

Expérimentation en vue d'attribuer l'appellation "Bovin non IPI" à des jeunes veaux à partir d'un prélèvements de cartilage auriculaire pour la maîtrise régionale de l'infection par le BVDV

JOLY A. (1,2), SEEGER H. (1), LOUARN G. (2), LE DREAN E. (3), FOURICHON C. (1)

(1) Unité Mixte BioEpAR 1300, Oniris, INRA, LUNAM, 44307, Nantes cedex 3, France

(2) Union Bretonne des Groupements de Défense Sanitaire, 56003, Vannes, France

(3) Institut en Santé et Agro-Environnement, 35000, Rennes, France

RESUME

En Bretagne, le plan de maîtrise collective de l'infection des bovins par le BVDV (Bovine Viral Diarrhoea Virus) concerne tous les cheptels. Un des piliers de ce plan de maîtrise consiste à proposer des appellations non IPI (infecté permanent immunotolérant) pour tous les bovins commercialisés pour la reproduction. L'objectif de cette étude était de tester la faisabilité et les performances d'une méthode basée sur le prélèvement par l'éleveur de cartilage auriculaire pour la recherche de l'ARN viral par RT-PCR. Dans un total de 62 exploitations, 968 veaux ont été prélevés dès la naissance lors de l'identification officielle et analysés. Parmi eux, 955 ont été garantis non IPI, dans un délai moyen de presque 10 jours suivant le prélèvement, pour la grande majorité d'entre eux. Ce délai est compatible avec les exigences de commercialisation qui se fait le plus souvent vers 3 semaines d'âge ou plus tard. Les animaux positifs ont été suivis et re-prélevés de façon à vérifier si le résultat correspondait bien au phénotype d'IPI ou de virémie transitoire. Les animaux garantis non IPI sont inclus dans un suivi régional permanent destiné à repérer d'éventuels IPI que la méthode initiale n'aurait pas détectés. L'ensemble du dispositif, caractérisé par une remarquable traçabilité, a été jugé satisfaisant et convainquant par les acteurs qui en ont d'ores et déjà décidé la généralisation.

Field-experiment to assign the "non-PI" status to young calves from an ear cartilage sample for regional control of the infection by BVDV

JOLY A. (1,2), SEEGER H. (1), LOUARN G. (2), LE DREAN E. (3), FOURICHON C. (1)

(1) Unité Mixte BioEpAR 1300, Oniris, INRA, 44300, Nantes, France

SUMMARY

In Brittany, the BVDV-infection control scheme concerns all cattle herds. One of the pillars of this control scheme consists in attesting that all animals are not PI (permanently infected) in case of trade for breeding. The aim of this study was to test the feasibility and the performances of a method based on sampling by the farmers of ear cartilage which were tested for viral RNA research by RT-PCR. In 62 herds, 968 calves were sampled after birth concomitantly to the official identification and tested. Out of them, 955 were guaranteed not PI, after an average time-interval of almost 10 days following the sampling for most of them. This time-interval was compatible with the requirements of live-animal trade, which occurs mostly at about 3 weeks of age or later. The positive animals were re-sampled to verify if their result corresponded to the PI or the transiently infected status. The non-PI animals were included in the regional follow-up scheme intended to detect possible PI that were not detected by the initial method. The whole protocol, characterized by a remarkable traceability, was considered satisfactory and convincing by the actors who have already decided on its generalization.

INTRODUCTION

En Bretagne, un plan de maîtrise collective de la BVD a été mis en place en 2000. Basé sur la détection des cheptels infectés et sur la mise en place de mesures visant à détecter et à éliminer les animaux infectés permanents immunotolérants (IPI), ce plan s'appuie également sur la mise en place de mesures de biosécurité. Ces dernières concernent toutes les introductions d'animaux, pour lesquels sont exigés soit des tests individuels au moment de l'introduction, soit l'obtention d'une appellation bovin non IPI, acquise avant la transaction par des tests (individuels ou de mélange) ou par des critères épidémiologiques. Le principal maillon faible dans ce dispositif concerne, d'une part, les jeunes veaux laitiers sur lesquels la réalisation de prélèvements sanguins par le vétérinaire et d'analyses individuelles est à la fois couteuse et peu opérationnelle, ainsi que, d'autre part, les brouards pour lesquels le délai entre l'allotement et la commercialisation ne permet pas de réaliser les prélèvements et tests nécessaires. L'objectif général de cette étude était de tester la faisabilité et les performances

d'une méthode innovante basée sur des prélèvements de cartilage auriculaire réalisés par l'éleveur dès la naissance sur les jeunes veaux. Une recherche du virus BVDV est effectuée par RT-PCR sur ce prélèvement et un résultat négatif permet de délivrer l'appellation "bovin non IPI".

Dans le détail, l'étude avait pour objet d'évaluer la faisabilité de cette méthode en condition de terrain, à la fois sur les aspects d'organisation des prélèvements, de compatibilité des délais avec les contraintes opérationnelles de commercialisation des veaux (les femelles laitières destinées à la reproduction sont vendues à l'âge de 3 semaines en moyenne), et de valeur prédictive des résultats. La perspective visée était, après avoir testé la méthode, de pouvoir la proposer et l'étendre, en grande nature, à tous les éleveurs susceptibles de commercialiser des jeunes veaux pour la reproduction ou des brouards. A terme, il s'agissait également d'apporter des données observationnelles de terrain pour pouvoir proposer ce critère à l'Association de Certification pour la Santé Animale (ACERSA).

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. NATURE ET ORGANISATION DES PRELEVEMENTS

La première étape consiste à réaliser un prélèvement de cartilage auriculaire, si possible dès la naissance du veau. Le prélèvement de cartilage auriculaire est réalisé par l'éleveur lui-même. Lors de la pose de la boucle d'identification officielle, à l'aide d'une pince spéciale, l'éleveur pose aussi un bouton spécifique, préalablement identifié aux coordonnées officielles du veau. Le cartilage et les tissus percés sont recueillis instantanément dans un tube spécial, contenant un asséchant. Le tube est ensuite serti de façon définitive et inviolable. Le prélèvement est alors expédié par voie postale au laboratoire dans une enveloppe matelassée, préaffranchie et munie d'une prescription d'analyse. Les données d'identification (numéro de cheptel naisseur, date de naissance, sexe, race) relatives au veau sont recueillies dans le circuit classique de l'identification.

Une séance de formation des éleveurs a été organisée, conjointement par les agents des Groupements de Défense Sanitaire (GDS), par un représentant de la société (Société Allflex) commercialisant le matériel de prélèvement et par un représentant du laboratoire réalisant les analyses (ISAE Rennes).

L'échantillon de test retenu correspondait à un profil de vendeurs réguliers de jeunes veaux pour la reproduction et à un profil d'élevages infectés par le BVDV. En outre, les 2 systèmes de production (laitier et allaitant) devaient être représentés. L'objectif initial était d'analyser 1000 veaux.

1.2. ANALYSES

La méthode testée présente la particularité d'être utilisable sur des veaux porteurs d'anticorps colostraux. En effet, les tissus cartilagineux ne contenant pas d'anticorps, la recherche du BVDV ou de son ARN n'est pas altérée par leur présence, contrairement à ce qui se passe sur d'autres matrices de prélèvement. Le choix de la PCR a été motivé par la meilleure sensibilité de la technique par rapport à la recherche d'antigène.

Les prélèvements ont été expédiés à un seul laboratoire départemental d'analyse (ISAE Rennes). A réception, ils ont été dessertis et les prélèvements de cartilage ont été recueillis dans leur intégralité. Ils ont alors été soumis à une recherche d'ARN viral par RT-PCR, à l'aide des 2 techniques commercialisées en France : AdiaVet®BVD REALTIME (ADIAGENE) et Kit TaqVet™BVDV « Screening » (LSI), selon les protocoles du fabricant. Après un stockage à < -16°C pendant une durée maximum d'une semaine, l'extraction de l'ARN a été réalisée par méthode manuelle sur plaque à l'aide du kit Nucléospin 96 Virus (MACHEREY NAGEL) sur tous les prélèvements individuels ; les extraits ont ensuite été poolés par 10 maximum et soumis à RT-PCR de mélange sur thermocycleur Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies). Les 2 étapes de la PCR ont été réalisées dans la continuité. En cas de résultat positif, les extraits individuels, stockés à < -16°C, ont été repris dans un délai maximum d'une semaine pour des RT-PCR individuelles selon les mêmes protocoles.

Les résultats qualitatifs (Pos/Neg) étaient transmis à l'éleveur et au GDS qui disposait en outre des résultats quantitatifs (valeur du Ct)

1.3. SUIVI DES ANIMAUX

Les animaux présentant un résultat négatif à la recherche de d'ARN viral sont directement inscrits dans le fichier régional des animaux garantis non IPI. Ils sont soumis, comme tous les animaux qui y sont inscrits à partir d'autres critères, à une procédure de contrôle des anomalies, procédure élaborée par les GDS de Bretagne et validée par l'ACERSA.

Les animaux présentant un résultat positif sont soumis à un second prélèvement pour une nouvelle recherche d'ARN viral, distant du premier d'environ 3 semaines, destiné à différencier les IPI des virémiques transitoires. Les IPI sont éliminés, alors que les animaux qui se sont négativés au second prélèvement sont considérés comme ayant été des virémiques transitoires (lors du premier prélèvement) et sont donc également inscrits dans le fichier des animaux garantis.

2. RESULTATS

2.1. NATURE DES PRELEVEMENTS ET DELAIS D'ACHEMINEMENT

2.1.1. Effectifs

Au total, 62 éleveurs ont participé à cette étude entre Juin et Décembre 2010. Ils ont prélevé 975 veaux dont 968 disposant d'un prélèvement utilisable pour analyse.

Plus de la moitié des animaux ont été prélevés dans la première semaine de vie. Les animaux prélevés plus tardivement l'ont été en tout début d'étude (lors de la première série de prélèvements, au cours de laquelle les éleveurs laitiers ont intégré tous les veaux susceptibles d'être commercialisés à 3 semaines et les éleveurs allaitants des veaux de moins de 3 mois, dont la commercialisation était prévue au moment du sevrage). En fin d'étude, l'immense majorité des veaux a été prélevée dans les 2 premiers jours de vie, c'est à dire au moment de l'identification officielle.

2.1.2. Délais

Le délai moyen entre le prélèvement et la réception au laboratoire était de 2,4 jours en intégrant compris les jours fériés (Tableau 1). Le délai prélèvement/analyse était en moyenne de presque 10 jours. Le GDS a été destinataire des résultats en général le jour même.

Pour les prélèvements dont le résultat s'est avéré positif, le délai moyen a été augmenté d'environ 8 jours, y compris pour les prélèvements négatifs appartenant à un mélange initialement positif. Ce délai supplémentaire est du au fait qu'une seule série d'analyse hebdomadaire était réalisée par le laboratoire.

Tableau 1 Délais observés dans les différentes étapes (j)

Critère	Prélèvement/ Réception au laboratoire	Prélèvement/ Analyse 1	Prélèvement/ Analyse 2
Moyenne	2,4	9,7	18,0
Ecart type	2,2	5,4	5,0
Nombre de veaux	975	968	129

2.2. RESULTATS DES ANALYSES

2.2.1. Analyses initiales

Au total, 101 mélanges ont été constitués, soit en moyenne 9,58 animaux par mélange.

Dans les faits, 86 mélanges contenaient 10 prélèvements. La taille des autres mélanges dépendait du nombre de prélèvements résiduels, car l'objectif était d'analyser lors de la manipulation hebdomadaire tous les prélèvements reçus depuis la manipulation précédente. 88 mélanges se sont avérés négatifs, permettant de garantir non IPI les 839 animaux constitutifs. A l'inverse, 13 mélanges se sont avérés positifs.

Les 129 prélèvements individuels constitutifs ont été repris en analyse individuelle. 110 d'entre eux se sont avérés négatifs, ce qui a permis de garantir non IPI, en seconde intention, 110 animaux supplémentaires alors que 19 se sont avérés positifs (tableau 2).

Tableau 2 Résultats des analyses selon le type d'échantillon analysé

Critère	Mélanges positifs	Mélange négatifs
Nombre de mélanges	13	88
Nombre de bovins correspondant aux mélanges	129	839
Nombre de bovins positifs	19	Sans objet

3.2.2. Suivi des positifs

Les 19 animaux positifs à l'analyse étaient répartis dans 9 cheptels (5 cheptels avec 1 bovin positif, 1 avec 2 bovins positifs, 2 avec 3 et 1 avec 6 positifs). 13 d'entre eux ont pu être re-prélevés en moyenne 33 jours plus tard. Le prélèvement réalisé était un prélèvement sanguin sur lequel une RT-PCR individuelle a été mise en œuvre. Les 6 animaux non prélevés étaient soit morts avant le second prélèvement, soit abattus dès connaissance du premier résultat en raison de leur état clinique (animaux maigres, diarrhéiques ou malformés) suggérant qu'ils étaient IPI. Parmi les 13 animaux re-prélevés, 7 se sont avérés positifs et ont été qualifiés de IPI alors que les 6 autres se sont avérés négatifs.

Une analyse des résultats quantitatifs de la RT-PCR a également été effectuée (tableau 3). Il est intéressant de constater que les 6 animaux négatifs au second prélèvement étaient ceux qui présentaient les Ct les plus élevés (et donc, a priori, la charge virale la plus faible lors du premier prélèvement) avec un Ct moyen de 33,99. A l'inverse, les 7 animaux confirmés IPI et les 6 suspects cliniquement présentaient lors du premier prélèvement les Ct les plus bas (en moyenne, respectivement 24,96 et 21,07). De plus, le Ct moyen lors du second contrôle (effectué sur le sang) est également bas (25,25).

Tableau 3 Suivi des 19 veaux positifs au premier prélèvement (P1) sur cartilage auriculaire et conclusion selon le résultat du second prélèvement (P2)

Critère	Second prélèvement		
	Résultat positif	Résultat négatif	Non Réalisé
Nombre	7	6	6
Ct moyen P1	24,96	33,99	21,07
Ct moyen P2	25,25	> 45	Sans objet
Conclusion	IPI certain	Virémique transitoire, garanti	IPI probable, non garanti

L'âge des veaux a également été pris en compte. Comme le montre le Tableau 4, les virémiques transitoires étaient plutôt des veaux âgés (4 sur 6 avaient plus de 1 mois) alors que les très jeunes veaux positifs (prélevés dans 2 les premiers jours de vie) étaient des IPI certains ou probables.

Tableau 4 Statut des veaux selon l'âge au premier prélèvement (P1)

Age à P1	IPI certains	IPI probables	Virémiques transitoires
< 3jrs	2	1	0
3 à 7 jrs	1	1	1
8 à 30 jrs	2	2	1
31 à 180 jrs	2	2	4

3. DISCUSSION

La première étape du dispositif a parfaitement bien fonctionné. Les points les plus critiques concernent l'adéquation entre les commandes de boucles destinées à l'identification officielle et celles des boutons destinés aux prélèvements. En effet, il est nécessaire d'anticiper de quelques mois pour réaliser les commandes. Si, pour les éleveurs allaitants, l'estimation du nombre de naissances et d'animaux susceptibles d'être commercialisés avec l'appellation est assez facile à réaliser, elle est plus délicate pour les laitiers qui ne sont intéressés que par la vente d'une petite partie des veaux femelles. Le fait d'apposer 3 boucles (une sur chaque oreille pour l'identification et le bouton de prélèvement) semble assez contraignant aux dires des éleveurs, en particulier allaitants. Il serait judicieux de pouvoir faire coïncider une des boucles officielles avec le tube de prélèvements, ce qui est techniquement possible, mais les délais nécessaires à l'agrément d'une telle boucle pour l'identification sont assez longs (>1 an).

La qualité des prélèvements est remarquable, puisque 99,3% des prélèvements ont pu être analysés. De plus, la traçabilité est parfaite puisque les boucles d'identification officielle et le bouton servant de support au prélèvement ont un code barre identique. De plus, dans l'hypothèse d'une erreur de l'éleveur qui attribuerait un mauvais bouton à un veau, cette erreur reste détectable bien après la réalisation de l'analyse.

Les délais naissance/prélèvement ont été trop longs au départ, mais s'expliquent par la nécessité de récupérer quelques veaux d'intérêt lorsque les boucles sont arrivées chez les éleveurs. En routine, cet inconvénient n'existera plus. Les délais prélèvement/résultat sont compatibles avec la demande, en particulier pour les allaitants. Toutefois, pour les veaux laitiers dont le prélèvement appartenait à un mélange positif, le délai observé (18 jours) s'est avéré trop long. Il pourrait être raccourci en cas de flux d'analyses plus important, ce qui permettrait de réaliser 2 séries d'analyses par semaine. En outre, un meilleur ciblage des élevages concernés permettrait de différencier deux circuits : celui des troupeaux à faible risque de détenir des IPI et celui à risque plus élevé, évalué par la connaissance des statuts d'élevage et/ou l'historique des résultats et pour lesquels le recours à l'analyse individuelle pourrait être envisagé d'emblée, la méthode ayant le double avantage de détecter les IPI très précocement par rapport aux modalités de dépistage classique et de garantir les non IPI immédiatement.

Les résultats des analyses sont conformes à ceux attendus. La fréquence observée de IPI (13 sur 968 soit 1,34%) est sans doute supérieure à la fréquence réelle. Ce niveau plus élevé est probablement dû au ciblage de quelques troupeaux récemment infectés, recrutés autant pour une détection précoce des IPI que pour l'obtention de garanties. Effectivement, 3 troupeaux détenaient à eux seuls plus de la moitié des positifs et des IPI.

La fréquence de virémiques transitoires (6/19) est plus importante que celle observée dans d'autres études, en particulier dans le plan d'éradication suisse. (Presi et Maret, 2010). Elle serait probablement diminuée si les prélèvements étaient réellement réalisés dans les 2 premiers jours de vie, délai ne permettant pas au veau qui serait contaminé dès la naissance d'avoir une virémie transitoire détectable.

Le kit d'analyse utilisé n'a pas eu d'influence sur le résultat final (détails non présentés). Les résultats présentés concernent le kit qui a permis de trouver le plus d'animaux positifs. Un seul veau n'a pas été trouvé positif par le second kit commercial, mais il s'agissait d'un veau qui s'est avéré être virémique transitoire. Tous les IPI certains et probables ont donc été trouvés par les 2 trousse de

réactifs. Compte tenu de l'objectif final (Appellation non IPI), les performances des 2 réactifs sont donc tout à fait superposables.

La taille des mélanges n'influence pas les résultats. Les animaux positifs ont tous été initialement détectés dans des mélanges de 10 (à l'exception d'un d'entre eux dans un mélange de 9). De plus, les Ct observés laissent entrevoir une marge de sécurité, les mélanges positifs ayant un Ct relativement bas, surtout s'ils détenaient un IPI.

Le suivi des animaux garantis est en cours mais les résultats ne sont pour l'instant pas disponibles. Le dispositif s'intègre dans une démarche globale visant à vérifier la qualité globale du système ainsi que celle de chacun des critères. Lorsqu'un animal dispose de l'appellation non IPI, il est intégré dans un fichier dans lequel sont renseignés le critère de l'appellation et la date d'obtention de celle-ci. Les critères sont validés par un groupe de travail piloté par l'ACERSA. Les critères expérimentaux (tels que celui de cette étude) sont tout d'abord validés a priori au regard des données bibliographiques et/ou observationnelles et soumis au même plan de contrôle que les critères officiels avant d'être validés définitivement. Le seuil retenu pour qu'un critère soit validé est de 1 pour 5000 : il est toléré que moins de 1 bovin sur 5000 soit garanti à tort. A titre d'exemple, 25 animaux ont été garantis à tort depuis 3 ans sur un total de 1 265 920 animaux garantis, soit 0,1 anomalie pour 5000, le critère le moins performant étant l'antigénémie à plus de 6 mois d'âge (0,6 anomalie pour 5000), les plus performants étant les critères épidémiologiques (de 0,03 à 0,1 anomalie pour 5000 selon les critères) (Joly *et al*, 2009). Il est donc prématuré de tirer des enseignements sur la qualité du critère « appellation par une analyse réalisée sur prélèvement de cartilage auriculaire » puisque moins de 1000 bovins sont concernés. A ce jour, aucune anomalie n'a été observée mais il faut un effectif de 15000 animaux sans détecter d'anomalies pour affirmer que la proportion d'anomalies est inférieure à 1 pour 5000 (au risque 95%).

La réalisation du prélèvement par l'éleveur n'est généralement pas admise dans les procédés de certification. Dans le cas présent, elle ne pose strictement aucun problème, puisque l'apposition d'un bouton de prélèvement permet de vérifier à tout moment la traçabilité. Le coût de l'opération est particulièrement séduisant : le coût global du prélèvement (comportant la fourniture du matériel de prélèvement et l'expédition du prélèvement lui-même) est de 3 euros par animal. Le coût de l'analyse est mutualisé à 9 euros par animal, y compris la réalisation si nécessaire d'analyses individuelles en cas de mélange positif. Le coût de l'acte de prélèvement proprement-dit est négligeable puisqu'il est fait par l'éleveur au moment de l'acte obligatoire d'identification. Le coût global est donc de

12 euros par animal, quel que soit le nombre de veaux concernés. A titre de comparaison, le coût d'une méthode traditionnelle (visite et prélèvement par le vétérinaire + analyse par PCR individuelle dans un cadre non organisé) peut atteindre 70 à 80 euros, selon le nombre de veaux simultanément concernés.

Parmi les points moins favorables, il faut noter que le prélèvement est intégralement utilisé pour la première extraction d'ARN. En cas de perte, il n'y a plus de support disponible pour une autre analyse, ce qui contraindrait l'éleveur à organiser un autre prélèvement. Nous n'avons pas eu à déplorer d'incident de ce genre.

CONCLUSION

Cette étude réalisée au deuxième semestre 2010 démontre l'intérêt d'une méthode basée sur le prélèvement de cartilage auriculaire par l'éleveur. Ce prélèvement est simple à réaliser et la traçabilité est remarquable. Les techniques d'analyses sont parfaitement adaptées à la matrice (cartilage) utilisée et les délais nécessaires sont totalement compatibles avec les impératifs liés aux âges de commercialisation. Concernant la maîtrise collective de la BVD, elle permet de combler un vide dans le dispositif existant par l'attribution de l'appellation "non-IPI" à une catégorie d'animaux à risque jusque là peu concernés, en raison de techniques à la fois couteuses et potentiellement défaillantes. En outre, en théorie au moins, la nature des prélèvements pourrait permettre d'envisager d'autres applications. Enfin, et ceci plus génériquement, de telles démarches de phénotypage appuyées sur la collecte de matériels biologiques par des prélèvements faciles et réalisables à grande échelle ouvrent des possibilités démultipliées pour la gestion de maladies ainsi que pour des études génomiques.

Les auteurs remercient particulièrement les éleveurs concernés pour leur implication quotidienne dans cette étude, l'Union Bretonne des Groupements de Défense Sanitaire pour le financement et l'implication des techniciens dans le recrutement et le suivi des élevages, et la Société Allflex pour ses idées et sa collaboration efficace dans la mise en place du circuit de prélèvements. Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'UMT Maîtrise de la Santé des Troupeaux Bovins.

Joly, A., Maurin, L., Seegers, H., Beaudeau, F., Fourichon, C., 2009. European Buiatrics Forum, Marseille, France, 165
Presi, P., Maret, C., 2010. Nouv. Prat. Elevages Santé, 4, 16, 45-51