolution du pourcentage d'inhibition sur le lait de tank dans 49 troupeaux suivis en 2009 et 2010

IV. DISCUSSION

IV.1. Intérêts et limites de l'étude

Cette étude confirme l'hypothèse que la séroprévalence intra troupeau vis-à-vis de la Border Disease peut être évaluée à partir du lait de tank des troupeaux ovins, à l'image de ce qui a déjà été démontré pour le BVD en élevage bovin (Beaudeau *et al.*, 2001a). Il s'agit également de la première étude basée sur un échantillon aussi important : 110 élevages inclus contre 34 pour la première étude publiée utilisant cette approche diagnostique, réalisée en Espagne (Garcia-Perez *et al.*, 2010). En outre notre étude est la première à avoir réévalué les seuils définis pour les bovins afin de les adapter aux ovins. En effet dans l'étude espagnole citée, les seuils définis pour les bovins ont été utilisés comme tels. .

Néanmoins, notre étude repose sur un effectif encore trop restreint d'élevages où la circulation virale (ancienne ou récente) est avérée, d'autant plus que les causes d'exclusions (vaccination, échantillon non représentatif de l'élevage) ont contribué à tronquer d'avantage l'échantillon. Par ailleurs, au sein de chaque élevage, le nombre d'animaux testés était également limité (45 animaux / élevages) ce qui contribue à une estimation imprécise de la séroprévalence (large intervalle de confiance). De ce fait, l'évaluation des seuils de décision en relation avec les niveaux de séroprévalence observée n'a pas pu être réalisée avec précision et robustesse. L'utilisation de simulations Monté Carlo a permis de s'affranchir quelque peu de l'incertitude liée à la petite taille de l'échantillon prélevé dans chaque élevage, mais les résultats obtenus nécessiteraient d'être validés sur le terrain à plus grande échelle. De même, des investigations complémentaires méritent d'être entreprises afin d'établir la distinction entre les seuils de décision de 65 % et 70 %.

Cette étude compte également un unique prélèvement par élevage et par an. Ceci ne permet ni de savoir si l'évolution de la valeur sur le lait de tank suit la séroprévalence, ni d'évaluer la dynamique de l'infection. La dynamique de l'infection est définie par la proportion de troupeaux changeant ou non de statut. En bénéficiant de prélèvements à quelques mois d'intervalle, par élevage, il serait possible de déterminer les statuts d'une séquence à l'autre et ainsi de mettre en évidence les élevages en séroconversion.

Ce test à vocation à être utilisé sur le lait de repasse (lait en période d'allaitement, non commercialisable) afin d'apporter une indication précise quant au statut sérologique intra-troupeau lors de livraison des agneaux d'engraissement. Cependant, les prélèvements de la présente étude ont été effectués au printemps, c'est-à-dire plusieurs mois avant la vente des

agneaux. Il conviendrait de réaliser de nouvelles analyses basées sur des prélèvements de lait de repasse, afin de constituer un échantillon plus représentatif de la réalité (nombre inférieur de brebis présentes à la traite, lait de brebis adultes essentiellement).

IV.2. Evaluation de la séroprévalence à partir des résultats de sérologie des petits mélanges

L'estimation de la séroprévalence intra-troupeau à partir de mélanges de sérums semble fiable pour des séroprévalences extrêmes. Toutefois la distinction entre faible et forte séroprévalence est difficile au-delà d'un certain nombre de mélanges positifs. Il apparaît ainsi que l'information basée sur les résultats de sérologie de 9 mélanges de 5 animaux permet de statuer, avec une certitude élevée, sur l'absence de circulation virale dans un troupeau (0 et 1 mélanges positifs). Cependant la précision de l'information quant à la séroprévalence vraie demeure faible. Une précision supérieure nécessiterait l'augmentation du nombre de mélanges et donc du nombre d'animaux prélevés. Notons cependant que les calculs ont été effectués sous la loi des grands nombres, qui fait l'hypothèse que l'échantillon analysé est de petite taille au regard de l'effectif des troupeaux (moins de 10%). Pour les petits troupeaux, l'intervalle de confiance de la prévalence vraie est en réalité plus resserré.

IV.3. Relation entre pourcentage d'inhibition et séroprévalence observée

Il existe une relation correcte entre le pourcentage d'inhibition et la séroprévalence observée. En effet, l'analyse conduit à une répartition possible des troupeaux en trois classes de pourcentage d'inhibition, à l'image de ce qui a déjà été démontré en bovin (Beaudeau *et al.*, 2001a). En outre, notre étude est la première à avoir réévalué les seuils de pourcentages d'inhibition obtenus dans l'espèce bovine afin d'optimiser la classification dans l'espèce ovine. Toutefois, la prédiction de la proportion des animaux positifs dans le troupeau apparaît bonne pour des pourcentages d'inhibition du lait de tank élevé (faible séroprévalence), alors que l'incertitude sur la valeur réelle de cette proportion est beaucoup plus importante pour des pourcentages d'inhibition du lait de tank inférieurs à 70 %. Cette imprécision est directement liée à la taille de l'échantillon prélevé (45 animaux), insuffisante pour fixer des seuils de décision permettant d'établir une correspondance précise avec des niveaux attendus de prévalence des animaux porteurs d'anticorps anti-BDV. La réalisation de nouvelles

investigations, basées sur un échantillon plus important d'animaux prélevés dans chaque troupeau, permettrait d'affiner les résultats.

IV.4. Définition de seuils de décision

La sensibilité et la spécificité du test ELISA Ac p80 compétition appliqué au lait de tank sont élevées pour la détection des élevages dont la séroprévalence est supérieure à 8-10% (respectivement 95.6 à 97.7 et 99.1 à 98.31) et proches de celles rapportées par d'autres tests ELISA appliqués au lait de tank bovin (Valle *et al.*, 2001). Pour les élevages où la séroprévalence est plus faible, la sensibilité et la spécificité du test sont moins bonnes. Cette baisse de performance risque d'occulter les élevages en cours de séroconversion (séroprévalence supérieure à 0 % mais inférieure à 10 %). Cependant, la simplicité de mise en œuvre de ce test permet de le répéter dans le temps (2 à 3 fois / an) et d'obtenir ainsi un statut actualisé permettant de détecter ces élevages, ce que ne permet pas l'épreuve de sérologie classique réalisée lors de la prophylaxie (1 fois par an).

Cette étude a également permis de déterminer un seuil de décision propre aux ovins (pour un pourcentage d'inhibition du lait à 65 %) qui s'avère différent du seuil défini pour les bovins (80 %) (Beaudeau *et al.*, 2001c). Le test a donc gagné en performance, en particulier quant à sa spécificité. Afin de parfaire le test, il est préconisé de réaliser de nouvelles analyses au sein des élevages où le pourcentage d'inhibition du lait de tank est compris entre 65 et 70%, fenêtre pour laquelle persiste une légère incertitude. La FODSA a d'ores et déjà pris en charge ces prélèvements.

Le choix du seuil de décision opérationnel dépend des objectifs en termes de sensibilité et de spécificité, conditionnant la gestion des faux positifs ou des faux négatifs. En maximisant la sensibilité au détriment de la spécificité, le nombre de faux positifs augmente. En pratique, la pénalisation des élevages faussement positifs représenterait un coût non négligeable, d'un point de vue économique et logistique. A l'inverse la maximisation de la spécificité se ferait au détriment de la sensibilité, avec un nombre de faux négatifs plus important. Le risque épidémiologique représenté par ces élevages faussement négatifs pourrait être supérieur à celui des faux positifs, tout du moins pour les ateliers d'engraissement introduisant des agneaux issus de ces élevages. Il appartient au gestionnaire du risque, ici la FODSA, d'évaluer le rapport coût/bénéfice des deux options, en fonction des coûts engendrés par les faux positifs et les faux négatifs.

CONCLUSION

L'utilisation d'un test ELISA Ac p80 compétition sur lait de tank constitue une approche novatrice de la stratégie de lutte contre la circulation du virus BDV dans les élevages ovins laitiers. Dans un contexte de recrudescence de Border Disease en Aveyron, l'ensemble des acteurs de la filière est très favorable à la mise en œuvre d'un tel programme, dans le cadre d'un plan de maîtrise collective. Les enjeux de l'utilisation en routine de ce test sont multiples : il offrirait la possibilité de contrôles fréquents à coût modéré et de mise en œuvre aisée. Il permettrait également de s'affranchir des contrôles sérologiques, seul outil utilisé classiquement pour la connaissance du statut des animaux mais non adapté au système de production ovin car réalisé une fois par an au cours de la prophylaxie, c'est-à-dire plusieurs mois avant la vente des agneaux d'engraissement.

Ce travail a tenté de montrer, au travers des données collectées dans des troupeaux ovins laitiers de l'Aveyron, que le statut sérologique en BDV reflété par l'analyse du lait de tank est représentatif de la séroprévalence réelle dans le troupeau. Par surcroît, il paraissait intéressant d'évaluer, à partir des données de cette étude, l'information fournie par le système d'épidémiosurveillance actuellement mis en place dans ce département, basé sur la réalisation d'analyses sérologiques sur petits mélanges.

Les résultats obtenus suggèrent que le test sur le lait de grand mélange constitue une alternative fiable à la sérologie. Les performances intrinsèques apparaissent très satisfaisantes voire exceptionnelles pour un outil utilisable à grande échelle et à moindre coût. Il apparaît par ailleurs que l'information fournie par la réalisation d'analyses sérologiques sur petits mélanges permet de garantir avec une certitude élevée l'absence de circulation virale mais souffre d'une grande imprécision quant à la détermination du niveau de séroprévalence.

Des analyses complémentaires, d'ores et déjà entreprises par la FODSA et l'UMT « Santé des troupeaux de Petits Ruminants », devraient permettre d'affiner les résultats et de les valider à plus grande échelle afin d'approuver à terme l'utilisation de ce test en routine.

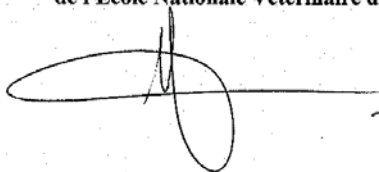
De par l'historique de l'apparition de la maladie en France et la mise au point de ce protocole, l'Aveyron est en quelque sorte le laboratoire de surveillance et de maîtrise de la Border Disease.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

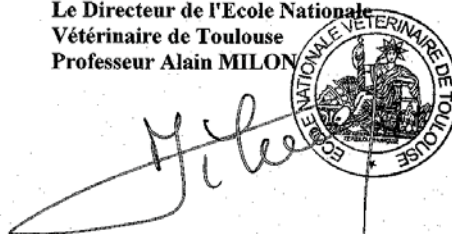
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Fabien CORBIERE, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **BERNARDIN Elise** intitulée « *Utilisation du lait de tank pour l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau vis-à-vis de la Border Disease en élevage ovin lait : une étude pratique en Aveyron.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

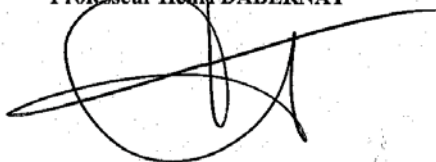
Fait à Toulouse, le 9 Novembre 2011
Docteur Fabien CORBIERE
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Henri DABERNAT



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

BIBLIOGRAPHIE

- Beaudeau, F., Assie, S., Seegers, H., Belloc, C., Sellal, E. & Joly, A. (2001a).** Assessing the within-herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk. *Vet Rec* **149**, 236-240.
- Beaudeau, F., Belloc, C., Seegers, H., Assie, S., Pourquier, P. & Joly, A. (2001b).** Informative value of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in milk. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **48**, 705-712.
- Beaudeau, F., Belloc, C., Seegers, H., Assie, S., Sellal, E. & Joly, A. (2001c).** Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. *Vet Microbiol* **80**, 329-337.
- Brock, K. V. (1995).** Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **11**, 549-561.
- Brock, K. V., Grooms, D. L., Ridpath, J. & Bolin, S. R. (1998).** Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* **10**, 22-26.
- Brownlie, J., Clarke, M. C. & Howard, C. J. (1989).** Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res Vet Sci* **46**, 307-311.
- Brownlie, J., Clarke, M. C., Howard, C. J. & Pocock, D. H. (1987).** Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann Rech Vet* **18**, 157-166.
- Cabezon, O., Rosell, R., Velarde, R., Mentaberre, G., Casas-Diaz, E., Lavin, S. & Marco, I.** Border disease virus shedding and detection in naturally infected Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*). *J Vet Diagn Invest* **22**, 744-747.

- Carlsson, U. (1991).** Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec* **128**, 145-147.
- Chappuis, G., Brun, A., Kato, F., Dauvergne, M., Reynaud, G. & Duret, C. (1986).** Etudes sérologiques et immunologiques réalisées à la suite de l'isolement d'un pestivirus dans un foyer ovina chez des moutons de l'Aveyron. *Pestiviroses des Ovins et des Bovins, Ste Française de Buiatrie, Paris, France*, **55-66**.
- Chu, H. J., Sawyer, M. M., Anderson, C. A., Higgins, R. J. & Zee, Y. C. (1987).** Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in sera from border disease virus-infected sheep. *Can J Vet Res* **51**, 281-283.
- Collett, M. S., Anderson, D. K. & Retzel, E. (1988).** Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J Gen Virol* **69 (Pt 10)**, 2637-2643.
- Domingo, E., Martinez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortin, J., Lopez-Galindez, C., Perez-Brena, P., Villanueva, N., Najera, R. & et al. (1985).** The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* **40**, 1-8.
- Edwards, S., Wood, L., Brockman, S. & Ibata, G. (1991).** Clinical and virological observations of a mucosal disease outbreak with persistently-infected seropositive survivors. *Arch Virol Suppl* **3**, 125-132.
- Entrican, G., Dand, A. & Nettleton, P. F. (1994).** A double monoclonal-antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet Microbiol* **43**, 65-74.
- Frolich, K., Jung, S., Ludwig, A., Lieckfeldt, D., Gibert, P., Gauthier, D. & Hars, J. (2005).** Detection of a newly described pestivirus of Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in France. *J Wildl Dis* **41**, 606-610.

- Garcia-Perez, A. L., Ruiz-Fons, F., Barandika, J. F., Aduriz, G., Juste, R. A. & Hurtado, A. (2010).** Border disease virus seroprevalence correlates to antibodies in bulk-tank milk and reproductive performance of dairy sheep flocks. *J Dairy Sci* **93**, 2444-2449.
- Gardiner, A. C. & Barlow, R. M. (1972).** Experiments in border disease. 3. Some epidemiological considerations with reference to the experimental disease. *J Comp Pathol* **82**, 29-35.
- Gardiner, A. C., Barlow, R. M., Rennie, J. C. & Keir, W. A. (1972).** Experiments in border disease. V. Preliminary investigations on the nature of the agent. *J Comp Pathol* **82**, 159-161.
- Hamers, C., Couvreur, B., Dehan, P., Letellier, C., Lewalle, P., Pastoret, P. P. & Kerkhofs, P. (2000).** Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea viral strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Vet J* **160**, 250-258.
- Howard, C. J., Clarke, M. C. & Brownlie, J. (1985).** An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera. *Vet Microbiol* **10**, 359-369.
- Kwang, J., Bolin, S. R. & Littledike, E. T. (1995).** Bovine viral diarrhoea serologic diagnostic reagents prepared from bacterially expressed recombinant proteins. *J Vet Diagn Invest* **7**, 143-145.
- Lindberg, A. L. & Alenius, S. (1999).** Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol* **64**, 197-222.
- Liu, L., Xia, H., Wahlberg, N., Belak, S. & Baule, C. (2009).** Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology* **385**, 351-357.
- Loken, T., Krogsrud, J. & Bjerkas, I. (1991).** Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J Comp Pathol* **104**, 195-209.

- Moening, V. (1990).** Pestiviruses: a review. *Vet Microbiol* **23**, 35-54.
- Mollet, P. (1992).** Enquête épidémiologique sur la Border Disease caprine en Poitou-Charentes. *Th Med Vét : Nantes*, **111**.
- Nettleton, P. F. (1990).** Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech* **9**, 131-150.
- Oguzoglu, T. C., Floegel-Niesmann, G., Frey, H. R. & Moening, V. (2001).** [Differential diagnosis of classical swine fever and border disease: seroepidemiological investigation of a pestivirus infection on a mixed sheep and swine farm]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **108**, 210-213.
- Sawyer, M. M., Schore, C. E., Menzies, P. I. & Osburn, B. I. (1986).** Border disease in a flock of sheep: epidemiologic, laboratory, and clinical findings. *J Am Vet Med Assoc* **189**, 61-65.
- Schelcher, F., Valarcher, J. F., Navetat, H. & Espinasse, J. (1993).** Aspect clinique de l'infection des bovins par le virus de la maladie des muqueuses. *Bulletin des GTV* **4**, 23-29.
- Sellal, E. (2003a).** Détection du BVD dans les élevages bovins. PCR en temps réel pour le contrôle du BVD. *Point vét* **237**, 36-37.
- Sellal, E. (2003b).** Lutte contre la maladie des muqueuses chez les bovins. Une méthode pour dépister la BDV, même chez les veaux. *Point vét* **34 (236)**, 12-13.
- Stober, M. (1990).** Aspects cliniques de la maladie des muqueuses (BVD-MD). *Bull Mens Soc Vet Prat France* **74**, 257-267.
- Terpstra, C. (1981).** Border disease: virus persistence, antibody response and transmission studies. *Res Vet Sci* **30**, 185-191.

- Thabti, F., Fronzaroli, L., Dlissi, E., Guibert, J. M., Hammami, S., Pepin, M. & Russo, P. (2002).** Experimental model of Border Disease Virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet Res* **33**, 35-45.
- Vaast, R. R. (1986).** Les perstiviroses des ovins en Aveyron (1984-1986). *Pestiviroses des Ovins et des Bovins, Ste Française de Buiatrie, Paris, France* **27**, 23-31.
- Valle, P. S., Wayne Martin, S. & Skjerve, E. (2001).** A Bayesian approach to estimating the performance of a bovine virus diarrhoea virus (BVDV) antibody ELISA bulk-tank milk test. *Prev Vet Med* **50**, 71-87.
- Vantsis, J. T., Barlow, R. M., Gardiner, A. C. & Linklater, K. A. (1980).** The effects of challenge with homologous and heterologous strains of Border disease virus on ewes with previous experience of the disease. *J Comp Pathol* **90**, 39-45.
- Vilcek, S. & Nettleton, P. F. (2006).** Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol* **116**, 1-12.
- Vilcek, S., Nettleton, P. F., Paton, D. J. & Belak, S. (1997).** Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J Gen Virol* **78 (Pt 4)**, 725-735.
- Ward, G. M. (1971).** Experimental infection of pregnant sheep with bovine viral diarrhoea-mucosa disease virus. *Cornell Vet* **61**, 179-191.
- Zaghawa, A. (1998).** Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. *Zentralbl Veterinarmed B* **45**, 345-351.
- Zimmer, G. M., Van Maanen, C., De Goey, I., Brinkhof, J. & Wentink, G. H. (2004).** The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples. *Vet Microbiol* **100**, 145-149.

ANNEXES

Annexe 1 : Densité de probabilité de la prévalence attendue en fonction du nombre de petits mélanges sérums positif en ELISA Ac p80. Les combinaisons pour laquelle la probabilité est inférieure à 1% ne sont pas présentées.

Nombre de mélanges positifs/ 9	X = Nombre d'individus positifs sur 45	Probabilité que le nombre d'individus positifs =X	Prévalence observée	95% CI inf	95 % CI sup
1	1	91.66	2.2	0.00	7.87
1	2	7.70	4.4	0.06	11.77
1	3	0.64	6.7	0.54	15.15
2	2	75.95	4.4	0.06	11.77
2	3	20.90	6.7	0.54	15.15
2	4	2.57	8.9	1.40	18.27
2	5	0.58	11.1	2.48	21.22
3	3	54.13	6.7	0.54	15.15
3	4	30.09	8.9	1.40	18.27
3	5	10.88	11.1	2.48	21.22
3	6	4.02	13.3	3.71	24.05
3	7	0.66	15.6	5.05	26.79
3	8	0.22	17.8	6.49	29.46
4	4	35.46	8.9	1.40	18.27
4	5	32.02	11.1	2.48	21.22
4	6	17.76	13.3	3.71	24.05
4	7	9.04	15.6	5.05	26.79
4	8	3.63	17.8	6.49	29.46
4	9	1.27	20.0	8.00	32.05
4	10	0.57	22.2	9.58	34.60
4	11	0.25	24.4	11.20	37.09
5	5	17.64	11.1	2.48	21.22
5	6	25.92	13.3	3.71	24.05
5	7	23.33	15.6	5.05	26.79
5	8	15.11	17.8	6.49	29.46
5	9	9.42	20.0	8.00	32.05
5	10	4.86	22.2	9.58	34.60
5	11	2.12	24.4	11.20	37.09
5	12	0.78	26.7	12.88	39.54
5	13	0.57	28.9	14.60	41.94
5	14	0.21	31.1	16.37	44.31
5	15	0.05	33.3	18.17	46.65

Nombre de mélanges positifs/ 9	X = Nombre d'individus positifs sur 45	Probabilité que le nombre d'individus positifs =X	Prévalence observée	95% CI inf	95 % CI sup
6	6	6.90	13.3	3.71	24.05
6	7	14.30	15.6	5.05	26.79
6	8	18.94	17.8	6.49	29.46
6	9	17.47	20.0	8.00	32.05
6	10	15.13	22.2	9.58	34.60
6	11	10.08	24.4	11.20	37.09
6	12	7.53	26.7	12.88	39.54
6	13	3.72	28.9	14.60	41.94
6	14	3.22	31.1	16.37	44.31
6	15	1.42	33.3	18.17	46.65
6	16	0.46	35.6	20.00	48.95
6	17	0.46	37.8	21.87	51.22
6	18	0.13	40.0	23.77	53.46
6	19	0.13	42.2	25.70	55.67
6	20	0.08	44.4	27.66	57.85
6	21	0.04	46.7	29.64	60.00
7	7	1.74	15.6	5.05	26.79
7	8	5.74	17.8	6.49	29.46
7	9	9.22	20.0	8.00	32.05
7	10	12.11	22.2	9.58	34.60
7	11	14.03	24.4	11.20	37.09
7	12	12.11	26.7	12.88	39.54
7	13	11.89	28.9	14.60	41.94
7	14	9.10	31.1	16.37	44.31
7	15	7.20	33.3	18.17	46.65
7	16	5.65	35.6	20.00	48.95
7	17	3.66	37.8	21.87	51.22
7	18	2.86	40.0	23.77	53.46
7	19	1.83	42.2	25.70	55.67
7	20	1.37	44.4	27.66	57.85
7	21	0.62	46.7	29.64	60.00
7	22	0.34	48.9	31.66	62.13
7	23	0.25	51.1	33.70	64.23
7	24	0.16	53.3	35.77	66.30
7	25	0.09	55.6	37.87	68.34
7	26	0.03	57.8	40.00	70.36

Nombre de mélanges positifs/ 9	X = Nombre d'individus positifs sur 45	Probabilité que le nombre d'individus positifs =X	Prévalence observée	95% CI inf	95 % CI sup
8	8	0.19	17.8	6.49	29.46
8	9	1.46	20.0	8.00	32.05
8	10	2.54	22.2	9.58	34.60
8	11	4.20	24.4	11.20	37.09
8	12	6.33	26.7	12.88	39.54
8	13	7.49	28.9	14.60	41.94
8	14	8.44	31.1	16.37	44.31
8	15	8.97	33.3	18.17	46.65
8	16	8.85	35.6	20.00	48.95
8	17	8.70	37.8	21.87	51.22
8	18	7.98	40.0	23.77	53.46
8	19	6.55	42.2	25.70	55.67
8	20	5.74	44.4	27.66	57.85
8	21	5.57	46.7	29.64	60.00
8	22	4.37	48.9	31.66	62.13
8	23	3.59	51.1	33.70	64.23
8	24	2.28	53.3	35.77	66.30
8	25	1.83	55.6	37.87	68.34
8	26	1.31	57.8	40.00	70.36
8	27	1.11	60.0	42.15	72.34
8	28	0.83	62.2	44.33	74.30
8	29	0.70	64.4	46.54	76.23
8	30	0.44	66.7	48.78	78.13
8	31	0.22	68.9	51.05	80.00
8	32	0.09	71.1	53.35	81.83
8	33	0.09	73.3	55.69	83.63
8	34	0.04	75.6	58.06	85.40
8	35	0.06	77.8	60.46	87.12
8	36	0.04	80.0	62.91	88.80
9	9	0.01	20.0	8.00	32.05
9	10	0.03	22.2	9.58	34.60
9	11	0.13	24.4	11.20	37.09
9	12	0.27	26.7	12.88	39.54
9	13	0.42	28.9	14.60	41.94
9	14	0.63	31.1	16.37	44.31
9	15	0.92	33.3	18.17	46.65
9	16	1.23	35.6	20.00	48.95
9	17	1.50	37.8	21.87	51.22
9	18	1.77	40.0	23.77	53.46
9	19	2.18	42.2	25.70	55.67

Nombre de mélanges positifs/ 9	X = Nombre d'individus positifs sur 45	Probabilité que le nombre d'individus positifs =X	Prévalence observée	95% CI inf	95 % CI sup
9	20	2.40	44.4	27.66	57.85
9	21	2.53	46.7	29.64	60.00
9	22	2.81	48.9	31.66	62.13
9	23	2.98	51.1	33.70	64.23
9	24	3.25	53.3	35.77	66.30
9	25	3.35	55.6	37.87	68.34
9	26	3.46	57.8	40.00	70.36
9	27	3.51	60.0	42.15	72.34
9	28	3.56	62.2	44.33	74.30
9	29	3.59	64.4	46.54	76.23
9	30	3.64	66.7	48.78	78.13
9	31	3.68	68.9	51.05	80.00
9	32	3.71	71.1	53.35	81.83
9	33	3.71	73.3	55.69	83.63
9	34	3.72	75.6	58.06	85.40
9	35	3.72	77.8	60.46	87.12
9	36	3.72	80.0	62.91	88.80
9	37	3.73	82.2	65.40	90.42
9	38	3.73	84.4	67.95	92.00
9	39	3.73	86.7	70.54	93.51
9	40	3.73	88.9	73.21	94.95
9	41	3.73	91.1	75.95	96.29
9	42	3.73	93.3	78.78	97.52
9	43	3.73	95.6	81.73	98.60
9	44	3.73	97.8	84.85	99.46
9	45	3.73	100.0	88.23	99.94

Annexe 2 : Densité de probabilité du nombre de petits mélanges de sérums positifs en fonction de la prévalence

Prévalence	Nombre de mélanges positifs									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1%	63.67	29.35	6.17	0.77	0.04	0	0	0	0	0
	55.4	29.68	9.03	1.43	0.09	0	0	0	0	0
2%	40.84	37.73	16.7	4.01	0.64	0.08	0	0	0	0
	35.54	38.15	24.43	7.46	1.38	0.18	0	0	0	0
5%	9.52	26.24	29.75	21.39	9.77	2.8	0.48	0.05	0	0
	8.28	26.53	43.53	39.8	21.11	6.24	0.91	0.07	0	0
10%	0.89	5.49	15.01	24.24	25.15	18.05	8.56	2.08	0.49	0.04
	0.77	5.55	21.96	45.11	54.34	40.24	16.27	2.99	0.42	0.01
20%	0	0.08	0.7	3.17	9.75	19.59	27.87	23.84	12.23	2.77
	0	0.08	1.02	5.9	21.07	43.67	52.98	34.21	10.5	0.52
30%	0	0	0.02	0.15	0.89	4	13.09	28.02	33.88	19.95
	0	0	0.03	0.28	1.92	8.92	24.89	40.21	29.08	3.73
40%	0	0	0	0.01	0.04	0.33	2.34	12.03	36.97	48.28
	0	0	0	0.02	0.09	0.74	4.45	17.26	31.74	9.04
50%	0	0	0	0	0	0.01	0.26	3.21	21.78	74.74
	0	0	0	0	0	0.02	0.49	4.61	18.7	13.99
60%	0	0	0	0	0	0	0	0.44	8.89	90.67
	0	0	0	0	0	0	0	0.63	7.63	16.97
70%	0	0	0	0	0	0	0	0.01	1.96	98.03
	0	0	0	0	0	0	0	0.01	1.68	18.35
80%	0	0	0	0	0	0	0	0	0.28	99.72
	0	0	0	0	0	0	0	0	0.24	18.67
90%	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	99.99
	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	18.72

- Pour chaque prévalence, la densité de probabilité du nombre de petits mélanges de sérums positifs est fournie par la première ligne.
- Pour chaque nombre de petits mélanges de sérums positifs, la densité de probabilité de la prévalence est fournie par la deuxième ligne.