

« Dépistage BVD chez les veaux nouveau-nés au LDA de la Nièvre » Mise en œuvre de l'antigénémie BVD E0 sur prélèvements auriculaires au LDA 58.

Interview de Chantal AUDEVAL, responsable technique santé animale et génétique moléculaire et responsable qualité du Laboratoire Départemental de la Nièvre (LDA 58).

Présentation du Laboratoire Départemental de la Nièvre

Le LDA 58 dépend du Conseil Départemental de la Nièvre et a une activité majoritairement en Santé Animale (65 à 70 % du CA), mais aussi en hydrologie (20 %) et en hygiène alimentaire (10 %). L'activité en Santé Animale comprend l'immuno-sérologie (notamment dans le cadre des prophylaxies), l'aide au diagnostic (autopsies, bactériologie et parasitologie), le dépistage de l'ESB sur prélèvements à l'équarrissage et la virologie.

Le LDA 58 compte une trentaine de salariés. Il est accrédité par le COFRAC pour la mise en évidence en virologie par PCR de nombreux pathogènes (BVD, Fièvre Q, paratuberculose etc...) dans le cadre du diagnostic de routine. L'espèce prépondérante pour les analyses de santé animale est l'espèce bovine (145 000 bovins en moyenne chaque année en prophylaxie, issus de 1800 cheptels, dont 1750 allaitants et 50 laitiers).

Le LDA 58 est pourvu de locaux classés P3 et réalise les analyses requises par la monte publique des chevaux, en particulier à la station de Cercy-La-Tour (58 340), vis-à-vis de la métrite contagieuse, de l'artérite virale équine et de l'anémie infectieuse des équidés ; le volume de ces analyses est de 700 à 800 par an, sur des prélèvements en provenance de la Nièvre et de la région Grand Est.

La biologie moléculaire est une activité qui a été tout particulièrement développée par Chantal AUDEVAL depuis son arrivée au LDA 58 en 2005, selon plusieurs axes :

- Diagnostic (en particulier par méthodes PCR).
- Génétique animale (depuis 2016, essentiellement dans l'espèce bovine) : génotypage pour contrôles de filiation ou détection de gènes d'intérêt zootechnique (exemple : sans cornes) ou de production (exemple : cular), ou liés à des maladies génétiques comme l'Ataxie progressive du Charolais. Un partenariat avec le Herd Book de la race a été développé pour la détection des gènes induisant cette maladie. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) et l'évaluation génomique par génotypage sur « puces à ADN » sont également proposés par le LDA 58. Il est l'un des deux seuls laboratoires publics accrédités en France par l'ICAR (International Committee for Animal Recording) pour l'identification des bovins par vérification de leur compatibilité génétique avec leur père et/ou leur mère. L'activité génétique animale du LDA 58 génère actuellement un CA d'environ 400 000 € par an, en croissance depuis sa création il y a 4 ans.

En Santé Animale, pour le diagnostic et les prophylaxies, en dehors de l'espèce équine, le LDA 58 a une activité départementale. Dans l'espèce équine, l'origine des prélèvements est plus large, en provenance de divers points de la région Bourgogne Franche-Comté.

Pour les analyses en génétique animale, l'aire d'activité est nationale et ponctuellement internationale (travaux réalisés sur des prélèvements originaires de Belgique).



Plan de lutte en vue de l'éradication de la BVD dans la Nièvre et type d'analyses pratiquées

Avant la fin juillet 2019, aucune mesure systématique de lutte contre la BVD n'avait été mise en place dans la Nièvre, et aucune donnée fiable de prévalence dans le département n'était disponible. Seuls des plans d'assainissement BVD dans les élevages manifestement infectés étaient mis en place chaque année au coup par coup.

Suite à la parution de l'arrêté ministériel du 31 juillet 2019 relatif à la surveillance et à la lutte contre la BVD, le GDS de la Nièvre a pris l'initiative de mettre en place un système volontaire de dépistage sur prélèvements auriculaires des veaux naissants, réalisés au moment du bouclage pour identification individuelle. L'appel d'offres passé par le GDS a été suivi de plusieurs propositions et d'une décision de son conseil d'administration en date du 12/03/2020 de faire réaliser les analyses correspondantes (virologie BVD) au LDA 58 par ELISA (antigénémie BVD E0).

Le type d'élevage bovin dominant dans le département est allaitant (97 % des cheptels), quasi-exclusivement en race Charolaise. La proportion de troupeaux vaccinés contre la BVD est de 25 à 30 % d'après le GDS 58, en grande majorité avec des vaccins vivants et fortement marqueurs en sérologie NS2-3 (par exemple : MUCOSIFFA®, BOVELA®, ...).

Pour cette raison, la stratégie de dépistage de la BVD choisie par la FRGDS Bourgogne Franche-Comté a été la virologie sur prélèvements auriculaires des veaux naissants.

Au cours de la saison de vélages 2019-2020, 10 000 à 12 000 prélèvements auriculaires étaient attendus au LDA 58, en provenance des éleveurs volontaires.

Le programme de dépistage est obligatoire pour tous les cheptels de la Nièvre depuis le 1er août 2020, avec un nombre de prélèvements attendus multiplié par 10 au cours de la saison de vélages 2020-2021 (environ 120 000 naissances par an dans le département).

Les vélages dans le département sont concentrés de Novembre à Avril, avec un pic entre Janvier et Mars.

A cette période de l'année, les équipes du LDA 58 sont déjà très occupées (analyses des sérums de prophylaxie et des prélèvements reçus dans un but diagnostique, avec un nombre maximal de prélèvements en saison d'étable, qui est aussi la période de risque pathologique maximal en élevage bovin, en particulier pour les maladies néo-natales et les affections respiratoires).

« Cette saisonnalité générera un énorme pic d'activité que le LDA 58 devra être en mesure de gérer » selon les termes de Chantal AUDEVAL.

« Actuellement nous devons traiter jusqu'à 200 à 300 biopsies auriculaires par jour pour virologie BVD : l'an prochain ce nombre devrait être multiplié par 10. »

Quels sont les défis que votre laboratoire va devoir relever pour mettre en place ce programme ?

« Le défi majeur est qu'on ne peut maîtriser le flux des différents prélèvements reçus au cours de l'année (jusqu'à 8000 à 9000 sérums de prophylaxie reçus quotidiennement en saison hivernale, auxquels il faut ajouter les prélèvements à des fins diagnostiques et les biopsies auriculaires dont le nombre devrait être multiplié par 10, avec des pics de 2000 à 2500 par jour, au cours de la prochaine saison). Une réflexion a dû être menée avec le GDS pour anticiper les événements et s'organiser conjointement afin d'éviter un trop-plein d'analyses à gérer (envoi des résultats aux différents destinataires, décisions à prendre en matière sanitaire selon la situation des cheptels, avec par exemple l'établissement de courriers-types destinés aux éleveurs). »

Votre laboratoire a une forte expertise sur la méthode PCR, mais quelles ont été vos motivations pour utiliser l'antigénémie ELISA au lieu de la PCR ?

« Oui je suis reconnue comme une pionnière de la PCR ; elle constitue mon domaine de prédilection ; je suis d'ailleurs auditeur en PCR pour le COFRAC » reconnaît Chantal AUDEVAL. « Antigénémie comme PCR présentent des caractéristiques globalement équivalentes, en termes de spécificité et de sensibilité, mais l'incertitude sur la prévalence de la BVD dans notre département rend les analyses en mélanges de 10 potentiellement difficiles à gérer, avec une grosse incertitude sur le temps nécessaire pour obtenir les résultats en cas de mélanges positifs, qui devront être repris en individuel. En outre les résultats sont plus difficiles à lire en PCR (interprétation des courbes) et nécessitent beaucoup d'opérations et de matériel, avec un personnel formé. Certains fournisseurs m'ont même proposé de réaliser la PCR BVD sur les prélèvements individuels à des tarifs compétitifs, mais traiter 2000 échantillons par PCR (soit 20 plaques) dans une journée est ingérable. Pour toutes ces raisons j'ai opté, au LDA 58, pour l'antigénémie ELISA » a confirmé Chantal AUDEVAL.

Quelles sont vos considérations sur la stabilité des prélèvements en regard des différentes technologies PCR et ELISA ?

« Tout d'abord les expériences de validation des différentes méthodes par le Laboratoire National de Référence sur des biopsies conservées à différentes températures pendant des durées croissantes ont montré une meilleure fiabilité de l'antigénémie E0 par rapport à la PCR au cours du temps. Avec la technique PCR toutes les biopsies auriculaires qui parviennent au-delà de 15 jours après la date de prélèvement sont refusées et un nouveau prélèvement est demandé. L'antigénémie nous permet d'alléger cette contrainte et de procéder aux analyses jusqu'à un délai maximal de 30 jours. La proportion d'envois trop tardifs par les naisseurs est faible cette année (éleveurs volontaires motivés et techniquement « haut de gamme ») mais l'an prochain où le dépistage sera obligatoire pour tous les naisseurs, cette proportion risque malheureusement d'augmenter » selon Chantal AUDEVAL qui ajoute :

« Dans le cadre de notre démarche d'accréditation par le COFRAC de l'ELISA BVD antigène sur biopsies auriculaires, que nous avons obtenue en juin 2019, comme une dizaine d'autres laboratoires en France, nous avons fait des tests sur des échantillons conservés à 21°C ou à 37°C qui ont montré une très bonne stabilité en ELISA jusqu'à 42 et même 48 jours après prélèvement. »

Quelle est votre organisation pour l'analyse BVD utilisant le test ELISA IDEXX BVDV Ag/Serum Plus ?

A réception par la poste au LDA 58, les enveloppes (qui peuvent contenir jusqu'à 3 biopsies auriculaires chacune) sont triées par jour de prélèvement (la mention doit être indiquée par le naisseur en manuscrit sur chaque enveloppe).

Après ouverture de toutes les enveloppes reçues portant le même jour de prélèvement, les ensembles formés par le trocart contenant la biopsie et le tube de prélèvement attenants sont « débouclés » un par un à l'aide du système de gestion des biopsies fourni par IDEXX : chaque échantillon à analyser est éjecté du trocart dans le tube qui l'accompagne. Ce tube comporte un QR code correspondant au numéro d'identification de l'animal, inscrit au fond du culot. Le trocart porte également sur sa collerette un QR code contenant le numéro d'identification de l'animal mais aussi le numéro du cheptel. Le système IDEXX de gestion individuelle des biopsies permet, après avoir scanné le QR code au fond du tube, d'éjecter la biopsie dans celui-ci en appuyant sur une pédale. Cette pédale déclenche la mise en mouvement d'un poinçon qui chasse la biopsie de la lumière du trocart en le propulsant dans le tube de prélèvement. Lors de cette opération, le QR code figurant sur la collerette du trocart est également scanné et sa cohérence avec le QR code figurant au fond du culot du tube est vérifiée. Cela permet d'éviter un risque d'erreur au cas où les deux codes ne correspondraient pas au même animal. En cas de doute, le numéro d'animal qui figure sur la collerette est privilégié par le laboratoire (un mélange des boucles et des tubes de prélèvement attenants étant toujours possible par l'éleveur).

Au fur et à mesure du débouclage des biopsies, les scans génèrent un plan de plaque qui s'affiche sur l'écran de l'opérateur. Le tout est exporté dans un fichier Excel qui s'intègre dans le logiciel de traitement des échantillons par le laboratoire.

Chaque tube de prélèvement contenant la biopsie et portant le QR code avec le numéro d'identification de l'animal est inséré dans une plaque de 96 puits (92 échantillons maximum par plaque, compte tenu de la présence des 4 témoins), avant de procéder à l'analyse par ELISA.

La présence de la biopsie au fond de chaque tube de prélèvement est vérifiée visuellement par l'opérateur avant de procéder à l'analyse de la plaque. Le prélèvement peut parfois rester collé à l'entrée du tube et nécessite alors d'être poussé manuellement par l'opératrice à l'aide d'un embout stérile.

Une seule opératrice peut scanner et déboucler en 10 à 15 minutes maximum les biopsies correspondant à la constitution d'une plaque pour analyse ELISA.

Quel est votre délai d'obtention et de transmission des résultats d'analyse ?

Cet hiver, en phase de test du dépistage BVD sur biopsies auriculaires, portant sur environ 10 % des vêlages, ce délai est de 24 heures (envoi des résultats au naisseur et au GDS avec mise à disposition, moyennant un accès sécurisé, sur le site internet du LDA 58). « L'objectif est un délai de 3 jours maximum la saison prochaine, où nous aurons 10 fois plus de prélèvements à traiter » indique Chantal AUDEVAL.

Pouvez-vous citer d'autres raisons qui font que le test IDEXX BVDV Ag ELISA satisfait à vos besoins et à ceux de votre client ?

« Le gain de temps et la traçabilité offerts par l'ensemble 'antigénémie & système IDEXX de gestion des biopsies', sont des éléments majeurs par rapport à d'autres offres qui peuvent avoir d'autres avantages par ailleurs. Le système IDEXX de gestion des biopsies présente également l'avantage de pouvoir faire fonctionner, si nécessaire, deux postes d'opérateur simultanément. En outre la vérification de la concordance des QR codes entre le culot du tube et la collerette du trocart de prélèvement offre une garantie de traçabilité importante » selon Chantal AUDEVAL.

« Par rapport à la PCR, l'absence de constitution de pools pour analyse, sans nécessité de reprendre ensuite les pools positifs en individuel, procure une économie de temps et minimise le risque d'erreurs manuelles liées à l'opérateur. De même il n'est pas nécessaire de garder les plaques au réfrigérateur après analyse, pour reprise des mélanges positifs, ce qui simplifie la gestion des prélèvements ».



▲ **Système IDEXX de gestion des biopsies : La biopsie auriculaire est une nouvelle matrice qui demande une nouvelle organisation et la mise en œuvre de nouveaux outils au sein du laboratoire.**

Avant de pouvoir lancer l'analyse sur ce type de prélèvement il y a des étapes d'ouverture des boucles, d'extraction et de traçabilité très chronophages et consommatrices en main d'œuvre.

Il est donc crucial, eu regard du grand nombre de prélèvements attendus lors de la mise en place du dépistage à la naissance, d'optimiser cette étape afin de gagner en efficacité, de limiter le temps passé et la main d'œuvre.

Qu'avez-vous mis en place pour optimiser la gestion des boucles reçues par courrier ?

« Nous effectuons au LDA 58 un seul tri des enveloppes reçues contenant les biopsies, par date de prélèvement. Nous avons réduit, grâce au système de gestion des biopsies auriculaires proposé par IDEXX, le temps nécessaire au débouclage des biopsies à 15 minutes seulement par plaque de 92 prélèvements. » d'après Chantal AUDEVAL.

En quoi ceci vous a permis d'optimiser les étapes pré-analytiques ?

« Nous réalisons une seule analyse par jour des biopsies que nous recevons.

Il faut à l'opératrice, pendant la phase actuelle de « rodage » de notre laboratoire vis-à-vis de cette nouvelle prestation, environ 15 minutes seulement pour constituer une plaque de 92 prélèvements pour analyse » témoigne Chantal AUDEVAL.

Pouvez-vous chiffrer les gains obtenus grâce à ces outils (temps, main-d'œuvre...) ?

« En comparaison avec les outils fournis par IDEXX, le système Allflex de gestion des biopsies auriculaires humides pour conduire des analyses génétiques nécessite 25 à 30 minutes pour déboucler une plaque de prélèvements. »

« Le système Amitech de débouclage permet d'ouvrir jusqu'à 5 trocarts simultanément mais sans lecture de code barre intégrée, ce qui nécessite la mise en place d'un système manuel de traçabilité et induit un délai supplémentaire de même qu'un risque d'erreurs liées à l'opérateur. »

Que vous a apporté plus spécialement IDEXX à travers son offre BVD ?

« Ce qui me séduit est l'offre globale proposée par IDEXX, intégrant tout le processus d'analyse depuis l'arrivée des échantillons au laboratoire jusqu'à la transmission des résultats ; cette chaîne intégrée est très confortable pour le laboratoire et permet de n'avoir qu'un seul interlocuteur avec des conditions de prix plus intéressantes. »

« J'apprécie également l'expérience d>IDEXX, notamment acquise dans les pays qui ont déjà conduit des plans d'éradication de la BVD, et son répondeur dans le domaine technique comme dans les relations commerciales » a conclu Chantal AUDEVAL.

Pour plus d'information :
www.idexxdiagnosticbvd.fr

Propos recueillis par Laurent MASCARON
(Vétérinaire Consultant)



Chantal AUDEVAL
Responsable technique santé animale et génétique moléculaire et responsable qualité du Laboratoire Départemental de la Nièvre (LDA 58)