

Deux protocoles d'hyperimmunisation au moyen de vaccins marqués réduisent l'incidence de séroconversion envers l'herpèsvirus bovin 1 en cheptels laitiers : résultats d'une étude sur le terrain.

DISPAS M.¹, LEMAIRE M.², SPEYBROECK N.³, BERKVEN D.³, DUPONT A.⁴, BOELAERT F.¹, DRAMAIX M.⁵, VANOPDENBOSCH E.¹, KERKHOFS P.¹, THIRY E.⁵

1 Centre d'Etudes et de Recherche Vétérinaires et Agrochimiques, Groeselenberg 99, B-1180 Bruxelles, Belgique.

2 Laboratoire Vétérinaire Départemental, Rue Las Escoumes, BP 83. 09007 FOIX cedex, France.

3. Department Animal Health, Epidemiology Unit, Prins Leopold Instituut voor Tropische Geneeskunde, Nationalestraat 155, B- 2000 Antwerpen, Belgique.

4. Direction Générale Statistique et Information Economique, SPF Economie, PME, classes moyennes et Energie, Square de Meeûs 23, B-1000 Bruxelles, Belgique.

5. Département Statistiques Médicales, Ecole de Santé publique – Université Libre de Bruxelles, CP598, route de Lennik 808, B-1070 Bruxelles, Belgique.

6. Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Virologie et Epidémiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster B43 bis, B-4000 Liège, Belgique.

Correspondance : Prof. Etienne THIRY

tél +32 (0)4 366 42 63 (secretariat) – fax +32 (0)4 366 42 61 – Email: etienne.thiry@ulg.ac.be

RESUME : Une étude de cohortes, d'une durée de 28 mois, a été réalisée dans des cheptels laitiers, en Belgique, pour évaluer l'efficacité de l'hyperimmunisation comme moyen de contrôle de la rhinotrachéite infectieuse bovine. Deux protocoles d'hyperimmunisation par administration répétée de vaccins marqués, délétés dans le gène codant pour la glycoprotéine d'enveloppe gE, ont été comparés à un groupe témoin, dans lequel les schémas de vaccination habituels étaient autorisés. Les deux protocoles d'hyperimmunisation différaient par la primovaccination : pour le premier groupe, une formulation atténuée a été utilisée, d'abord par voie intra-nasale, puis par voie intramusculaire, alors que pour le second groupe, une formulation inactivée a été utilisée, administrée deux fois par voie sous-cutanée. Ensuite, les vaccinations de rappel étaient identiques pour les 2 groupes : une administration sous-cutanée d'un vaccin inactivé, tous les 6 mois. Au sein du groupe témoin, une vaccination annuelle d'une partie du cheptel fut la règle. Pour chaque groupe, six bilans semestriels précisent 1. l'évolution de l'effectif de la population catégorisée en semestres de générations, 2. l'incidence de séroconversion envers gE au sein de chaque cohorte et 3. l'évolution de la séroprévalence vis-à-vis de gE. Les courbes de survie des groupes hyperimmunisés montrent une plus grande proportion d'animaux sains restant séronégatifs par rapport au groupe témoin ($P < 0,001$). Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les deux protocoles de vaccinations répétées. Les deux protocoles d'hyperimmunisation testés pourraient donc être utilisés comme moyen de contrôle de la rhinotrachéite infectieuse bovine.

INTRODUCTION

L'herpèsvirus bovin 1 (BoHV-1), appartenant à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, est responsable de plusieurs tableaux cliniques dont la forme la plus fréquente est la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) (Lemaire *et al.*, 1994). La forme affectant le système reproducteur est caractérisée, chez les femelles, par

des métrites après césarienne, des avortements (Thiry, 2002) ou plus rarement la vulvovaginite infectieuse pustuleuse (Kahrs, 1977), alors que les mâles infectés présentent de la balanoposthite (Wyler *et al.*, 1989). Les veaux nouveau-nés privés de protection colostrale développent généralement la forme systémique de l'infection pouvant conduire à la mort de

l'animal (Thiry *et al.*, 1984).

A l'instar des autres herpèsvirus, le BoHV-1 s'établit à l'état latent : l'animal, après primo-infection, reste porteur à vie du virus. En effet, lors de la phase de multiplication au niveau de la « porte d'entrée » (muqueuse nasale ou génitale), le virus pénètre dans les terminaisons périphériques des neurones sensitifs et est transporté par

voie axonale rétrograde jusqu'au ganglion régional (trijumeau ou sacral) (Enquist *et al.*, 1999). Le génome viral y persiste sous forme d'épisode (Ward et Roizman, 1994) durant toute la vie de l'animal. A la suite de stimuli naturels, comme la mise-bas (Thiry *et al.*, 1985), le transport (Thiry *et al.*, 1987) ou à l'occasion d'une surinfection virale (Mensik *et al.*, 1976) le virus peut être réactivé, c'est-à-dire reprendre son cycle de multiplication et de production de nouvelles particules virales. Selon l'immunité spécifique de l'animal au moment de la réactivation, cette dernière sera ou non suivie de réexcrétion virale, c'est-à-dire de production de particules infectieuses au niveau des muqueuses (Pastoret *et al.*, 1982).

L'estimation des pertes économiques encourues par les éleveurs (Limbourg *et al.*, 2002) dues à la diminution de la production et aux restrictions à l'exportation vers les pays européens indemnes de BoHV-1 (directive 64/432/CEE), a justifié le choix, par plusieurs gouvernements européens, de la mise en œuvre de plans de contrôle de l'IBR. Les pays dans lesquels le taux de prévalence est élevé ont opté pour une politique de contrôle basée sur la vaccination répétée. La mise sur le marché de vaccins marqués (Kaashoek *et al.*, 1995) a grandement facilité l'élaboration de ces programmes. Ces vaccins, délétés dans le gène codant pour la glycoprotéine d'enveloppe E (gE-) (revue par Schynts *et al.*, 1998) permettent la différenciation sérologique entre animaux infectés par une souche sauvage du BoHV-1 et animaux vaccinés (Van Oirschot *et al.*, 1997).

La vaccination répétée, si elle n'empêche pas l'infection ultérieure, permet de fortement réduire les signes cliniques, la durée de la réexcrétion virale mais également les quantités de virus réexcrétés lors d'un épisode de réactivation (Kaashoek *et al.*, 1995; 1996; Makoschey et Keil, 2000), en particulier avec les vaccins marqués inactivés (Bosch *et al.*, 1997).

Une première étude sur le terrain (Bosch *et al.*, 1998), basée sur le suivi de troupeaux laitiers durant 13 mois, a comparé les incidences de séroconversions dans 2 groupes de fermes, le premier suivait un schéma d'administration répétée de vaccins marqués inactivés, le second se voyant administrer un placebo selon des modalités identiques. Cette étude a conclu à une

réduction significative de l'incidence de séroconversions dans le groupe vacciné par rapport au groupe placebo. Une seconde étude (Mars *et al.*, 2001), toujours menée au sein de troupeaux laitiers et portant sur 17 mois, comparant, selon le même principe, vaccins marqués atténués et placebo a également conclu à une réduction significative de l'incidence de séroconversion dans le groupe vacciné par rapport au groupe placebo. Ces études ont servi de base à l'élaboration du plan de contrôle de l'IBR aux Pays-Bas (Vonk Noordegraaf *et al.*, 2000; 2002).

Le gouvernement belge, désireux de se conformer à la législation européenne autorisant les plus libres échanges commerciaux, a posé en 1997 les bases d'un plan de contrôle de l'IBR en définissant le statut sanitaire des troupeaux (Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture, 1997). Ce plan, limitant strictement le choix des vaccins contre l'IBR aux vaccins marqués délétés, fut accompagné d'une étude transversale visant à définir le taux de séroprévalence envers le BoHV-1 au début du plan de contrôle. Les résultats obtenus attestent la constance d'une séroprévalence élevée au niveau national. En effet, 62,4% des exploitations hébergeaient au moins un animal séropositif envers le BoHV-1 en 1986 (Van Malderen *et al.*, 1987) et 67,0% en 1997 (Boelaert *et al.*, 2000). Ce taux élevé de séroprévalence ne permet pas un assainissement des cheptels par un abattage des animaux séropositifs couplé à l'interdiction de toute vaccination. De telles mesures de contrôle ont été et sont encore appliquées au Danemark, en Suède, en Finlande, en Autriche et en Suisse (Thiry *et al.*, 1999).

Les études réalisées aux Pays-Bas, qui portaient uniquement sur des cheptels laitiers dont le nombre de bovins achetés par an était faible (Bosch *et al.*, 1997), n'étaient pas transposables dans nos conditions belges d'élevage, caractérisées par une importante circulation d'animaux (Dr Robijns J.M., Association Centrale de la Santé Animale, communication personnelle). Il était important d'étudier l'efficacité d'un plan de contrôle basé sur la vaccination répétée des animaux, dans des exploitations dont la gestion quotidienne restait par ailleurs inchangée.

Le présent article décrit les résultats

obtenus au cours du suivi de 34 cheptels laitiers en Belgique. Ces cheptels ont été répartis au hasard dans 3 groupes expérimentaux afin de comparer l'efficacité de 2 protocoles de vaccination répétée par rapport à un groupe témoin dans lequel les éleveurs sont autorisés à vacciner selon les schémas de vaccination traditionnels (mais ne peuvent suivre les protocoles dévolus aux groupes vaccinaux). Cette approche originale pourrait permettre de justifier l'application d'un schéma de vaccination plus onéreux et plus astreignant mais d'une plus grande efficacité que les protocoles usuels. Les protocoles de vaccination diffèrent par la primovaccination: dans le premier, elle est basée sur deux administrations de vaccin atténué alors que dans le second elle est basée sur deux administrations de vaccin inactivé. Les rappels sont ensuite identiques dans les deux groupes: un vaccin inactivé est administré tous les six mois environ.

L'incidence de la séroconversion et la séroprévalence envers gE ont été évaluées au sein des 3 groupes expérimentaux durant les 28 mois qu'a duré cette étude. Les résultats ont été obtenus grâce à l'analyse d'une banque de données originale, particulièrement en ce qui concerne la durée de la collecte d'informations. Les résultats préliminaires, basés sur une analyse de survie, rendent compte de l'égale efficacité des deux protocoles de vaccination testés, chacun d'eux permettant une diminution significative du nombre de séroconversions et de la séroprévalence gE au cours du temps, comparée à celles mesurées dans le groupe témoin.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sélection des troupeaux

Sur base de la typologie «troupeau laitier» enregistrée dans la base de donnée SANITEL (Ministère de la santé publique), 36 exploitations furent tirées au sort, à partir d'une liste de 48 volontaires, fournie par des médecins vétérinaires de quatre provinces belges (Hainaut, Liège, Limbourg et Flandre Occidentale) et dont la taille d'exploitation permettait de vivre des seuls revenus de l'activité agricole. Les inventaires de troupeau furent extraits du registre natio-

Tableau I : Description des groupes d'étude selon le protocole de vaccination utilisé.

		Groupes expérimentaux		
		1	2	Témoin
Nombre de fermes		11	8	15
Age à l'entrée		1 mois	3 mois	1 mois
Type de vaccin / voie d'administration	Primo vaccination 1	Atténué / Intranasale	Inactivé / Sous-cutanée	Libre
	Primo vaccination 2 (après 3 - 5 semaines)	Atténué / Intramusculaire	Inactivé / Sous-cutanée	Libre
	Rappels (tous les 6 mois)	Inactivé / Sous-cutanée	Inactivé / Sous-cutanée	Libre

nal SANITEL. La taille maximale de troupeau fut fixée à 160 animaux, afin de permettre, dans une enveloppe budgétaire fixe, le suivi d'un plus grand nombre de troupeaux ainsi que d'éviter les biais d'analyse liés à la taille de troupeau (Boelaert *et al.*, 2002; Van Wuijckhuise *et al.*, 1998). Afin d'avoir une large répartition, chaque médecin vétérinaire a fourni au moins 2 adresses d'exploitations laitières. Au sein du groupe ainsi créé, l'attribution du protocole expérimental fut réalisée par tirage au sort, chaque numéro tiré se voyant attribuer l'un des protocoles définis ci-après, selon la séquence reprise en boucle : 1, 2, témoin.

Le tirage au sort de ces groupes expérimentaux fut effectué simultanément avec celui d'une étude équivalente, portant sur des cheptels mixtes. Sur base de l'étude de l'évolution des pyramides de population de chaque troupeau (résultats non présentés) il fut nécessaire de modifier le classement des troupeaux selon le type de production. Le critère de classification d'un cheptel dans la catégorie 'laitier' fut modifié pour tenir compte de la réalité du terrain. Un troupeau laitier fut défini comme ne pouvant, à aucun moment de l'étude, héberger plus de 2% d'animaux mâles. La nouvelle répartition des troupeaux selon le type de production a eu pour résultat une modification du nombre de fermes initialement prévu pour chaque groupe. La répartition des fermes par groupe expérimental est présentée au tableau I. Les détenteurs d'animaux s'engageaient à ne modifier en rien leur façon de gérer leur exploitation.

GROUPES D'ÉTUDE

Groupe 1

Le protocole faisant appel à une primovaccination au moyen d'un vaccin vivant atténué, administré la première fois par voie intra-nasale et la seconde par voie intramusculaire (Bayovac® IBR-Marker vivum, Bayer AG; Rhinobovin® Marker Live, Intervet - alors Hoechst), 3 à 5 semaines plus tard, fut attribué aux 11 fermes du groupe 1 (tableau I). Les vaccinations de rappel ont été effectuées tous les 6 mois environ, à l'aide d'un vaccin inactivé (Bayovac® IBR-Marker inactivatum, Bayer AG; Rhinobovin® Marker inactivated, Intervet - alors Hoechst) administré par voie sous-cutanée. Tous les animaux, femelles ou mâles, âgés de plus d'un mois ont été vaccinés selon ce protocole, durant toute la durée de l'étude, qu'ils aient été présents au début de l'étude, naissent ensuite dans la ferme ou soient achetés. Toutes les vaccinations ont été effectuées par le vétérinaire responsable du suivi de l'exploitation, selon les recommandations du fabricant.

La première administration a été réalisée avant le 21 janvier 1997, la seconde avant le 15 février 1997. Les intervalles recommandés pour les rappels vont ensuite du 15 avril au 15 mai 1997, du 15 octobre au 15 novembre 1997, du 15 avril au 15 mai 1998, du 15 octobre au 15 novembre 1998 et enfin du 15 avril au 15 mai 1999.

Groupe 2

Le protocole faisant appel exclusivement aux vaccins inactivés gE- pour

les primovaccinations et les rappels (Bayovac® IBR-Marker inactivatum, Bayer AG; Rhinobovin® Marker inactivated, Intervet) fut également attribué à 8 fermes (tableau I). Les échéances de vaccinations étaient identiques à celles du groupe 1. Afin de respecter les recommandations du fabricant, la vaccination ne concerne que les animaux âgés de plus de 3 mois. Les règles de vaccination des animaux entrant dans le troupeau furent identiques à ceux du groupe 1.

Groupe Témoin (contrôle positif)

Un groupe contrôle positif est un groupe expérimental dans lequel le traitement usuel est appliqué. La comparaison entre le nouveau traitement et le traitement habituel permet de définir le meilleur traitement utilisable (Petrie *et al.*, 1999). Cette approche est très différente des comparaisons habituelles entre groupe traité et groupe placebo. Pour simplifier la lecture, ce groupe sera nommé « groupe témoin » dans la suite du présent article.

Dans ce groupe comprenant 15 fermes, la vaccination des animaux était donc autorisée, à condition que le protocole utilisé soit, au niveau du troupeau, différent de ceux décrits pour les groupes hyperimmunisés. Ainsi, les choix de la fréquence d'administration et du type de vaccin marqué furent laissés aux appréciations du médecin vétérinaire d'exploitation et du propriétaire des animaux.

SUIVI SÉROLOGIQUE

Calendrier des prises de sang

Le calendrier des prises de sang fut calqué sur celui de la vaccination. Une série de prélèvements fut programmée, afin de suivre l'évolution du statut sérologique individuel de tous les animaux présents en ferme, âgés de plus d'un mois dans le groupe 1 et le groupe témoin ou de plus de 3 mois dans le groupe 2.

Un premier bilan sérologique fut réalisé au début de l'étude. Cinq bilans furent ensuite organisés, correspondant, au printemps, à la sortie des troupeaux pour la période de pâture et, en automne, au début de la période de stabulation. L'ensemble des prises de sang a permis d'établir 4 bilans saisonniers complets : 2 périodes de

stabilisation et 2 périodes de pâture. L'ensemble des prélèvements fut effectué par les médecins vétérinaires d'exploitation.

Analyses sérologiques

Tous les prélèvements furent testés pour la présence d'anticorps anti-BoHV-1 avec les coffrets de diagnostic gE Antibody Test kits (Herd-Check®, IDEXX), utilisés selon les recommandations du fabricant.

N'ayant pu retester systématiquement tous les animaux ayant présenté un résultat douteux (59 cas), tous ont été considérés comme positifs (de Werfifosse *et al.*, 1996).

Tous les animaux âgés de plus de 6 mois et séropositifs envers gE au début de l'étude ont été définitivement considérés comme porteurs latents (Lemaire *et al.*, 1994), indépendamment des résultats sérologiques ultérieurs.

Les animaux âgés de moins de 6 mois, pouvant être encore porteurs d'anticorps d'origine maternelle (Brar *et al.*, 1978), se sont vu réattribuer, pour tous les tests antérieurs, les résultats du premier dosage d'anticorps effectué après qu'ils aient dépassé l'âge de 6 mois. Aussi, lors du dernier prélèvement sanguin à la fin de la période de stabulation 1998-1999, les animaux de moins de 6 mois ne furent pas testés : aucune prise de sang ultérieure n'étant prévue, leur statut sérologique réel, après disparition des anticorps maternels, ne pouvait être déterminé.

BANQUE DE DONNÉES

Une banque de données permettant le suivi sérologique individuel des animaux a été actualisée avant chaque prise de sang saisonnière. Les listes d'inventaires de troupeaux, extraites du registre SANITEL ont été fournies par les Centres de Prévention et de Guidance des Provinces concernées (Hainaut, Liège, Limbourg et Flandre orientale) avant chaque bilan sérologique saisonnier. Deux types de données furent enregistrés dans la banque : des données brutes et des variables calculées. Les données brutes étaient : le numéro d'identification, la date de naissance, le sexe, les dates d'entrée et de sortie dans le troupeau, les dates des prélèvements

successifs et les résultats sérologiques individuels. Les variables calculées furent : le temps écoulé entre d'une part la date du début du suivi, fixée au 1^{er} janvier 1997, ou bien la date d'entrée dans le troupeau, et d'autre part la date des événements considérés : naissance, achat, vente, séroconversion envers gE. Les dates de séroconversion furent estimées à la moitié de la période comprise entre 2 prises de sang successives ; il en fut de même pour la date de perte de vue (sortie du protocole expérimental) si aucune date de vente n'était signalée et si l'animal n'était plus testé ultérieurement.

Afin de pouvoir étudier les événements indépendamment des saisons, 6 inventaires de troupeaux furent reconstitués aux échéances semestrielles du calendrier : 1^{er} janvier et 1^{er} juillet des années 1997 à 1999. Aux échéances semestrielles, les statuts sérologiques individuels furent attribués aux animaux présents en se rapportant aux statuts connus à la date la plus proche.

DESCRIPTIONS PAR ÉCHÉANCE, ÂGE ET GÉNÉRATION

Cette description est présentée à l'aide de diagrammes de Lexis : ces représentations graphiques permettent de classer les individus selon 3 critères : le moment de l'observation, l'âge des animaux et la génération des individus concernés (Tapinos, 1991).

Les inventaires de troupeaux furent reconstruits en fonction de la présence théorique des animaux aux premier janvier et premier juillet des années 1997, 1998 et 1999, en intégrant les animaux achetés comme s'ils étaient nés dans la ferme. Les animaux achetés en cours d'étude et séronégatifs ont été considérés comme nés dans la ferme pour le calcul des prévalences mais n'ont été pris en compte dans l'analyse de survie qu'à partir du jour de leur entrée officielle dans l'étude. Les animaux achetés et séropositifs au premier test ont été considérés comme nés dans la ferme et positifs envers gE dès leur naissance.

L'indication de la génération des animaux (définie par l'ensemble « année-semester » de naissance) est portée en ordonnée. L'âge des ani-

maux, porté en abscisse, est calculé aux échéances semestrielles et catégorisé selon 2 échelles : il est exprimé en semestres de vie accomplis (SVA) et en années de vie accomplies (AVA). A chaque échéance, les animaux âgés de plus de 5 AVA sont regroupés dans une seule classe.

Calcul des effectifs, de l'incidence et de la densité d'incidence

Pour chaque groupe expérimental, un premier diagramme (figures 1a, 2a et 3a) permet l'étude de :

- 1) la répartition des effectifs par classe d'âge aux dates définies : 1^{er} janvier et 1^{er} juillet des années 1997 à 1999 (lecture des rangées) ;
- 2) la comparaison des effectifs pour une même classe d'âge, âge calculé aux dates définies ci-dessus (lecture des colonnes du diagramme) ;
- 3) le suivi de l'extinction des cohortes d'animaux nés durant un même semestre (diagonales du diagramme) et enfin ;
- 4) de l'incidence de séroconversion envers gE calculée entre chaque échéance, pour chaque sous-groupe d'âge, en fonction du temps (diagonales, coin supérieur droit). L'incidence renseignée ne prend en compte que les animaux encore présents en ferme à l'échéance calendrier suivante.

La densité d'incidence (DI) est la valeur de l'incidence pondérée par le temps à risque des animaux de la classe d'âge considérée. Le temps à risque est la somme des contributions en temps de tous les animaux d'une cohorte restés sains auquel s'ajoute la moitié des contributions en temps des animaux sains au début de l'intervalle et qui ont été vendus (perdus de vue) durant celui-ci, ou des animaux qui ont séroconverti durant l'intervalle. La DI est exprimée en nombre de séroconversion(s) par 100 animaux-années à risque (S/100A-AR).

Calcul de la séroprévalence

Pour chaque groupe d'étude, un second diagramme renseigne les séroprévalences gE calculées sur les effectifs correspondants, aux mêmes échéances (figures 1b, 2b, 3b). Il s'agira toujours de la séroprévalence apparente.

		94-2	94-1	93-2	93-1	92-2	92-1	91-2	91-1	cumul des générations précédentes				
Cohortes de naissance (générations)	95-1													
	95-2													
	96-1													
	96-2	183	71	201	74	155	53	99	34	74	40	47	22	147
	97-1	85	179	70	200	68	136	45	89	30	67	40	43	155
	97-2	191	84	177	70	181	49	111	37	79	27	51	32	138
	98-1	77	190	84	176	64	166	47	100	30	70	21	42	115
	98-2	128	76	189	83	166	50	151	37	89	25	56	18	111
	99-1		101	54	163	58	128	45	126	31	77	20	51	104
	Semestres	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	≥ 12 sva
Années	0		1		2		3		4		5		≥ 6 ava	
Age en termes accomplis														

effectifs semestriels
incidences semestrielles

Figure 1a : Evolution en fonction du temps des effectifs du groupe 1, catégorisés par semestre de naissance et par âge accompli aux échéances semestrielles (semestres de vie accomplie [SVA] ; années de vie accomplie [AVA]). Pour chaque cohorte, les incidences de séroconversions entre 2 échéances semestrielles sont indiquées. Le triangle en traits gras contient les valeurs présentées par toutes les cohortes entrées dans le groupe d'animaux en production laitière alors que l'ensemble du troupeau s'est vu administrer primovaccinations et au moins un rappel.

		94-2	94-1	93-2	93-1	92-2	92-1	91-2	91-1	cumul des générations précédentes				
Cohortes de naissance (générations)	95-1													
	95-2													
	96-1													
	96-2	3,3	0,0	7,0	50,0	45,8	69,8	78,8	70,6	89,2	87,5	93,6	95,5	84,4
	97-1	1,2	3,9	14,3	10,0	54,4	47,8	66,7	80,9	70,0	88,1	90,0	93,0	85,2
	97-2	3,7	1,2	4,5	14,3	11,6	49,0	49,5	64,9	84,8	70,4	84,3	97	84,8
	98-1	2,6	3,7	1,2	4,5	15,6	14,5	51,1	52,0	66,7	85,7	71,4	83,3	90,4
	98-2	7,8	2,6	4,2	6,0	4,8	18,0	16,6	62,2	57,2	72,0	85,7	72,2	90,1
	99-1		5,0	5,6	5,5	10,3	7,8	20,0	22,2	71,0	57,1	75,0	84,4	82,4
	Semestres	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	≥ 12 sva
Années	0		1		2		3		4		5		≥ 6 ava	
Age en termes accomplis														

Figure 1b : Evolution en fonction du temps de la séroprévalence des effectifs du groupe 1, catégorisés par semestre de naissance et par âge accompli aux échéances semestrielles (semestres de vie accomplie [sva] ; années de vie accomplie [ava]). Le triangle en traits gras contient les valeurs présentées par les cohortes entrées dans le groupe d'animaux en production laitière alors que l'ensemble du troupeau s'est vu administrer primovaccinations et au moins un rappel.

		94-2	94-1	93-2	93-1	92-2	92-1	91-2	91-1	cumul des générations précédentes					
Cohortes de naissance (générations)	95-1														
	95-2														
	96-1														
	96-2														
	97-1	136	74	125	63	110	61	76	43	53	36	47	35	89	948
	97-2	70	134	73	124	63	100	58	71	47	53	34	42	107	976
	98-1	128	70	134	72	114	59	91	50	58	39	40	23	104	982
	98-2	52	127	70	132	69	97	52	77	46	49	33	32	91	927
	99-1	105	52	126	66	127	59	79	49	69	40	46	29	86	933
	99-2	90	51	125	58	111	48	71	41	58	32	36	114	835	
Semestres	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	_ 12 sva		
Années	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	_ 6 ava		
Age en termes accomplis															

effectifs semestriels
incidences semestrielles

19
13
4
11
9

Figure 2a : Evolution en fonction du temps des effectifs du groupe 2, catégorisés par semestre de naissance et par âge accompli aux échéances semestrielles (semestres de vie accomplie [sva] ; années de vie accomplie [ava]). Pour chaque cohorte, les incidences de séroconversions entre 2 échéances semestrielles sont indiquées. Le triangle en traits gras contient les valeurs présentées par toutes les cohortes entrées dans le groupe d'animaux en production laitière alors que l'ensemble du troupeau s'est vu administrer primovaccinations et au moins un rappel.

		94-2	94-1	93-2	93-1	92-2	92-1	91-2	91-1	cumul des générations précédentes				
Cohortes de naissance (générations)	95-1													
	95-2													
	96-1													
	96-2													
	97-1	1,5	4,1	8,8	19,0	24,5	34,4	32,9	49,0	52,8	55,6	63,8	80,0	74,2
	97-2	0,0	1,5	5,5	11,3	23,8	26,0	37,9	35,2	48,9	54,7	55,9	66,7	74,8
	98-1	0,0	0,0	2,2	5,6	11,4	21,6	28,6	38,0	36,2	48,7	55,0	61	74,0
	98-2	0,0	0,0	0,0	2,3	4,3	10,3	23,1	29,9	41,3	32,7	45,5	56,3	70,3
	99-1	1,9	0,0	0,0	0,0	3,9	8,5	12,7	26,5	30,4	42,5	34,8	41,4	73,3
	99-2	1,1	0,0	0,8	0,0	0,0	7,2	10,4	14,1	29,3	34,5	46,9	30,6	53,5
Semestres	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	≥ 12 sva	
Années	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	≥ 6 ava	
Age en termes accomplis														

Figure 2b : Evolution en fonction du temps de la séroprévalence des effectifs du groupe 2, catégorisés par semestre de naissance et par âge accompli aux échéances semestrielles (semestres de vie accomplie [sva] ; années de vie accomplie [ava]). Le triangle en traits gras contient les valeurs présentées par les cohortes entrées dans le groupe d'animaux en production laitière alors que l'ensemble du troupeau s'est vu administrer primovaccinations et au moins un rappel.

		94-2	94-1	93-2	93-1	92-2	92-1	91-2	91-1	cumul des générations précédentes				effectifs semestriels	incidences semestrielles	
Cohortes de naissance (générations)	95-1															
	95-2															
	96-1															
	96-2															
	97-1	195	102	206	108	185	69	134	68	96	48	69	26	219	1525	
	97-2	72	193	102	203	100	173	64	121	63	86	44	63	230	1514	57
	98-1	152	72	189	101	184	90	140	52	98	52	72	36	227	1465	64
	98-2	90	152	72	187	98	160	78	124	46	89	44	68	216	1424	56
	99-1	97	89	150	71	173	83	144	70	114	36	75	40	222	1364	28
Semestres	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	≥ 12 sva	528	26	
Années	0		1		2		3		4		5		≥ 6 ava			
		Age en termes accomplis														

Figure 3a : Evolution en fonction du temps des effectifs du groupe témoin, catégorisés par semestre de naissance et par âge accompli aux échéances semestrielles (semestres de vie accomplie [sva] ; années de vie accomplie [ava]). Pour chaque cohorte, les incidences de séroconversions entre 2 échéances semestrielles sont indiquées. Le triangle en traits gras contient les valeurs présentées par toutes les cohortes entrées dans le groupe d'animaux en production laitière un semestre après le début du suivi .

		94-2	94-1	93-2	93-1	92-2	92-1	91-2	91-1	cumul des générations précédentes				effectifs semestriels	incidences semestrielles	
Cohortes de naissance (générations)	95-1															
	95-2															
	96-1															
	96-2															
	97-1	5,1	16,7	20,4	40,7	40,0	47,8	31,3	54,4	36,5	68,8	56,5	58	58,4		
	97-2	5,6	5,2	18,6	20,7	40,0	50,9	53,1	38,8	55,6	41,9	68,2	58,7	61,3		
	98-1	5,9	8,3	18,0	28,7	29,3	41,1	49,3	55,3	38,8	53,8	38,9	72	63,0		
	98-2	3,3	9,9	18,1	20,3	34,7	35,0	51,3	54,0	60,9	39,3	63,6	38,2	64,4		
	99-1	27,8	2,2	16,7	18,3	23,1	34,9	37,5	52,9	55,3	55,6	40,0	62,5	58,1		
Semestres	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	≥ 12 sva			
Années	0		1		2		3		4		5		≥ 6 ava			
		Age en termes accomplis														

Figure 3b : Evolution en fonction du temps de la séroprévalence des effectifs du groupe témoin, catégorisés par semestre de naissance et par âge accompli aux échéances semestrielles (semestres de vie accomplie [sva] ; années de vie accomplie [ava]). Le triangle en traits gras contient les valeurs présentées par les cohortes entrées dans le groupe d'animaux en production laitière un semestre après le début du suivi .

La prévalence peut, d'un semestre à l'autre, être influencée par trois facteurs: l'apparition de nouveaux cas, la perte de vue d'animaux séronégatifs envers gE (animaux quittant l'étude alors que le dernier test ELISA gE connu est négatif) et la sortie de cohorte d'animaux séropositifs. Les diagrammes décrivant la séroprévalence gE doivent dès lors être analysés simultanément avec ceux qui décrivent effectifs et incidences.

Analyse statistique

L'efficacité des protocoles de vaccination est comparée à celle du groupe témoin par une analyse de survie. Cette méthode prend en compte les temps individuels de participation jusqu'à l'éventuelle séroconversion vis-à-vis de gE et les contributions en temps des animaux restés séronégatifs envers gE jusqu'à la fin de leur suivi (Hill *et al.*, 1996). Les animaux achetés en cours d'étude et séronégatifs ont été pris en compte dès le jour officiel de leur entrée dans le troupeau.

Les résultats sont portés en graphe selon Kaplan et Meier (1958) et comparés au moyen du test du Logrank (Peto et Peto, 1972). Pour cette analyse, le seuil de rejet d'hypothèse d'égalité des courbes de survie est fixé à 5%. Des comparaisons 2 à 2 des courbes de survie ont ensuite été effectuées. Pour ces comparaisons, la correction de Bonferroni a été appliquée (Bland *et al.*, 1995). Les seuils corrigés α' étaient alors de $0,05 / 3 = 0,017$.

Les bovins mâles, ne représentant jamais plus de 2% de l'effectif du troupeau, n'ont pas été inclus dans l'analyse.

Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel STATA 7.0 Special Edition® (2002, Stata Corporation, Texas, USA).

RÉSULTATS

Groupe 1

Effectifs, incidences de séroconversion et densité d'incidence

Onze fermes furent désignées pour suivre ce protocole caractérisé par une primovaccination au moyen de

vaccins vivants atténués et les rappels avec une formulation inactivée. Toutes ces exploitations sont restées incluses dans l'étude jusqu'à la dernière échéance. L'évolution des cohortes catégorisées selon la génération (année et semestre de naissance) est présentée dans la figure 1a.

Le nombre de naissances durant les seconds semestres des années 1996 (183 veaux), 1997 (191 veaux) et 1998 (128 veaux) est plus élevé que celui du premier semestre des années 1997 (85 veaux) et 1998 (77 veaux). La proportion des animaux en âge de production (âge en SVA ≥ 4) est toutefois constante durant les 4 premiers semestres de l'étude (valeurs extrêmes: 55,4% - 57,5%). Les troupeaux semblent dès lors être en équilibre dynamique.

L'incidence la plus élevée fut observée durant le premier semestre de l'étude: 27 séroconversions envers gE furent recensées. Chronologiquement, les incidences semestrielles dénombrées furent ensuite de 7, 8, 17 et 15 séroconversions envers gE. Des 74 séroconversions observées, 13 concernent des résultats douteux considérés comme positifs. De ces treize cas, cinq furent confirmés au cours des bilans sérologiques ultérieurs et 4 furent infirmés. Un animal présenta des résultats soit douteux soit négatifs tout au long de l'étude et trois animaux furent perdus de vue.

Après le premier semestre de suivi, les incidences les plus élevées sont observées dans les groupes d'âge supérieur à 1 AVA (animaux d'au moins 2 ans). Les cohortes des animaux nés entre les 1^{er} juillet 1995 et 1997 (95-2, 96-1, 96-2 et 97-1) présentent la particularité d'être intégrées au groupe des vaches en production laitière alors que l'ensemble du troupeau s'est vu administrer une primovaccination complète et au moins un rappel. Cette hyperimmunité n'empêche toutefois pas la séroconversion. Dans la cohorte 95-2, 3 séroconversions sont enregistrées entre le 1^{er} janvier et le 1^{er} juillet 1998, ensuite 3 et 5 séroconversions sont successivement recensées aux échéances semestrielles suivantes. Au sein de la cohorte 96-1, aucune séroconversion n'est observée après un premier semestre passé au sein du troupeau en production (4^e semestre de suivi). Ensuite, une seule séroconversion est recensée.

D'une manière générale, après le premier semestre de suivi, c'est durant les 2 premières années de production laitière qu'a eu lieu le plus grand nombre de séroconversions, en particulier si l'on rapporte l'incidence au temps à risque dans chaque groupe d'âge.

En effet, les DI semestrielles (tableau II) calculées pour les animaux âgés d'au moins 2 ans sont toujours supérieures à celles calculées dans le groupe plus jeune. Les DI calculées en fin de premier semestre sont toutes supérieures à celles observées ensuite.

Evolution de la distribution de la séroprévalence envers la glycoprotéine gE

La figure 1b représente la distribution des séroprévalences gE calculées aux 6 échéances semestrielles. Elle permet de suivre dans le temps l'évolution de la séroprévalence gE par cohorte d'animaux nés le même semestre. Cette figure permet aussi la comparaison des séroprévalences à classe d'âge constante après un ou plusieurs semestres de vaccination.

L'échéance du 1^{er} janvier 1997 décrit la situation au début de l'essai de terrain. A ce moment, les animaux âgés de moins de 18 mois (0 à 2 SVA) présentaient une séroprévalence gE inférieure à 10,0%. Elle était comprise entre 45,8% et 95,5% chez les animaux plus âgés.

A la seconde échéance, 10 séroconversions ayant été détectées dans les animaux de la cohorte 96-1, on observe une augmentation de la prévalence de 0,0% à 14,3%. Toutefois, la séroprévalence reste faible dans les groupes de jeunes animaux (classes d'âge de 0 à 3 SVA). Aux échéances suivantes, les groupes d'animaux à faible séroprévalence vieillissent et remplacent progressivement les groupes à haute prévalence.

Les incidences de séroconversion, décrites dans la figure 1a, font néanmoins croître le taux de séroprévalence au sein des cohortes des jeunes animaux, sans pour autant atteindre les niveaux de séropositivité calculés au début de l'étude. Ainsi, au sein de la cohorte 95-2, la séroprévalence gE croît de 7,0% à 22,2% en 5 semestres de suivi. Ce taux est toutefois très inférieur à celui mesuré au sein de la classe d'âge correspondante (7 SVA)

Tableau II : Densités d'incidence semestrielles (nombre d'animaux infectés par 100 animaux-années à risque) par groupe expérimental. Les valeurs sont calculées pour l'ensemble des animaux (tous) et pour 2 classes d'âge : animaux âgés de moins de 2 années de vie accomplies (AVA) (< 2 AVA) et animaux ayant au moins vécu 2 années (≥ 2 AVA), les âges sont établis au début du semestre de suivi.

Groupe	Densités d'Incidence semestrielles (Tous / <2 AVA / ≥2 AVA)				
	1 ^{er} semestre	2 ^e semestre	3 ^e semestre	4 ^e semestre	5 ^e semestre
1	8,9 / 8,3 / 10,7	2,2 / 1,2 / 5,3	2,1 / 0,4 / 5,2	4,4 / 3,2 / 6,5	3,9 / 2,0 / 6,1
2	6,1 / 4,9 / 7,7	4,0 / 1,1 / 8,2	1,1 / 0,0 / 2,6	3,2 / 1,1 / 5,6	2,5 / 0,6 / 4,2
Témoin	12,9 / 2,4 / 26,1	15,5 / 21,3 / 8,2	13,4 / 10,9 / 16,1	6,9 / 7,2 / 6,6	10,2 / 16,3 / 5,0

au début de l'étude (70,6%). La séroprévalence mesurée au sein de la cohorte 96-1 passe de 0,0% à 20,0% au cours de la même période. Le taux de séroprévalence atteint par cette cohorte en fin de suivi est très inférieur à celui atteint par la cohorte 93-2 au même âge de 6 SVA (78,8%). Dans toutes les autres cohortes et pour chaque échéance, la prévalence est toujours inférieure à 11,3%.

L'intégration aux cohortes des animaux gE+ achetés, comme s'ils avaient été présents (8 cas sur 31 achats), ne modifie que légèrement les séroprévalences. Les différences observées valent respectivement 1,0% ; 1,9% ; 0,6% et 0,8% pour les cohortes 97-2 (2 cas), 95-1 (4 cas), 94-1 (1 cas) et 90-2 (1 cas).

A l'exception de la cohorte 98-2, suivie durant un semestre, les taux de séroprévalence calculés pour chaque classe d'âge en fin de suivi sont tous inférieurs à ceux mesurés en début de période.

Groupe 2

Effectifs, incidences de séroconversion et densité d'incidence

Huit troupeaux furent désignés pour suivre ce protocole basé sur l'usage répété et exclusif de vaccins inactivés.

L'évolution des cohortes reconstituées est présentée dans la figure 2a. Les troupeaux de ce groupe ont présenté les mêmes caractéristiques de répartition d'effectif par classe d'âge aux échéances calendrier que ceux inclus dans le groupe 1 : un plus grand nombre de naissances est remarqué durant le second semestre de chaque

année. Les proportions d'animaux en âge de production par rapport à l'effectif total sont restées constantes durant les deux premières années de suivi (valeurs extrêmes : 58,0 %, en janvier 1997 et 62,6 %, en janvier 1999).

L'incidence de séroconversion fut la plus élevée durant le premier semestre de l'étude : 19 cas furent recensés, distribués dans toutes les classes d'âge. Les incidences semestrielles de séroconversion recensées ensuite furent, chronologiquement, de 13, 4, 11 et 9 nouveaux cas. Après le premier semestre, ce fut toujours dans le groupe des animaux âgés de 2 à 4 ans (2 et 3 AVA) qu'est apparu le plus grand nombre de séroconversions entre chaque échéance : 8 sur un total de 13 durant le 2^e semestre, 4 sur 4 durant le 3^e, 6 sur 11 durant le 4^e et 5 sur 9 durant le 5^e semestre de suivi.

Des 56 séroconversions recensées, 18 concernent des résultats douteux. De ces 18 animaux, 6 cas furent confirmés par une analyse sérologique ultérieure, 9 cas redevinrent séronégatifs, un cas resta douteux au test suivant puis fut perdu de vue et 2 cas furent perdus de vue sans être retestés.

Les DI calculées (tableau II) dans les groupes en âge de production laitière (âgés d'au moins 2 AVA) sont toujours supérieures à celles calculées dans le groupe de moins de 2 AVA. Durant les trois derniers semestres, pour un intervalle donné, toutes les DI sont les plus faibles des trois groupes expérimentaux.

Evolution de la distribution de la séroprévalence envers gE

La répartition, par classe d'âge, des séroprévalences aux échéances

semestrielles du groupe vacciné uniquement avec le vaccin inactivé est présentée à la figure 2b.

A la première échéance (janvier 1997), les animaux des classes d'âges 0 ; 1 et 2 SVA présentaient une séroprévalence inférieure ou égale à 10,0%. La séroprévalence croissait avec l'âge, de 19,0% à 80,0 %, entre 3 et 11 SVA. Chez les animaux plus âgés, elle valait 74,2%.

A l'instar des animaux du groupe 1, c'est dans le groupe des animaux en production que la séroprévalence gE était la plus élevée.

Ce protocole d'hyperimmunisation n'a pas permis de supprimer totalement la circulation virale au sein des exploitations, en particulier au sein des cohortes entrant en contact avec le groupe des animaux en production. Ainsi, la cohorte 95-2 vit progressivement sa séroprévalence croître de 8,8% à 14,1%. Cette dernière valeur reste cependant bien inférieure à celle de 49,0 %, mesurée au début de l'étude dans la même classe d'âge. Il en alla de même pour la cohorte 96-1 qui vit sa séroprévalence augmenter de 4,1 % (janvier 1997) à 10,4 % (juillet 1999), valeur très inférieure aux 32,9% d'animaux gE+ recensés dans la même classe d'âge en début d'étude. La cohorte 96-2 suivit la même tendance : la séroprévalence évolua de 1,5 % en janvier 1997 à 7,2% en juillet 1999.

L'intégration des animaux achetés (17 durant l'étude), répartis dans les différentes classes d'âge n'a que très peu d'influence sur la prévalence. En effet, seulement 4 d'entre eux étaient gE+ lors de leur premier test sérologique. Ils étaient distribués dans les cohortes 95-2 (1 cas), 95-1 (2 cas) et 92-2 (1 cas). Les surestimations de taux de prévalence, qui n'existent que

Tableau III : Résultats du test global d'égalité des fonctions de survie (Log-rank).

	Nombre de séroconversions observées	Nombre de séroconversions attendues
Protocole 1	78	125,62
Protocole 2	56	113,51
Groupe témoin	232	126,87
Total	366	366
Test de signification	X^2 (2dl.) = 137,66 ; Pr $\geq X^2$ = 0.0001	

jusqu'à l'intégration réelle des animaux dans le troupeau, sont respectivement de l'ordre de 0,5 %, 2,1 % et 0,9 % pour les cohortes 95-2, 95-1 et 92-2.

Les taux de séroprévalence des animaux âgés de moins de 2 AVA sont les plus faibles de tous les groupes expérimentaux.

Les rares séroconversions limitèrent l'évolution de la séroprévalence au sein de chaque cohorte, de sorte qu'en fin d'étude, les taux de séroprévalence furent, pour toutes les classes d'âge, très inférieurs aux taux initiaux.

Comme cela fut remarqué dans le groupe 1, les groupes de faible prévalence (jeunes animaux) remplacèrent au cours de leur vieillissement les groupes d'animaux à prévalence plus élevée au début d'étude.

GROUPE TÉMOIN (CONTRÔLE POSITIF)

Protocoles de vaccination suivi dans le groupe témoin

Alors que seulement 6 exploitants déclarèrent avoir vacciné régulièrement une partie de leur cheptel, tout au long de l'étude, 252 bovins ayant un profil sérologique d'animal vacciné furent détectés dans ce groupe, dont 49 répartis dans d'autres exploitations. Ainsi, 18 animaux de ce type furent identifiés dans 7 fermes au cours de la première prise de sang, 15 animaux dans 8 fermes lors du second bilan sérologique, 19 animaux dans 7 fermes lors du troisième bilan, 9 animaux dans 5 fermes lors du quatrième bilan, 9 animaux dans 5 fermes lors de l'avant dernier bilan et enfin 3 animaux de ce type dans 2 fermes lors du dernier bilan. Le protocole généralement utilisé par les

détenteurs ayant déclaré avoir vacciné régulièrement consistait en une administration intranasale de vaccin atténué, aux génisses, au début de la période de stabulation.

Effectifs, incidence de séroconversion et densité d'incidence

Quinze fermes furent incluses dans le groupe de témoin positif. Huit exploitants souhaitèrent arrêter le suivi de leur troupeau après le 5^e bilan sérologique (automne 1998), trouvant trop astreignante la contention des animaux ou souhaitant commencer une activité d'engraissement de bovins. Les animaux suivis dans ces exploitations sont considérés comme perdus de vue à la date du 5^e bilan sérologique.

La distribution des effectifs et le nombre de séroconversions chez les animaux présents à l'échéance calendrier suivante est décrite sur la figure 3a. Les troupeaux de ce groupe présentent des caractéristiques comparables à celles des autres groupes, mis à part un faible effectif de la cohorte née durant le 2^e semestre de l'année 1998 : les proportions des animaux en âge de production par rapport à l'effectif total sont comprises entre 59,9 % (janvier 1997) et 64,9 % (janvier 1998).

Les incidences observées au cours des 5 semestres de l'étude sont les plus élevées des 3 groupes expérimentaux : respectivement 57, 64, 56, 28 et 26 nouveaux cas. Ces séroconversions envers gE sont apparues dans toutes les classes d'âge.

Parmi les 232 séroconversions recensées, 28 concernent des animaux ayant présenté des résultats douteux. Douze de ces 28 résultats ont été ensuite confirmés comme positifs,

13 animaux étaient redevenus séronégatifs lors du bilan sérologique suivant et 3 animaux furent perdus de vue sans avoir pu être retestés.

Les DI semestrielles sont présentées dans le tableau 2. A chaque échéance semestrielle, elles sont les plus élevées des 3 groupes expérimentaux en ce qui concerne les valeurs calculées sur l'ensemble des animaux, ainsi que dans la plupart des DI calculées sur les groupes dichotomisés (7 valeurs sur 10).

Evolution de la distribution de la séroprévalence envers gE

L'évolution semestrielle de la distribution des séroprévalences gE par classe d'âge est présentée dans la figure 3b. A la première échéance, les séroprévalences calculées dans les classes d'animaux les plus jeunes (0 à 2 SVA) étaient légèrement supérieures à celles des autres groupes, alors que celles calculées dans les classes plus âgées étaient intermédiaires entre celles des groupes 1 et 2 (figures 1b à 3b).

Le suivi de 8 des 15 exploitations de ce groupe expérimental n'ayant pu se faire durant la dernière période, les résultats au 1^{er} janvier 1999 traduisent mieux l'évolution du groupe que ceux du 1^{er} juillet 1999. Bien que de nombreuses séroconversions firent croître les prévalences au sein de toutes les cohortes, toutes les séroprévalences calculées au 1^{er} janvier 1999 étaient inférieures à celles calculées au début de l'étude, à l'exception des cohortes 95-2, 94-2 et 93-1. Au semestre suivant, les prévalences observées étaient quasiment toutes revenues, au sein de chaque classe d'âge, aux valeurs mesurées en janvier 1997 ou les avaient dépassées.

Evolution de la proportion d'animaux indemnes au cours du temps

Les probabilités de séroconversion en fonction du temps passé dans l'étude sont comparées entre groupes : 3466 animaux sont séronégatifs le jour de leur entrée dans l'étude : 1110 dans le groupe 1 ; 1012 dans le groupe 2 et 1344 dans le groupe témoin. De ces animaux, 361 sont devenus gE+ : 74 étaient inclus dans le groupe 1 ; 56 dans le groupe 2 et 232 dans le groupe témoin.

Les courbes de survie (figure 4) représentent l'évolution de la proportion d'animaux séronégatifs envers gE en fonction du temps passé dans l'étude. La proportion d'individus restant séronégatifs envers gE décroît de manière plus rapide dans le groupe témoin. Cette proportion reste la plus élevée dans le groupe 2. Les courbes correspondant aux groupes 1 et 2 sont situées bien au-dessus de la courbe correspondant au groupe témoin, ce qui reflète la meilleure protection conférée par les deux protocoles de vaccinations répétées. Une différence très significative entre les courbes de survie est mise en évidence par le test du Logrank (tableau III). Des comparaisons 2 à 2 sont ensuite effectuées : les courbes de survie des 2 groupes hyperimmunisés sont chacune très significativement différentes du groupe témoin ($P \leq 0,000$). On n'observe pas de différence significative entre les deux protocoles de vaccination ($P = 0,1778$).

DISCUSSION

Le suivi, durant environ 28 mois, de 34 troupeaux laitiers répartis au hasard dans 2 groupes hyperimmunisés et un groupe témoin, a permis de mettre en évidence la plus grande efficacité de l'administration répétée de vaccins sur la réduction de l'incidence de séroconversion envers gE comparativement à celle observée dans le groupe dont les habitudes de vaccination restaient inchangées. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les protocoles d'hyperimmunisation.

La présente étude a permis de tester, pour la première fois sur le terrain, un protocole de vaccination associant l'administration successive de vaccins atténués et inactivés, dont l'efficacité avait déjà été étudiée expérimentalement (Kerkhofs *et al.*, 2003).

C'est également la première fois qu'un groupe de type contrôle positif est utilisé comme témoin mais, comme il importait de démontrer la plus grande efficacité de l'hyperimmunisation sur les protocoles de vaccination habituellement suivis par les éleveurs, ce choix s'est imposé d'emblée. En effet, les différences significatives entre traitement(s) et témoin sont plus difficiles à mettre en évidence, mais lorsqu'elles existent, elles permettent de définir le meilleur traitement applicable (Petrie et Watson, 1999).

La mise en œuvre de cette étude de 28 mois ne pouvait se faire sans bénéficier de la participation active des détenteurs d'animaux. L'attribution du protocole par tirage au sort au sein d'un pool de volontaires semblait être alors le meilleur compromis entre

« randomisation » et faisabilité de l'étude.

Tout au long de l'étude, les populations des groupes expérimentaux ont présenté des caractéristiques semblables : regroupement des naissances durant les seconds semestres -afin de maximaliser la production laitière au moment où le prix de vente du lait est le plus élevé- et proportions constantes d'animaux en âge de production par rapport à l'effectif total. Ces populations furent donc considérées comme vivant en équilibre dynamique. Les diagrammes de Lexis pouvaient dès lors rendre compte de l'évolution de la séroprévalence due aux incidences de séroconversion envers gE, au sein des trois groupes étudiés.

Bien qu'ils aient permis une forte réduction de la DI, les protocoles de vaccinations répétées n'ont toutefois pu assurer une protection virologique totale : une circulation virale a pu être mise en évidence dans tous les groupes étudiés. Toutefois, dans les groupes hyperimmunisés, elle a toujours été inférieure à celle observée dans le groupe témoin.

La circulation virale a été quantifiée de manière indirecte, par le dosage des anticorps anti-gE de tous les animaux présents en ferme. Les animaux infectés par une souche sauvage de BoHV-1, donc porteurs à vie du virus, restent gE+ et participent donc au calcul de la séroprévalence propre à leur cohorte (définie par le semestre de naissance). Une diminution de l'incidence dans un troupeau va donc de pair avec une diminution de séroprévalence en fonction du temps.

Seules les prévalences apparentes ont été renseignées : les valeurs de sensibilité et de spécificité du test ELISA utilisé comme moyen de diagnostic, valant respectivement 98 % et 99 % (Van Oirschot *et al.*, 1997), ont été calculées dans des populations dans lesquelles aucune vaccination répétée n'a été effectuée et ne peuvent donc être utilisées (Toma *et al.*, 2001) en toute rigueur, pour le calcul d'une prévalence corrigée. Il importe d'ailleurs plus d'observer une diminution de la séroprévalence dans les groupes hyperimmunisés, en fonction du temps, que d'en définir les valeurs corrigées pour les valeurs intrinsèques de la trousse de diagnostic. Une autre source de correction serait de devoir prendre en compte la pré-

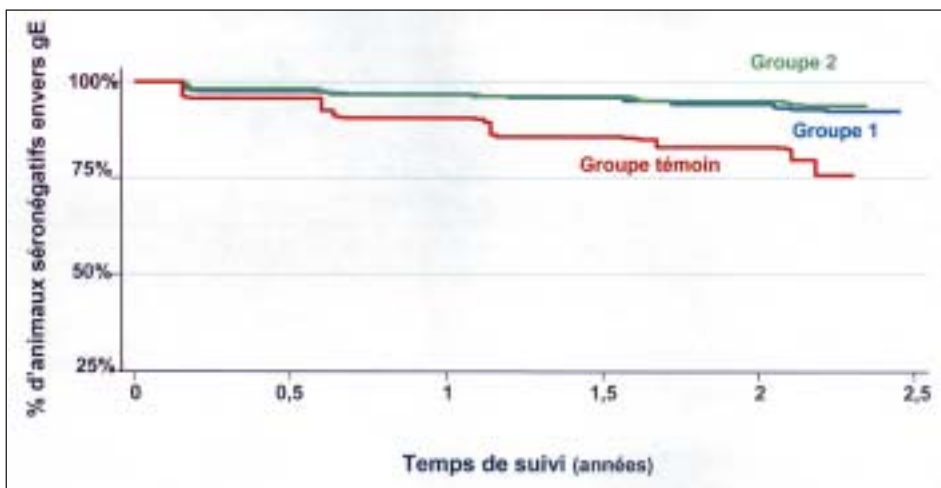


Figure 4 : Evolution, par groupe d'étude, de la proportion de bovins indemnes restant séronégatifs envers gE, en fonction du temps passé dans l'étude

sence d'animaux séronégatifs mais néanmoins porteurs latents de BoHV-1 (*seronegative latent carrier*, SNLC). En effet, de tels animaux peuvent exister dans la population, suite à une infection du veau sous couvert colostrale (Lemaire *et al.*, 1995; 2000a; 2000b) ou encore d'individus dont la séroconversion serait retardée par l'administration répétée de vaccins (Kerkhofs *et al.*, 2003).

L'incidence de séroconversion et la séroprévalence doivent être analysées de pair, non seulement à cause de l'influence directe de l'évolution de la population testée au cours du temps, mais également à cause du mode d'investigation choisi : les tests ELISA ne peuvent détecter une nouvelle infection chez un animal déjà gE+. L'intensité et la fréquence des circulations virales ont donc pu être sous-estimées.

Si la sélection des animaux quittant une cohorte (vente, réforme) est indépendante de leur statut sérologique individuel, l'effet de la vaccination est mis en évidence par la constance, en fonction du temps, de la séroprévalence au sein d'une même cohorte. L'effet de la vaccination est également mis en évidence, au sein d'une même classe d'âge, par la diminution de la séroprévalence aux échéances chronologiquement croissantes.

Les séroprévalences des groupes 1 (35,5 %) et témoin (35,3 %) n'étaient pas significativement différentes au début de l'étude mais différaient significativement de la prévalence au sein du groupe 2 (25,7 %). Malgré ces différences, les séroprévalences des groupes hyperimmunisés décroissent de concert alors qu'elles restent constantes dans le groupe témoin, démontrant l'efficacité des vaccinations répétées sur le contrôle de l'infection par le BoHV-1.

Ces résultats sont en accord avec deux études de terrain précédentes : l'une comparant la protection conférée par l'administration répétée de différentes formulations de vaccins marqués (Bosch *et al.*, 1998) et l'autre comparant l'administration répétée d'un vaccin marqué atténué et un groupe placebo (Mars *et al.*, 2001). Ces deux études avaient conclu à la plus grande efficacité des vaccins atténués sur la réduction de l'incidence.

Les résultats obtenus au cours du présent essai sur le terrain rendent

compte de l'égale efficacité des protocoles d'hyperimmunisation testés, offrant la possibilité d'utiliser d'autres protocoles d'hyperimmunisation pour contrôler l'infection par le BoHV-1. Les études susmentionnées sont malheureusement difficilement comparables à la présente, tant au point de vue virulence de souche sauvage de BoHV-1, signalé par Mars et collaborateurs (2001), que de contrôle de facteurs de risque : fréquence et nombre des achats annuels, par exemple. De plus, seule la présente étude comptabilise les séroconversions envers gE observées dans toutes les classes d'âge et, grâce à sa durée, permet d'observer un effet « immunité de troupeau » (Anderson, 1992). En effet, dans les groupes 1 et 2, les incidences furent plus élevées durant la première période d'observation qu'au cours des semestres suivants, attestant de la nécessité de vacciner plusieurs fois les animaux avant de voir apparaître l'effet protecteur de la vaccination sur l'ensemble du troupeau. Au cours des semestres suivants, le nombre de séroconversions dans le groupe 1 est toujours resté supérieur à celui observé dans le groupe 2. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les vaccins inactivés réduisent plus efficacement l'excrétion virale après réactivation que les vaccins atténués (Bosch *et al.*, 1997) et que dans les troupeaux laitiers dans lesquels le nombre d'achats de bovins est généralement faible, la principale source d'infection est constituée par les animaux porteurs latents (Pastoret *et al.*, 1982). Contrôler la réactivation/réexcrétion serait donc plus efficace que d'empêcher la primo-infection.

Comparativement au groupe témoin, l'administration répétée de vaccins a permis de réduire l'incidence dans le groupe des jeunes animaux entrant dans le groupe en production, allant de pair avec la réduction progressive du nombre des animaux infectés porteurs latents, par les effets conjoints du contrôle de l'apparition de nouveaux cas et la réforme des animaux âgés arrivés au terme de leur vie de production. A long terme, ces protocoles devraient permettre l'assainissement progressif des troupeaux.

Le protocole combinant formulations atténuées et inactivées, testé pour la première fois sur le terrain, donne des résultats comparables à ceux obtenus dans le groupe vacciné exclusivement

avec la formulation inactivée. Le premier protocole a l'avantage de pouvoir être administré plus précocement, notamment aux veaux possédant des anticorps d'origine maternelle ; en revanche, il ne permet pas l'obtention rapide du « statut indemne d'IBR ». En effet, la souche atténuée gE- ayant la capacité de s'installer à l'état latent chez les bovins vaccinés (Lemaire *et al.*, 2001), les animaux vaccinés avec une souche atténuée resteront séropositifs envers les autres antigènes du BoHV-1. Le statut « troupeau indemne d'IBR » ne sera accordé qu'après élimination du dernier animal vacciné avec une souche atténuée. Ce délai pourrait par ailleurs être allongé du fait de la circulation potentielle de virus vaccinal atténué au sein d'un troupeau (Dispas *et al.*, 2003). Les vaccins atténués resteraient néanmoins particulièrement utiles lorsque l'obtention rapide d'une protection est souhaitée (achat, épisode d'IBR clinique) (Bosch *et al.*, 1996).

A l'inverse, les vaccins inactivés ont pour désavantage de ne pouvoir être administrés qu'aux veaux plus âgés mais, ne pouvant s'installer à l'état latent, permettent l'obtention du statut « troupeau indemne d'IBR » plus rapidement après arrêt de la vaccination.

Le choix du protocole de vaccination répétée devrait donc reposer sur l'analyse de la situation sanitaire, la connaissance de la gestion du troupeau et le choix d'une échéance à laquelle obtenir le statut indemne.

Cette étude a permis d'observer l'efficacité de la protection vaccinale au niveau intra-troupeau, dans un environnement où les autres risques de contamination sont restés habituels (contacts directs ou indirects avec des troupeaux potentiellement infectieux, par ex.), les détenteurs n'ayant en rien modifié leurs habitudes. Un programme de vaccination au niveau national aurait l'avantage de réduire la fréquence des contacts infectieux entre troupeaux et, associé aux indispensables mesures sanitaires devant accompagner l'hyperimmunisation des animaux (contrôle aux achats, quarantaines), pourrait faciliter l'obtention du statut officiel « Pays indemne d'IBR ».

Une étude visant à hiérarchiser les facteurs de risque de transmission de l'IBR, portant sur les mêmes exploi-

tations et durant la même période, est actuellement en cours. Elle devrait permettre de mieux cibler les mesures sanitaires que chaque exploitant pourrait prendre afin d'optimiser l'effet de la vaccination répétée de ses animaux.

REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier le Fonds de la Santé Animale et de la Qualité des Produits animaux, qui a intégralement financé la présente étude, ainsi que les sociétés Bayer et Intervet (alors Hoechst) qui ont fourni tous les vaccins utilisés durant l'étude. Que soient remerciés le Dr Debliquy, le Dr Bertels, le Dr Czaplicki et le Dr Wullepit, des Centres de Guidance et de Prévention des maladies du bétail, pour la centralisation des sérums et les nombreux conseils lors des visites en ferme. Les auteurs remercient vivement les Médecins-Vétérinaires d'exploitation : les Docteurs Arens, Coulon, Demortier, De Roo, Devillers, Devos, Dhaeze, Doyen, Ghijssens, Grégoire, Halleux, Ide, Lambotte, Leen, Melchior, Michiels, Nuyten, Peeters, Plasman, Pollentier, Quoilin, Rombaux, Rosier, Sacré, Verhaege, Verhellen, Willem et Xhonneux pour leur excellent travail sur le terrain. Que soient également remerciés tous les détenteurs d'animaux qui nous ont

accueillis dans leur ferme ainsi que Mme Hamande et MM. Massard, Maingiaux et Sorgeloos pour les analyses sérologiques et l'encodage des données.

Two protocols of hyperimmunisation using marker vaccines reduce the incidence of seroconversion against the bovine herpesvirus 1 in dairy herds : results of a field study.

SUMMARY

A 28 months long cohort study was organized in dairy herds in Belgium, to assess the efficacy of hyperimmunisation as a tool for the control of infectious bovine rhinotracheitis. Two protocols of hyperimmunisation in which glycoprotein-E deleted marker vaccines were repeatedly administered were compared to a positive control group in which the usual vaccination protocols were authorised. The two hyperimmunisation protocols differed in the primovaccination: the first group was treated with an attenuated vaccine firstly

given intra-nasally then by intramuscular route whereas the second group was given an inactivated vaccine by subcutaneous injection. Afterwards, booster vaccinations were the same in both groups : an inactivated vaccine was administered by subcutaneous route every 6 months. In the control group, as a rule, part of the herd was vaccinated annually. For each group, 6 half-yearly reports specify: 1. the evolution of the population, categorized by birth half-year, 2. the incidence of seroconversion against gE in the cohorts and 3. the evolution of the gE seroprevalence. The survival curves of the hyperimmunised groups show a significantly higher proportion ($P < 0,001$) of animals remaining seronegative against glycoprotein-E compared to the positive control group. No significant difference was shown between the two protocols of hyperimmunisation. Both of them could then be used as tools for the control of infectious bovine rhinotracheitis.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON R. The concept of herd immunity and the design of community-based immunization programmes. *Vaccine*, 1992, **10**, 928-935.
- Directive 64/432/CEE du Conseil, du 26 juin 1964, relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine. *Journal officiel*, 1964, **121**, 1977-2012. Adresse URL : http://www.adminet.com/eur/loi/leg_euro/fr_364L0432.html Consulté le 30/01/03.
- BLAND J.M., ALTMAN D.G. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *Brit. Med. J.*, 1995, **310**, 170.
- BOELAERT F., BIRONT P., SOUMARE B., DISPAS M., VANOPDENBOSCH E., VERMEERSCH J.-P., RASKIN A., DUFÉY J., BERKVEN D., KERKHOFS P. Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. *Prev. Vet. Med.*, 2000, **45**, 285-295.
- BOELAERT F., BERKVEN D., SPEYBROEK N., MINTIENS K., DISPAS M., VERMEERSCH J.-P., KERKHOFS P., DE KRUIF A. Risk factors associated with Belgian cattle positive to Bovine Herpesvirus-1. In : Gummow B., Mapham P.H., Jack J.B. (Eds.), Proceedings of the 2nd Annual Congress of the Southern African Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine, July 22-23 2002. African Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine: Onderstepoort, 2002, 21-30.
- BOSCH J., KAASHOEK M., KROESE A., VAN OIRSCHOT J. An attenuated bovine herpes-virus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. *Vet. Microbiol.*, 1996, **52**, 223-234.
- BOSCH J., KAASHOEK M., VAN OIRSCHOT J. Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine. *Vaccine*, 1997, **15**, 1512-1517.

- BOSCH J., DE JONG M., FRANKEN P., FRANKENA K., HAGE J., KAASHOEK M., MARIS-VELDHUIS M., NOORDHUIZEN J., VAN DER POEL W., VERHOEF J., WEERDMEESTER K., ZIMMER G., VAN OIRSCHOT J. An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine*, 1998, **16**, 265-271.
- BRAR J.S., JOHNSON D.W., MUSCOPLAT C.C., SHOPE R.E., MEISKE J.C. Maternal immunity to infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea viruses: duration and effect on vaccination in young calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1978, **39**, 241-244.
- DE WERGIFOSSE B., LEMAIRE M., PASTORET P.-P., THIRY E. Etablissement d'un plan volontaire de contrôle de la rhinotrachéite infectieuse bovine en Région Wallonne de Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1997, **141**, 185-196.
- DISPAS M., SCHYNTS F., LEMAIRE M., LETELLIER C., VANOPDENBOSCH E., THIRY E., KERKHOFS P. Isolation of a glycoprotein E deleted bovine herpesvirus-1 strain in the field. *Vet. Rec.*, 2003, **153**, 209-212.
- ENQUIST L.W., HUSAK P., BANFIELD B. & SMITH A. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv. Virus Res.*, 1999, **51**, 237-347.
- HILL C., COM-NOUGUE C., KRAMAR A., MOREAU T., O'QUIGLEY J., SENOSSI R. CHASTANG C. Comparaison de la survie de deux ou plusieurs groupes: approche non paramétrique. In : Hill C., Com-Nougue C., Kramar A., Moreau T., O'Quigley J., Senoussi R. Chastang C., Analyse statistique des données de survie. Flammarion Médecine Sciences: Paris, 1996, 37- 55.
- KAASHOEK M.J., MOERMAN A., MADIC J., WEERDMEESTER K., MARIS-VELDHUIS M.A., RIJSEWIJCK F.A.M., VAN OIRSCHOT J.T. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine*, 1995, **13**, 343-346.
- KAASHOEK M.J., VAN OIRSCHOT J.T. Early immunity induced by a live gE-negative bovine herpesvirus1 marker vaccine. *Vet. Microbiol.*, 1996, **53**, 191-197.
- KAHRS R.F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1977, **171**, 1055-1064.
- KAPLAN E., MEIER P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.*, 1958, **53**, 457-481.
- KERKHOFS P., RENJIFO X., TOUSSAINT J.-F., LETELLIER C. VANOPDENBOSCH E. WELLEMANS G. Enhancement of the immune response and virological protection of calves against bovine herpesvirus type 1 with an inactivated gE-deleted vaccine. *Vet. Rec.*, 2003, **152**, 681-686.
- LEMAIRE M., PASTORET P.-P., THIRY E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 1994, **138**, 167-180.
- LEMAIRE M., MEYER G., ERNST E., VANHERREWEGHE V., LIMBOURG B., PASTORET P.-P., THIRY E. Latent bovine herpesvirus 1 infection in calves protected by colostral immunity. *Vet. Rec.*, 1995, **137**, 70-71.
- LEMAIRE M., WEYNANTS V., GODFROID J., SCHYNTS F., MEYER G., LEYESSON J.-J., THIRY E. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J. Clin. Microbiol.*, 2000a, **38**, 1485-1494.
- LEMAIRE M., MEYER G., BARANOWSKY E., SCHYNTS F., WELLEMANS G., KERKHOFS P., THIRY E. Production of bovine herpesvirus type 1 seronegative latent carriers by administration of a live-attenuated vaccine in passively immunized calves. *J. Clin. Microbiol.*, 2000b, **38**, 4233-4238.
- LEMAIRE M., F. SCHYNTS, G. MEYER, J.P. GEORGIN, C. ROS, S. BELAK, THIRY E. Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine: influence of virus load and effect of specific maternal antibodies. *Vaccine*, 2001, **19**, 4795-4804.
- LIMBOURG B., KERKHOFS P., MASSARD C., MICHELLET S., SAEGERMAN C., THIRY E. Avantages et inconvénients d'un plan de lutte contre la rhinotrachéite infectieuse bovine en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **147**, 57-69.
- MAKOSCHEY B., KEIL G.M. Early immunity induced by a glycoprotein E-negative vaccine for infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Rec.*, 2000, **147**, 189-191.
- MARS M.H., DE JONG M.C.M., FRANKEN P., VAN OIRSCHOT J.T. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine*, 2001, **19**, 1924-1930.
- MENSIK J., POSPISIL Z., SUCHANKOVA A., CEPICA A., ROZOSNY V., MACHATKOVA M. Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis after experimental infection with parainfluenza 3 virus in young calves. *Zentralbl. Vet. Med.*, 1976, **23B**, 854-864.
- MINISTERE DES CLASSES MOYENNES ET DE L'AGRICULTURE. Arrêté Royal du 8 août 1997 relatif à la qualification des troupeaux dans la lutte contre la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Monit. Belge*, 1997, 22312-22314.
- PASTORET P.-P., THIRY E., BROCHIER B., DERBOVEN G. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann. Rech. Vét.*, 1982, **13**, 221-235.
- PETO R., PETO J. Asymptotically efficient rank invariant test procedures (with discussion). *J. R. Stat. Soc.*, 1972, **135**, 185-207.
- PETRIE A., WATSON P. Experimental design and clinical trials. In: Petrie A., Watson P., Statistics for veterinary and animal science. Blackwell Science: London, 1999, 53-65.
- SCHYNTS F., LEMAIRE M., BARANOWSKI E., THIRY E. La glycoprotéine gE de l'herpèsvirus bovin de type 1 et les nouveaux vaccins marqués. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 21-32.
- STRAUB O.C. Infectious bovine rhinotracheitis virus. In: Dinter Z., Morein B. (Eds.), Virus infections of ruminants. Elsevier Science: Amsterdam, 1990, 71-108.

- TAPINOS G. Les caractéristiques d'une population. In: Tapinos G., *Eléments de démographie*. Armand Collin: Paris, 1991, 29-44.
- THIRY E., DETILLEUX P., DE VRIESE A., PIRAK M., PASTORET P.-P. La rhinotrachéite infectieuse bovine en période néonatale: revue et exposé d'un cas. *Ann. Méd. Vét.*, 1984, **128**, 33-40.
- THIRY E., SALIKI J., SCHWERS A., PASTORET P.-P. Parturition as a stimulus of IBR reactivation. *Vet. Rec.*, 1985, **116**, 599-600.
- THIRY E., SALIKI J., BUBLLOT M., PASTORET P.-P. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1987, **10**, 59-63.
- THIRY E., LEMAIRE M., SCHYNTS F., MEYER G., DISPAS M., GOGEV S. Les conséquences de l'infection des bovins par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Point Vét.*, 1999, **30**, 279-286.
- THIRY E. Stratégies de prévention des avortements provoqués par les herpesvirus et les pestivirus de ruminants. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **146**, 161-168.
- TOMA B., DUFOUR B., SANAA M., BENET J., SHAW A., MOUTOU F., LOUZA A. Le dépistage des maladies infectieuses animales. In: Toma B., Dufour B., Sanaa M., Benet J., Shaw A., Moutou F., Louza A., *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*. Association pour l'Etude de l'Epidémiologie des Maladies Animales: Paris, 2001, 41-95.
- VAN MALDEREN G., VANOPDENBOSCH E., WELLEMANS G. Bovien herpesvirus 1 en 4: een seroepidemiologisch onderzoek van de Belgische rundveestapel. *Diergeneeskd. Tijdschr.*, 1987, **4**, 309-318.
- VAN OIRSCHOT J.T., KAASHOEK M.J., MARISVELDHUIS M.A., WEERDMEESTER K., RIJSEWIJK F.A.M. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *J. Virol. Methods*, 1997, **67**, 23-34.
- VAN WUIJCKHUISE L., BOSCH J.C., FRANKEN P., FRANKENA K., ELBERS A.R. Epidemiological characteristics of bovine herpesvirus 1 infections determined by bulk milk testing of all Dutch dairy herds. *Vet. Rec.*, 1998, **142**, 181-184.
- VONK NOORDEGRAAF A., JALVINGH A.W., DE JONG M.C., FRANKEN P., DIJKHUIZEN A.A. Evaluating control strategies for outbreaks in BHV1-free areas using stochastic and spatial simulation. *Prev. Vet. Med.*, 2000, **44**, 21-42.
- VONK NOORDEGRAAF A. Simulation modelling to support national policy making in the control of bovine herpes virus type 1 (PhD Thesis). Wageningen University: Wageningen, 2002, 168 p. Adresse URL: <http://www.gcw.nl/dissertations/3199/dis3199.pdf> Consulté le 23/10/03.
- WARD P.I., ROIZMAN B. Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends Genet.*, 1994, **10**, 267-274
- WYLER R., ENGELS M., SCHWYZER M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvo-vaginitis (BHV1). In: Wittmann G. (Eds.), *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs*. Kluwer Academic: Boston, 1989, 1-72.