

2m11.2593.9

Université de Montréal

Mise au point d'une technique ELISA pour le contrôle  
du BVDV à partir du lait du réservoir.

par

Younès Tahiri Alaoui

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie

Août, 1997

©Younès Tahiri Alaoui, 1997



SF  
607  
U54  
1998  
V.007

Université de Montréal

Mémoire en vue de l'obtention du B.A. en Économie  
du B.A. en Économie

par  
Yves-Fabrice Alou

Le programme de postgraduate en macroéconomie  
Faculté de l'éducation permanente

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise en Économie (M.É.)  
en Économie  
Spécialité: Économie

1998

Yves-Fabrice Alou, 1998



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Mise au point d'une technique ELISA pour le contrôle  
du BVDV à partir du lait du réservoir.

présenté par:

Younès Tahiri Alaoui

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Émile Bouchard, président du jury  
Youssef El Azhary, directeur de recherche  
Yvon Couture, codirecteur de recherche  
Khyali R. Mittal, membre du jury

Mémoire accepté le :.....12.03.1998.....

---

## SOMMAIRE

Un test ELISA indirect mettant en évidence, dans le lait et dans le sérum, les anticorps contre le BVDV a été élaboré.

Ce test a été évalué et validé. La sensibilité et la spécificité ont été confirmées par comparaison au test de référence de séroneutralisation (SN) dont le titre de référence est de 1:4.

La valeur de la sensibilité et de la spécificité de l'ELISA-sérum pour détecter des animaux ayant un titre d'anticorps supérieur ou égal à 1:4 à la SN est de 96%, pour une densité optique (DO) de 0.15. La valeur de la sensibilité et de la spécificité de l'ELISA-lait pour détecter des animaux ayant un titre d'anticorps supérieur ou égal à 1:4 à la SN est de 93%, pour une DO de 0.25.

L'influence des facteurs suivants sur l'ELISA-lait a été étudiée:

- le mode de conservation (réfrigération, congélation et température ambiante).
- la variation journalière de la DO dans le lait individuel et dans le lait de mélange (réservoir à lait).
- le quartier échantillonné au sein de la même vache.
- l'effet de la parturition.

Le test ELISA a été ensuite évalué et validé dans le lait de mélange de 12 troupeaux. Des prélèvements de 12 réservoirs à lait de 12 troupeaux de statuts vaccinaux différents, dont 3 sont non vaccinés, 4 vaccinés par un vaccin tué une fois par an et 5 vaccinés par un vaccin tué deux fois par an, sont effectués et analysés par le test ELISA. La DO d'un échantillon du réservoir est corrélée au pourcentage de vaches fortement positives (titrant à la SN 128 ou 256) à la SN sur chaque animal.

Une bonne relation entre la DO d'un échantillon du réservoir à lait de troupeaux de différents statuts vaccinaux et le pourcentage de vaches fortement positives à la SN a été observée.

Une vaccination a été établie sur un troupeau laitier séronégatif afin de suivre la séroconversion et la conversion dans le lait. Les résultats de cette expérience dans le lait individuel et pour le lait de mélange ont démontré que la vaccination avec un vaccin tué



n'est pas un facteur perturbateur du taux d'anticorps. Les réponses vaccinales, à ce type de vaccin, dans le lait individuel et dans le lait de mélange sont non significatives.

**Mots Clés:** ELISA, BVDV, Contrôle, réservoir à lait, Vaccination

---

## TABLE DES MATIÈRES

	page
IDENTIFICATION DU JURY .....	ii
SOMMAIRE .....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xii
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	2
I-LE VIRUS DE LA DIARRHÉE BOVINE ET SA TAXONOMIE.....	2
II-SYNDROME ET PATHOGÉNIE DES INFECTIONS CAUSÉES PAR LE VIRUS DU BVD.....	3
III-EPIDEMIOLOGIE.....	4
1-Source du BVDV dans les exploitations.....	4
2-Modes de transmission.....	5
IV-PROBLÈMES CAUSÉS PAR LE VIRUS DU BVD.....	6
V-DIAGNOSTIC.....	7
1-Méthodes qui détectent le virus ou l'antigène.....	7
2-Méthodes qui détectent l'anticorps .....	8
VI-CONTRÔLE ET LUTTE CONTRE L'INFECTION DU BVDV.....	10
1-Vaccination .....	10
2-L'élimination complète de l'infection des troupeaux.....	12

MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	15
I-DÉVELOPPEMENT D'UN TEST ELISA.....	15
1-Souches virales et cultures cellulaires.....	15
2-Préparation de l'antigène BVDV.....	16
3-Technique de l'ELISA indirecte pour la détection des anticorps contre le BVDV..	16
II-ÉVALUATION DE L'ÉPREUVE ELISA .....	17
1-Traitement des échantillons.....	17
2-Épreuve de séroneutralisation.....	18
3-Sensibilité et spécificité.....	18
4-Vérification de la variation journalière de la DO dans le lait individuel.....	19
5-Variation de la DO par quartier.....	19
6-Variation de la DO selon le mode de conservation.....	19
7-Dilution en laboratoire.....	19
8-Influence de la parturition sur le taux d'anticorps dans le lait individuel.....	20
III-VALIDATION DE L'ELISA DANS LE LAIT DE MÉLANGE.....	20
1-Sélection des troupeaux laitiers pour l'étude.....	20
2-Corrélation entre la DO du réservoir et le pourcentage de vaches séropositives...	20
3-Variation journalière de la DO dans le lait de mélange.....	20
IV-ESSAI VACCINAL DANS UN TROUPEAU LAITIER.....	21
V- ANALYSES STATISTIQUES.....	21
1-Corrélation de Pearson.....	21
2-Analyse de la régression linéaire.....	21
3-Analyse d'association.....	22
4-Test de $X^2$ .....	22
5-Test de t pairé.....	22
6-Analyse de covariance.....	22
RÉSULTATS.....	23
I-ÉVALUATION DE L'ÉPREUVE ELISA INDIRECTE.....	23
1-Sensibilité et spécificité.....	23
2-Vérification de la variation journalière de la DO dans le lait individuel.....	23
3-Variation de la DO par quartier.....	28

4-Variation de la DO selon le mode de conservation.....	28
5-Dilution en laboratoire.....	32
6-Influence de la parturition sur le taux d'anticorps dans le lait individuel.....	32
II-VALIDATION DE L'ÉPREUVE ELISA DANS LE LAIT DE MÉLANGE.....	36
1-Relation entre la DO du réservoir de lait et le pourcentage de vaches fortement positives à la séroneutralisation dans un troupeau.....	36
2-Vérification de la variation journalière de la DO dans le lait de mélange.....	36
III-ESSAI VACCINAL DANS UN TROUPEAU LAITIER.....	36
1-Essai vaccinal dans un troupeau laitier.....	36
DISCUSSION.....	42
I-CONTRAINTES ET POSSIBILITÉS D'AMÉLIORATION.....	45
CONCLUSION.....	47
BIBLIOGRAPHIE.....	48
ANNEXE.....	i

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.** Tableau de contingence de l'ELISA-sérum et de la séroneutralisation... 24

**Tableau 2.** Tableau de contingence de l'ELISA-lait et de la séroneutralisation..... 24

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Relation de la distribution de la DO de l'ELISA-sérum en fonction des titres de séroneutralisation pour 765 échantillons. La courbe de régression linéaire est illustrée ( $y= 1.099 x +0.15$ ,  $r^2=0.90$ ) ..... 25
- Figure 2.** Relation de la distribution de la DO de l'ELISA-lait en fonction du titre de la séroneutralisation pour 506 échantillons. La courbe de régression linéaire entre les 2 variables est illustrée ( $y=1.5 x + 0.5$ ,  $r^2=0.89$ )..... 26
- Figure 3.** Relation de la DO de l'ELISA-sérum en fonction de la DO de l'ELISA-lait pour 506 échantillons. La courbe de régression linéaire est illustrée ( $y= 1.1 x +0.3$ ,  $r^2 =0.56$ ) ..... 27
- Figure 4.** Représentation de la différence de DO du lait entre différentes combinaisons de prélèvements de lait (1: prélèvement du matin, 2: prélèvement du milieu de la journée, 3: prélèvement du soir) chez 5 vaches sur une période de 24 heures. La moyenne des différences est illustrée par le point. La boîte inclue la moyenne plus ou moins un écart-type. Les barres sortant de la boîte rejoignent le maximum et le minimum de la distribution..... 29
- Figure 5.** Représentation de la différence de DO du lait pour différentes combinaisons de quartiers (1: avant-gauche, 2: avant-droit, 3: arrière-gauche, 4: arrière-droit) chez 6 vaches. La moyenne des différences est illustrée par le point. La boîte inclue la moyenne plus ou moins un écart-type. Les barres sortant de la boîte rejoignent le maximum et le minimum de la distribution..... 30
- Figure 6.** Variation de la DO selon le mode de conservation (congélation, réfrigération, et température ambiante) durant les 24 premières heures après prélèvement.. 31
- Figure 7.** Variation de la DO du lait selon le mode de conservation (congélation, réfrigération, et température ambiante) durant les 280 premières heures après prélèvement..... 33

- Figure 8.** Variation de la DO dans le lait en fonction de la dilution en laboratoire pour trois échantillons de lait à DO initiales différentes (DO forte équivalente à 0.54, DO moyenne équivalente à 0.35, DO faible à 0.24)..... 34
- Figure 9.** Représentaion de la différence de DO du lait pour différentes combinaisons d'étapes du péri-partum (pr:pré-partum, pa:partum, po:post-partum) chez 6 vaches. La moyenne des différences est illustrée par le point. La boîte inclue la moyenne plus ou moins un écart-type. Les barres sortant de la boîte rejoignent le maximum et le minimum de la distribution..... 35
- Figure 10.** Relation entre le pourcentage de vaches fortement positives à la séroneutralisation et la DO du réservoir à lait dans les trois groupes de fermes (nv: fermes non vaccinées, v1: fermes vaccinées 1 fois par an, v2: fermes vaccinées 2 fois par an). La courbe de régression linéaire pour l'ensemble des trois groupes de fermes est illustrée ( $y = 112.1 x + 6.63$ ,  $r^2 = 0.80$ )..... 37
- Figure 11.** Représentation de la différence de DO du lait pour différentes combinaisons de traites (1:traite du matin, 2: traite en milieu de journée, 3: traite du soir) dans 3 réservoirs à lait sur une période de 24 heures. La moyenne des différences est illustrée par le point. La boîte inclue la moyenne plus ou moins l'écart-type. Les barres sortant de la boîte rejoignent le maximum et le minimum de la distribution..... 38
- Figure 12.** Variation et relation entre la DO de laits individuels de 87 échantillons du troupeau laitier fermé et la DO du réservoir à lait pendant 8 semaines suite à la vaccination (vaccination à la première semaine avec un rappel à la 3 ième semaine) par un vaccin tué. La moyenne des différences est illustrée par le point. La boîte inclue la moyenne plus ou moins un écart-type. Les barres sortant de la boîte rejoignent le maximum et le minimum de la distribution. La courbe joignant les étoiles illustre la fluctuation de la DO dans le réservoir à lait ..... 40
- Figure 13.** Variation de la DO du lait du réservoir et du sérum (moyenne des 87 échantillons pendant 8 semaines) du troupeau laitier fermé suites à la vaccination (vaccination à la première semaine avec un rappel à la 3 ième semaines) par un vaccin tué. .... 41

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ARN:	Acide ribonucléique
BVDV:	Bovine viral diarrhea virus (virus de la diarrhée virale bovine)
BVD:	Bovine viral diarrhea (diarrhée virale bovine)
BT:	Bovine turbinate ( cornet de nasaux bovin)
CAEV:	Caprine arthritis encephalitis viral (encéphalite arthrite caprine virale)
CP:	Cytopathogène
DMSO:	Diméthyl-sulfoxyde
DO:	Densité optique
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
HRP:	Horse radish peroxidase
IBR:	Infectious bronchitis respiratory (Rhino-trachéite infectieuse bovine)
LBE:	Leucose bovine enzootique
MAPAQ:	Ministère de l'agriculture et des pêcheries du Québec
MEM:	Minimal Essential Medium
MD:	Maladie des muqueuses
NCP:	Non-cytopathogène
PBS-T:	Phosphate Buffered Saline contenant 0.05% de Tween 80
PCR:	Polymerase chain reaction (réaction en chaîne de polymérisation)
SN:	Séroneutralisation
TCID:	Tissue culture infectious dose (Dose infectieuse en culture de tissu)



## REMERCIEMENTS

Ce document est le fruit d'une collaboration digne de mention.

J'aimerais offrir mes remerciements aux personnes suivantes:

Au docteur Youssef El Azhary, docteur Yvon Couture pour leurs travaux de direction dont ils ont fait preuve et pour leurs aides permanentes.

Au docteur Émile Bouchard, docteur Khyali R. Mittal et docteur Mahi Fassi Fehri pour leurs conseils et la correction de ce mémoire.

## INTRODUCTION

L'infection par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD) a des conséquences économiques importantes dans le monde entier. Au Québec, suite à une épidémie en 1993, un taux de morbidité de 80% et un taux de mortalité maximal de 30% ont été signalés dans certains troupeaux de veaux d'engraissement (Rivard, 1993).

La protection conférée par les vaccins n'est pas confirmée (Bolin, 1995). Dans les pays où l'on ne vaccine pas, tels les pays scandinaves, d'autres méthodes de contrôle non vaccinales ont été élaborées. Elles sont basées sur la détection des troupeaux infectés et sur l'élimination des animaux immunotolérants. En 1993, Niskanen a montré que cette détection peut se faire sur un échantillon du réservoir à lait. En effet, elle indique le statut de l'infection du virus du BVD (BVDV) dans un troupeau non vacciné. Par un test ELISA indirect, cette équipe a démontré une excellente corrélation, d'une part, entre la valeur de l'absorbance et le titre d'anticorps, et d'autre part, la valeur de l'absorbance et la prévalence de vaches séropositives des prélèvements issus du réservoir à lait (Niskanen *et al*, 1991).

Dans la plupart des pays, notamment au Canada, la vaccination contre le BVDV est courante. Elle est laissée au gré du vétérinaire, la décision de vacciner est dictée par l'évaluation du risque associée à la manifestation de la maladie clinique dans un troupeau. Cela nous a incité à chercher l'existence d'une corrélation du taux d'anticorps obtenu sur le réservoir à lait et le statut d'un troupeau vacciné.

Pour ce faire, le premier objectif a été de mettre au point un test ELISA indirect susceptible de mettre en évidence, aussi bien dans le lait que dans le sérum des anticorps contre le BVDV.

Le deuxième objectif a été l'évaluation et la validation de cette épreuve. La sensibilité et spécificité ont été évaluées par comparaison au test de référence de séroneutralisation. Une corrélation entre le taux d'anticorps dans le sérum et dans le lait individuel doit être établie.

Le troisième objectif consiste à évaluer et à valider le test ELISA dans le lait de mélange (réservoir à lait) de troupeaux vaccinés. Une corrélation entre la DO du réservoir à lait de troupeaux de statuts vaccinaux différents et le pourcentage de vaches positives à la séroneutralisation doit être mise en évidence.

Le quatrième objectif, consiste à étudier la cinétique des anticorps dans le sérum et dans le lait suite à la vaccination dans un troupeau laitier.

## REVUE DE LA LITTÉRATURE

### I-LE VIRUS DE LA DIARRHÉE BOVINE ET SA TAXONOMIE

Le virus de la diarrhée bovine est un virus sphérique et enveloppé de 40 à 60 nm de diamètre. C'est un virus à un seul brin d'ARN, à polarité positive, contenant 12500 nucléotides avec un seul cadre de lecture codant pour 4000 acides aminés (Deng et Brock, 1992). Le virus est ubiquiste et la maladie est mondialement répandue (Della Porta, 1985, Saurat *et al*, 1972).

La taxonomie récente classe le virus du BVD dans le genre des Pestivirus, et plus précisément dans la famille des Flaviviridae, anciennement nommée Togaviridae, avec le virus du choléra porcine, de la Border disease auxquels il semble étroitement apparenté (Francki *et al*, 1991). Collet *et al* (1988) ainsi que Renard *et al* (1985) ont montré une forte analogie des séquences en acides aminés des protéines codées par le BVDV et les Flavivirus. Les membres de cette famille ont la particularité au niveau génomique d'être dépourvus de poly A à leur extrémité 3'.

On distingue deux biotypes, le biotype cytopathogène (CP) qui entraîne la vacuolisation puis la lyse des cellules en culture (Horzinek, 1981) et le biotype non-cytopathogène (NCP) qui ne produit pas de lyse cellulaire bien qu'il reste étroitement associé à la cellule. Il est important de rappeler que la majorité des souches sont NCP et qu'une souche CP peut devenir NCP et inversement. Il a été également observé que les souches non cytopathogènes sont dépourvues de la protéine P80 (Donis et Dubovi, 1987, Magar *et al*, 1988).

Les deux biotypes CP et NCP peuvent être virulents pour les bovins et leur présence simultanée au sein du même animal est fondamentale pour la pathogénie de la maladie des muqueuses (Brownlie, 1985). Il semblerait que les deux biotypes ont un histotropisme différent, le biotype CP est le plus souvent retrouvé dans les prélèvements intestinaux alors que le biotype NCP est retrouvé dans les cellules sanguines et les tissus associés à la circulation sanguine ainsi que dans le tractus respiratoire (Brownlie, 1985).

Le virus du BVD peut infecter plusieurs espèces, notamment d'autres ruminants ainsi que le porc (Paton *et al*, 1994).

## II-SYNDROME ET PATHOGÉNIE DES INFECTIONS CAUSÉES PAR LE VIRUS DU BVD

Le virus du BVD ou BVDV est responsable de la diarrhée virale bovine et de la maladie des muqueuses. Ce virus est répandu dans le monde entier, 50 à 90% des bovins possèdent des anticorps anti-BVDV (Alenius *et al*, 1986). Peu de virus semble avoir une pathogénie aussi diverse et complexe que celle du BVDV.

Ce virus cause principalement 3 types de syndrômes (Duffel et Harkness, 1985)

### - La diarrhée virale bovine (BVD) ou primo-infection

La diarrhée virale bovine affecte le plus souvent des bovins immunocompétants et séronégatifs âgés de 6 à 24 mois (Blood *et al*, 1983). La période d'incubation peut durer une semaine, et la virémie peut persister 15 jours. Les symptômes non-pathognomoniques, se traduisent par de l'anorexie, de la fièvre, du jetage oculo-nasal et de la diarrhée (Done et Terlecki, 1980).

### - La maladie des muqueuses (MD)

Il s'agit souvent d'une forme sporadique et grave. La forme aiguë est la plus fréquente; elle se caractérise par de l'anorexie, de l'affaiblissement, de l'amaigrissement et de l'hyperthermie. Au début de la maladie, on note la présence d'érosions sur les commissures labiales, la langue, le voile du palais et la muqueuse gingivale. Ces lésions s'ulcèrent et s'accompagnent de ptyalisme, de jetage nasal mucopurulent et surtout d'une diarrhée profuse. D'autres lésions ulcéreuses sont notées au niveau de la muqueuse digestive, vulvaire et de l'espace interdigité. La forme chronique se traduit par une diarrhée discontinue et récidivante d'évolution fatale.

### - Les infections foetales (mortalité foetale, immunotolérants, maladies congénitales)

L'infection foetale, selon le moment de l'infection, peut entraîner la résorption foetale, la momification, la mort du foetus, des avortements, des anomalies congénitales, des infertilités, une mauvaise croissance et surtout des infections persistantes (Duffels et Harkness, 1985; Done et Terlecki, 1980). Les anomalies congénitales s'accompagnent le plus souvent de lésions du système nerveux et du globe oculaire, lésions caractéristiques de l'infection par le BVDV.

Selon Bolin *et al* (1985b), la prévalence des veaux laitiers et de boucherie, en Amérique du Nord, en état d'infection persistante est de 1,7 à 1,9% parmi les jeunes; les symptômes sont inapparents mais l'immunodépression transitoire qui s'ensuit favorise l'action des germes pathogènes opportunistes (Pastoret *et al*.1986). Les animaux infectés de manière

persistante peuvent avoir une apparence normale ou être chétifs et présentent un retard de croissance. La virémie chez la vache gestante, durant le premier tiers de la gestation, produit des veaux immunotolérants vis-à-vis des souches NCP (Mc Clurkin *et al*, 1984). Ces veaux, infectés de manière persistante, excrètent continuellement le virus NCP. Ils représentent une source de contamination constante pour le troupeau.

Les veaux infectés persistants naissent virémiques et séronégatifs (immunotolérants) vis-à-vis de la souche qui les a infecté; leur réponse immunitaire contre les autres antigènes est normale. Le déclenchement de la maladie des muqueuses chez l'animal immunopersistant s'explique par deux hypothèses, l'une endogène et l'autre exogène. Selon l'hypothèse exogène, l'animal immunotolérant serait infecté, soit d'un vaccin vivant (Duffel et Harkness, 1985; Martin, 1983) ou d'un contact avec un animal malade, par une souche CP homologue à la souche NCP qu'il héberge. Pour l'hypothèse endogène, les deux biotypes d'une souche virale de BVDV isolée à partir d'un animal atteint de la maladie des muqueuses sont antigéniquement semblables. Selon Howard *et al*, (1987), le bovin immunotolérant, une mutation de la souche NCP en une souche CP, ou une surinfection par une souche CP antigéniquement identique, induit le syndrome mortel de la maladie des muqueuses.

Ces animaux immunotolérants peuvent excréter durant toute leur vie du virus NCP (Coria *et al*, 1987) et constituer une source d'infection dans l'exploitation (Roeder *et al*, 1984). La majorité des veaux immunotolérants présente à la naissance un mauvais état général et un retard de croissance. Le taux de survie est de 50% la première année, la mortalité est causée essentiellement par une pneumonie, une entérite ou la maladie des muqueuses (Duffel et Harkness, 1985). Chez la plupart des individus, les symptômes sont inapparents mais l'immunodépression transitoire qui s'ensuit favorise l'action des germes pathogènes (Pastoret *et al*, 1986).

### **III- ÉPIDÉMIOLOGIE**

#### **1-Source du BVDV dans les exploitations**

Les sources de contamination par le BVDV sont généralement les mêmes dans les différents pays, elles peuvent subir de légères variations d'une région à une autre selon les structures des fermes et les systèmes de gestion (Bitsch Viggo *et al*, 1995).

Dans les régions à forte prévalence, les animaux immunotolérants doivent être considérés comme une grande source potentielle d'infection des troupeaux et d'excrétion du virus dans la nature (Niskanen, 1995).

Le maintien du virus dans l'environnement se fait principalement et essentiellement par les sécrétions et l'excrétion corporelle des immunotolérants. Les animaux ayant subi une primo-infection peuvent également contaminer le troupeau parce qu'ils peuvent excréter le virus entre le quatrième et le dixième jour après l'infection. On a même pu isoler chez des animaux en primo-infection le virus des poumons et des ganglions bronchiques jusqu'au cinquante-sixième jour de l'infection (Corapi et al, 1987). Parallèlement, la survie du virus du BVD en dehors de l'organisme est relativement longue car ce virus est résistant aux variations de température et de pH. On ne connaît pas précisément sa survie dans le milieu extérieur, cependant, il est à noter que le virus du choléra porcine, qui est également de la famille des flavivirus, peut survivre jusqu'à 14 jours.

Le virus du BVD est l'exemple type du pathogène persistant (Brownlie *et al*, 1988). Il se maintient principalement dans la nature par l'infection persistante. L'immunotolérant (infecté persistant) excrète d'une manière continue le virus sans qu'il ait pour autant une production d'anticorps spécifiques. L'immunotolérance résulte de l'infection d'une vache, la plupart des cas, non-immunisée avant le 120<sup>ème</sup> jour de gestation, date avant laquelle le veau n'est pas immunocompétent. Il convient de noter cependant que les animaux infectés par transmission horizontale développent une réponse sérologique leur permettant de résister aux infections ultérieures.

## 2-Modes de transmission:

Une femelle infectée de manière persistante donnera toujours naissance à des veaux immunotolérants permettant ainsi au virus de se maintenir dans l'exploitation. D'une manière générale, la transmission du virus se fait par contact entre un animal virémique et un animal sain. Les animaux immunotolérants constituent le réservoir et les agents de transmission les plus importants du BVDV (Roeder et Harkness, 1986). La virémie peut atteindre un titre de virus de  $10^4$  à  $10^6$  TCID (dose infectieuse en culture cellulaire) 50/ml (Bolin *et al*, 1985d).

La propagation de l'infection d'un troupeau à un autre se fait, le plus souvent, via les personnes contaminées qui se déplacent de ferme à ferme et leur équipements (Gunn, 1993, Lang-Ree *et al*, 1994). Selon Bolin (1990), ce type de contamination peut être évité par le nettoyage et la désinfection du matériel et par l'utilisation d'aiguilles et de seringues jetables. Le porc, le mouton, la chèvre et les ruminants sauvages qui sont des porteurs sains au BVDV peuvent également le transmettre. Les animaux infectés de manière persistante excrètent le virus du BVD dans toutes les sécrétions, y compris le lait. Le

sperme de taureaux infectés de manière persistante peut contenir du virus à un titre pouvant atteindre  $10^4$  à  $10^6$  TCDI 50/ml (Brownlie *et al.*, 1988).

Des vaches qui initialement étaient séronégatives et inséminées avec du sperme infecté sont devenues infectées et leur taux de fertilité a été réduit (Grahn *et al.*, 1984). Meyling et Jensen, (1988), ont montré que de ces vaches peuvent occasionnellement produire des veaux immunotolérants. Le transfert d'embryon infecté peut être l'occasion de transmettre la maladie. Les aiguilles hypodermiques, les instruments chirurgicaux et les insectes piqueurs contaminés sont une source d'infection. Tarry *et al.* (1991) ont montré que sous certaines conditions expérimentales, des insectes piqueurs tels que (Stomoxys calcitrans et Haemotopota pluvialis) et même les insectes non-piqueurs tel Hydrotaea irritans peuvent transmettre le virus du BVD aux bovins et aux ovins, bien qu'une telle transmission n'a jamais jusqu'à présent été prouvée dans les conditions naturelles. Les vaccins vivants atténués administrés à des périodes non appropriées peuvent également, telle qu'au début de gestation, entraîner des nouveaux-nés infectés de manière persistante (Bolin, 1995). La transmission du virus par les animaux en primo-infection est possible sur une courte période, entre le quatrième et le dixième jour après infection; cette période correspond, en effet, à une virémie avec une variation de la concentration du virus dans le sérum (Radwan *et al.*, 1995).

#### **IV-PROBLÈMES CAUSÉS PAR LE VIRUS DU BVD**

Malgré que les pertes économiques dues à l'infection du BVDV sont difficiles à estimer d'une manière précise à cause d'un manque de données épidémiologiques et d'une méconnaissance des conséquences des infections, les pertes économiques sont importantes. Au Québec, suite à l'épidémie de 1993, un taux de morbidité de 80% et un taux de mortalité maximal de 30% ont été signalés dans certains troupeaux de veaux d'engraissement (Rivard, 1993). Dans le reste du monde, la diarrhée virale bovine présente une forte morbidité de 80 à 100% et une mortalité allant jusqu'à 20% selon Radostits et Littlejohns (1988).

A titre d'exemple, en Grande-Bretagne, la majorité des pertes économiques du BVDV sont associées aux infections pré-natales (Harkness, 1987). Le coût de ces pertes est estimé à 47 millions de livres sterling par année (Bennet et Done, 1986). Selon le Conseil des Recherches des Pêches et de l'Agro-Alimentaire du Québec, il semblerait que les pertes annuelles sont évaluées à 1,1 millions de dollars en animaux de remplacement, à 1,12 millions en coût de médicament et à plus 5 millions en pertes dues à des retard de

croissance (Rapport annuel Conseil des Recherches des Pêches et de l'Agro-Alimentaire du Québec, 1994).

De plus, la dissémination du virus est naturellement très facile. Elle peut être aggravée par la contamination des vaccins vivants, par le sperme de taureaux infectés lors des saillies naturelles, ou d'inséminations artificielles et par les embryons infectés lors de la transplantation embryonnaire (Bistch et Houe, 1995). Lors de la transmission horizontale, le virus non-cytopathogène peut pénétrer par différentes voies; il serait responsable de divers symptômes dont une chute importante de la production de lait. (Bistch et Houe, 1995).

D'autres problèmes rendent le contrôle de cette maladie extrêmement délicat. Du point de vue clinique, l'infection est inapparente, et même quand les symptômes sont présent la confusion entre les formes cliniques rend difficile le diagnostic et, par conséquent, la dissémination difficile à contrôler.

Les animaux immunotolérants répandent facilement l'infection et sont responsables majoritairement de la transmission du BVDV dans le troupeau (Houe *et al*, 1993a). L'introduction de nouveaux sujets contaminés dans un troupeau augmente le risque de contamination dans un élevage. Les conséquences de cette situation est d'autant plus dangereuse que l'infection est transmise à plusieurs femelles séronégatives en début de gestation. A tous ces problèmes causés par le BVDV s'ajoute une très grande diversité de souches. En effet, selon Donis *et al*, (1987) la diversité des profils antigéniques parmi les différents isolats de BVDV seraient probablement la conséquence d'un haut taux d'erreur des RNA répliques virales.

## V-DIAGNOSTIC

### 1-Méthodes qui détectent le virus ou l'antigène

#### a) La technique de réaction en chaîne de polymérisation (PCR)

La PCR définie comme une synthèse enzymatique *in vitro* d'amplification de séquences d'ADN spécifiques, détecte l'acide nucléique du BVDV dans le sérum (Brock, 1991 et Hertig *et al*, 1991) et dans le lait (Radwan *et al*, 1995).

La spécificité de la PCR du virus du BVD est liée à des amorces oligonucléotidiques codants pour des régions conservées dans la majorité des pestivirus. Ces séquences conservées se situent dans différentes régions. Les amorces peuvent se localiser.



- dans la protéine non glycosylée (P80) et glycosylée (GP 53) (Hertig *et al*, 1995),
- dans la région 5' non traduite (5' UTR) (Pellerin *et al*, 1994, Harpin *et al*, 1995).

Pour la PCR du BVDV dans le lait, Radwan a utilisé 4 amorces,

- 2 situées dans la région 5' UTR,
- 2 situées dans la région P80.

Cette technique amplifie l'acide nucléique du BVDV à partir de cellules somatiques du lait en deçà d'une dilution de  $10^{-3}$  avec un titre de  $10^{5,5}$ , soit un seuil de détection de  $10^{2,5}$ . Dans ce cas, la PCR dans le lait est 14,6 fois plus sensible que l'isolement viral des cellules somatiques du lait.

Radwan (1995) a montré que la détection du virus ne peut se faire, chez des bovins infectés expérimentalement, qu'entre le sixième et le dixième jour après l'inoculation. Les individus infectés aigus possèdent un titre viral ( $10^{2,5}$ ) plus faible que les immunotolérants, ce qui correspond à peine au seuil de positivité.

#### b) Le test ELISA-antigène

Le test ELISA-antigène (enzyme-linked immunosorbent assay) met en évidence l'antigène du BVDV dans le sérum (Fenton *et al*, 1991, Gottschalk *et al*, 1992, Horner *et al*, 1995, Mignon *et al*, 1991, Sandvick *et al*, 1995).

L'ELISA-antigène est beaucoup moins sensible que la technique de la PCR et ne peut être utilisée que dans les tissus et le sang (Horner *et al*, 1995). Selon Drew *et al* (1993) et Greiser-wilke *et al* (1993b), le test ELISA-antigène ne peut être appliqué que pour le diagnostic des virémies transitoires qui ont lieu au cours des primo-infections. Pour la détection de tels animaux le test d'immunoperoxydase est le plus communément utilisé. De nombreuses vaches virémiques peuvent être faussement positives par ce test (Brock, 1991).

## 2- Méthodes qui détectent l'anticorps

L'immunité humorale joue un rôle très important lors de l'infection du BVDV, selon Howard *et al* (1989), la majorité des anticorps anti-BVDV trouvés dans le sérum est constituée des IgG1 et IgG2.

Les méthodes communes utilisées pour mettre en évidence l'anticorps anti-BVDV sont le test de séroneutralisation et le test de fixation du complément. La séroneutralisation

nécessite la culture cellulaire et une longue période d'incubation à 37°C avant la lecture des résultats. Dans la pratique de laboratoire, on considère qu'un taux strictement supérieur à quatre (1:4) indique que l'animal est séropositif (El Azhary, 1995). On considère que le taux d'anticorps neutralisant chez les animaux infectés est supérieur à 1:20 et peut aller jusqu'à 1/1280 (Wellemans, 1995). Un titre de 1/64 n'est pas forcément protecteur (Baz, 1992). Chez les animaux vaccinés (après 2 doses vaccinales) par un vaccin inactivé, ce taux varie entre 1/5 et 1/20 (Wellemans, 1995). D'une manière générale, la protection procurée par des vaccins tant vivants, qu'inactivés, contre le BVDV n'est pas connue (Bolin, 1995).

La technique de fixation du complément est peu spécifique à cause de l'activité anti-complémentaire de certains sérums. La technique de l'immunofluorescence est aussi peu spécifique, coûteuse, et ne donne qu'un résultat quantitative.

#### a) Le test ELISA-anticorps

Le test ELISA-anticorps dans le sérum (Chu *et al*, 1985; Howard *et al*, 1985; Junti *et al*, 1987; Westenbrinck *et al*, 1985) et dans le lait (DeMeuron, 1982; Stuker, 1980) est la technique de choix vue sa forte sensibilité, spécificité et son intérêt pratique à l'image de ce qui a été réalisé pour les rotavirus bovins (Ellens, 1978), la leucose bovine enzootique: (LBE) (Kerkhofs *et al*, 1990; Klintevall *et al*, 1991; Mammerickx *et al* 1985; Perrin *et al*, 1986; Toma *et al*, 1984), l'encéphalite-arthrite caprine virale: CAEV (Motha et Ralston, 1994), la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) (Perrin *et al*, 1984) et le BVDV (Niskanen *et al*, 1989).

L'ELISA-anticorps s'emploie en routine sur le sérum et le lait, ce test spécifique, sensible, rapide, et économique peut être automatisé pour un grand nombre d'échantillons (Schroeder *et al*, 1985) ce qui favorise les études épidémiologique à grande échelle (Niskanen *et al*, 1989; Klintevall *et al*, 1991). De plus, cette technique :

- ne subit pas l'interférence des mammites (Niskanen *et al*, 1989),
- a une bonne spécificité et sensibilité comparées à celles du sérum (Perrin *et al*, 1984; Motha et Ralston, 1994),
- évite de faire appel à des prises de sang qui constituent un risque de transmission du virus au sein du troupeau infecté par des seringues souillées (Toma *et al*, 1984).

## VI-CONTRÔLE ET LUTTE CONTRE L'INFECTION DU BVDV

La pierre angulaire de la contamination du troupeau est due à l'existence d'animaux immunotolérants. C'est ainsi que tous les efforts devraient être dirigés pour éliminer les immunotolérants et empêcher l'infection des animaux *in utero* et à la naissance. Cet objectif peut être atteint par l'élimination des animaux infectés avec ou sans vaccination des troupeaux.

### 1-Vaccination:

Les vaccins vivants ont plusieurs inconvénients, dont le plus grave est la possibilité pour l'antigène de ces vaccins de traverser la barrière placentaire et d'infecter, ainsi, le fœtus (Duffell et Harkness, 1985). Par ailleurs, ces vaccins peuvent entraîner une virémie vaccinale (Martin, 1983) chez les veaux infectés d'une manière persistante et les bovins stressés ainsi que les vaches gestantes.

Théoriquement, les vaccins vivants induisent une réponse immunitaire rapide, 3 semaines après vaccination, utile lorsque la protection doit être établie rapidement. Chez ces animaux vaccinés, le taux d'anticorps détecté, dans le sérum, neutralise diverses souches de BVDV (Mc Clurkin *et al*, 1984). Déjà en 1967, Peter *et al* ont démontré que certains vaccins vivants entraînent le syndrome de la maladie des muqueuses chez des veaux immunotolérants, et des avortements chez les vaches gestantes facilitant ainsi le risque de propagation horizontale et verticale du virus. La maladie des muqueuses post-vaccinale n'est pas très fréquente mais elle demeure fatale quand elle se produit entre 1 à 4 semaines après vaccination (Bittle, 1968; Clark, 1968; Mc Kercher, 1968; Peter *et al*, 1967; Rosner, 1968). Parfois, les vaccins vivants perpétuent l'infection et donc la survie du virus dans le milieu extérieur (Bolin, 1991). Il y a également des risques de contamination de ces vaccins avec d'autres agents utilisés dans la fabrication capables de causer des contaminations par des souches NCP de BVDV (Harasawa *et al*, 1994; Kreeft, 1990; Levings, 1990; Wensvoort *et al*, 1988). D'autres problèmes potentiels sont associés aux vaccins vivants tel l'immunosuppression et la recombinaison génétique. Les souches vaccinales du BVDV entraînent des propriétés immunosuppressives manifestes après vaccination (Roth *et al*, 1983). L'immunosuppression, induite par le vaccin vivant, peut amplifier la pathogénicité d'autres agents infectieux responsables de maladies post-vaccinales.

Il est possible que les vaccins vivants induisent aussi une recombinaison génétique avec l'acide nucléique d'autres virus autres que le BVDV ou d'autres vaccins vivants (Qi,

1992). On a démontré que l'ARN du BVDV se recombine avec l'ARN d'origine virale ou de cellules animales (Meyers *et al*, 1991; Meyers *et al*, 1992). Il y a donc un risque d'apparition de recombinants génétiques entre les souches de vaccins vivants et d'autres souches infectieuses de BVDV.

Des chercheurs spéculent que de nouvelles formes sévères émergentes de BVDV chez les bovins ont été induites par les vaccins vivants (Bolin *et al*, 1992; Corapi *et al*, 1990; Corapi *et al*, 1989; David *et al*, 1994; Rebhun *et al*, 1989).

Par ailleurs, la persistance des anticorps dans le sérum après vaccination n'est pas bien connue, il se pourrait fort bien, qu'elle soit similaire à celle causée par une infection naturelle. Théoriquement, les anticorps induits par une infection naturelle montrent généralement un titre élevé pendant plus d'un an qui persiste chez la plupart des vaches pendant plusieurs années (Coria *et al*, 1978; Kahrs *et al*, 1966).

Les vaccins inactivés ont été développés pour pallier aux inconvénients des vaccins vivants (Bolin, 1990). La vaccination avec des vaccins tués est plus sécuritaire chez la vache gestante, et ne cause ni maladie, ni immunosuppression, mais son efficacité demeure douteuse même si la plupart des vaccins inactivés contiennent les souches CP et NCP (Roeder et Harkness, 1986).

Une étude de Harvey *et al* (1989) portant sur 54 vaches séronégatives a montré une faible séroconversion à la séroneutralisation contre le virus du BVD suite à l'administration d'un vaccin inactivé. Les souches utilisées pour le test de séroneutralisation étant similaire à celle du vaccin. Selon cette étude, aucune de ces vaches n'a présenté un changement de titre d'anticorps après le rappel annuel, indiquant ainsi une très faible immunogénicité de ce vaccin inactivé. Même dans des conditions idéales de vaccination, il s'avère que 2 à 5% des animaux ne présentent pas de séroconversion (Lambert, 1973); de plus les anticorps post-vaccinaux n'apparaissent que dans les jours qui suivent la vaccination de rappel. Le plus souvent, ces vaccins inactivés sont constitués de souches virales qui ont une plus grande variation antigénique comparés aux souches communes utilisées dans les vaccins vivants (soient les souches BVDV-NADL, BVDV-Singer, BVDV-C24V). D'une manière générale, la protection procurée par des vaccins tant vivants, qu'inactivés, contre le BVDV n'est pas connue (Bolin, 1995). Il semblerait que ces vaccins inactivés protègent durant une très courte durée. Les anticorps neutralisant les souches de BVDV, antigéniquement distincts de ceux du vaccin, persistent moins d'un an (Baz, 1992). D'ailleurs, pour induire la protection du troupeau, certains vétérinaires administrent 3 à 4 fois par année les vaccins inactivés. L'un des principaux inconvénients de l'injection de deux doses séparées dans le temps, pour établir une immunité protectrice, est la lenteur d'apparition

d'une immunité protectrice. Deux doses de vaccin inactivé appliquées à un intervalle de 2 à 4 semaines, sont recommandées pour avoir une immunisation (Niskanen, 1995).

Tout les vaccins, aussi bien vivants que tués, présentent des variations antigéniques selon la souche du virus du BVD. Ainsi, un vaccin fait avec une seule souche ne peut assurer une protection complète du foetus contre toutes les souches du BVDV (Radostits et Littlejohns, 1988). Bolin *et al* (1991) ont montré que l'immunité induite contre une souche hétérologue est de courte durée. Ces vaccins polyvalents, contenant d'autres virus et agents bactériens, ont l'inconvénient majeur de ne pas donner une amplification de l'immunité protectrice. En outre, la durée de protection induite, est plus courte que celle des vaccins vivants (Bolin *et al*, 1991). Par ailleurs, la vaccination par des vaccins vivants et inactivés n'est pas capable d'éliminer l'infection active du virus. De plus, souvent la fréquence de vaccination est le plus souvent anarchique et dépend du système de gestion du troupeau, de la prévalence régionale du BVDV ainsi que de la durée de protection voulue par l'éleveur.

Plus de 140 vaccins contre le BVDV sont licenciés par l'administration fédérale des Etats-Unis, et même si ces vaccins respectent les normes de pureté, la vaccination du troupeau ne protège pas toujours contre la maladie (Bolin, 1995). Si la protection a lieu, elle ne protège que contre la manifestation clinique et non contre l'infection virale du moins pour une certaine période de temps. La protection conférée par la vaccination dépend autant de l'immunité de la vache que de la qualité du vaccin (Bolin, 1995).

En plus de leur coût, d'autres inconvénients comme la réaction inflammatoire au site d'injection, le choc anaphylactique et une chute de la production laitière transitoire sont notés au cours de la vaccination (Harazawa *et al*, 1994). L'interférence avec les anticorps d'origine maternelle peuvent aussi interférer avec les vaccins inactivés, d'où la nécessité de vacciner assez tardivement soit après six mois d'âge (Schultz, 1993).

## II-L'élimination complète de l'infection des troupeaux

L'apparition récente au Canada et dans de nombreux pays de variants très virulents du BVDV non neutralisés par des sérums neutralisants du BVDV de souches communes (BVDV-NADL, BVDV-Singer), traduit l'importance de la variabilité antigénique du BVDV et soulève le problème des épreuves de diagnostic et des vaccins. Comme au Québec, le Danemark, et d'autres pays Scandinaves, comptent peu de troupeaux séronégatifs. Ces derniers pays ont établi des programmes de lutte économique par rapport aux pertes causées par le BVDV (Niskanen, 1993).

Les pertes annuelles, du cheptel de 500 000 têtes au Danemark, causées par l'infection du BVDV ont été estimées à 17 millions de dollars américains annuellement, tandis que le montant du contrôle et de l'éradication qui durerait une période de trois ans a été estimé approximativement à 27 millions de dollars américains (Bitsch et Ronsholt, 1995).

Pour ce faire, il est nécessaire d'identifier et d'éliminer les porteurs et les transmetteurs du virus (Larsson *et al.*, 1994). Une fois détectés, les bovins infectés d'une manière persistante doivent être éliminés car ils constituent la principale source de dissémination virale. Pour le succès du contrôle et de l'éventuelle éradication de l'infection du BVDV, il est fondamental de développer un test qui puisse donner le statut individuel de l'animal et qui puisse indiquer le statut du troupeau (Niskanen, 1995).

Houe et Palfi (1993), insistent sur le fait qu'une excellente stratégie d'élimination de l'infection du BVDV dans une exploitation nécessite un suivi virologique de tous les descendants au cours de l'année ainsi que l'élimination physique des veaux identifiés comme immunotolérants. Théoriquement, il devrait s'en suivre une chute évidente du taux d'anticorps protecteurs anti-BVDV, s'il n'y a pas de programme de vaccination. Après l'application de cette stratégie, si le taux d'anticorps augmente, cela indique que le troupeau est devenu infecté par le virus du BVD suite à son introduction dans l'exploitation. Cette présence est due à un contact avec un animal infecté, un immunotolérant nouvellement introduit dans l'exploitation, ou d'une femelle gestante porteuse d'un animal immunotolérant éliminant du virus (Houe et Palfi, 1993b; Loken et Daling, 1994).

En Finlande, le programme de contrôle du BVDV est coordonné avec celui de la leucose bovine, ce dernier programme sert de modèle logistique tant au niveau des troupeaux que des régions géographiques indemnes de leucose bovine (Husu *et al.*, 1993). De plus, ces types de programmes ne sont pas strictement réservés aux élevages bovins laitiers, mais peuvent être généralisés aussi aux troupeaux de bovins de boucherie. Le contrôle du statut du troupeau peut être déterminé par un dépistage sérologique chez les jeunes animaux pouvant être inclus dans le programme d'un contrôle du BVDV. Le diagnostic d'une primo-infection est mis en évidence par la détection de la séroconversion grâce à un prélèvement de sang pairés séparé de trois à quatre semaines (Niskanen, 1985).

Les épreuves des anticorps sur le lait du réservoir, vu leur facilité et leur efficacité, ont été utilisées pour de nombreuses maladies infectieuses tel que la leucose bovine enzootique, la brucellose bovine, la rhinotrachéite infectieuse bovine. Niskanen (1993) a montré que l'échantillonnage du réservoir à lait est particulièrement pratique pour indiquer le statut de l'infection dans un troupeau non vacciné. En utilisant un ELISA indirect, Niskanen *et al.*

(1991) a démontré une excellente corrélation entre la valeur de l'absorbance de l'ELISA et la prévalence de vaches séropositives

Des programmes de contrôle du BVDV ont été établis dans les pays Scandinaves (Suède, Norvège, Danemark et Finlande), soit dans des pays où la vaccination contre le BVDV est interdite. Il faut noter que la prévalence du BVDV dans ces pays peut être très faible (4% en Finlande) ou très forte (45% au Danemark) (Alenius *et al*, 1986). Le programme de contrôle de l'infection du BVDV dans ces pays est le même et se divise en trois étapes. La première étape consiste en une surveillance de l'augmentation du taux d'anticorps dans le réservoir à lait indiquant que l'infection est établie dans le troupeau.

La deuxième étape consiste d'analyser individuellement les vaches dans les troupeaux dont la DO à augmenter, et ainsi d'identifier et d'éliminer les immunotolérants. La troisième étape est de continuer de surveiller le troupeau par le réservoir à lait et de protéger le troupeau des réintroductions (Larsson *et al*, 1994).



## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### I. DÉVELOPPEMENT D'UN TEST ELISA

#### 1-Souches virales et cultures cellulaires.

Les souches cytopathogènes du BVD type 1 (souche Singer) ou type 2 (souche 890) proviennent de l'American Type culture collection (ATCC). Les cultures cellulaires confluentes de cellules BT (Bovine Turbinate est une lignée de cellules de cornets de nasaux bovins) dans les flacons P30 (Corning Montréal) sont rincées au PBS à pH 7.3 et inoculées avec les souches virales à infectivité multiple de 0.05 TCI-D50. Les cultures cellulaires inoculées sont incubées à 37 degrés jusqu'à destruction complète de la couche cellulaire (habituellement de 3 à 5 j pour une souche virale cytopathogène). Les cellules infectées et le surnageant infectieux sont alors congelés et décongelés à trois reprises pour être ensuite clarifiés par centrifugation à 10,000 xg pendant 30 minutes à 4 degrés. Pour le titrage de la suspension virale, nous avons utilisé des plateaux de microtitrage de 96 puits (Linbro, Flow laboratories inc, Mc Lean, VA). Ces plateaux sontensemencés auparavant avec une suspension de 0,1 ml/puits, soit 150 000 cellules BT par ml. Le Milieu Essentiel Medium (MEM) complet supplémenté de 10% de sérum de veau foetal est utilisé comme milieu de croissance. Des dilutions décimales du virus dans du milieu exempt de sérum sont préparées. Une fois que le tapis cellulaire est confluent à 30 à 50 pour cent, des aliquots de 0,1 ml/puits de chaque dilution de solution virale sont distribués en quadruplicata dans les puits. Après une adsorption de deux heures du virus à 37 degrés en présence de 5% de CO<sub>2</sub>, on ajoute 0,1 ml de milieu MEM de maintenance (MEM complet contenant 2% de sérum de veau foetal). Les plateaux ont été ensuite incubés à 37 degrés en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. L'effet cytopathogène (ECP) des souches Singer et 890 est estimé chaque jour au microscope optique renversé et le titre infectieux (TCID<sub>50</sub>) est déterminé le quatrième jour selon la méthode de Kaerber (Payment et Pavilanis, 1980). D'une manière générale, pour ne pas être à court de cellules, après un passage on peut congeler une quantité de cellules au cas où il y aurait une perte ultérieure de cellules. Pour ce faire, après deux lavages au PBS, les cellules sont séparées par l'addition de 0.1% de trypsine-EDTA. Ces cellules sont stockées dans de l'azote liquide dans un milieu contenant 10% de diméthyl-sulfoxyde (DMSO) et 10% de sérum de veau foetal. Un comptage cellulaire élevé est nécessaire, il est de l'ordre de 4, 000 000 de cellules par ml.



Les cellules sont contrôlées contre les IgG anti-BVDV par un ELISA antigène développé au laboratoire.

## 2-Préparation de l'antigène BVDV.

La préparation de l'antigène a été faite selon la méthode de Junti *et al* (1987). En résumé, les cellules Bovine turbinate (BT) ont été cultivés jusqu'à confluence dans des flacons en plastiques de 150 cm<sup>2</sup> couramment appelés P30 à 37 degrés dans le MEM. Le sérum de veau foetal indemne d'IgG et de virus du BVD a été ajouté. Les cultures cellulaires BT utilisées nécessitent un milieu de croissance MEM 410-1500, (Laboratoire GIBCO), Montréal. A ce milieu de croissance, on rajoute de plus 1% de gentamycine, 1% de penicilline-Streptomycine, 1% de Fungizone ( 5 mg/100 ml), (Laboratoire GIBCO).

Chaque flacon est inoculé avec 5 ml de surnageant contenant du BVD (type 1, souche Singer ou type 2, souche 890) dilué à un centième (10 exposant 7, DICT 50 par 0,1 ml). Après adsorption d'une heure à 37°C, 40 ml de milieu MEM enrichi de 2% de sérum de veau foetale ajouté. Les flacons seront congelés à moins 70°C quand 90% à 95% du tapis cellulaire est détruit, soit après trois à quatre jours d'incubation. L'antigène du BVDV est préparé par deux séries de congélation et décongélation du virus, puis centrifuger pendant une heure à 45000 rotations par minute (rpm) dans un Kontron (rotor SW-50). Le mélange sera dissout dans un millilitre de PBS contenant un détergent MEGA-10 et incubés pendant une heure à température ambiante. Le lysat passera au sonicateur (fréquence 50%) durant 30 secondes et clarifié par une centrifugation à basse vitesse. Afin d'éliminer le détergent de la préparation de l'antigène solubilisé, il est filtré sur une colonne de gel sephadex G-50. L'antigène sera dilué 1/1000 dans un tampon (carbonate de sodium de NA 0,05 M, à pH 9,6 contenant 0,1% de NaNo3) et complété à 100 microlitres/puits pour la plaque. Le plateau sera fermé hermétiquement et stocké à quatre degrés jusqu'à utilisation, ou congelé à moins 20° C.

## 3-Technique de l'ELISA indirecte pour la détection des anticorps contre le BVDV.

Les plateaux à 96 cupules (Nunc polysorb F16) sont sensibilisés avec l'antigène dilué dans du tampon coating (Tampon carbonate de sodium 0,05 M, ph 9,6, contenant 0,1 NaNo3) à raison de 100 microlitres par puits. Les plateaux sont fermés hermétiquement et conservés au moins 17 heures à 4°C.

Les produits non-liés aux plateaux seront enlevés par trois lavages successifs dans du PBS-Tween (Phosphate buffered Saline contenant 0,05% de Tween 80).

Les échantillons de laits et de sérum sont testés pour la présence d'anticorps et sont dilués dans du PBS-Tween et incubés dans un volume de 100 µl par puits 1 heure à 37°C. Puis, on lave trois à quatre lavages successifs avec du PBS-Tween. L'anticorps monoclonal anti-IgG bovin conjugué couplé à la peroxydase avec le HRP selon la méthode de Nakane (1979) proviennent de l'entreprise Dimension Laboratories Toronto (Ontario). Un volume de 100 µl de conjugué dilué est ajouté dans chaque puits. Après incubation, une heure à 37°C, deux cents microlitres de solution de substrat (0,1 mg de tétra-méthyl-benzidine/ml, 0,1 M d'acétate de sodium et 0,05 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est ajouté à chaque puits. Après 10 minutes de développement à température ambiante, 50 µl d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est ajouté pour arrêter la réaction. La valeur de l'absorbance à 450 nm est mesurée par un spectrophotomètre.

## **II. ÉVALUATION DE L'ÉPREUVE ELISA DANS LE LAIT.**

### 1-Traitement des échantillons.

Le lait est un mélange des quatre quartiers, il est collecté dans un tube en plastique de 10 ml. Les prélèvements de lait sont centrifugés pendant 10 minutes à 3000 rpm et la couche de matière grasse du lait ôtée. Le lait écrémé est prélevé dans la couche inférieure après centrifugation du lait entier. Il constitue le prélèvement destiné à l'analyse par le test ELISA. Les échantillons de sang sont collectés (10 ml) dans un tube à vacuum (Becton Dickinson). Le sang est centrifugé de la même manière et le sérum est prélevé. Les couples d'échantillons de lait et de sérum de la même vache sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à l'analyse. Compte tenu du risque d'infection des animaux dans les étables, et donc à un changement de la séroconversion, tous les prélèvements de sérum et de lait individuel ou de réservoir d'une même ferme ont été prélevés au même moment. Ainsi, aucune erreur par défaut du test ELISA ne pourrait tenir à une différence de moment de prélèvement.

## 2-Épreuve de séroneutralisation.

Cette épreuve met en évidence le titre d'anticorps contre le BVDV dans le sérum. Elle est utilisée comme épreuve de référence pour la détermination de la sensibilité et de la spécificité de l'ELISA. Des sérums titrés sont dilués, à raison de 2, de 1/4 à 1/256 dans des plateaux de 96 cupules à fond plats contenant des cellules BT en monocouches de moins de 24h. Une dose égale du virus BVD (200 TCD50/0.1 ml) est ajoutée en quantité égale à chaque dilution de sérum formant un volume total de 0.2 ml. Pour chaque plateau, deux contrôles positifs (100 µl de virus) et deux négatifs sont inclus. Le tout est incubé à une température de 37°C pendant une heure. Ensuite, 100 µl de chaque dilution seront transférés dans une plaque de 96 cupules contenant des cellules confluentes de 24 h (les plaques doivent être vidées préalablement de leur milieu et rincées au PBS). Le tout est incubé pendant une heure à 37°C. Cent microlitres de milieu de cellules Bovines Turbinates (BT) à 2% de sérum sont ajoutés. Le sérum de veau foetal est inactivé avec du bétapropiolactone (Kansas City, Biological Inc.). La lecture est faite tout les jours, la lecture finale se fait au 4<sup>ième</sup>-5<sup>ième</sup> jour. L'épreuve de séroneutralisation de notre laboratoire a été comparée avec celle d'un laboratoire de référence, sur plus de 130 échantillons. La corrélation de Pearson entre les deux mesures de test est positive et significative ( $r=0.86$ ,  $n=130$ ,  $p=0.0001$ ). La comparaison des deux techniques de séroneutralisation indique que 98% des échantillons sont classifiés de façon similaire.

## 3-Sensibilité et spécificité.

La sensibilité et la spécificité de l'ELISA sont déterminées par comparaison à la séroneutralisation au titre de référence de 1:4. Ensuite, sur 765 couples sérum-lait prélevés des 12 troupeaux laitiers, les résultats de l'ELISA-sérum sont comparés à ceux de la séroneutralisation. La sensibilité et la spécificité de l'ELISA-sérum et de l'ELISA-lait relatives à la séroneutralisation, sont calculées selon une analyse d'association. Cette analyse a été appliquée pour l'analyse de la sensibilité et spécificité de l'ELISA: Avec l'aide du tableau de contingence, une analyse d'association permet de classer les résultats positifs et négatifs en fonction de différents seuils. Les valeurs seuils sont celles qui minimise les mauvaises classifications à la fois positives et négatives. Les seuils ont été étudié de façon systématique.

Pour cette analyse statistique, nous avons utilisé les différentes composantes du logiciel SAS.

#### 4-Vérification de la variation journalière de la DO dans le lait individuel.

Afin de vérifier si la DO du lait individuel ne change pas au cours d'une même journée, nous avons prélevé du lait de 5 vaches provenant de 5 troupeaux différents, le matin au cours d'une première traite, au cours de la traite du soir et entre les deux traites. Ces laits sont testés pour déterminer la variation journalière de la DO.

#### 5-Variation de la DO par quartier.

Afin de faciliter la méthode de prélèvement individuel, nous avons déterminé s'il y a une variation de la DO selon les quatre quartiers (1: avant-gauche, 2: avant-droit, 3: arrière-gauche, 4: arrière-droit) chez la même vache. Pour cela, nous avons choisi aléatoirement 6 vaches et nous avons mesuré, par ELISA, les DO des quatre quartiers séparément de chacune des vaches. Aucun quartier des 6 vaches n'avait de mammite clinique.

#### 6-Variation de la DO selon le mode de conservation.

Dans le but de déterminer l'influence du mode de conservation du lait lors de son stockage dans la ferme et de son transport au laboratoire d'analyse, trois modes de conservation sont éprouvés, soit à température ambiante (25-28°C), à température de réfrigération (4°C) ou à température de congélation (-20°C). Pour cela, un prélèvement de lait à forte DO, d'environ 0.72, est analysé par ELISA pendant une période de 280 heures, soit environ 4 jours.

#### 7-Dilution en laboratoire.

La dilution en laboratoire d'un lait fortement positif (0,75) avec un lait de contrôle négatif a été réalisée pour simuler la dilution d'un lait de vaches positives une fois mélangé avec d'autres laits négatifs dans le même réservoir.

Pour cela, nous avons pris un lait témoin positif que nous avons dilué jusqu'à 100 fois avec un lait témoin négatif. Des laits moyennement et faiblement positifs ont été aussi dilués et testés par ELISA.

### 8-Influence de la parturition sur le taux d'anticorps dans le lait individuel.

Théoriquement, la production laitière des vaches parturientes n'est pas incorporée au lait de mélange, cependant, en pratique, certaines exploitations risquent de l'inclure. Pour cette raison, nous avons étudié la DO du lait de 6 vaches 24 heures en pré-partum, au partum et 24 heures en post-partum.

## III. VALIDATION DE L'ELISA DANS LE LAIT DE MÉLANGE

### 1-Sélection des troupeaux laitiers pour l'étude.

Tous les échantillons de sang et de lait, ainsi que ceux du réservoir, proviennent de 12 troupeaux participant à un programme de suivi mensuel de régie de la reproduction. Les troupeaux ont des programmes de vaccination différents. Parmi les 12 troupeaux sélectionnés 3 n'ont pas de programme de vaccination, 4 sont vaccinés une fois par an et 5 sont vaccinés deux fois par an. Tous les producteurs utilisent un vaccin tué. Le statut de l'infection du BVDV n'était pas connu avant l'étude. De nombreuses données et informations concernant les dates de vaccination, le type de vaccination, la présence antérieure de signes cliniques liés au BVDV, la confirmation du BVDV au laboratoire sont enregistrées. Pour chaque animal, la date de naissance, ainsi que la date d'entrée des animaux provenant d'autres élevages sont enregistrées. Chaque animal est identifié par un numéro attribué par l'élevage.

### 2-Corrélation entre la DO du réservoir et le pourcentage de vaches séropositives.

Des prélèvements de 12 réservoirs à lait de 12 troupeaux de statuts vaccinaux différents, dont 3 sont non vaccinés, 4 vaccinés par un vaccin tué une fois par an et 5 vaccinés par un vaccin tué deux fois par an, sont effectués et analysés par le test ELISA. La DO du réservoir est corrélée au pourcentage de vaches fortement positives (titrant 128 et 256 à la SN) à la séroneutralisation sur chaque animal.

### 3-Variation journalière de la DO dans le lait de mélange.

Afin de nous assurer que la DO du mélange au cours d'une même journée ne change pas, nous avons prélevé du lait des réservoirs de trois troupeaux différents. Pour chaque réservoir, nous avons effectué 3 prélèvements, le premier après la première traite du matin

entre 9h et 10 heures, le deuxième après la traite du soir (19h -20h) et le dernier après la traite du matin du lendemain. Ces prélèvements sont analysés par le test ELISA.

#### **IV. ESSAI VACCINAL DANS UN TROUPEAU LAITIER.**

Pour vérifier si la vaccination par un vaccin tué entraîne une séroconversion et une conversion dans le lait individuel et le lait de mélange, nous avons élaboré le protocole de vaccination expérimental suivant: une vaccination et un rappel deux semaines plus tard sont effectués sur 87 vaches séronégatives avec un vaccin inactivé contre le BVDV. Un échantillon de sérum est prélevé sur chaque vache avant la première vaccination pour déterminer le titre d'anticorps pré-vaccinal, des prélèvements de lait sont effectués toute les semaines pendant 8 semaines.

Les anticorps contre le BVDV dans le lait sont mesurés par la technique ELISA, ceux du sérum par la technique ELISA et la séroneutralisation. Pour s'assurer que l'élevage est resté indemne de toute infection au BVDV durant l'expérimentation, nous avons fait en même temps un contrôle de l'antigénémie par quatres prélèvements testés par ELISA-antigène chez tous les animaux du troupeau à  $j=0$ ,  $j=7$ ,  $j=21$ ,  $j=35$  et  $j=49$ .

#### **V-ANALYSES STATISTIQUES**

##### **1-Corrélation de Pearson.**

C'est une corrélation de deux variables entre elles, plus la corrélation est élevée, et plus elle est meilleure. Nous avons appliqué la corrélation de Pearson pour étudier l'analyse reproductibilité et de la répétabilité, la comparaison entre la technique de séroneutralisation de notre laboratoire (FMV) et la séroneutralisation du laboratoire de référence (Texas).

##### **2-Analyse de la régression linéaire.**

Elle réunit deux variables suivant une équation linéaire de type  $y=ax+b$ , ( $y$ ) est la mesure de l'ordonnée, ( $x$ ) étant celle de l'abscisse, ( $a$ ) étant la pente de la relation entre les deux valeurs et  $b$  l'intercept. Plus le  $r^2$  est élevé et plus la corrélation est bonne. Nous avons utilisé cette analyse pour déterminer la relation entre le test de séroneutralisation et l'ELISA, pour l'analyse de la DO en fonction du mode de conservation. Dans le cas où la pente de la relation est égale à zéro cela indique que la variable DO ne varie pas en fonction du temps.

### 3-Analyse d'association.

Cette analyse a été appliquée pour l'analyse de la sensibilité et spécificité de l'EI ISA: Avec l'aide du tableau de contingence, une analyse d'association permet de classer les résultats positifs et négatifs en fonction de différents seuils. Les valeurs seuils sont celles qui minimise les mauvaises classifications à la fois positives et négatives. Les seuils ont été étudié de façon systématique.

### 4- Test de X2.

Ce test a été utilisé pour examiner l'association entre la classsication obtenu par les deux tests.

### 5-Test de t pairé.

On calcule la différence pour des paires d'échantillons, la moyenne et la variation des différences sont utilisés pour le calcul. Elle a été utilisé l'étude sur quartiers, le péripartum et l'étude sur les traites individuels et de mélange.

L'hypothèse nulle est que la moyenne des différences est égal à zéro.

Comme plusieurs comparaison de paires sont nécessaire pour déterminer des différences nous avons utilisé un seuil alpha égal à 0.05 par le nombre de comparaison rendant le test plus conservateur.

### 6-Analyse de covariance.

Pour l'analyse du pourcentage de vaches fortement positives en fonction de la DO du réservoir, nous avons utilisé une analyse de covariance qui nous permet de comparer l'élévation de la courbe de régression linéaire pour les différents groupes de vaches vaccinées et non vaccinées. Dans cette anlyse, à cause de la faible taille de l'échantillon nous avons combiné les groupe vaccinée 1 fois (v1) et vaccinée deux fois (v2).

Pour toutes les analyses statistiques, nous avons utilisé les différentes composantes du logiciels SAS. Tous les seuils d'acceptation statisque sont fixés à 0.05 sauf mention contraire.

## RÉSULTATS

### I-ÉVALUATION DE L'ÉPREUVE ELISA INDIRECTE

L'épreuve de séroneutralisation de notre laboratoire a été comparée avec celle d'un laboratoire de référence sur plus de 130 échantillons. La corrélation de Pearson entre les deux mesures de test est positive et significative ( $r=0.86$ ,  $n=130$ ,  $p=0.0001$ ). La comparaison des deux techniques de séroneutralisation indique que 98% des échantillons sont classifiés de façon similaire.

#### 1-Sensibilité et spécificité.

La sensibilité et la spécificité de l'ELISA sont déterminées par comparaison à la séroneutralisation. Pour le sérum, nous avons trouvé une forte association entre les deux tests ( $\chi^2=546.2$ ,  $p=0.001$ ). La figure 1 illustre la relation de la distribution de la DO de l'ELISA-sérum en fonction des titres de séroneutralisation pour 766 échantillons. La sensibilité et la spécificité ont été maximisées de façon conjointe avec le seuil de 0.15. La valeur de sensibilité et de spécificité pour ce seuil est de 96% (Tableau 1). Pour le lait, aussi, nous avons trouvé une forte association entre les deux tests ( $\chi^2=538.5$ ,  $p=0.001$ ). La figure 2 illustre la relation de la distribution de la DO de l'ELISA-lait en fonction des titres de séroneutralisation pour 506 échantillons. La sensibilité et la spécificité ont été maximisées de façon conjointe avec le seuil suivant de 0.25. La valeur de sensibilité et de spécificité pour ce seuil est de 93% (Tableau 2).

Nous avons trouvé une forte relation positive entre la valeur de la DO de l'ELISA-sérum et celle du lait ( $F(1,469)=588.5$ ,  $p<0.0001$ ). La figure 3 illustre la relation de la DO de l'ELISA-sérum en fonction de la DO de l'ELISA-lait pour 506 échantillons.

#### 2-Vérification de la variation journalière de la DO dans le lait individuel.

Afin de vérifier si la DO du lait individuel ne change pas au cours d'une même journée, nous avons prélevé du lait de 5 vaches provenant de 5 troupeaux différents, le matin au cours d'une première traite, au cours de la traite du soir et entre les deux traites. Les tests de Wilcoxon pour échantillons appariés n'ont montré aucune différence statistique entre les

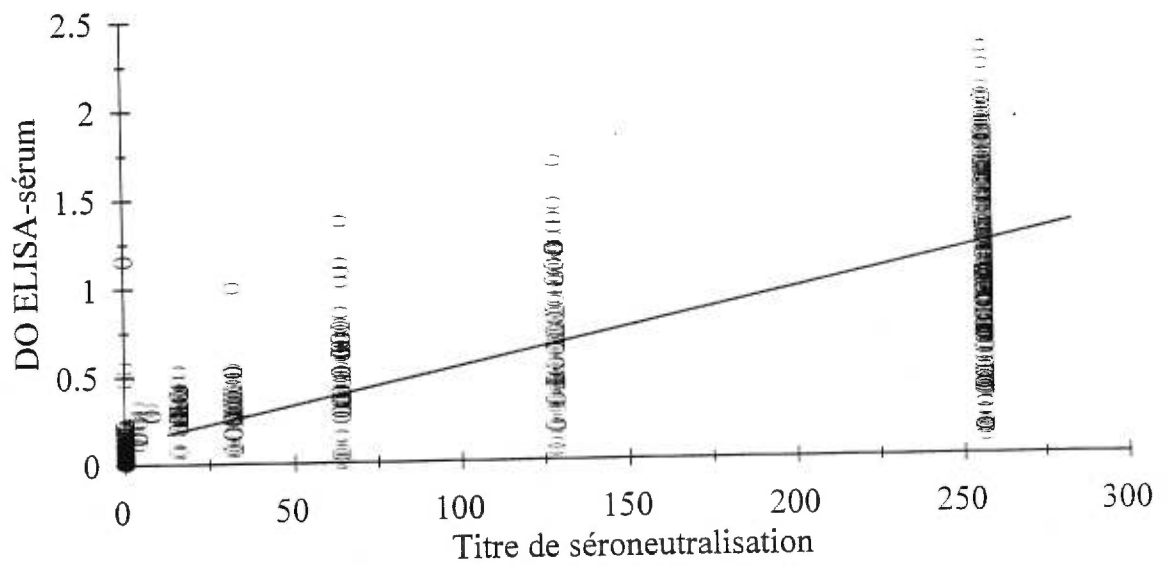


		Séroneutralisation	
		positive Titre $\geq$ 4	négative Titre $<$ 4
ELISA-sérum	positive DO $\geq$ 0.15	576	8
	négative DO $<$ 0.15	25	157

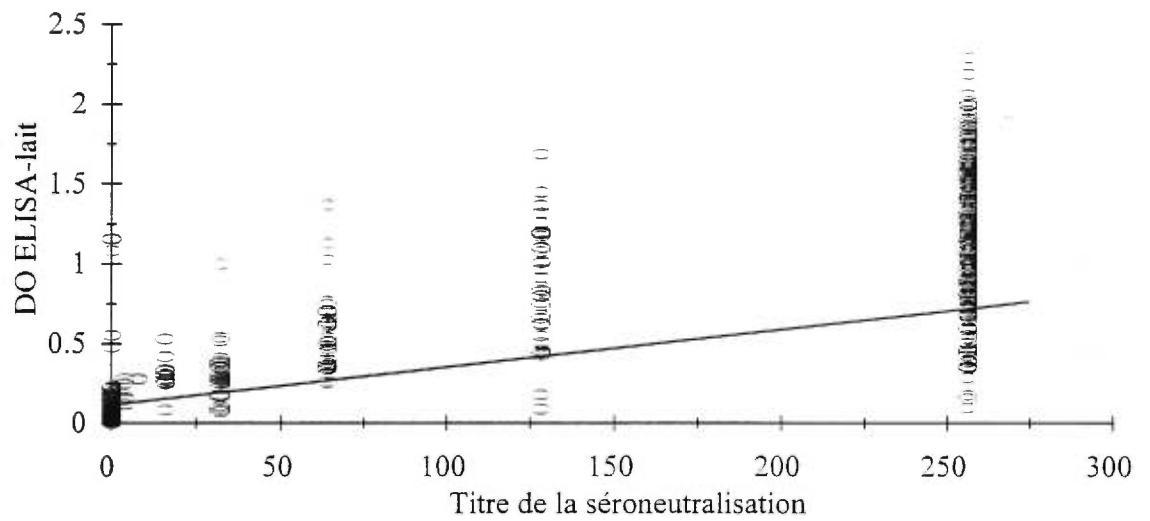
**Tableau 1.** Tableau de contingence de l'ELISA-sérum et de la séroneutralisation.

		Séroneutralisation	
		positive Titre $\geq$ 4	négative Titre $<$ 4
ELISA-lait	positive DO $\geq$ 0.25	374	7
	négative DO $<$ 0.25	28	97

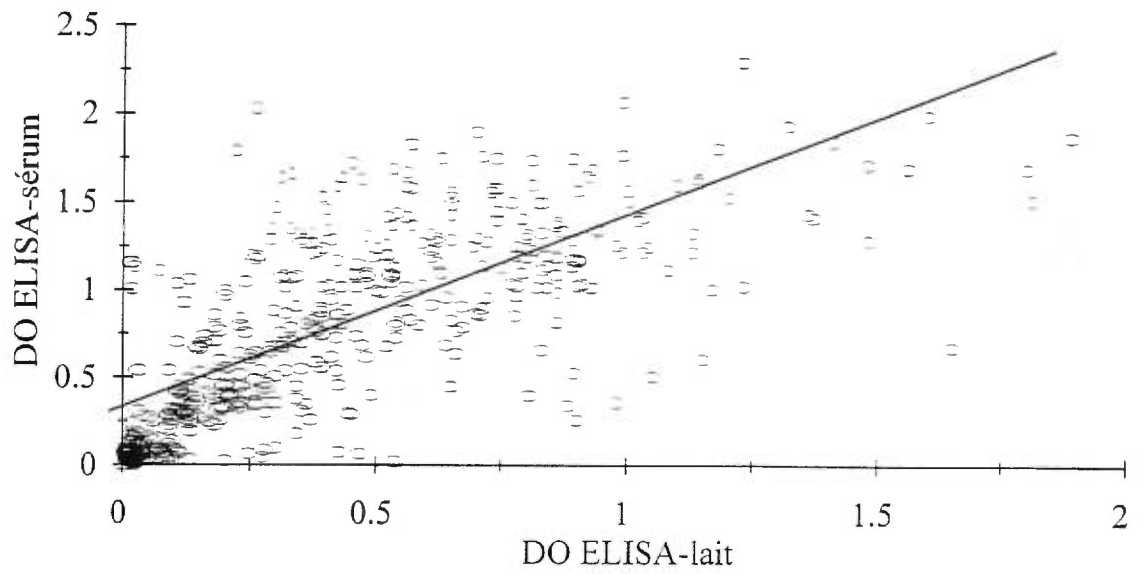
**Tableau 2.** Tableau de contingence de l'ELISA-lait et de la séroneutralisation.



**Figure 1.** Relation de la distribution de la DO de l'ELISA-sérum en fonction des titres de séroneutralisation pour 766 échantillons. La courbe de régression linéaire est illustrée ( $y = 1.099x + 0.15$ ,  $r^2 = 0.90$ ).



**Figure 2.** Relation de la distribution de la DO de l'ELISA-lait en fonction du titre de la séroneutralisation pour 506 échantillons. La courbe de régression linéaire entre les deux variables est illustrée ( $y = 1.5x + 0.5$ ,  $r^2 = 0.89$ ).



**Figure 3.** Relation de la DO de l'ELISA-sérum en fonction de la DO de l'ELISA-lait pour 506 échantillons. La courbe de régression linéaire est illustrée ( $y = 1.1x + 0.3$ ,  $r^2 = 0.56$ ).

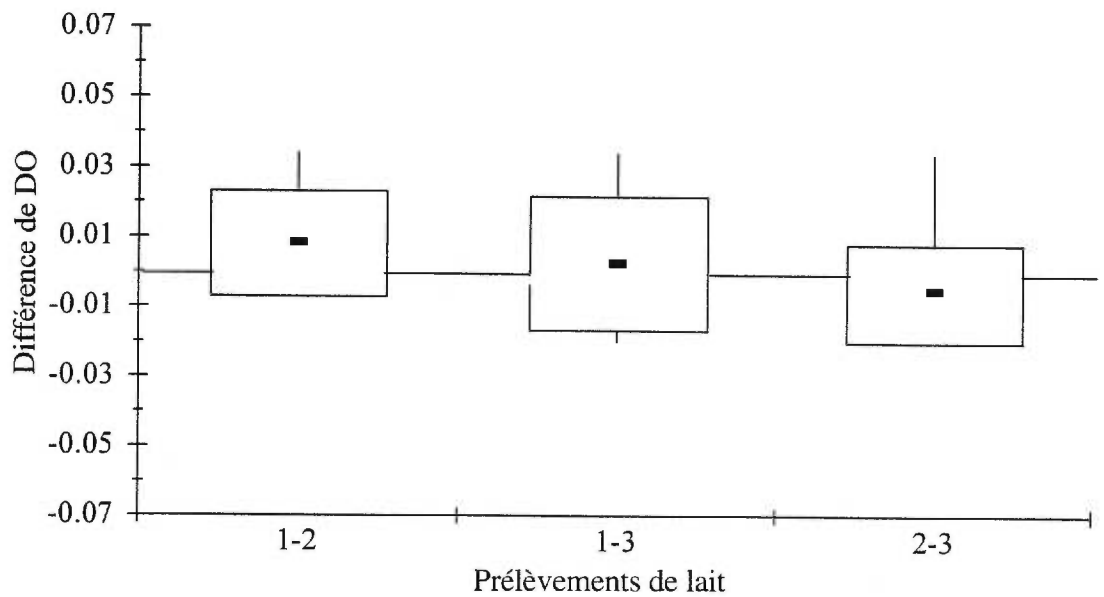
valeurs de DO des différentes traites, soit aucune variation de la DO au cours de la journée. (fig.4; comparaison traite 1 et traite 2:  $T=4.5$ ,  $p=0.5$ ; la comparaison traite 1 et traite 3:  $T=7.5$ ,  $p=1$ ; la comparaison 2 et 3:  $T=5.5$ ,  $p=0.63$ ).

### 3-Variation de la DO par quartier.

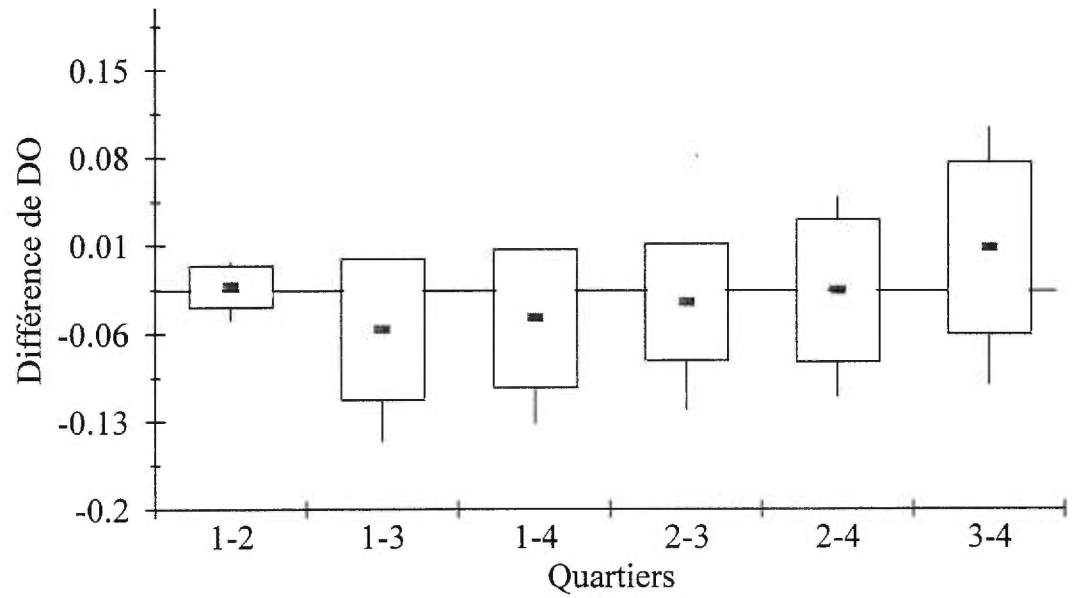
Afin de faciliter la méthode de prélèvement individuel, nous avons déterminé s'il y a une variation de la DO selon les quatre quartiers (1: avant-gauche, 2: avant-droit, 3: arrière-gauche, 4: arrière-droit) chez la même vache. Pour cela, nous avons choisi aléatoirement 6 vaches et nous avons mesuré les DO des quatre quartiers séparément de chacune des vaches. Les tests de Wilcoxon pour échantillons appariés n'ont montré aucune différence statistique entre les valeurs de DO des différents quartiers chez une même vache, (fig.5; comparaison entre les quartiers 1 et 2:  $T=0$ ,  $p=0.031$ ; comparaison entre les quartiers 1 et 3:  $T=0$ ,  $p=0.031$ ; comparaison entre les quartiers 1 et 4:  $T=3$ ,  $p=0.063$ , comparaison entre les quartiers 2 et 3:  $T=0$ ,  $p=0.031$ ; comparaison entre les quartiers 2 et 4:  $T=4$ ,  $p=0.22$ ; comparaison entre les quartiers 3 et 4:  $T=8$ ,  $p=0.69$ ). Plusieurs des comparaisons, bien que non-significatives d'un point de vue statistique, montrent tout de même des différences importantes entre certains quartiers, en particulier le quartier 1 et les trois autres. Il est à préciser qu'aucun quartier des 6 vaches n'avait de mammite clinique.

### 4-Variation de la DO selon le mode de conservation.

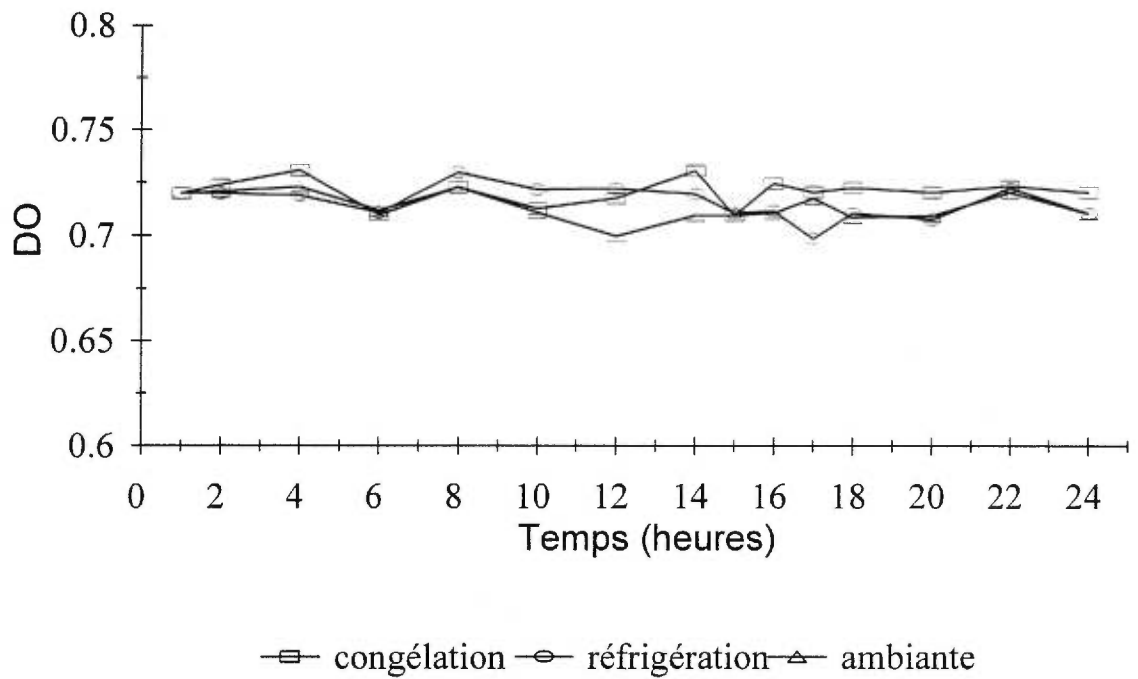
Dans le but de déterminer l'influence du mode de conservation du lait lors de son stockage dans la ferme et de son transport au laboratoire d'analyse, trois modes de conservation sont éprouvés, soit à température ambiante, à température de réfrigération ( $4^{\circ}\text{C}$ ) ou à température de congélation ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Pour cela, un prélèvement de lait à forte DO, d'environ 0.72, est analysé pendant une période de 280 heures, soit environ 4 jours. Durant la première journée, aucune différence significative entre les trois modes de conservation n'est notée par un test de régression linéaire, (congélation:  $F(1,14)=0.021$ ,  $p=0.89$ ; réfrigération  $F(1,14)=4.48$ ,  $p=0.053$ ; ambiante:  $F(1,14)=4.56$ ,  $p=0.051$ ). Une comparaison des pentes à l'aide d'un test de t n'a montré aucune différence dans la dégradation de la DO en fonction du temps entre les trois modes de conservation ( $t<1.5$ ,  $n=30$ ,  $p>0.1$ ). La figure 6 représente la variation de la DO de l'ELISA-lait (pour une moyenne de 3 échantillons) selon le mode de conservation durant les premières heures après prélèvement. Cependant, à partir de la 24<sup>ème</sup> heure, la DO du prélèvement chute



**Figure 4.** Représentation de la différence de DO du lait entre différentes combinaisons de prélèvements de lait (1: prélèvement du matin, 2: prélèvement au milieu de la journée, 3:prélèvement du soir) chez 5 vaches sur une période de 24 heures. La moyenne des différences est illustrée par le point. La boîte inclue la moyenne plus ou moins un écart-type. Les barres sortant de la boîte rejoignent le maximum et le minimum de la distribution.



**Figure 5.** Représentation de la différence de DO du lait pour différentes combinaisons de quartiers (1: avant-gauche, 2: avant-droit, 3: arrière-gauche, 4: arrière-droit) chez 6 vaches. La moyenne des différences est illustrée par le point. La boîte inclue la moyenne plus ou moins un écart-type. Les barres sortant de la boîte rejoignent le maximum et le minimum de la distribution.



**Figure 6.** Variation de la DO selon le mode de conservation (congélation, réfrigération, et température ambiante) durant les 24 premières heures après prélèvement.



pour les trois modes de conservation (congélation:  $F(1,24)=166.89$ ,  $p=0.0001$ ; réfrigération  $F(1,24)=393.35$ ,  $p=0.0001$ ; ambiante:  $F(1,24)=333.50$ ,  $p=0.0001$ ). Une comparaison des pentes à l'aide d'un test de t montre une différence de dégradation dans les trois modes de conservation ( $t>8.6$ ,  $n=50$ ,  $p<0.001$ ). La dégradation la plus importante a été observée pour la température ambiante, alors que celles des deux prélèvements, réfrigéré et congelé, se maintiennent à la DO de base d'environ 0.72 durant les quatre jours. La figure 7 représente la variation de la DO de l'ELISA-lait (pour une moyenne de 3 échantillons) selon le mode de conservation durant les 280 premières heures après prélèvement. La différence entre la réfrigération et la congélation n'est pas significative durant les 4 jours, cependant la congélation demeure le mode de conservation idéal à long terme.

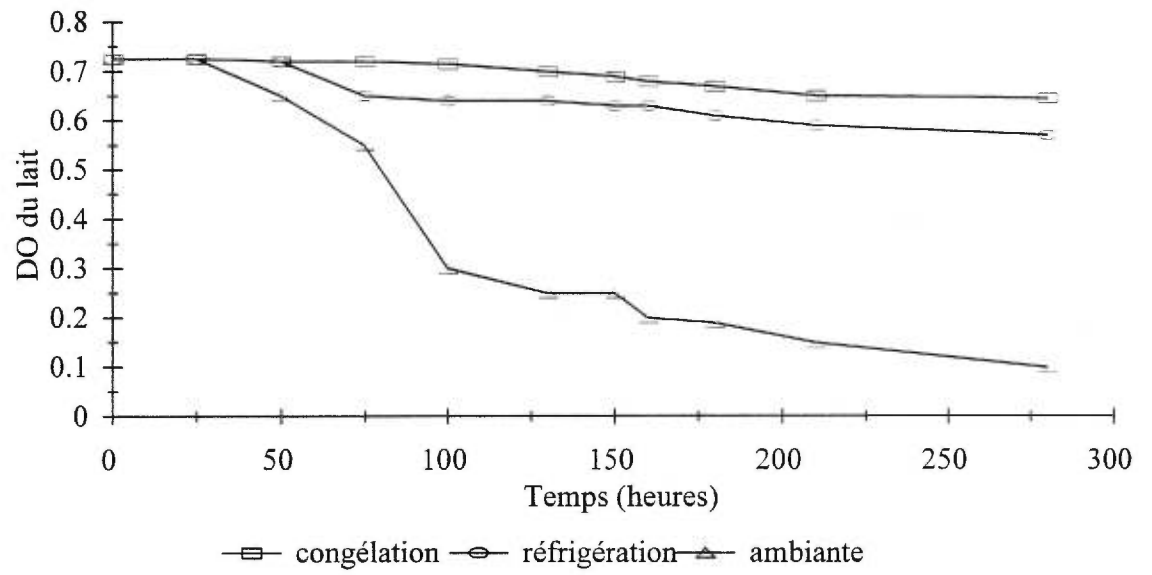
#### 5-Dilution en laboratoire.

La dilution en laboratoire d'un lait positif avec un lait de contrôle négatif simule la dilution des laits de vaches positives une fois mélangé avec d'autres laits négatifs dans le même réservoir.

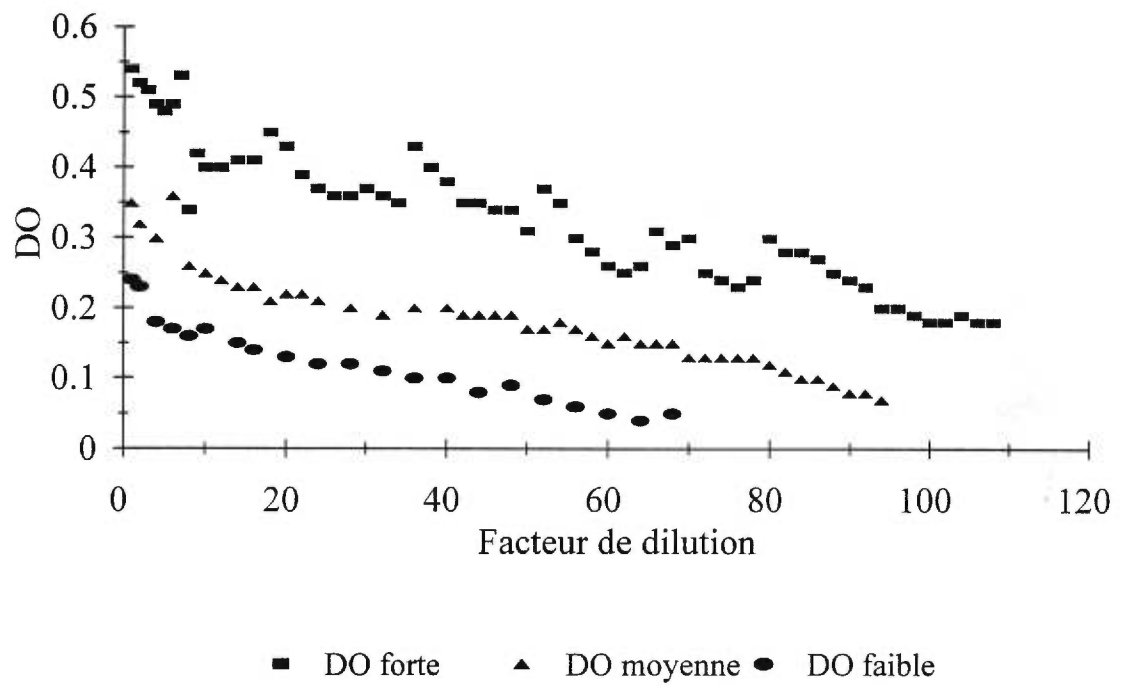
Pour cela, nous avons pris du lait positif que nous avons dilué avec un lait négatif. Les résultats de la figure 8 montrent une représentation moyenne du même échantillon répété trois fois. On remarque qu'un mélange d'un volume de lait hautement positif avec 60 volumes de lait négatif donne une DO supérieure au seuil de positivité individuel qui est de 0.25.

#### 6-Influence de la parturition sur le taux d'anticorps dans le lait individuel.

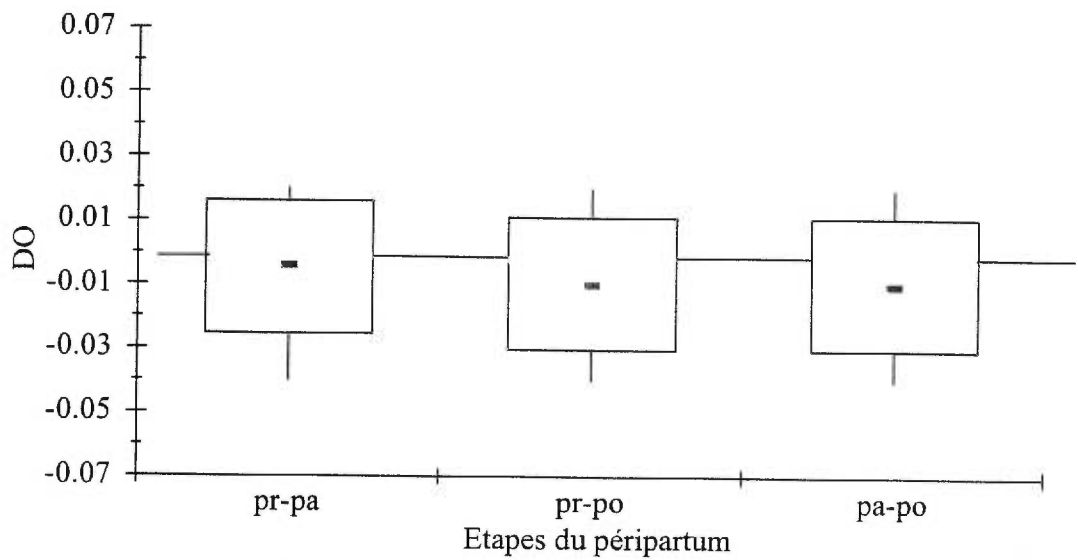
Théoriquement, la production laitière des vaches parturientes n'est pas incorporée au lait de mélange, cependant, en pratique, certaines exploitations risquent de l'inclure. Pour cette raison, nous avons étudié d'une manière globale la variation de la DO sur 6 vaches 24 heures en pré-partum et 24 heures en post-partum par rapport au moment du partum. Les tests de Wilcoxon pour échantillons pairés n'ont montré aucune différence statistique entre les valeurs de DO de ces différents stades de reproduction. (fig.9; comparaison entre le pré-partum et le partum:  $T=8.5$ ,  $p=0.75$ ; comparaison entre le pré-partum et le post-partum:  $T=5$ ,  $p=0.34$ ; comparaison entre le partum et le post-partum:  $T=5$ ,  $p=0.34$ ).



**Figure 7.** Variation de la DO du lait selon le mode de conservation (congélation, réfrigération, et température ambiante) durant les 280 premières heures après prélèvement.



**Figure 8.** Variation de la DO dans le lait en fonction de la dilution en laboratoire pour trois échantillons de lait à DO initiales différentes (DO forte équivalente à 0.54, DO moyenne équivalente à 0.35, DO faible à 0.24).



**Figure 9.** Représentaion de la différence de DO du lait pour différentes combinaisons d'étapes du péri-partum (pr:pré-partum, pa:partum, po:post-partum) chez 6 vaches. La moyenne des différences est illustrée par le point. La boîte inclue la moyenne plus ou moins un écart-type. Les barres sortant de la boîte rejoignent le maximum et le minimum de la distribution.

## II- VALIDATION DE L'ÉPREUVE ELISA DANS LE LAIT DE MÉLANGE

1- Relation entre le pourcentage de vaches fortement positives à la séroneutralisation dans un troupeau et la DO du réservoir à lait.

Des prélèvements de 12 réservoirs à lait de 12 troupeaux de 3 statuts vaccinaux différents, dont 3 sont non vaccinés, 4 vaccinés une fois par an et 5 vaccinés deux fois par an, sont effectués et analysés par le test ELISA. Pour l'ensemble des trois groupes, nous avons trouvé une relation positive et très significative entre le pourcentage de vaches fortement positives et la DO du réservoir (fig.10;  $F(1,10)=40.33$ ,  $p<0.0001$ ). Nous avons regroupé les deux groupes vaccinés (v1 et v2) et non vaccinés (nv) et à l'aide d'une analyse de covariance, nous avons comparé l'élévation de la relation du groupe vacciné et celui non vacciné. L'analyse démontre un faible effet non significatif entre les groupes ( $F(1,9)=4.04$ ,  $p=0.075$ ). La tendance va dans la direction d'un plus fort pourcentage de vaches fortement positives chez les fermes vaccinées en comparaison avec les fermes non vaccinées.

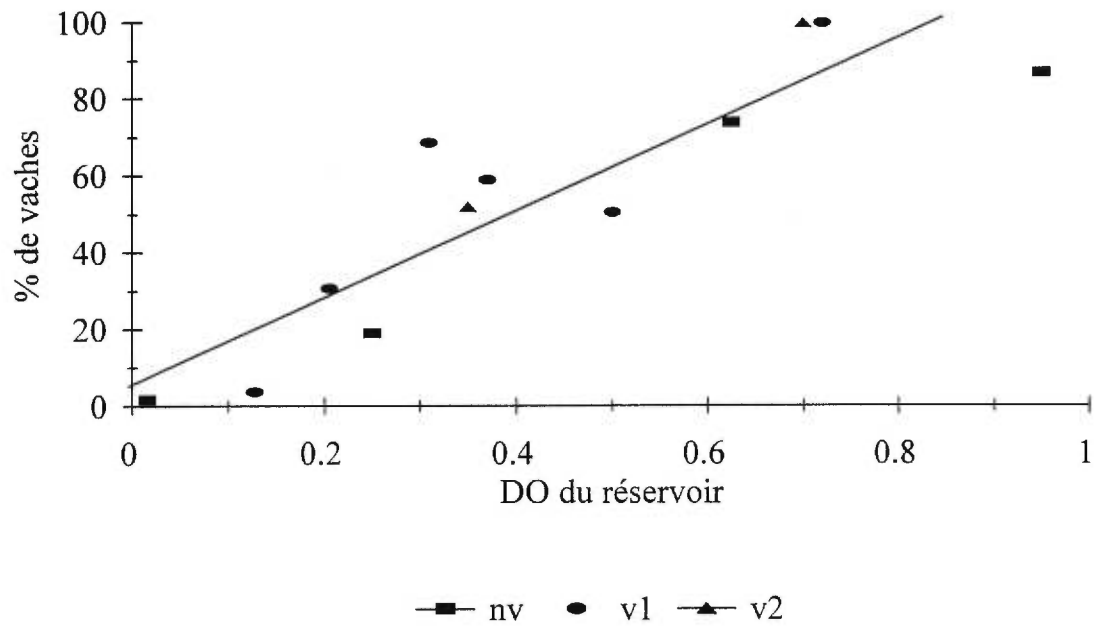
2-Vérification de la variation journalière de la DO dans le lait de mélange.

Afin de nous assurer que la DO du mélange au cours d'une même journée ne change pas, nous avons prélevé du lait des réservoirs de trois troupeaux différents. Pour chaque réservoir, à l'heure où le réservoir était vide, nous avons effectué 3 prélèvements, le premier après la première traite du matin (9-10 heures), le deuxième après la traite du soir (19-20 heures) et le dernier après la traite du matin du lendemain. Les tests de Wilcoxon pour échantillons appariés n'ont montré aucune différence statistique entre les valeurs de DO des différentes traites, ce qui n'indique aucune variation de la DO au cours de la journée (fig. 11; comparaison traite 1 et traite 2:  $T=1$ ,  $p=0.5$ ; comparaison traite 1 et traite 3:  $T=1.5$ ,  $p=0.75$ ; comparaison traite 2 et traite 3:  $T=1.5$ ,  $p=0.75$ ).

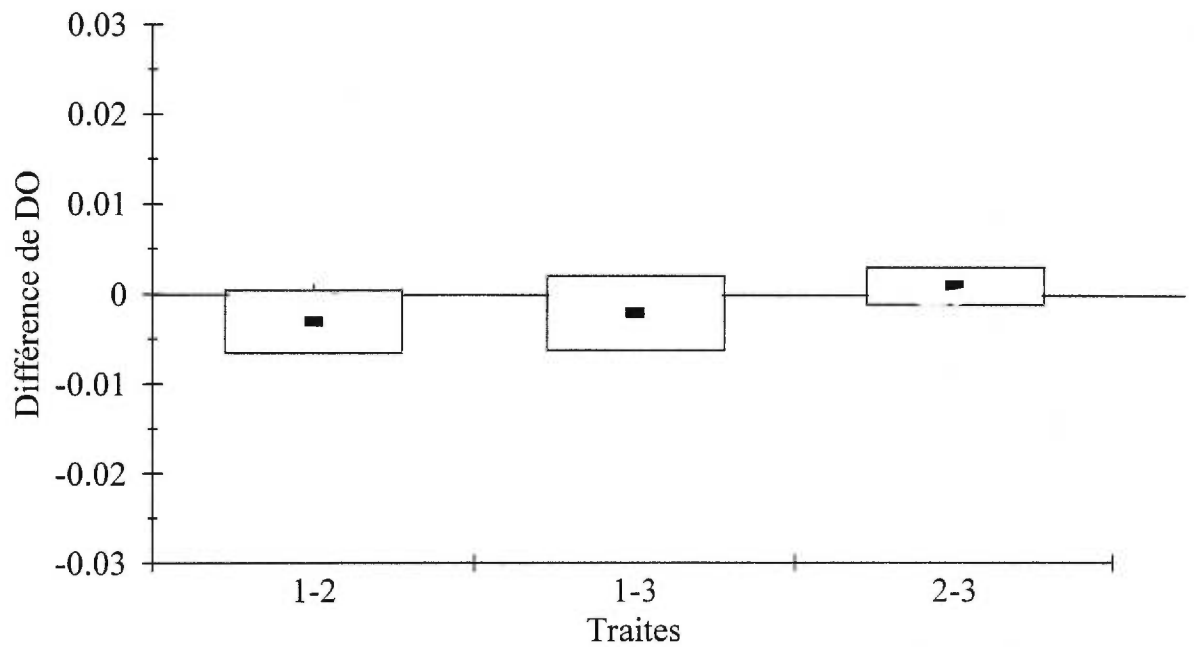
## III-ESSAI VACCINAL DANS UN TROUPEAU LAITIER

1-Essai vaccinal dans un troupeau laitier.

Pour vérifier si la vaccination par un vaccin tué entraîne une séroneutralisation et une conversion dans le lait individuel et le lait de mélange, nous avons élaboré le protocole de vaccination expérimental suivant: une vaccination et un rappel deux semaines plus tard sont effectués sur 87 vaches séronégatives avec un vaccin inactivé contre le BVDV. Un échantillon de sérum est prélevé sur chaque vache avant la première vaccination pour



**Figure 10.** Relation entre le pourcentage de vaches fortement positives à la séroneutralisation et la DO du réservoir à lait dans les trois groupes de fermes (nv: fermes non vaccinées, v1: fermes vaccinées 1 fois par an, v2: fermes vaccinées 2 fois par an). La courbe de régression linéaire pour l'ensemble des trois groupes de fermes est illustrée ( $y=112.1x+6.63$ ,  $r^2=0.80$ ).



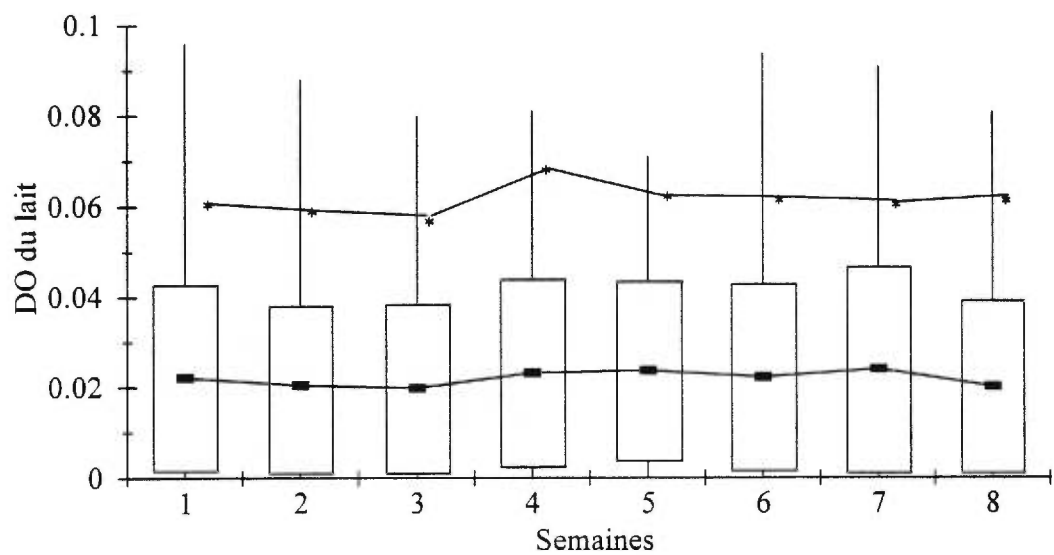
**Figure 11.** Représentation de la différence de DO du lait pour différentes combinaisons de traites (1:traite du matin, 2: traite en milieu de journée, 3: traite du soir) dans 3 réservoirs à lait sur une période de 24 heures. La moyenne des différences est illustrée par le point. La boîte inclue la moyenne plus ou moins l'écart-type. Les barres sortant de la boîte rejoignent le maximum et le minimum de la distribution.

déterminer le titre d'anticorps pré-vaccinal, des prélèvements de lait sont effectués toute les semaines pendant 8 semaines.

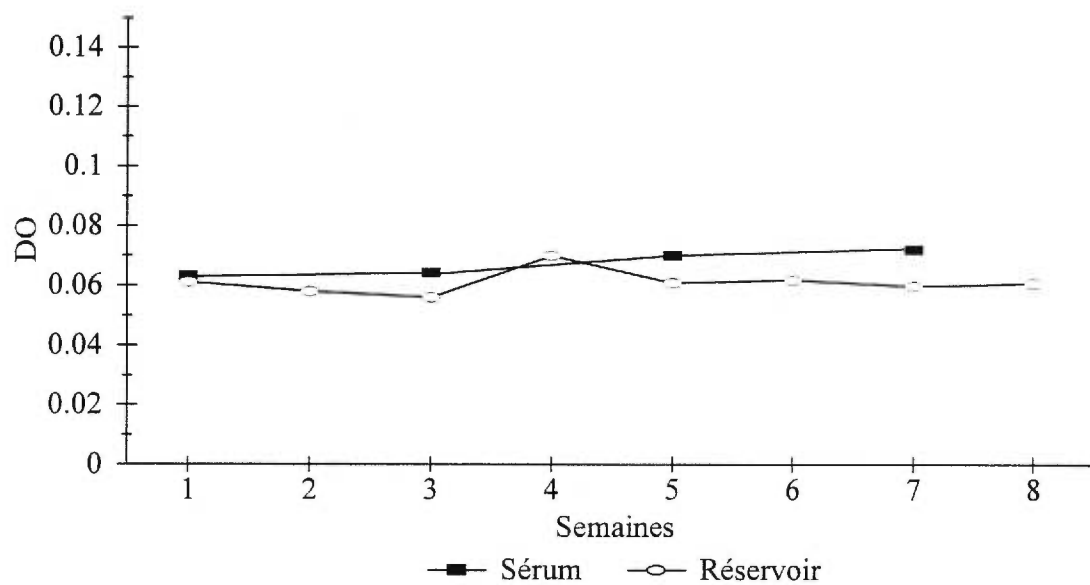
Les anticorps contre le BVDV dans le lait sont déterminés par la technique ELISA, ceux du sérum par la technique ELISA et la séroneutralisation. Pour s'assurer que l'élevage est resté indemne de toute infection au BVDV durant l'expérimentation, nous avons fait en même temps un contrôle de l'antigénémie par quatre prélèvements testés par ELISA-antigène chez tous les animaux du troupeau à  $j=0$ ,  $j=7$ ,  $j=21$ ,  $j=35$  et  $j=49$ .

Les résultats de cette expérience sont représentés pour les réponses vaccinales dans le lait individuel (fig.12) et pour la réponse vaccinale dans le lait de mélange (fig.13). La représentation de l'évolution du réservoir à lait est représenté dans la (fig.12) et (fig.13). Autant pour le lait de réservoir que pour le lait individuel, aucune relation n'est observée entre la DO et le temps (lait individuel:  $F(1,607)=0.021$ ,  $p=0.88$ ; lait du réservoir:  $F(1,5)=0.0$ ,  $p=0.99$ ). Par ailleurs, nous n'avons observé aucune relation entre la valeur de DO dans le réservoir et la moyenne de la DO des laits et des sérums des 87 individus ( $r=-0.46$ ,  $n=7$ ,  $p=0.30$ ;  $r=-0.37$ ,  $n=4$ ,  $p=0.22$ ). Les réponses vaccinales dans le lait individuel et dans le lait de mélange sont non significatives.





**Figure 12.** Variation et relation entre la DO de laits individuels de 87 échantillons du troupeau laitier fermé et la DO du réservoir à lait pendant 8 semaines suite à la vaccination (vaccination à la première semaine avec un rappel à la 3<sup>ème</sup> semaines) par un vaccin tué. La moyenne des différences est illustrée par le point. La boîte inclue la moyenne plus ou moins un écart-type. Les barres sortant de la boîte rejoignent le maximum et le minimum de la distribution. La courbe joignant les étoiles illustre la fluctuation de la DO dans le réservoir à lait.



**Figure 13.** Variation de la DO du lait du réservoir et du serum (moyenne des 87 échantillons pendant 8 semaines) du troupeau laitier fermé suites à la vaccination (vaccination à la première semaine avec un rappel à la 3<sup>ème</sup> semaines) par un vaccin tué.

## DISCUSSION

L'épreuve de séroneutralisation de notre laboratoire comparée avec celle du laboratoire de référence montre une corrélation de Pearson positive et significative ( $r^2=0.86$ ,  $n=130$ ,  $p=0.0001$ ). La comparaison des deux techniques de séroneutralisation indique que 98% des échantillons sont classifiés de façon similaire. Notre test de séroneutralisation peut être considéré comme un golden-test.

L'ELISA indirect, que nous avons développé, se révèle hautement spécifique et sensible dans le sérum et dans le lait pour détecter des individus ayant un titre d'anticorps supérieur ou égal à 1:4 à la SN. Le coefficient de corrélation 0.90 indique une très bonne relation de l'ELISA-sérum et du test de référence (SN). Le seuil de positivité de 0.25 pour distinguer les laits individuels en positifs et en négatifs est retenu; ce seuil est le plus approprié avec le titre de référence de séroneutralisation de 1:4. Le coefficient de corrélation de 0.89 entre l'ELISA-lait est le test de référence signifie une très bonne relation. Le seuil de positivité du sérum retenu de 0.15 est plus faible que celui du lait de 0.25, cette différence est normale car le taux d'anticorps dans le lait est plus faible que celui dans le sérum (Florent *et al*, 1988; Mammerickx *et al*, 1985). Le coefficient de corrélation de 0.56, entre le sérum et le lait est moins bon cela signifie que la technique devrait être améliorée pour éviter les variations. Cependant, le prélèvement de lait peut remplacer celui du sérum vu leurs bonnes corrélations au test de référence. Il faut signaler que l'utilisation de la technique ELISA-lait pour le diagnostic individuel à la place de l'ELISA-sérum apporterait un élément de commodité et d'efficacité appréciable tout en diminuant les coûts à l'éleveur. Les échantillons de lait sont plus faciles à collecter et surtout plus économiques que le sang, même si la concentration du taux d'immunoglobulines dans le lait est plus faible que celle dans le sérum.

Par ailleurs, nous n'avons pas noté de fluctuation de DO chez l'individu à différentes heures de la journée. Aucune différence statistiquement significative entre les différentes traites chez la même vache n'est observée. Des résultats similaires dans le cas d'autres maladies virales ont été observés. Klintevalls (1991) a démontré, pour le cas de la Leucose Bovine, que le taux d'anticorps au cours de la journée est le même. Il s'ensuit que le prélèvement chez la vache peut avoir lieu à n'importe quel moment de la journée. De même, au niveau du réservoir à lait, nous n'avons pas observé de fluctuation de la DO lors des prélèvements pendant 24 heures. Le prélèvement du lait de mélange peut avoir lieu à n'importe quel moment après la traite pourvu que la plupart des animaux en lactation soit

représentée. Si dans un troupeau, les vaches en lactation ne sont pas majoritaires, la valeur du test risque d'être sérieusement compromise, d'où la nécessité de le répéter lorsque la majorité est en lactation. Un brassage du lait du réservoir pendant 5 minutes avant le prélèvement est nécessaire.

Après avoir testé à l'ELISA des échantillons de lait provenant des quatre quartiers sur plusieurs vaches nous n'avons observé aucune différence de DO par quartier. On peut en déduire que le prélèvement d'un quartier est représentatif des autres et que les quartiers ont sensiblement le même taux d'anticorps chacun. Ces résultats sont conformes à ceux de Mammericks *et al.* (1985) qui ont démontré, dans le cas de la Leucose Bovine, que le taux d'anticorps du lait est le même quelque soit le quartier de la mamelle. Cependant, plusieurs des comparaisons, bien que non-significatives, d'un point de vue statistique, montrent tout de même des différences importantes entre certains quartiers, en particulier le quartier I (avant-droit) et les trois autres. De plus, les vaches utilisées dans notre expérience n'avaient pas de mammites cliniques (les mammites sub-cliniques n'ont pas été vérifiées). Il se pourrait que cette pathologie influence le taux d'anticorps dans le lait. Il est donc souhaitable, pour plus de précaution, que le prélèvement se fasse sur les quartiers sains avec des proportions équivalentes de lait prélevé. Si l'on est dans l'impossibilité de prendre les quatre quartiers en même temps, un seul quartier prélevé peut être suffisant.

D'autre part, il n'y a pas de risque d'erreur lié à la conservation et au transport les premiers 24 heures. Durant la première journée, après prélèvement, le type de conservation ne rentre pas en considération. Le prélèvement de lait peut être acheminé au laboratoire réfrigéré, congelé, ou à la température maximale de 28°C sans subir de modification. Après la première journée de prélèvement, dans la ferme ou dans le laboratoire, le prélèvement doit être réfrigéré. On peut le laisser réfrigéré presque 50 heures, soit un peu plus de deux jours. Si dans la ferme, ou dans le laboratoire on désire conserver le prélèvement plus de deux jours, l'idéal serait de le conserver à la température de congélation (- 20°C). Le lait, laissé plus de 24 heures à température ambiante ou plus de 50 heures à température de réfrigération, subit une chute du taux d'anticorps lié sans doute à une protéolyse bactérienne ou mycosique.

De même, nous n'avons pas observé de fluctuation journalière en relation avec les périodes les plus critiques du péri-partum (soit 24 heures avant le partum, et 24 heures après). Nos résultats nous indiquent une bonne stabilité du taux d'anticorps. Il est possible, si l'éleveur le désire, d'incorporer le lait de vaches parturiantes dans le lait de mélange.

Dans le souci de comprendre le comportement des anticorps dans le réservoir à lait, la dilution du lait en laboratoire constitue une simulation de ce qui se passe dans le lait de mélange. Ainsi, plusieurs laits provenant d'élevages différents à forte, moyenne et faible DO ont été étudiés. Ces laits provenant de vaches différentes et contenant des anticorps du BVDV à taux différents ont été dilués dans des quantités de lait croissantes indemnes d'anticorps. Leurs réponses en DO ont été analysées par le test ELISA.

En prenant comme seuil de positivité celui du lait individuel, soit 0.25, on est capable de mettre en évidence une vache hautement positive, de DO de 0.75, dans un troupeau d'une soixantaine de vaches négatives, la moyenne des têtes par troupeau au Québec étant 45. La finalité d'une telle simulation n'est pas de détecter une vache positive dans un réservoir à lait d'une ferme, mais d'évaluer notre seuil de positivité optimal et d'estimer le comportement d'un lait positif au sein d'un lait de mélange. Toute tentative de modélisation du réservoir, par la procédure de dilution, peut s'avérer très compliquée voire impossible car liée à la diversité des facteurs tels la variation de la quantité de lait par vache dans le réservoir, le facteur lié à la vaccination, celui lié au stress, le facteur saisonnier, le facteur alimentaire ou d'autres facteurs. La variation de ces facteurs sont multiples et la composition d'une grille proposée serait toujours insatisfaisante. Un modèle théorique est difficilement transposable à la réalité.

Un des objectifs importants était de déterminer la corrélation entre la prévalence des vaches fortement séropositives à la séroneutralisation et le taux d'anticorps dans le réservoir de 12 troupeaux de différents statuts vaccinaux. Le test ELISA a montré une bonne corrélation ( $r^2=0.80$ ) entre la séropositivité individuelle à la SN et celle du lait de mélange de 12 troupeaux dont 3 sont non-vaccinés, 4 vaccinés une fois par an et 5 deux fois par an. Quelque soit le statut vaccinal, la DO du réservoir augmente avec la prévalence de vaches positives. Cela implique que la vaccination par un vaccin tué ne perturbe pas de manière importante cette bonne corrélation de la DO avec la prévalence des vaches positives. Nous avons tout de même noté, un faible effet non significatif entre les groupes de fermes vaccinées réunies et ceux de fermes non vaccinées. Les groupes vaccinés ont tendance à avoir un plus fort pourcentage de vaches fortement positives en comparaison aux non vaccinés. Cependant, nous ne connaissons pas les antécédents infectieux au BVDV de ces troupeaux et le nombre de fermes n'est pas grand.

Pour répondre à ces lacunes, nous avons choisi un troupeau de 87 vaches séronégatives, qui n'ont aucun antécédent infectieux au BVDV, pour vérifier si la vaccination par un vaccin tué entraîne une séroconversion et une conversion dans le lait individuel et de mélange. Dans cet essai de vaccination, nous considérons le troupeau vacciné comme

fermé. Plus de 90% des vaches de ce troupeau sont séronégatives (les 10% restant, étant faiblement positives, ont été éliminées de l'expérimentation). Par ailleurs, aucune contamination du BVDV venu de l'extérieur, suite à l'introduction de nouveaux sujets dans l'exploitation, n'a eu lieu. Un contrôle tout les 15 jours de l'antigénémie le démontre. On peut aussi affirmer l'inexistence d'animaux immunotolérants et infectés dans cette exploitation. Les résultats de cette étude montrent essentiellement que la conversion des anticorps dans le lait est négligeable pour un vaccin inactivé. La variation de la DO pour le lait individuel, comme pour le lait de réservoir, n'est pas significative après vaccination et rappel. Dans le sérum, huit semaines après le rappel, il s'avère que sur les 87 vaches, 5 (soit 5.6%) sont devenues positives à l'ELISA. Par ailleurs, nous n'avons observé aucune relation entre la valeur de DO dans le réservoir et la moyenne de la DO des laits et des sérums des 87 individus. Cet essai nous montre que le risque de variation du taux d'anticorps, lié à une vaccination par un vaccin tué, sur le lait individuel et de mélange, est faible durant les 8 semaines après rappel. Cela est vrai, à plus forte raison, au cours des rappels des années suivantes. Ce qui démontre que la vaccination par un vaccin tué ne fausse pas fondamentalement un suivi par le réservoir.

On en déduit que deux prélèvements du réservoir de troupeaux vaccinés par un vaccin tué, séparés par une période de temps, montrant une augmentation de la DO, signifie la présence d'une infection active (présence d'individus en primo-infection, ou d'individus immuno-tolérants).

Deux tests ELISA sur le lait de mélange, séparés par une période de temps, permettent alors d'identifier la très grande majorité des exploitations qui auraient changé de statut.

Cette méthode deviendrait une méthode de surveillance du BVDV, révélant le statut du troupeau ainsi que l'estimation de l'incidence d'exposition. Une augmentation de la DO signifierait la présence d'une infection active. Une chute de la DO signifierait la disparition d'une infection active. La périodicité des prélèvements devrait être déterminée sur des critères scientifiques et économiques.

## I-CONTRAINTE ET POSSIBILITÉS D'AMELIORATION

Comme le souligne Forscher *et al* (1989), le test sur le réservoir à lait est très efficace et très pratique surtout pour de larges études épidémiologiques, mais perd de l'efficacité avec l'augmentation de la taille du troupeau. Plus la taille du troupeau est grande, plus le risque de ne pas mettre en évidence les infectés est grand.

Cela a été démontré pour le cas de la Leucose Bovine et cela serait vrai pour tout virus infectieux notamment le BVDV. L'influence de la taille du troupeau dans le cas de la Leucose Bovine est valable quand le troupeau dépasse 100 vaches. Le risque d'erreur par défaut est possible. De même, il est clair que les troupeaux faiblement infectés ou dans lesquelles certaines vaches n'excrétant qu'une faible quantité d'anticorps risquent d'échapper au contrôle par le réservoir à lait. Par ailleurs, l'application de l'ELISA au niveau des échantillons de lait individuel peut entraîner des fausses réactions, surtout s'il s'agit d'un lait provenant d'une vache ayant une mammite, produisant du colostrum ou tout simplement une fausse réaction qui peut être causée au laboratoire sur un lait mal conservé ou mal écrémé. Un lait contenant un fort taux d'IgG pourrait aussi entraîner une fausse réaction positive; cela a été démontré pour le sérum.

C'est la raison pour laquelle il est nécessaire d'optimiser les conditions d'utilisation. Un test ELISA plus sensible et plus spécifique peut être développé en sélectionnant des types d'antigènes plus variés (notamment provenant de plusieurs souches), et surtout en améliorant la purification de ces antigènes. Des antigènes mal purifiés contiennent toujours un excès de macromolécules provenant de cellules hôtes et se mettant en compétition avec les antigènes spécifiques. La pureté de la préparation de l'antigène est extrêmement importante pour la précision et la reproductibilité du test. Cela est particulièrement vrai quand les antigènes viraux sont utilisés. Les cellules hôtes B.T., utilisées pour la production virale, peuvent même être légèrement contaminées par d'autres micro-organismes tels les mycoplasmes ou surtout d'autres virus BVDV non-cytopathogènes. Cela pourrait avoir pour conséquence des réactions faussement positives.

Par ailleurs, l'amélioration de la sensibilité peut être appliquée au prélèvements de lait et réalisée par la technique de concentration des immunoglobulines du lactosérum. L'amélioration du dépistage de la Leucose Bovine par le test ELISA appliqué au lactosérum concentré du réservoir pourrait constituer un modèle pour le BVDV. On peut sans doute recommander dès maintenant son emploi pour le BVDV. La technique de concentration des immunoglobulines du lactosérum par le sulfate d'ammonium améliore les performances du test ELISA appliqué au lait de mélange dans le cas de la Leucose Bovine et de l'IBR. Cette technique rend plus efficace le dépistage de l'infection des troupeaux faiblement infectés, notamment des grands troupeaux.

## CONCLUSION

Un test ELISA indirect mettant en évidence, dans le lait et dans le sérum, les anticorps contre le BVDV a été élaboré. Une excellente corrélation entre le taux d'anticorps dans le sérum et dans le lait individuel par rapport au test de référence de séroneutralisation a été établie.

Le prélèvement chez la vache ou dans le réservoir peut avoir lieu à n'importe quel moment de la journée. Le prélèvement d'un quartier de la mamelle est représentatif des autres. Le péri-partum ne modifie la DO dans le lait. Nous n'avons trouvé aucun effet significatif du mode de conservation des échantillons de lait durant les premières 24 heures. La réfrigération est possible pendant 50 heures. Au delà de deux jours, le prélèvement est à conserver à la température de congélation (- 20°C).

Une bonne relation entre la DO d'un échantillon du réservoir à lait de troupeaux de statuts vaccinaux différents et le pourcentage de vaches fortement positives à la SN a été observée. Une vaccination a été établie sur un troupeau laitier séronégatif afin de suivre la séroconversion et la conversion dans le lait. Les résultats de cette expérience dans le lait individuel et pour le lait de mélange ont démontré que la vaccination avec un vaccin tué n'est pas un facteur perturbateur du taux d'anticorps. Les réponses vaccinales dans le lait individuel et dans le lait de mélange sont non significatives.

L'application d'un programme de contrôle du BVDV à l'échelle du Québec, sans être en opposition avec l'utilisation d'un vaccin tué, est possible. Il paraît par conséquent possible de recommander l'emploi du test ELISA pour le dépistage systématique de l'infection par le BVDV dans une population vaccinée par un vaccin tué, comme on le fait déjà pour la population non vaccinée. Ce dépistage sera essentiellement basé sur l'élimination des immunotolérants dans les troupeaux laitiers. Il a en outre, l'avantage d'être peu coûteux, très méthodique et de ne pas faire appel au prise de sang.



**BIBLIOGRAPHIE**

- Alenius, S. et Jacobson, S.** 1986. Proceeding of 14 th world congress on disease cattle Dublin, Ireland, 204-207.
- Bistch, V. et Houe, H.** 1995. Control of bovine viral diarrhea virus infection without vaccines. *Vet. Clin. Of North America: Food animal practice.* **11**: 26-29.
- Bittle, J.L.** 1968. Vaccination for bovine diarrhea-mucosal disease. *J. AM. Vet. Med. Assoc.* **152**:861-865.
- Blood, D.C.** 1983. *Veterinary medicine.* Baillière Tindall, London , 6th ed., 754-761.
- Bock, R.E.** 1986. Developpement of an ELISA for detection of bovine serum antibody to BVDV. *Aust. Vet. J.* **63**: 406-408.
- Bolin, S.R. Mc Clurkin Cutlip R.C. et Coria M.F.** 1985. Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus to vaccination for bovine viral diarrhea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am.J.vet. Res.* **46**: 2467-2470.
- Bolin, S.R.** 1990. Control of bovine virus diarrhea virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **9**:163-171.
- Bolin, S.R.** 1991. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhea viruses in a vaccinated herd. *Am. J. Vet. Res.* **52**:1033-1037.
- Bolin, S.R. et Ridpath, J.F.** 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.* **53**:2157-2201.
- 
- Bolin, S.R.** 1995. Control of bovine diarrhea infection by use of vaccination. *Veterinary clinics of North America, food animal practice.* **11**(3): 615-25.

- Boye, M. Kamstrup, S. et Daalsgard, K.** 1991. Specific sequence amplification of bovine virus diarrhea (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. *Vet. Microbiol.* **29**: 1-13.
- Brock, K.V.** 1991. Detection of persistent bovine viral diarrhea infections by DNA hybridization and polymerase chain reaction assay. *Arch. Virol.* **S3**:199-208.
- Brownlie, J.** 1985. Clinical aspects of the bovine virus diarrhea / mucosal diseases in cattle. In *Pract.*, **7**: 195-202.
- Carlsson,** 1991. Protective effect of an iscoms bovine diarrhea virus (BVDV) vaccines against an experimental BVDV infections in vaccinated and non-vaccinated pregnant ewes. *Vaccine* **9**:577-582.
- Chu, H. J. et Zee Y.C.** 1985. ELISA for detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus sera. *Vet. Microbiol.* **10**: 325-333.
- Clark, F.R.** 1968. Immunologic aspects of mucosal disease. *Mod. Vet. Pract.* **49**:38-43.
- Collet, M.S., Larson Gold, R., Strick, C., Anderson, D., DK Purchio, A.F. et al .** 1988. Proteins encoded bovine virus diarrhea virus: the genomic organisation of pestivirus. *Virology*, **165**: 200-208.
- Corapi, W.V et Elliot, R.D.** 1989. Severe thrombocytopenia in young calves infected with noncytopathic BVDV. *J. Virol.* **63**:34-39.
- Corapi, W.V., Elliot, R.D., French T.W., Arthur, D.G., Bezek, D.M. et Dubovi, E.J.** 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with BVDV. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **196**: 590-594.
- Coria, M. et Mc Clurkin, A.W.** 1987. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *JAVMA.* **172**:449-451.
- Coria, M. et McClurkin A.W.** 1993. Duration of active and colostrum deprived passive antibodies to bovine viral diarrhea virus in calves. *Can J Comp Med* **42**:239-242.

- David, G.P. et Grawshaw, R.F.** 1993. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet. Rec.* **134**:468-473.
- Della Porta, A.J.** 1985. Veterinary viral diseases: Their significance in south east Asia and the western Pacific. Proc. of international Seminar on virus diseases of veterinary importance in south east Asia and Western Pacific. Aust. National Animal Health Laboratory, CSIRO, Geelong, Australia, 27-30 August 1984. Academic Press. Sydney.
- De Meuron, P.A.** 1982. Recherche d'anticorps IBR-IPV dans le lait. *Arch. Tier.* **124**:203-208.
- Deng, R. et Brock, K.V.** 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology* **191**: 867-879.
- Donis, R.O. et Dubovi E.J.** 1987. Characterisation of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus specific proteins in bovine cells. *J. Gen. Virol.* **68**: 1597-1605.
- Duffel, S.J. et Sharp, M.W.** 1984. Bovine virus diarrhoea / mucosal disease virus-induced fetopathy in cattle; efficacy of prophylactic maternal pre-exposure. *Vet. Rec.* **114**: 558-561.
- Duffel, S.J. et Harkness, J.W.** 1985. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. rec.* pp 240-245.
- Drew, Frost, T. et Edwards, S.** 1993. The application of novel techniques to bovine virus diarrhoea antigen detection. *In*: Edwards S (ed.) *Europ. Soc. Vet. Virol. Proceed.* 2nd Symp. Pestiv. 1-3 October, 1992, Annecy, 193-198.
- Ellen.** 1978. The detection of rotavirus specific antibody in colostrum and milk by ELISA. *Ann. Med. Vet.* **9(2)**:337-342.
- Fenton, A., Nettleton, P.F., Entrican, G., Herring, J.A., Malloy, C. et Greig, A.** 1991. Identification of cattle infected with bovine virus diarrhoea virus using a monoclonal antibody capture ELISA. *Arch. Virol. Suppl.* **3**:169-174.

- Francki, R.I., Fauquets, C.M., Knudson, D.L. et Brown.** 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on taxonomy of viruses. Arch. Virol.Suppl. **2**:223-233.
- Florent, G.** 1988. An ELISA for the diagnosis of bovine leukemia virus infection. Vet. Rec. **123**:5570-5571.
- Forschner, E. et Bünger, I.** 1986. Nachweis-von IBR-IPV, Leukose-und Brucellose-Antikörpern in Bestandmilchproben mit ELISA nach einer einfachen konzentrierungs methode. D. Tie. Woc. **93**:112-115.
- Forschner, E.** 1989. Kontrollmassnahmen in amtlich anerknnten brucellosefreien und leukoseunverdächtigen Milchviehbeständen auf der Basis von Tankmilch-proben in Koombination mit ELISA-TESTS. Dts. TIE. Woch. **96**: 475-486.
- Gottschalk, E.E., Greiser-Wilke, Frey, H.R., Liess, B. et Moening, V.** 1992. An antigen capture test for detection of cattle viremic with BVD virus - a comparison with BVD -virus isolations from buffy coat cells in bovine kidney cells. J. Vet. Med. B. **39**: 467-472.
- Grahn, T.C. et Maess, J.** 1984. Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhea virus. J. Am.Vet. Med. Ass. **185**:429-432.
- Greiser-Wilke, I., Haas, L., Dittmar, K., Liess, B., et Moening, V.** 1993. Identification of calves persistently vireamic with bovine virus diarrhea virus using an antigen capture immunoassay. *In*: Edwards S. (ed).Europ. soc. Vet.Virol. Proceed. 2nd Symp. Pestiv. 1-3 October, 1992, Annacy, 213-214.
- Gunn, H.M.** 1993. Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhea virus. Vet. Rec. **131**:376.
- Harasawa et Hazka L.** 1994. Evidence of pestivirus RNA in human virus vaccines.J Clin. Microbiol. **32**:1604.
- Harkness, J.W.** 1987. The control of bovine virus diarrhea virus infection. Annl's Rech.Vet.**18**:167-174.

- Harpin, S., Mehdy Elahi, S., Cornaglia, E., Yolken, R.H. et Elazhary, Y.** 1995. The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of BVD virus. *Arch. Virol.* **140**: 1285-1290.
- Harvey, D. El Azhary et Bigras-Poulin M .** 1989. Essai clinique d'un vaccin tué contre la diarrhée à virus bovine (BVD). *Med. Vet. Quebec.* **19**:33-34.
- Hertig, C. et Orr, D.M.** 1991. Detection of bovine diarrhea (BVD) virus using the PCR. *Vet. Microbiol.* **26**:65-76.
- Hooft van Iddekinge, B.J .L., Van Wamel. J.L.B., Van Gennip M. et Moorman, R.J.M.** 1992. Application of the PCR of BVDV infections in cattle. *Vet. Micro.*, **30**: 21-34.
- Horner, G.W. et Orr D.M.** 1995. Comparaison of an antigen capture ELISA with reverse transcription-polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Vet. Microbiol.* **43**:75-84.
- Horzinek, M.C.** 1981. Non-arthropod-borne Togaviruses. Academic press. London, 1-200.
- Houe, H. et Palfi, V.** 1993a. Attempts at preventing further spread of bovine virus diarrhea virus infection in five Danish dairy herds in which BVDV had been isolated. *Acta vet. scand.* **34**:139-144.
- Houe, H. et Palfi, V.** 1993b. Estimation of herd incidence of infection with bovine virus diarrhea virus in herds previously without animals persistently infected with BVDV. *Acta Vet. Scand.* **34**:133-137.
- Howard, C.J., Brownlie, J. et Thomas LH.** 1985. An ELISA for the detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus in cattle sera. *Vet. Microbiol.*, **10**: 359-369
- Howard, C.J., Brownlie J., et Clarke, M.C.** 1987. Comparison by the neutralisation assays of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet. Microbiol.*, **13**: 361-369.

- Husu, J. et Kulkas, L.** 1993. Control of enzootic bovine leucosis and BVD. Suomen Eläinlääkälehti. **99**:482-483.
- Juntti, N., Larsson, B. et Fossum, C.** 1987. The use of monoclonal antibodies in ELISA for detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. J. Vet. Med.B.,**34**:356-363
- Kahrs, R.F.** 1966. Epidemiological considerations for the control of bovine virus diarrhoea. Proceedings of the annual Meeting of the united states livestock sanitation Association, 1966, p.145.
- Kerkhofs, P., Knappen, K., Tuytens, N., Wullepit, J. et Mammerickx, M.** 1990. Le diagnostic de la leucose bovine enzootique par l'ELISA sur le lait: avantages et inconvénients. Ann. Med. Vet.,**93**-99.
- Klintevall, K., Naslund, K., Svelund, G. et hadju, L.** 1991. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. J. Vir. Met., **33**: 319-333.
- Kreeft, M.** 1990. Attempts to characterize bovine virus diarrhoea virus isolated from cattle after immunization with contaminated vaccine. Dtsch Tierarztl Wochenschr **97**: 63-70.
- Lambert, G.** 1973. Bovine viral diarrhoea: Prophylaxis and post-vaccinal reactions . J. Am .Vet. Med. Assoc., **163**: 874-876.
- Lang-Ree, J. R., Vatn, T., Kommissrud, E. et Loken, T.** 1994. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. Vet. Rec. **135**:412-413.
- Larsson, B., Alenius, S., Niskanen, R., Carlsson, U. et Jacobsson, S.O.** 1994. Establishment of cattle herdsfree from infections with bovine virus diarrhoea virus. *In*: Proceedings of 18th world Buiatrics congress. 26 th congress of the Italian Association of buiatrics. August29-September2, 1994, Bologna, 745-748.
- Levings, R.L.** 1990. Bovine virus diarrhoea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. Dev. Biol. Stand. **75**:177,182.

- Loken, T. et Daling, K.** 1994. Spredning av pestivirus hos storfe på et fellesbeite (spread of pestivirus in cattle herds on a common pasture). *Norks vet Tidsskr.* **106**:7-13.
- Mc Kercher, D.G.** 1968. Complications following vaccination with combined bovine viral diarrhea infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *J Am Vet Med Assoc* **152**:1621-1625.
- Magar, R., Minocha, H.C. et Lecompte, J.** 1988. Bovine virus diarrhea virus proteins: heterogeneity of cytopathogenic and noncytopathogenic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralisation epitope. *Vet. Microbiol.* **16**:303-314.
- Mammerickx, M., Porterelle, D. et Burny, A.** 1985. An ELISA involving Monoclonal Antibody for detection of BLV antibodies in individual or pooled bovine milk samples *Zbl. Med. Vet.* **B, 32**:526-533.
- Martin, S.W.** 1983. Vaccination: is it effective in preventing respiratory disease or influencing weight gains in feedlot calves ? *Can. Vet. J.* **24**: 10-19.
- Meyer, G. et Rumenapf, T.** 1991. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* **180**:602-605.
- Meyer, G. et Thief, H.J.** 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* **191**:368-372.
- Meyling, A. et Jensen, A.M.** 1988. Transmission of bovine virus diarrhea virus (BVDV) by artificial insemination with semen from a persistently-infected bull. *Vet. Microbiol.* **17**: 97-105.
- Mignon, B., Dubuisson, J., Baranowski, E., Koromyslov, I. et Ernst, D.** 1991. A monoclonal ELISA for BVD pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J. Virol. Methods*, **35**:177-188.
- Motha, J. et Ralston, J.** 1994. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Vet. Microbiol.*, **38**: 359-367.
- Nguyen, V.K. et Maes, R.F.** 1990. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk. *J. Clin. Micro, Apr.* :979-98

- Niskanen, R.** 1985. Bovine virus diarrhoea virus infection in dairy cattle. Dissertation, Uppsala 1985.
- Niskanen, R., Alenius, S., Larsson, B. et Juntti, N.** 1989. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in milk. *J. Vet. Med. B.*, **36**:113-118.
- Niskanen, R., Alenius, S., Larsson, B. et Jacobsson, S.O.** 1991. Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in the bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy cattle. *Arch. virol.* **3**(suppl):245-251, 1991
- Niskanen, R.** 1993. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.*, **133**:341-344.
- Pastoret, P.P., Thiry, E., Schwers, A. et Dubuisson, J.** 1986. Epidemiologie et physiopathologie de l'infection par le virus de la BVD .In pestivirose des ovins et des bovins. société française de buaîtrerie. Paris 6-7 Novembre 1986.
- Pastoret, P.P., Detal, G., Dive, M., Waxweiler, S., Thiry, E., Wellemans, G., Marcourt, J.** 1989. Mesures à prendre au centre de sélection bovine de Ciney en vue de répondre aux nouvelles normes sanitaires imposées par la CEE. *Ann. Med. Vet.*, **133**:247-256.
- Paton, D.J., Carlsson, U., Lowings, J.P., Sands, J.J., Vilcek, S. et Alenius, S.** 1994. Identification of herd specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Vet. Microbiol.* (accepté pour publication)
- Pellerin, C., Van der Hurk, J., Lecomte, J. et Tijssen, P.** 1994. Identification of new group of BVD strains associated with severe outbreak and high mortalities. *Virol.* **203**:260-268.
- Perrin, B., Tixier, G., Dannacher, G., Soula, A., Moussa, A. et Goyon, M.** 1984. Utilisation d'un kit ELISA pour la détection des anticorps dans le sérum et dans le lait. (Rhinotrachéite bovine infectieuse). *Rec. Méd. Vét.*, **160** (9):755-761.



- Peter, C.P.** 1967. Characteristics of a condition following vaccination with bovine virus diarrhea vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **150**: 46-52.
- Qi Fe** , 1992. Analysis of the BVDV genome for possible cellular insertions. *Virology*. **189**:285-289.
- Radostits, O.M. et Littlejohns, I.R.** 1988. New concept in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus. *Can. Vet. J.* **29**:513-528.
- Radwan, G.S., Kenny, V. B., Hogan, J.S. et Larry, S.** 1995. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* **44**:77-92.
- Rebhun, W.C., French, T.W., Perdriuzet, J.A., Dubovi, E.J., Dill, S.G. et Karcher, L.F.** 1989. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection of cattle. *J. Vet. Intern. Med.* **3**:42-45 .
- Renard, A., Dina, D. et Martial J.A.** 1985. Molecular cloning of bovine virus diarrhea virus sequences. *DNA*, **4**:429-438.
- Roeder, P. et Drew, T.** 1984. Mucosal disease of cattle: a late sequel to fetal infection. *Vet. Rec.*, 309-313.
- Roeder, P.L. et Harkness, J.W.** 1986. BVD virus infection: Prospects for control. *Vet. Rec.* **14**:309-313.
- Rosner., S.F.** 1968. Complications following vaccination of cattle against infectious bovine rhinotracheitis, bovine viral mucosal disease, and parainfluenza type 3. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **152**: 898-901.
- Roth, J.A. et Kaeberle, M.L.** 1983. Suppression of neutrophil lymphocyte function induced by a vaccinal strain of BVDV with or without the administration of ACTH. *Am. J. Vet. Res.* **44**:23-66.
- Sandvik, T. et Krogsrud, J.** 1995. Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle blood samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**:65-71.

- Saurat, P., Gilbert, Y. et Chantal, J.** 1972. La maladie des muqueuses ou diarrhée à virus des bovins. L'expansion scientifique française, Paris.
- Schroeder, B.A., Oliver, R.E. et Cathcart, A.** 1985. The development and evaluation of an ELISA for the detection of antibodies to CAEV in goats sera. *M. Z. Vet. J.*, **33**: 213-215.
- Schultz, R.D.** 1993. Certain factors to consider when designing a bovine vaccination program. *In* Proceeding of the American Association of Bovine Practitioners, Albuquerque, NM, p.19
- Stuker, G.** 1980. Nachweis von IBR-iPV. Antikörpern aus der Milch. *Schweiz. Arch. Tierh.*, **122**: 707-710.
- Tamoglia, T. W.** 1968. Laboratory evaluation of bovine respiratory disease vaccines for safety. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **152**:847-850.
- Tarry, D.W.** 1991. Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Vet. Rec.* **128**:82-84.
- Toma, B., Eloit, M. et Savey, M.** 1984. Dépistage de la leucose bovine enzootique par l'application du test ELISA sur le lait. *Rec. Med. Vet.* **160** (1):53-60.
- Wellemans, G. et Vanopdenbosch, E.** 1990. Dépistage des bovins BVD-IT à partir des lymphocytes: un aperçu de 22 mois de contrôle de la population bovine belge. *Ann. Méd. Vét.* **134**:175-178.
- Wensvoort, G., Terpstra, C. et De Kluyver, E.P.** 1988. BVDV infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccines. *Res. Vet. Sci.* **45**:143-144.
- Westenbrink, F., Straver, P.J., Kimmam, T.G. et Leeuw, P.W.** 1985. A blocking ELISA for BVDV serology. *J. Vet. Med. B.*, **33**:354-361.

## ANNEXE

### Données de la figure 1

SN	ELISA-sérum
256	1.119
256	0.677
256	0.88
256	1.008
256	1.412
256	1.037
256	0.981
256	0.861
256	0.509
256	1.233
256	0.158
256	0.363
256	0.399
256	1.4
256	1.15
256	1.83
256	1.6
256	1.05
256	1.56
256	1.58
256	1.32
256	1.53
256	1.24
256	0.36
256	0.93
256	0.79
256	1.05
256	1.3
256	1.81
256	1.04
256	1.06
256	0.79
256	1.35
256	1.35
256	0.61
256	1
256	0.73
256	0.75
256	0.68
256	0.89
256	0.72

256	1.07
256	0.81
256	1.04
256	0.89
256	1.17
256	1.57
256	1.27
256	0.66
256	1.32
256	0.56
256	0.68
256	0.47
256	0.61
256	0.39
256	0.45
256	0.51
256	1.1
256	0.65
256	1.34
256	1.02
256	1.02
256	1.23
256	1.65
256	1.85
256	1.39
256	2.2
256	1.77
256	1.81
256	1.87
256	1.61
256	1.92
256	1.8
256	1.26
256	1.45
256	2.01
256	1.74
256	1.47
256	1.65
256	1.72
256	1.15
256	1.72
256	1.09
256	1.41
256	1.85
256	1.39
256	1.5

256	1.42
256	1.72
256	1.12
256	1.75
256	1.62
256	1.3
256	1.58
256	1.74
256	1.75
256	1.75
256	1.64
256	1.64
256	1.53
256	1.44
256	1.94
256	1.35
256	1.76
256	1.88
256	2.07
256	1.34
256	1.69
256	1.65
256	1.42
256	1.66
256	2.07
256	1.75
256	1.49
256	1.97
256	1.63
256	1.9
256	1.49
256	1.57
256	1.23
256	1.25
256	1.82
256	1.39
256	2.2
256	1.77
256	1.8
256	1.87
256	1.81
256	1.92
256	1.59
256	1.26
256	1.45
256	2.01

256	1.74
256	1.47
256	1.64
256	1.55
256	1.15
256	1.72
256	1.09
256	1.25
256	1.41
256	1.85
256	1.39
256	1.5
256	1.42
256	1.72
256	1.42
256	1.75
256	1.62
256	1.3
256	0.77
256	1.08
256	1.59
256	0.81
256	1.29
256	1.29
256	0.74
256	1.09
256	1.2
256	1.02
256	1.29
256	1.59
256	1.29
256	0.91
256	1.47
256	1.28
256	0.89
256	1.24
256	1.02
256	0.88
256	1.21
256	1.15
256	1.44
256	1.22
256	0.77
256	1.07
256	1.05
256	1.08

256	0.1
256	0.6
256	0.59
256	0.54
256	0.7
256	1.17
256	1.22
256	1.17
256	0.92
256	1.31
256	1
256	1.02
256	0.61
256	0.78
256	0.87
256	0.88
256	0.92
256	0.43
256	0.6
256	0.18
256	1.3
256	0.97
256	1.17
256	0.77
256	1.1
256	1.09
256	0.74
256	0.86
256	1.19
256	1.5
256	0.83
256	1.01
256	0.87
256	0.54
256	0.56
256	1.3
256	1.57
256	0.8
256	1.17
256	1.42
256	0.81
256	0.75
256	1.12
256	1.19
256	1.19
256	1.22

256	1.22
256	0.82
256	1.18
256	0.9
256	1.14
256	1.26
256	0.85
256	1.03
256	1.35
256	1.28
256	1.05
256	0.91
256	1.03
256	1.33
256	1.28
256	1.46
256	1.12
256	1.37
256	0.99
256	1.43
256	1.23
256	1.02
256	1.54
256	1.2
256	1.4
256	1.56
256	1.4
256	1.12
256	0.74
256	0.91
256	1.29
256	1.01
256	1.75
256	0.46
256	1.22
256	1
256	1.16
256	1.02
256	1.28
256	1.04
256	1.57
256	0.83
256	1.02
256	0.61
256	1.6
256	1.42



256	1.52
256	1.4
256	1.77
256	1.1
256	0.99
256	1.2
256	1.4
256	1.3
256	1.35
256	0.68
256	1.27
256	1.64
256	0.35
256	0.45
256	2.03
256	0.29
256	1.23
256	0.87
256	1.09
256	1.2
256	0.95
256	1.28
256	2.3
256	1.14
256	1.74
256	0.96
256	1.29
256	0.689
256	1.51
256	1.53
256	2
256	1.7
256	1.7
256	1.09
256	1.79
256	1.33
256	1.27
256	1.22
256	1.25
256	1.32
256	1.31
256	1.25
256	1.03
256	1.63
256	1.6
256	1.37

256	1.29
256	0.99
256	1.18
256	1.19
256	1.1
256	1.67
256	1.14
256	0.73
256	1.2
256	1.59
256	1.34
256	1.58
256	1.23
256	0.92
256	0.7
256	0.91
256	1.13
256	1.25
256	0.99
256	1.08
256	1.03
256	0.81
256	0.77
256	0.97
256	1.12
256	1.03
256	0.81
256	1.02
256	1.08
256	0.95
256	0.82
256	0.89
256	0.68
256	1.18
256	0.96
256	0.48
256	0.62
256	0.56
256	0.49
256	0.71
256	0.34
256	0.9
256	0.696
256	1.023
256	0.652
256	0.686

256	0.938
256	0.856
256	0.79
256	0.675
256	0.862
256	1.03
256	1.129
256	1.029
256	0.832
256	0.458
256	1.039
256	0.167
256	0.558
256	0.884
256	0.6
256	0.9
256	0.287
256	0.148
256	0.162
256	0.136
256	0.195
256	0.667
256	0.921
256	0.395
256	0.373
256	0.411
256	0.248
256	0.378
128	0.09
128	1.194
128	0.804
128	1.69
128	1.208
128	1.368
128	0.46
128	1.11
128	0.74
128	0.18
128	1.2
128	0.44
128	1.01
128	0.62
128	0.8
128	0.55
128	0.74
128	0.84

128	0.97
128	0.43
128	0.68
128	0.76
128	1.18
128	1.02
128	0.45
128	0.51
128	1.32
128	1.26
128	0.66
128	1.45
128	0.92
128	1.19
128	1.32
128	1.08
128	1.1
128	0.76
128	0.83
128	0.63
128	0.8
128	1.11
128	0.86
128	0.41
128	0.42
128	0.54
128	0.46
128	0.719
128	0.341
128	0.298
128	0.201
128	0.645
128	0.9
128	0.679
128	0.704
128	0.325
128	0.055
128	0.731
128	0.475
128	0.277
128	1.038
128	0.192
64	1.028
64	0.362
64	0.47
64	1.132

64	0.705
64	0.49
64	1.37
64	1.37
64	0.34
64	0.66
64	0.4
64	0.31
64	0.38
64	0.38
64	0.51
64	0.37
64	0.64
64	0.31
64	0.54
64	0.71
64	0.38
64	0.35
64	0.26
64	0.75
64	0.69
64	0.61
64	0.38
64	0.63
64	0.77
64	0.31
64	0.45
64	0.62
64	0.52
64	0.77
64	0.64
64	0.49
64	0.38
64	0.35
64	0.4
64	0.45
64	0.66
64	0.664
64	0.854
64	0.074
64	0.047
64	0.022
64	0.404
64	0.411
64	0
64	0.355

64	0.259
64	0.293
64	0.289
64	0.153
64	0.788
56	0.94
32	0.073
32	0.348
32	0.39
32	0.087
32	0.105
32	0.172
32	0.54
32	0.38
32	0.36
32	0.23
32	0.54
32	0.29
32	0.26
32	1
32	0.41
32	0.25
32	0.52
32	0.32
32	0.29
32	0.3
32	0.25
32	0.18
32	0.26
32	0.28
32	0.17
32	0.27
32	0.41
32	0.36
32	0.33
32	0.27
32	0.42
32	0.29
32	0.41
32	0.49
32	0.45
32	0.1
32	0.29
32	0.529
32	0.271
32	0.149

16	0.083
16	0.42
16	0.3
16	0.25
16	0.13
16	0.26
16	0.34
16	0.31
16	0.33
16	0.27
16	0.25
16	0.26
16	0.31
16	0.28
16	0.23
16	0.07
16	0.3
16	0.2
16	0.25
16	0.3
16	0.26
16	0.39
16	0.4
16	0.43
16	0.28
16	0.32
16	0.41
16	0.31
16	0.26
16	0.35
16	0.47
16	0.21
8	0.278
8	0.28
8	0.32
8	0.285
4	0.16
4	0.15
4	0.12
4	0.28
4	0.25
4	0.28
4	0.25
4	0.33
4	0.24
0	0.15

0	0.07
0	0.072
0	0.16
0	0.001
0	0.0018
0	0.012
0	0.19
0	0.02
0	0.024
0	0.053
0	0.04
0	0.08
0	0.076
0	0.035
0	0.024
0	0.07
0	0.045
0	0.035
0	0.07
0	0.038
0	0.09
0	0.08
0	0.038
0	0.027
0	0.021
0	0.062
0	0.036
0	0.06
0	0.08
0	0.09
0	0.09
0	0.085
0	0.005
0	0.045
0	0.042
0	0.068
0	0.025
0	0.077
0	0.082
0	0.019
0	0.085
0	0.027
0	0.071
0	0.09
0	0.08
0	0.09



0	0.025
0	0.0001
0	0.08
0	0.038
0	0.023
0	0.025
0	0.071
0	0.129
0	0.171
0	0.06
0	0.008
0	0.168
0	0.087
0	0.086
0	0.097
0	0.05
0	0.074
0	0.051
0	0.049
0	0.025
0	0.0664
0	0.044
0	0.048
0	0.036
0	0.164
0	0.083
0	0.022
0	0.084
0	0.021
0	0.032
0	0.069
0	0.063
0	0.003
0	0.046
0	0.042
0	0.009
0	0.094
0	0.098
0	0.162
0	0.06
0	0.061
0	0.027
0	1.146
0	0.051
0	0.08
0	0.019

0	0.085
0	0.039
0	0.001
0	0.077
0	0.045
0	0.062
0	0.056
0	0.068
0	0.06
0	0.024
0	0.066
0	0.095
0	0.038
0	0.096
0	0.13
0	0.034
0	0.086
0	0.037
0	0.138
0	0.08
0	0.48
0	0.025
0	0.083
0	0.072
0	0.062
0	0.138
0	0.122
0	0.048
0	0.071
0	0.06
0	0.141
0	0.161
0	0.091
0	0.051
0	0.051
0	0.087
0	0.107
0	0.05
0	0.04
0	0.06
0	0.07
0	0.06
0	0.01
0	0.05
0	0.02
0	0.09

0	0.01
0	0.07
0	0.2
0	0.14
0	0.13
0	0.14
0	0.145
0	0.14
0	0.08
0	0.13
0	0.13
0	0.11
0	0.05
0	0.08
0	0.07
0	0.08
0	0.23
0	0.1
0	0.01
0	0.02
0	0.23
0	0.15
0	0.14
0	0.13
0	0.12
0	0.14
0	0.03
0	0.07
0	0.08
0	0.12
0	0.13
0	0.05
0	0.04

---

**Données de la figure 2**

SN	ELISA lait
256	1.89
256	1.81
256	1.8
256	1.65
256	1.6
256	1.56
256	1.48
256	1.48
256	1.48
256	1.41
256	1.41
256	1.37
256	1.36
256	1.32
256	1.23
256	1.2
256	1.18
256	1.17
256	1.14
256	1.14
256	1.14
256	1.13
256	1.13
256	1.129
256	1.1
256	1.08
256	1.05
256	1.04
256	1.039
256	1.03
256	1.03
256	1.03
256	1.03
256	1.03
256	1.029
256	1.023
256	1.02
256	0.99
256	0.99
256	0.99
256	0.98
256	0.98

256	0.94
256	0.94
256	0.938
256	0.93
256	0.93
256	0.921
256	0.92
256	0.91
256	0.9
256	0.9
256	0.9
256	0.9
256	0.9
256	0.89
256	0.89
256	0.89
256	0.89
256	0.884
256	0.87
256	0.862
256	0.86
256	0.86
256	0.86
256	0.86
256	0.86
256	0.86
256	0.86
256	0.856
256	0.84
256	0.84
256	0.84
256	0.832
256	0.83
256	0.83
256	0.83
256	0.83
256	0.82
256	0.82
256	0.81
256	0.81
256	0.81
256	0.806
256	0.8
256	0.8
256	0.79
256	0.79

256	0.79
256	0.79
256	0.78
256	0.78
256	0.78
256	0.78
256	0.77
256	0.77
256	0.75
256	0.74
256	0.74
256	0.74
256	0.73
256	0.73
256	0.72
256	0.72
256	0.72
256	0.71
256	0.71
256	0.71
256	0.708
256	0.7
256	0.7
256	0.7
256	0.696
256	0.69
256	0.686
256	0.675
256	0.67
256	0.667
256	0.66
256	0.652
256	0.65
256	0.65
256	0.65
256	0.65
256	0.65
256	0.65
256	0.65
256	0.65
256	0.65
256	0.64
256	0.64
256	0.63
256	0.63
256	0.62
256	0.62
256	0.62

256	0.61
256	0.61
256	0.61
256	0.61
256	0.6
256	0.59
256	0.59
256	0.57
256	0.57
256	0.56
256	0.56
256	0.56
256	0.56
256	0.56
256	0.558
256	0.54
256	0.54
256	0.54
256	0.54
256	0.53
256	0.53
256	0.53
256	0.53
256	0.52
256	0.52
256	0.52
256	0.52
256	0.52
256	0.51
256	0.5
256	0.5
256	0.49
256	0.48
256	0.48
256	0.48
256	0.48
256	0.48
256	0.47
256	0.46
256	0.46
256	0.46
256	0.46
256	0.458
256	0.45
256	0.45
256	0.45
256	0.45
256	0.44
256	0.43
256	0.43

256	0.43
256	0.42
256	0.42
256	0.42
256	0.411
256	0.41
256	0.41
256	0.41
256	0.41
256	0.4
256	0.4
256	0.395
256	0.39
256	0.39
256	0.39
256	0.39
256	0.39
256	0.39
256	0.39
256	0.38
256	0.38
256	0.38
256	0.378
256	0.373
256	0.37
256	0.37
256	0.37
256	0.37
256	0.37
256	0.36
256	0.36
256	0.35
256	0.35
256	0.35
256	0.35
256	0.34
256	0.34
256	0.34
256	0.34
256	0.33
256	0.33
256	0.33
256	0.33
256	0.32
256	0.32
256	0.31
256	0.31
256	0.3
256	0.3



256	0.29
256	0.29
256	0.29
256	0.287
256	0.27
256	0.26
256	0.26
256	0.25
256	0.248
256	0.24
256	0.22
256	0.195
256	0.18
256	0.18
256	0.167
256	0.162
256	0.148
256	0.146
256	0.142
256	0.136
256	0.13
256	0.12
256	0.017
256	0.26
256	1
256	1
128	1.038
128	0.9
128	0.8
128	0.8
128	0.74
128	0.731
128	0.719
128	0.704
128	0.679
128	0.645
128	0.585
128	0.54
128	0.532
128	0.53
128	0.52
128	0.48
128	0.475
128	0.37
128	0.35
128	0.341

128	0.34
128	0.34
128	0.325
128	0.32
128	0.32
128	0.31
128	0.3
128	0.3
128	0.298
128	0.28
128	0.28
128	0.277
128	0.263
128	0.26
128	0.25
128	0.25
128	0.24
128	0.23
128	0.23
128	0.22
128	0.201
128	0.2
128	0.2
128	0.192
128	0.16
128	0.11
128	0.11
128	0.07
128	0.055
128	0.053
64	1.231
64	1.15
64	0.9
64	0.854
64	0.788
64	0.664
64	0.66
64	0.66
64	0.57
64	0.53
64	0.49
64	0.42
64	0.411
64	0.404
64	0.355
64	0.35

64	0.34
64	0.34
64	0.314
64	0.293
64	0.289
64	0.259
64	0.25
64	0.273
64	0.293
64	0.26
64	0.29
64	0.28
64	0.28
64	0.258
64	0.253
64	0.26
64	0.253
64	0.263
64	0.262
64	0.27
64	0.26
64	0.31
64	0.74
64	0.47
64	0.28
64	0.32
64	0.55
32	0.529
32	0.277
32	0.271
32	0.261
32	0.26
32	0.259
32	0.24
32	0.23
32	0.23
32	0.26
32	0.25
32	0.29
32	0.29
32	0.28
32	0.38
32	0.25
32	0.25
32	0.254
32	0.26

32	0.31
32	0.27
32	0.25
32	0.26
32	0.25
32	0.31
32	0.26
32	0.26
32	0.25
32	0.1
32	0.29
32	0.279
32	0.27
16	0.37
16	0.28
16	0.28
16	0.29
16	0.28
16	0.26
16	0.25
16	0.32
16	0.29
16	0.27
16	0.25
16	0.253
16	0.28
16	0.23
16	0.27
16	0.31
16	0.251
16	0.25
16	0.26
16	0.31
16	0.29
16	0.29
16	0.28
16	0.25
8	0.32
8	0.285
8	0.39
4	0.29
4	0.33
4	0.29
4	0.25
4	0.256
0	0.468

0	0.256
0	0.184
0	0.106
0	0.097
0	0.096
0	0.093
0	0.29
0	0.09
0	0.28
0	0.08
0	0.071
0	0.27
0	0.07
0	0.06
0	0.26
0	0.052
0	0.25
0	0.05
0	0.045
0	0.043
0	0.042
0	0.04
0	0.038
0	0.038
0	0.035
0	0.032
0	0.03
0	0.03
0	0.03
0	0.03
0	0.028
0	0.026
0	0.023
0	0.022
0	0.02
0	0.02
0	0.02
0	0.02
0	0.02
0	0.02
0	0.02
0	0.019
0	0.019
0	0.019
0	0.018
0	0.018

0	0.018
0	0.017
0	0.017
0	0.017
0	0.016
0	0.016
0	0.016
0	0.016
0	0.015
0	0.014
0	0.014
0	0.014
0	0.013
0	0.013
0	0.013
0	0.013
0	0.012
0	0.012
0	0.012
0	0.012
0	0.012
0	0.011
0	0.011
0	0.011
0	0.011
0	0.01
0	0.01
0	0.01
0	0.01
0	0.01
0	0.01
0	0.01
0	0.009
0	0.009
0	0.009
0	0.008
0	0.008
0	0.008
0	0.008
0	0.008
0	0.006
0	0.006
0	0.006
0	0.006
0	0.005

0	0.005
0	0.0045
0	0.003
0	0

**Données de la figure 3**

ELISA sérum	ELISA lait
2.3	1.23
2.07	0.99
2.03	0.26
2.0	1.6
1.94	1.32
1.9	0.7
1.88	1.89
1.85	1.41
1.85	1.41
1.83	0.57
1.81	1.18
1.79	0.22
1.77	0.99
1.76	0.71
1.75	0.89
1.75	0.74
1.75	0.63
1.74	0.81
1.72	1.48
1.72	1.48
1.72	0.45
1.72	0.45
1.7	1.8
1.7	1.56
1.69	0.93
1.69	0.532
1.67	0.56
1.66	0.33
1.65	0.92
1.64	1.14
1.64	0.43
1.64	0.31
1.63	0.47
1.62	1.14
1.62	1.14
1.6	1.1
1.6	0.81
1.59	0.56
1.59	0.42
1.58	0.74
1.58	0.73



1.58	0.57
1.57	1
1.57	0.9
1.56	0.73
1.56	0.65
1.53	1.2
1.53	0.65
1.53	0.39
1.52	1.81
1.51	1
1.5	0.83
1.5	0.82
1.5	0.77
1.49	0.65
1.47	0.3
1.46	0.4
1.45	0.74
1.44	1.36
1.44	0.54
1.43	0.65
1.42	1.37
1.42	1.03
1.42	1.03
1.42	0.56
1.42	0.52
1.41	0.79
1.41	0.79
1.4	1.02
1.4	0.74
1.39	0.86
1.39	0.86
1.37	0.86
1.37	0.57
1.37	0.53
1.35	0.94
1.35	0.33
1.35	0.29
1.34	0.94
1.34	0.87
1.34	0.4
1.33	1.13
1.33	0.83
1.32	0.8
1.32	0.61
1.32	0.37
1.32	0.34

1.31	0.48
1.3	0.8
1.3	0.8
1.3	0.7
1.3	0.62
1.29	1.48
1.29	0.89
1.29	0.65
1.29	0.41
1.29	0.35
1.29	0.29
1.28	0.72
1.28	0.62
1.27	0.59
1.27	0.37
1.27	0.35
1.26	0.98
1.26	0.52
1.25	1.04
1.25	1.04
1.25	0.78
1.25	0.69
1.24	0.5
1.24	0.39
1.23	0.81
1.23	0.61
1.22	1.13
1.22	1.03
1.22	1.03
1.22	0.99
1.22	0.38
1.21	0.37
1.2	0.84
1.2	0.78
1.2	0.52
1.2	0.25
1.194	0.263
1.19	0.86
1.19	0.8
1.19	0.61
1.19	0.49
1.18	0.9
1.18	0.89
1.18	0.26
1.17	0.9
1.17	0.42

1.16	0.62
1.16	0.016
1.156	0.016
1.15	0.52
1.15	0.46
1.14	0.89
1.14	0.84
1.14	0.71
1.132	0.022
1.13	0.75
1.129	0.536
1.12	1.08
1.12	0.83
1.11	0.07
1.1	0.79
1.1	0.63
1.1	0.48
1.09	0.86
1.09	0.53
1.09	0.53
1.09	0.46
1.09	0.45
1.085	0.314
1.08	0.53
1.08	0.48
1.08	0.34
1.07	0.33
1.07	0.31
1.06	0.13
1.05	0.53
1.05	0.24
1.04	0.91
1.04	0.77
1.04	0.48
1.038	0.105
1.03	0.901
1.03	0.78
1.03	0.59
1.029	0.404
1.028	1.231
1.02	0.93
1.02	0.84
1.02	0.82
1.02	0.56
1.02	0.46
1.02	0.43

1.02	0.39
1.02	0.32
1.01	1.17
1.008	0.017
0.99	0.86
0.99	0.51
0.97	0.78
0.97	0.2
0.96	0.72
0.96	0.64
0.95	0.41
0.94	0.55
0.93	0.12
0.92	0.61
0.91	0.67
0.91	0.34
0.9	0.71
0.9	0.387
0.89	0.56
0.89	0.44
0.884	0.296
0.88	0.39
0.87	0.7
0.87	0.32
0.862	0.425
0.861	0.708
0.86	0.18
0.856	0.776
0.85	0.39
0.84	0.23
0.832	0.568
0.83	0.65
0.83	0.37
0.82	0.86
0.82	0.54
0.81	0.43
0.81	0.41
0.81	0.36
0.804	0.585
0.8	0.54
0.8	0.23
0.79	0.672
0.79	0.37
0.79	0.18
0.788	0.33
0.77	0.66

0.77	0.38
0.77	0.19
0.76	0.31
0.76	0.24
0.75	0.39
0.74	0.46
0.74	0.16
0.73	0.54
0.73	0.42
0.71	0.33
0.71	0.18
0.705	0.106
0.7	0.35
0.7	0.32
0.7	0.158
0.689	0.64
0.686	0.471
0.68	1.65
0.68	0.52
0.68	0.3
0.679	0.317
0.677	0.146
0.675	0.284
0.667	0.149
0.66	0.83
0.65	0.29
0.645	0.26
0.64	0.66
0.64	0.23
0.63	0.25
0.62	0.48
0.62	0.41
0.61	1.15
0.61	0.25
0.6	0.191
0.59	0.38
0.56	0.39
0.558	0.203
0.55	0.35
0.54	0.42
0.54	0.32
0.54	0.27
0.54	0.09
0.54	0.03
0.53	0.15
0.529	0.893

0.52	0.23
0.52	0.18
0.51	1.05
0.51	0.3
0.49	0.26
0.49	0.13
0.49	0.13
0.49	0.13
0.47	0.28
0.47	0.158
0.46	0.22
0.46	0.2
0.458	0.425
0.45	0.65
0.45	0.34
0.45	0.23
0.45	0.2
0.45	0.11
0.44	0.28
0.43	0.11
0.42	0.26
0.42	0.11
0.41	0.28
0.41	0.24
0.41	0.2
0.41	0.11
0.404	0.178
0.4	0.49
0.4	0.21
0.4	0.2
0.4	0.12
0.399	0.806
0.39	0.21
0.39	0.14
0.38	0.34
0.38	0.18
0.378	0.109
0.363	0.142
0.36	0.98
0.36	0.23
0.36	0.12
0.355	0.301
0.35	0.36
0.35	0.25
0.35	0.22
0.348	0.261

0.341	0.882
0.34	0.14
0.34	0.13
0.335	0.195
0.33	0.23
0.33	0.2
0.33	0.19
0.32	0.19
0.32	0.19
0.32	0.09
0.31	0.35
0.31	0.12
0.31	0.11
0.31	0.1
0.31	0.03
0.3	0.28
0.3	0.12
0.298	0.445
0.29	0.45
0.29	0.12
0.29	0.12
0.29	0.09
0.285	0.112
0.28	0.13
0.28	0.1
0.28	0.1
0.28	0.09
0.278	0.039
0.271	0.055
0.27	0.15
0.27	0.15
0.26	0.9
0.26	0.37
0.26	0.19
0.26	0.13
0.26	0.13
0.26	0.1
0.25	0.17
0.25	0.06
0.24	0.13
0.24	0.02
0.23	0.18
0.23	0.09
0.21	0.08
0.2	0.09
0.195	0.133

0.18	0.34
0.18	0.03
0.18	0.03
0.171	0.01
0.168	0.018
0.16	0.05
0.16	0.02
0.15	0.02
0.141	0.011
0.14	0.06
0.138	0.097
0.138	0.019
0.134	0.042
0.13	0.02
0.13	0.01
0.13	0.01
0.129	0.017
0.12	0.09
0.12	0.04
0.11	0.03
0.1	0.3
0.098	0.005
0.097	0.01
0.096	0.07
0.095	0.096
0.09	0.053
0.09	0.017
0.09	0.011
0.09	0.01
0.09	0.003
0.087	0.277
0.087	0.014
0.086	0.038
0.086	0.016
0.085	0.07
0.085	0.035
0.084	0.017
0.083	0.106
0.083	0.01
0.08	0.02
0.08	0.018
0.08	0.014
0.08	0.012
0.08	0.012
0.08	0.009
0.08	0.008



0.08	0
0.077	0.012
0.076	0.006
0.074	0.425
0.073	0.079
0.072	0.032
0.071	0.052
0.071	0.011
0.071	0.008
0.07	0.11
0.07	0.06
0.07	0.014
0.07	0.009
0.07	0.008
0.068	0.08
0.068	0.006
0.0664	0.468
0.066	0.246
0.062	0.006
0.06	0.043
0.06	0.013
0.051	0.03
0.051	0.028
0.051	0.019
0.051	0.01
0.05	0.08
0.05	0.02
0.05	0.013
0.048	0.093
0.047	0.273
0.045	0.005
0.044	0.012
0.042	0.01
0.042	0.006
0.04	0.071
0.04	0.05
0.038	0.022
0.038	0.018
0.038	0.011
0.036	0.038
0.035	0.13
0.035	0.008
0.032	0.013
0.03	0.02
0.027	0.016
0.025	0.045

0.025	0.019
0.025	0.015
0.025	0.012
0.024	0.2
0.024	0.008
0.023	0.026
0.022	0.537
0.021	0.013
0.015	0.02
0.009	0.023
0.005	0.02
0.0018	0.0045
0.0001	0.009
1	0.5
1	0.2
0	0

---

**Données de la figure 4**

	1-2	1-3	2-3
min	-0.002	-0.02	-0.02
max	0.034	0.034	0.034
moy-sd	-0.0066	-0.0164	-0.0195
moy+sd	0.023	0.0216	0.0079
moy	0.0084	0.0026	-0.005

**Données de la figure  
5**

	1-2	1-3	1-4	2-3	2-4	3-4
max	-0.003	-0.004	0	-0.001	0.049	0.104
moy+sd	-0.00574	-0.00041	0.0073	0.0118	0.0311	0.0768
moy-sd	-0.0376	-0.1116	-0.1009	-0.0805	-0.0815	-0.0585
min	-0.049	-0.145	-0.131	-0.12	-0.11	-0.1
moy	-0.02167	-0.056	-0.04683	-0.03433	-0.02517	0.009167

### Données de la figure 6

temps	congélation	réfrigération	ambiante
1	0.72	0.72	0.72
2	0.724	0.72	0.721
4	0.731	0.719	0.723
6	0.71	0.711	0.712
8	0.723	0.73	0.723
10	0.713	0.722	0.711
12	0.718	0.7223	0.7
14	0.731	0.72	0.71
15	0.71	0.711	0.71
16	0.725	0.712	0.711
17	0.721	0.699	0.718
18	0.723	0.711	0.709
20	0.721	0.708	0.71
22	0.724	0.723	0.721
24	0.721	0.711	0.711

### Données de la figure 7

temps	congélation	réfrigération	ambiante
0	0.725	0.725	0.725
25	0.725	0.725	0.725
50	0.72	0.72	0.65
75	0.72	0.65	0.55
100	0.715	0.64	0.3
130	0.7	0.64	0.25
150	0.69	0.63	0.25
160	0.68	0.63	0.2
180	0.67	0.61	0.19
210	0.65	0.59	0.15
280	0.645	0.57	0.1

## Données de la figure 8

dilutions	DO forte	DO moyenne	DO faible
1	0.54	0.35	0.24
2	0.52	0.32	0.23
3	0.51		
4	0.49	0.3	0.18
5	0.48		
6	0.49	0.36	0.17
7	0.53		
8	0.34	0.26	0.16
9	0.42		
10	0.4	0.25	0.17
12	0.4	0.24	
14	0.41	0.23	0.15
16	0.41	0.23	0.14
18	0.45	0.21	
20	0.43	0.22	0.13
22	0.39	0.22	
24	0.37	0.21	0.12
26	0.36		
28	0.36	0.2	0.12
30	0.37		
32	0.36	0.19	0.11
34	0.35		
36	0.43	0.2	0.1
38	0.4		
40	0.38	0.2	0.1
42	0.35	0.19	
44	0.35	0.19	0.08
46	0.34	0.19	
48	0.34	0.19	0.09
50	0.31	0.17	
52	0.37	0.17	0.07
54	0.35	0.18	
56	0.3	0.17	0.06
58	0.28	0.16	
60	0.26	0.15	0.05
62	0.25	0.16	
64	0.26	0.15	0.04
66	0.31	0.15	
68	0.29	0.15	0.05
70	0.3	0.13	
72	0.25	0.13	
74	0.24	0.13	

76	0.23	0.13
78	0.24	0.13
80	0.3	0.12
82	0.28	0.11
84	0.28	0.1
86	0.27	0.1
88	0.25	0.09
90	0.24	0.08
92	0.23	0.08
94	0.2	0.07
96	0.2	
98	0.19	
100	0.18	
102	0.18	
104	0.19	
106	0.18	
108	0.18	

---

**Données de la figure 9**

	pr-pa	pr-po	pa-po
min	-0.04	-0.04	-0.04
moy-sd	-0.025	-0.03	-0.03
moy+sd	0.016	0.011	0.011
max	0.02	0.02	0.02
moy	-0.00417	-0.01	-0.01

**Données de la figure 10**

DO de BT	% v sn fortes	vaccinatio n
0.015	1.88	nv
0.127	3.84	v1
0.205	30.76	v1
0.25	19	nv
0.309	68.75	v1
0.35	52	v2
0.37	59	v1
0.5	50.5	v1
0.625	74	nv
0.7	100	v2
0.72	100	v1
0.95	87	nv

**Données de la figure 11**

	1-2	1-3	2-3
min	-0.005	-0.006	-0.001
max	0.001	0.002	0.003
mean-sd	-0.00646	-0.006	-0.001
mean+sd	0.00046	0.002	0.003
moy	-0.003	-0.002	0.001

## Données préliminaires de la figure 12

1ière	2ième	3ième	4ième	5ième	6ième	7ième	8ième
0.08	0.06	0.07	0.058	0.071	0.08	0.067	0.071
0.07	0.014	0.01	0.015	0.011	0.0123	0.013	0.016
0.072	0.032	0.0029	0.029	0.03	0.025	0.013	0.0029
0.09	0.053	0.05	0.052	0.056	0.052	0.053	0.05
0.015	0.02	0.019	0.018	0.02	0.024	0.025	0.019
0.0018	0.0045	0.0044	0.0042	0.0048	0.0048	0.0051	0.0044
0.08	0	0	0	0.001	0.0002	0.0011	0
0.076	0.006	0.0056	0.006	0.005	0.0045	0.004	0.005
0.035	0.03	0.029	0.03	0.028	0.031	0.025	0.029
0.024	0.008	0.0081	0.0056	0.006	0.006	0.008	0.0081
0.07	0.009	0.008	0.008	0.0065	0.0064	0.009	0.008
0.035	0.008	0.007	0.006	0.0068	0.0078	0.004	0.007
0.07	0.008	0.003	0.005	0.001	0.002	0.0012	0.003
0.038	0.018	0.02	0.05	0.052	0.023	0.025	0.02
0.09	0.017	0.019	0.025	0.023	0.011	0.002	0.019
0.08	0.012	0.01	0.02	0.03	0.014	0.012	0.012
0.06	0.013	0.012	0.025	0.023	0.015	0.016	0.012
0.08	0.012	0.01	0.013	0.012	0.016	0.011	0.01
0.09	0.01	0.001	0.002	0.01	0.02	0.011	0.001
0.085	0.07	0.06	0.05	0.02	0.054	0.03	0.063
0.005	0.02	0.021	0.03	0.012	0.01	0.023	0.021
0.042	0.01	0.01	0.013	0.012	0.014	0.02	0.01
0.068	0.006	0.005	0.06	0.02	0.002	0.03	0.005
0.025	0.015	0.016	0.018	0.02	0.0023	0.011	0.016
0.077	0.012	0.01	0.015	0.016	0.015	0.012	0.011
0.085	0.035	0.04	0.045	0.063	0.041	0.061	0.049
0.073	0.079	0.078	0.081	0.051	0.063	0.061	0.078
0.071	0.052	0.041	0.04	0.056	0.029	0.03	0.041
0.09	0.003	0.003	0	0.001	0.001	0	0.002
0.09	0.011	0.01	0.001	0	0.0021	0.001	0.01
0.025	0.019	0.018	0.016	0.011	0.015	0.012	0.0187
0.0001	0.009	0.003	0	0.01	0	0.001	0.003
0.08	0.014	0.016	0.0018	0.02	0.002	0.011	0.016
0.038	0.011	0.01	0.015	0.016	0.01	0.013	0.015
0.023	0.026	0.01	0.015	0.016	0.014	0.013	0.01
0.025	0.012	0.016	0.012	0.02	0.022	0.023	0.018
0.071	0.011	0.012	0.018	0.024	0.013	0.063	0.012
0.007	0.017	0.012	0.001	0.02	0.015	0.013	0.012
0.171	0.01	0.012	0.01	0.013	0.014	0.013	0.01
0.06	0.011	0.015	0.016	0.013	0.014	0.01	0.015
0.008	0.0012	0	0.01	0	0	0	0



0.017	0.018	0.01	0.01	0.012	0	0.017	0.012
0.086	0.016	0.012	0.015	0.018	0.024	0.022	0.012
0.097	0.01	0.01	0	0	0.03	0.001	0.01
0.05	0.013	0.016	0.014	0.02	0.031	0.025	0.016
0.074	0.01	0.014	0.012	0.023	0.014	0.001	0.014
0.051	0.01	0.022	0.018	0.01	0.001	0.0045	0.024
0.049	0.02	0	0.01	0.02	0.031	0.012	0
0.025	0.045	0.05	0.061	0.061	0.041	0.071	0.051
0.044	0.012	0.021	0.031	0.014	0.041	0.061	0.021
0.048	0.093	0.08	0.081	0.061	0.071	0.091	0.081
0.036	0.038	0.0321	0.037	0.061	0.031	0.051	0.0321
0.028	0.01	0.016	0.031	0.015	0.012	0.011	0.0164
0.025	0.042	0.03	0.025	0.046	0.04	0.039	0.03
0.083	0.016	0.01	0	0.012	0	0.013	0.01
0.022	0.01	0.021	0.032	0.024	0.023	0.01	0.021
0.084	0.017	0.012	0.01	0.018	0.016	0.014	0.012
0.021	0.013	0.012	0.013	0.014	0.0051	0.031	0.012
0.032	0.013	0.01	0.012	0.031	0.001	0.0121	0.01
0.069	0.001	0	0.001	0	0.0012	0	0
0.063	0.04	0.031	0.034	0.061	0.065	0.071	0.031
0.003	0.02	0.031	0.021	0.032	0.034	0.022	0.03
0.046	0.03	0.03	0.029	0.031	0.03	0.024	0.03
0.042	0.006	0	0.005	0	0.0031	0	0
0.009	0.023	0.021	0.021	0.031	0.029	0.031	0.021
0.094	0.02	0.03	0.023	0.031	0.0211	0.02	0.03
0.098	0.005	0	0.001	0	0.0003	0	0
0.278	0.039	0.012	0.041	0.039	0.029	0.031	0.012
0.162	0.025	0.018	0.022	0.022	0.029	0.023	0.015
0.06	0.012	0.01	0.01	0.012	0.013	0.011	0.01
0.061	0.05	0.041	0.051	0.05	0.046	0.051	0.041
0.027	0.016	0	0.011	0.01	0.016	0.031	0
0.156	0.011	0.01	0.021	0.014	0.014	0.003	0.01
0.051	0.028	0.021	0.03	0.01	0.031	0.061	0.021
0.08	0.018	0.023	0.012	0.012	0.041	0.031	0.024
0.019	0.01	0.031	0.054	0.061	0.031	0.034	0.031
0.085	0.02	0.031	0.061	0.041	0.051	0.05	0.031
0.039	0.021	0.03	0.024	0.031	0.012	0.041	0.03
0.077	0.01	0.021	0.01	0.013	0.015	0.012	0.021
0.045	0.005	0.001	0.002	0.003	0.0041	0.005	0.001
0.062	0.006	0.0021	0.0031	0.0014	0.0021	0.0021	0.002
0.068	0.08	0.045	0.078	0.056	0.058	0.081	0.044
0.06	0.043	0.064	0.067	0.068	0.094	0.06	0.065
0.004	0.001	0	0.006	0	0.004	0	0
0.024	0.0084	0.001	0.0056	0	0	0.001	0.001
0.066	0.046	0.042	0.043	0.051	0.061	0.037	0.04
0.095	0.096	0.06	0.038	0.053	0.042	0.08	0.061

**Données finales de la figure 12**

Semaines	1	2	3	4	5	6	7	8
min	0	0	0	0	0	0	0	0
max	0.096	0.088	0.08	0.081	0.071	0.094	0.091	0.081
moy-sd	0.001634	0.0014	0.0013380	0.0025724	0.0039316	0.0017120	0.001396	0.0013421
moy+sd	0.0425971	0.038	0.0383710	0.0439343	0.0434661	0.0427970	0.0466962	0.0391260
moy	0.0221159	0.0205	0.0198545	0.0232534	0.0236988	0.0222545	0.0240465	0.0202340

**Données préliminaires de la figure 13**

1 <sup>ière</sup> semaine	3 <sup>ième</sup>	5 <sup>ième</sup>	7 <sup>ième</sup>
0.031	0.041	0.04	0.047
0.041	0.03	0.055	0.071
0.0899	0.078	0.065	0.063
0.09	0.09	0.08	0.083
0.04	0.035	0.036	0.033
0.05	0.051	0.053	0.052
0.053	0.055	0.052	0.058
0.02	0.021	0.022	0.02
0.087	0.086	0.085	0.083
0.06	0.061	0.052	0.06
0.071	0.075	0.079	0.078
0.077	0.065	0.079	0.078
0.08	0.08	0.082	0.081
0.063	0.061	0.06	0.065
0.04	0.033	0.049	0.054
0.045	0.047	0.048	0.05
0.044	0.043	0.04	0.042
0.09	0.094	0.096	0.097
0.088	0.081	0.087	0.08
0.07	0.07	0.071	0.072
0.08	0.082	0.083	0.08
0.074	0.073	0.072	0.072
0.064	0.063	0.06	0.07
0.05	0.064	0.047	0.058
0.081	0.082	0.155	0.19
0.052	0.063	0.054	0.055
0.08	0.081	0.084	0.083
0.089	0.09	0.091	0.092
0.081	0.083	0.084	0.08
0.063	0.061	0.064	0.062
0.074	0.073	0.075	0.073
0.082	0.082	0.084	0.08
0.04	0.041	0.042	0.045
0.036	0.039	0.041	0.045
0.064	0.067	0.07	0.071
0.062	0.063	0.069	0.07
0.071	0.07	0.069	0.062
0.044	0.045	0.047	0.04
0.088	0.087	0.086	0.08
0.06	0.069	0.18	0.19
0.058	0.06	0.061	0.071
0.07	0.071	0.072	0.069
0.086	0.082	0.084	0.08

0.055	0.045	0.047	0.05
0.074	0.073	0.07	0.079
0.086	0.082	0.091	0.09
0.093	0.089	0.092	0.096
0.064	0.065	0.067	0.071
0.083	0.084	0.081	0.082
0.065	0.063	0.055	0.047
0.063	0.07	0.17	0.2
0.083	0.08	0.081	0.084
0.034	0.075	0.15	0.17
0.078	0.08	0.16	0.18
0.041	0.042	0.047	0.046
0.021	0.023	0.024	0.027
0.065	0.07	0.071	0.07
0.035	0.036	0.037	0.038
0.05	0.053	0.054	0.056
0.08	0.084	0.085	0.082
0.088	0.086	0.087	0.085
0.073	0.072	0.071	0.074
0.05	0.065	0.06	0.059
0.03	0.035	0.036	0.038
0.044	0.045	0.047	0.046
0.053	0.05	0.056	0.06
0.09	0.089	0.092	0.093
0.0532	0.054	0.06	0.061
0.062	0.067	0.064	0.06
0.05	0.052	0.054	0.053
0.078	0.07	0.081	0.08
0.035	0.037	0.038	0.039
0.03	0.04	0.036	0.05
0.064	0.069	0.063	0.07
0.068	0.063	0.065	0.07
0.055	0.056	0.061	0.059
0.066	0.067	0.06	0.069
0.03	0.035	0.039	0.032
0.045	0.05	0.051	0.052
0.084	0.089	0.086	0.079
0.051	0.052	0.054	0.053
0.073	0.072	0.074	0.08
0.054	0.057	0.059	0.06
0.07	0.071	0.072	0.074
0.084	0.08	0.082	0.081
0.059	0.06	0.062	0.0585
0.095	0.094	0.092	0.093
0.078	0.08	0.082	0.079

---

**Données finales de la figure 13**

semaines	1	3	5	7
min	0.02	0.021	0.022	0.02
max	0.095	0.094	0.18	0.2
moy-sd	0.044	0.057	0.05	0.04
moy+sd	0.0819	0.082	0.0981	0.104
moy	0.063194	0.064307	0.070125	0.072278
sd	0.018956387	0.01780217	0.02868196	0.03253275

**Tableau des données pour l'étude de l'effet technicien**

1 technicien	2 technicien	3 technicien
1.13	1.16	1.222
0.06	0.07	0.06
1.3	1.2	1.25
0.53	0.55	0.55
0.95	0.93	1.04
0.79	0.78	0.77
0.31	0.31	0.32
0.18	0.16	0.18
0.41	0.41	0.39
0.56	0.51	0.55
0.92	1	0.98
0.57	0.65	0.56
1.15	1.14	1.12
0.51	0.54	0.52
0.9	0.94	0.95
0.73	0.79	0.72
0.3	0.31	0.27
0.16	0.18	0.17
0.41	0.46	0.37
0.67	0.68	0.76
1.02	0.78	0.99
0.3	0.7	0.51
1.16	1.23	1.06
0.55	0.62	0.5
0.97	1.05	0.99
0.73	0.43	0.69
0.26	0.17	0.25
0.18	0.24	0.16
0.42	0.53	0.4
0.69	0.9	0.82
0.76	0.67	0.9
0.27	0.47	0.46
1.26	1.34	1.21
0.59	0.62	0.78
0.89	1.02	1.15
0.69	0.77	0.57
0.28	0.29	0.31
0.17	0.16	0.25
0.44	0.47	0.38
0.69	0.63	0.71
0.89	0.73	0.88
0.33	0.53	0.43

Tableau des données pour l'étude de la reproductibilité du test

premier technicien		deuxième technicien		troisième technicien	
0.47	0.48	0.48	0.46	0.53	0.53
0.38	0.39	0.42	0.39	0.46	0.46
1.14	1.09	1.22	1.08	1.35	1.25
0.28	0.38	0.3	0.29	0.36	0.36
1.01	0.98	1.16	1.04	1.13	1.07
0.74	0.79	0.8	0.95	0.75	0.76
0.87	0.86	0.98	0.96	1.07	1.05
1.29	1.3	1.34	1.36	1.25	1.23
0.39	0.4	0.44	0.44	0.51	0.51
1.07	1	1.01	0.97	1.07	1.06
0.61	0.53	0.57	0.57	0.65	0.64
0.91	0.88	0.93	0.9	0.9	0.87
0.78	0.77	0.83	0.8	0.92	0.82
0.98	0.95	1.04	0.98	1.21	1.07
0.71	0.74	0.7	0.68	0.77	0.87
0.9	0.91	0.86	0.85	0.95	0.84
0.81	0.84	0.77	0.79	0.84	0.85
0.71	0.69	0.67	0.65	0.73	0.73
0.27	0.27	0.29	0.31	0.29	0.27
0.52	0.51	0.58	0.55	0.6	0.65
0.78	0.72	0.69	0.72	0.75	0.74
0.62	0.65	0.67	0.66	0.65	0.6
0.31	0.33	0.36	0.34	0.39	0.34
0.61	0.61	0.65	0.65	0.64	0.66
0.94	0.95	0.82	0.8	0.99	0.9
0.3	0.3	0.245	0.26	0.24	0.24
0.75	0.75	0.83	0.8	0.78	0.76
0.66	0.65	0.59	0.56	0.54	0.54
0.3	0.3	0.33	0.31	0.37	0.36
0.78	0.77	0.67	0.66	0.67	0.65

Tableau figurant la SN-Texas et celle de FMV

SN-Texas	SN-FMV	ELISA sérum
0	0	0.15
0	0	0.2
0	0	0.23
0	0	0.24
0	0	0.19
0	0	0.09
0	0	0.1
0	0	0.17
0	0	0.21
0	8	0.27
0	0	0.16
0	4	0.2
0	32	0.26
0	32	1.71
0	0	0.6
0	0	0.01
0	0	0.02
0	0	0.1
0	0	0.19
0	0	0.07
0	0	0.06
0	0	0.08
0	0	0.13
0	0	0.21
0	0	0.09
0	0	0.02
0	0	0.05
0	0	0.3
0	0	0.26
0	0	0.39
0	0	0.03
0	0	0.15
0	0	0.02
0	0	0.13
0	0	0.12
0	0	0.09
0	0	0.02
0	0	0.08
4	16	0.14
4	4	0.07
4	4	0.27
4	4	0.23
4	16	0.26



4	16	0.26
4	8	0.23
4	16	0.38
4	8	0.3
8	64	0.41
8	4	0.37
8	32	0.35
8	8	0.44
8	32	0.46
8	32	0.34
8	16	0.51
8	8	0.25
8	8	0.3
8	16	0.44
8	8	0.54
8	16	0.3
8	16	0.26
8	32	0.27
16	32	0.43
16	32	0.44
16	32	0.37
16	64	0.58
16	64	0.28
16	16	0.29
16	16	0.19
16	128	0.71
16	16	0.28
16	16	0.02
32	64	0.3
32	64	0.35
32	64	0.54
32	64	1.29
32	64	0.27
32	64	0.88
32	64	0.48
32	32	0.41
32	64	0.29
32	64	0.53
32	64	0.44
32	16	0.35
32	64	0.77
32	64	0.61
32	128	0.65
64	32	0.15
64	128	0.97
64	128	0.98

64	32	0.82
64	64	0.52
64	256	1.09
64	128	0.67
64	128	0.66
64	128	0.7
64	64	0.62
64	64	0.29
64	64	0.32
64	32	0.39
128	256	1.4
128	256	1.14
128	64	0.37
128	256	1.2
128	256	0.84
128	256	1.08
128	256	0.47
128	256	0.42
128	128	0.58
128	64	0.48
128	256	0.92
128	64	0.59
128	256	0.7
128	256	1.27
128	256	0.34
256	256	1.25
256	256	0.58
256	128	1.35
256	256	1.02
256	256	1.01
256	256	0.69
256	256	0.76
256	256	0.66
256	256	0.62
256	256	0.94
256	128	0.39
256	128	0.29
256	256	1.12
256	256	1.02
256	256	0.78
256	256	0.07
256	256	0.83

---