

Journée UMT Santé



Vendredi 5 avril 2013

Démarche harmonisée d'investigation des avortements bovins

R. Guatteo

L'idéal

Diagnostic direct systématique

Sur toutes les matrices d'intérêt

Sur des animaux venant d'avorter

Ces animaux avortant tous en même temps d'un même pathogène

Avec un laboratoire d'analyse juste à côté

Des analyses peu coûteuses



La vraie vie

Vache	BVD		Fièvre Q		Néosporose		Leptospirose		Chlamydirose		Anaplasmosse	Listeriose		Salmonellose
	Séro	PCR	Séro	PCR	Séro	PCR	Séro	PCR	Séro	PCR	Séro	Séro	Bact	Bact
0833	+		-		-				-		-	-		
0548				-	-									
0866		-				-	+			-				
0573														
0782				-										
0879		-				-		-		-			-	-
0902	+		-				-							

Rarement les mêmes analyses, au même moment
Que conclure ?

Travaux UMT 2010

En première intention [Travaux UMT Santé Bovins]

Agent	Rang	Prélèvement(s)	Analyse(s)	Grille d'interprétation	Commentaires
<i>Coxiella burnetii</i>	1	Placenta ou E ou Liquide stomacal avorton	PCR temps réelle	Charge >10 ⁴ b/g PCR+ sur liquide stomacal	Cf recommandations ACERSA
		Sérum sur 6 Vaches (avortée(s), vaches à problèmes repro qsp 6, dont 3 primipares)	ELISA (souche isolée de Ruminants)	Au moins 4 séropositives sur 6 pour attribuer les avortements répétés à Cb	
Néosporose	1	Placenta ou EV (voire encéphale avorton)	PCR	PCR positive suffisante	
		Sérum sur 6 vaches (avortée(s), vaches à problèmes repro qsp 6, dont 3 primipares)	ELISA (n'importe lequel)	Au moins 4 séropositives sur 6, voire 2 avortées sur 3	Besoin d'un sang de référence
BVD	1	Placenta ou EV ou rate avorton	PCR temps réelle	PCR positive	Risque de Faux négatifs
		Sérum sur 6 Vaches (avortée(s), vaches à problèmes repro qsp 6, dont 3 primipares)	ELISA p80	Au moins 4 séropositives sur 6 avec lait de tank négatif	En allaitant, 4/6 plus confirmation sur 5 sentinelles au sevrage
Bacterio/myco	1	Placenta ou EV, ou Liquide stomacal avorton	Bactériologie (y compris Listeria)/Myco classiques	Isolement (ou pathogène majeur) en culture pure	Sur liq stomacal : isolement suffisant pour Listeria Diagnostic individuel uniquement

En 2^{ème} ou 3^{ème} intention [Travaux UMT Santé Bovins]

Agent	Rang	Prélèvement(s)	Analyse(s)	Grille d'interprétation	Commentaires
FCO-BTV	2-3	Sang total (EDTA) de l'avortée(s)	PCR temps réelle	Ct précoce	
Salmonelles	2-3	Placenta ou EV ou Liquide stomacal avorton	Bactériologie (voire PCR ?)	Isolement en culture pure plus identification : <i>Dublin</i> , <i>Montevideo</i> , <i>Typhimurium</i> , <i>Panama</i> ?	A passer en rang 1 selon contexte
<i>Chlamydoiphila</i>	2-3	Placenta ou EV ou Liquide stomacal avorton	PCR temps réelle	PCR positive pour le moment (seuil à définir)	Si PCR spécifique abortus/pecorum
		Sérum sur 6 Vaches (avortée(s), vaches à problèmes repro qsp 6, 3 primipares/3 multipares si possible)	ELISA (à définir)	A définir	Besoin d'une étude Chlam spp vs Chlam abortus?
BHV-4	2-3	Placenta ou EV ou rate avorton	Virologie	(à affiner)	Besoin d'études
		Sérum sur 6 Vaches (avortée(s), vaches à problèmes repro qsp 6, 3 primipares/3 multipares si possible)	ELISA	(à affiner)	
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	2-3	Sang total (EDTA) de l'avortée de J0 à J5 et serum sur 6 VL avortées	PCR IFI	PCR positive A affiner	

En 2^{ème} ou 3^{ème} ou 4^{ème} intention [Travaux UMT Santé Bovins]

Agent	Ran g	Prélèvement(s)	Analyse(s)	Grille d'interprétation	Commentaires
<i>Leptospira</i>	2-3	Placenta ou EV ou Liquide stomacal avorton	PCR (ciblant lepto pathogènes)	PCR Positive	Très lié à qualité prélèvement et envoi
		Sérum sur 6 Vaches (avortée(s), vaches à problèmes repro qsp 6, 3 primipares/3 multipares si possible)	A affiner	A affiner	
<i>Campylobacter</i>	2-3	Placenta ou EV ou Liquide stomacal avorton	PCR (ciblant <i>C. foetus</i>)	PCR positive	PCR disponible ?
IBR-BHV1	2-3	Selon l'épidémiologie, sérum sur 6 vaches	ELISA	Recherche séroconversion (inutile si lait tank négatif)	
Besnoitiose	3-4	Placenta ou EV	PCR	PCR positive et contexte clinique	(intérêt DO ELISA ?)
Toxoplasmose	3-4	Placenta ou EV ou Liquide stomacal avorton	PCR	A affiner avec LASAT	
		Sérum sur 6 Vaches (avortée(s), vaches à problèmes repro qsp 6, 3 primipares/3 multipares si possible)	ELISA ?	A affiner avec LASAT	

Boite de prélèvement

Dans l'idéal avorton entier, si pas possible

Placenta prélevé dans l'utérus
avec houppe cotylédonaire
Et/ou 3 écouvillons vaginaux

Avorton si possible, *a minima* :
contenu stomacal tube sec au
vacutainer, plus -si possible-
organes de l'avorton
(rate, foie, cœur)

1 couple tube sec et tube EDTA
sur vache avortée

Echantillon 6 tubes sec sur
vaches à problèmes (refaire
anciennes avortées après J21
et à problèmes) dont 3
primipares



Prélever d'emblée ce qui pourrait servir en 1ère
et 2-3-4ème intention

Un exemple de mise en œuvre

Equipe de Recherche

- UMR BioEpAR

Laboratoires d'analyses

- ISAE35, LDA56, LASAT

Groupements de Défense Sanitaire

- UBGDS

Un fabricant de réactifs

- LSI

Un creuset



Protocole mis en œuvre

Prélèvements

- 888 avortements inclus (2/3 Laitier, 1/3 Allaitant), >70% avortements répétés
- Sur écouvillon vaginal (en l'état ou fait sur placenta)
- PCR « multi-agent » : Trousse SAR LSI

Détection concomitante de 8 agents à ADN

- *Coxiella burnetii*
- *Chlamydophila abortus*
- *Anaplasma phagocytophilum*
- *Listeria monocytogenes*
- *Salmonella* spp
- BHV 4
- *Campylobacter fetus fetus* et *veneralis*
- *Leptospira* spp (pathogènes)

		ech 1	ech 2	ech 3	ech 4	ech 5	ech 6	ech 7	ech 8	ech 9	ech 10	ech 11	ech 12
PCR duplex	<i>Coxiella b.*</i>												
	<i>Chlamydia spp.*</i>												
PCR simplex	<i>Listeria monocytogenes</i>												
	<i>Salmonella spp.</i>												
	<i>Campylobacter fetus</i>												
	<i>Leptospira pathogènes</i>												
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>												
	BHV4												

* validation IPC de l'ensemble des PCR du kit "avortement" pour chaque échantillon

Résultats : Au global

Cibles	Total (%)
<i>Coxiella burnetii</i>	17.12
<i>Chlamydophila abortus</i>	1.01
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	1.18
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	0.19
<i>Campylobacter</i> (ff, v)	0.34
BHV 4	1.69
Total	33.3

Réel intérêt d'une détection simultanée
Confirme les rangs de recherche
Voire écarte certains agents en 1-2^{ème} intention (Chlam)

Bonus

PCR Néosporose sur encéphale

6 pos / 85

BVD

0 pos sur 57

Schmallenberg

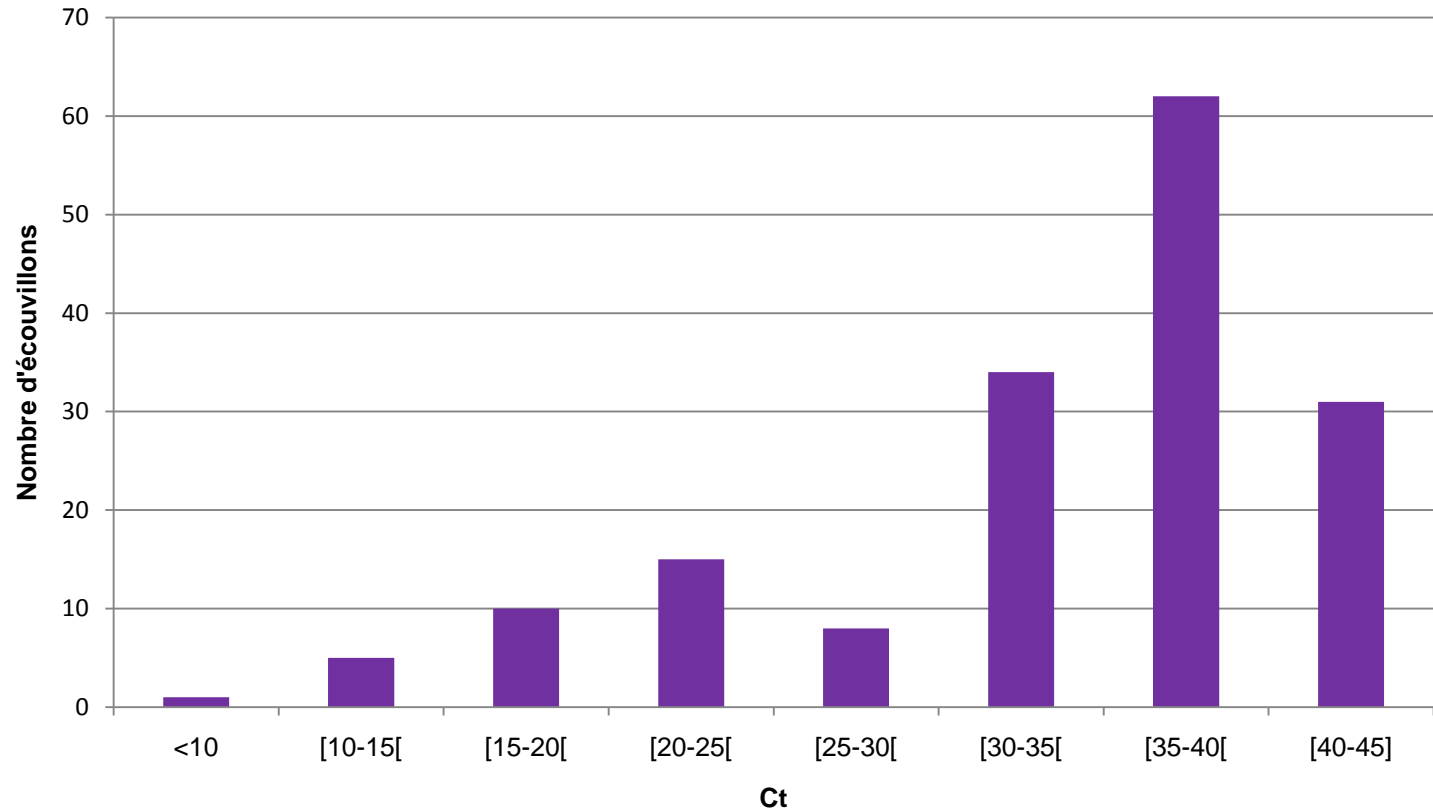
16 pos /103

Des constantes et des préférences régionales

Cibles	LASAT 79-86	ISAE 35	LDA 56	Total
Coxiella	19.2	9.7	22.0	17.12
Chlam	2.1	0.4	0.4	1.01
Listeria	1.2	1.4	1.8	1.46
Salmo	0.9	9.0	3.2	4.17
Lepto	0.9	2.2	1.1	1.35
Anaplasma	5.2	5.8	7.8	6.19
Campylo	0.3	0.7	0.0	0.34
BHV	3.4	0.4	1.1	1.69
<i>Total</i>	33.2	29.5	37.2	33.3

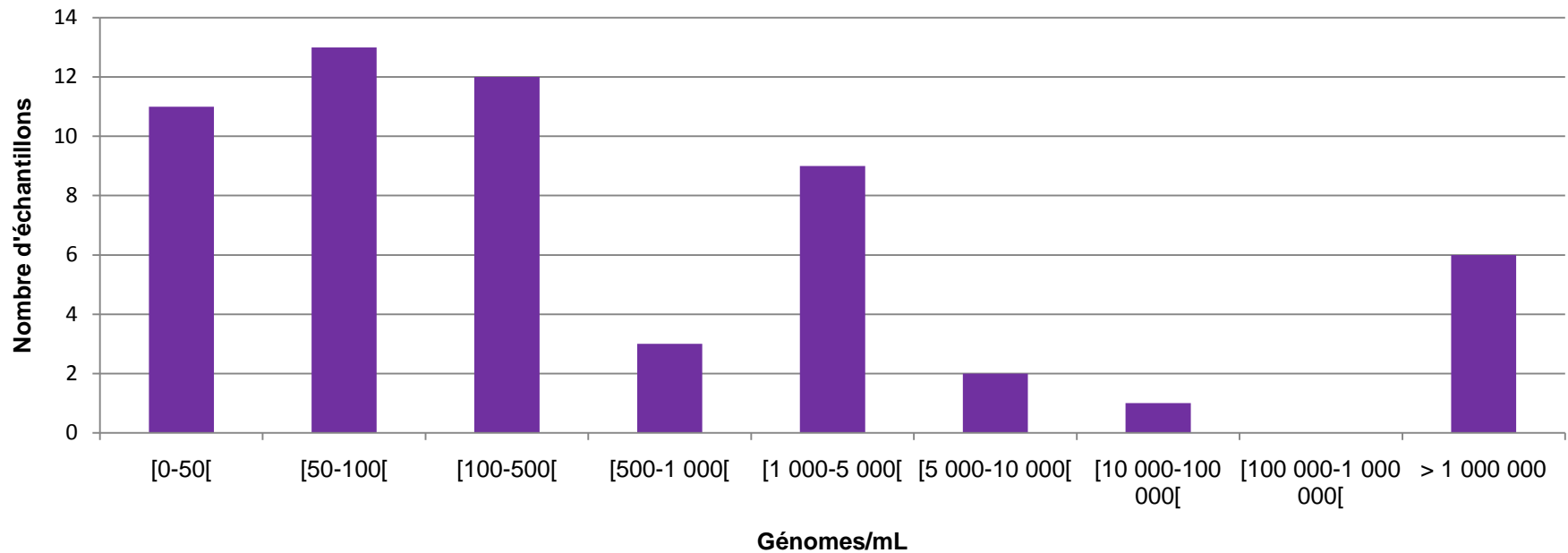
- Confirmation Cible FQ « partout »
- Confirmation du besoin de cibles « locales »
- Anaplasma à considérer plus tôt ?
- Analyses en cours (moment avortement, saison, délai prélèvement...)

Focus FQ : Distribution Ct



Quid imputabilité ?
Besoin quantification et sérologies

Focus FQ : Quantification



N=51 échantillons LASAT

Gamme Ct : 8-40

Ct<30 : tous >10⁴

Focus FQ : Sérologies (Morbihan)

Sérologies concomitantes		PCR		Total
		PCR -	PCR +	
Pas réalisées/disponibles		178	48	226
Sérologies (>5 animaux)	0%	0	1	1
]0-50% sero + [28	8	36
	[50% séro + et plus	12	5	17
Total		218	62	280

Détection « précoce » du fait étude/sensibilisation

Choix des animaux prélevés ? : dilution potentielle par témoins

- Choix primordial : animaux malades

Intérêt de collecter/centraliser données

Au final

FQ confirmée comme maladie abortive majeure

Moins de co-infections que initialement suspecté

Des signaux originaux : *Anaplasma Phagocytophilum*

Intérêt de la recherche directe concomitante

“Elucidation” : 33% environ seulement

Matrice écouvillon utilisable : standardisation ++

Envoi de l'avorton : idéal !!!

Mais quand on coupe avec les analyses sérologiques autres (Néospora/BVD)

On arrive à 50-60% d'élucidation au mieux

Besoin d'appliquer une démarche standardisée
Analyser rétrospectivement pour élaborer version mise à jour

Conclusion

Première limitante : la déclaration par l'éleveur : Sensibilisation-Information

Deuxième limitante : quelles vaches-quelles analyses : Proposition d'un socle commun (Néosporose, BVD, FQ +/- spécificités locales)

Troisième limitante : moment du prélèvement-analyse : prélever tout à J0

Quatrième limitante : des mesures après le diagnostic : des mesures disponibles et validées pour le diagnostic posé

Importance signes cliniques connexes pour recherche II intention

Encore de nombreuses inconnues/limites : besoin de produire de la connaissance (études terrain, harmonisation protocole, études de prévalence)

Merci de votre attention



Co-infections ?

Co-infections ?

Sur les données de 736 avortements

230 positifs

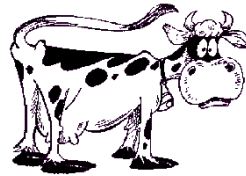
→ 10% seulement (n=24) positifs à plusieurs cibles (BHV, FQ)

Combinaisons	Nombre
FQ/Anaplasma	8
FQ/Listeria	3
FQ/Salmo	3
FQ/BHV	2
FQ/Lepto	1
FQ/Chlam	1
Salmo/Lepto	2
Salmo/Anaplasma	1
BHV/Chlam	1
BHV/Anaplasma	1
<i>Total</i>	<i>24</i>

Effet fréquence ?
Agent toujours
présent ?

Un protocole ... centré sur le bovin Ex FQ

Diagnostic avortement isolé



PCR individuelle

Sérologie

PCR Lait Tank

OUI

NON

NON

Placenta, mucus ou avorton



**Existence séro(-)
excréteurs**

**Aucune valeur prédictive
positive**

La sérologie individuelle pour l'avortée ?

Vache	J0	J0	Séroprévalence Intra-troupeau (%)
	Résultats PCR	ELISA LSI	
1	+	++	51
2	+	-	42
3	+	++	56
4	+	+	51
5	+	+	75
6	+	++	33
7	+	++	40
8	+	+	53
9	+	++	47
10	+	++	40
11	+	-	47
12	+	-	33
13	+	-	15

Manque de Sensibilité sérologie, intérêt échelle troupeau

Quand réaliser les sérologies

Réponse sérologique

Chèvres infectées expérimentalement

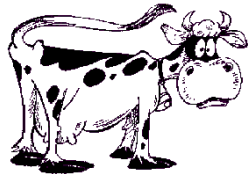
Densité optique : % de positivité



D'après Arricau-Bouvery et al. 2003

Un protocole ... centré sur les bovins Ex FQ

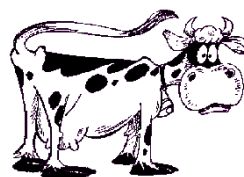
Diagnostic avortements répétés



PCR individuelle

OUI sur VL dont
l'avortement < 8j

*Placenta, mucus ou
avorton*



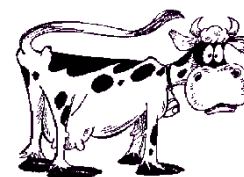
Sérologie

Oui sur VL dont l'avortement > **NON**
8-15j

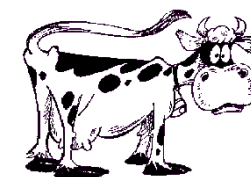
ou à problèmes
de reproduction

*3 primipares
3 multipares*

Pas de témoins

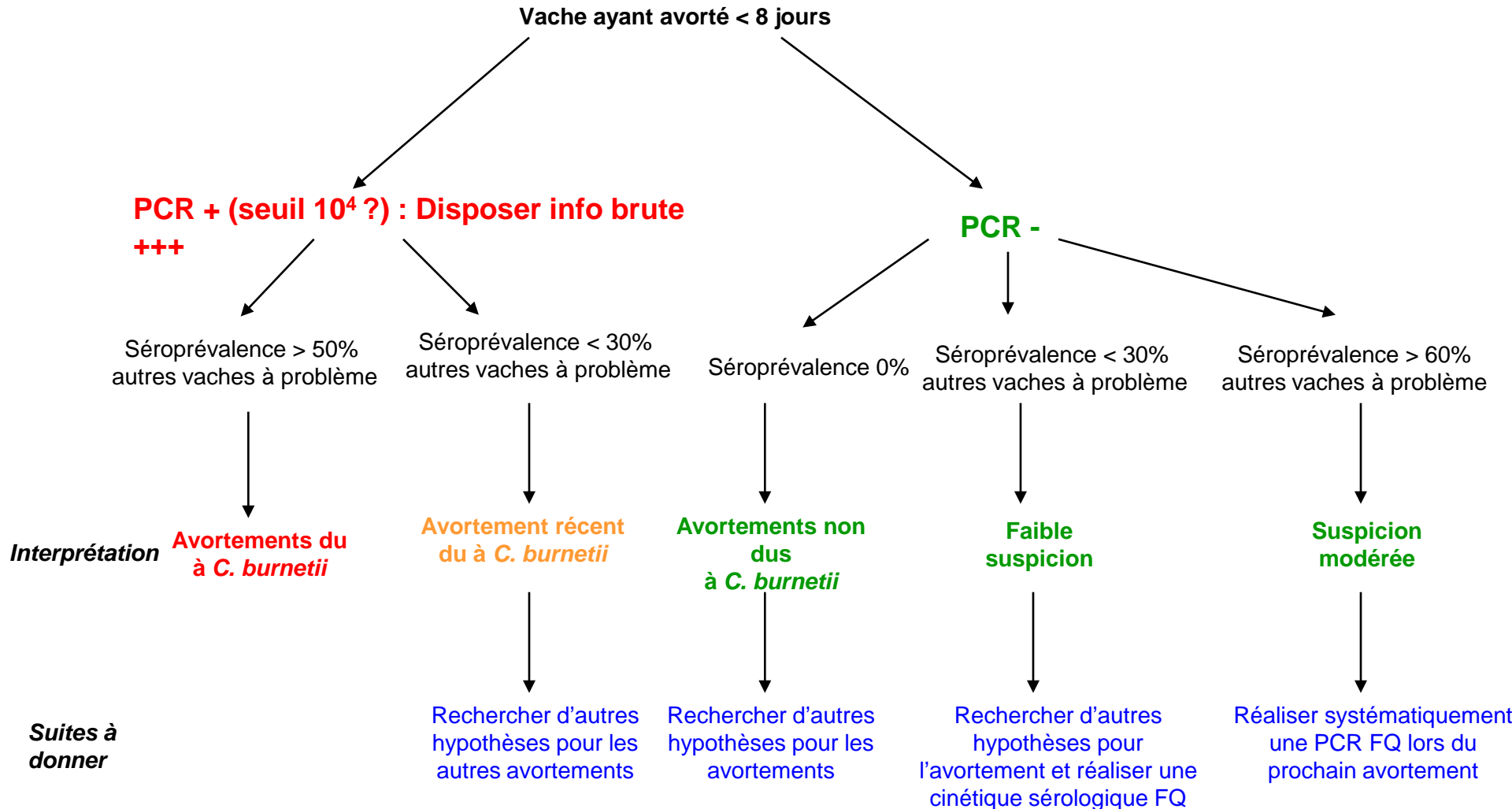


PCR Lait Tank



Des résultats ... une interprétation Ex FQ

Acersa d'après Guatteo et Joly, 2004



Exemple 2 : Diagnostic BVD allaitant

**PCR : excellente VPP mais faible VPN
virémie souvent finie au moment de l'avortement**

Cas de figure où le statut du troupeau est connu et favorable (négatif)

Faire réaliser les sérologies sur les prises de sang des vaches avortées (vache récemment avortée et vache(s) anciennement avortée(s) prélevées parmi les 6 vaches à problèmes

- Si toutes les vaches avortées sont séronégatives l'imputabilité du virus BVD dans la série d'avortements peut être considérée comme « Peu probable »
- Si au total parmi les 6 vaches à problème 1 vache est séropositive, l'imputabilité du virus BVD dans la série d'avortements peut être considérée comme « Peu probable »
- Si au total parmi les 6 vaches à problème 2 ou 3 vaches sont séropositives, l'imputabilité du virus BVD dans la série d'avortements peut être considérée comme « Possible (présomption ++) »
- Si au total parmi les 6 vaches à problème 4 à 6 vaches sont séropositives, l'imputabilité du virus BVD dans la série d'avortements peut être considérée comme « Forte »