

ECOLE DOCTORALE : Biologie Santé

THESE N°

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur d'Oniris
Sous le label de l'Université de Nantes Angers Le Mans
Discipline : Biologie, médecine et santé

Soutenue le 16 décembre 2011

Simon Nusinovici

Infection par le virus de la Bluetongue sérotype 8 et performances dans les troupeaux bovins laitiers

Directeur de thèse : **François Beaudeau**
Encadrant : **Christine Fourichon**

Rapporteurs :
Claude Saegerman, Professeur, Faculté de médecine vétérinaire de Liège
Bénédicte Grimard, Professeur, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort

Membres du jury :
Didier Calavas, Ingénieur de recherche, ANSES Lyon
Claire Ponsart, Directeur de recherche, UNCEIA Paris

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	21
1. Cycle et transmission de l'infection par le virus de la Bluetongue.....	23
2. Répartition géographique et émergence en Europe du nord.....	25
3. Maîtrise de l'épizootie en France.....	26
3.1 Stratégies de contrôles.....	26
3.2. Système de surveillance.....	27
3.3 Evaluation des coûts et des bénéfices de la vaccination.....	28
4. Etat de l'art.....	28
4.1. Effets de l'infection par le BTV-8.....	28
4.1.1. Impacts sanitaires associés à l'infection au BTV-8.....	28
4.1.1.1. Expression clinique de l'infection par le BTV-8	28
4.1.1.2. Mortalité.....	29
4.1.2. Principaux impacts zootechniques associés à l'infection au BTV-8.....	29
4.1.2.1. Troubles de la reproduction.....	30
4.1.2.2. Production de lait.....	31
4.2. Effets secondaires de la vaccination contre le BTV-8.....	31
4.2.1. Données issues de la pharmacovigilance.....	31
4.2.2. Etudes épidémiologiques.....	32
5. Besoins de recherche identifiés.....	32
6. Objectifs de la thèse.....	34
7. Stratégie générale de la thèse.....	35
7.1. Principe / approche globale.....	35
7.2. Sources des données.....	35
8. Plan de la thèse.....	36
Références.....	38

CHAPITRE 1 : Effets de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 sur les performances des vaches laitières dans des troupeaux antérieurement naïfs.....	45
---	----

<u>Part 1</u> : Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds.....	47
---	----

Résumé.....	47
Abstract.....	49
Introduction.....	50
Materials and methods.....	52
1. General study design and available data.....	52
2. Definition of herd exposure according to the spatio-temporal pattern of the epizootic.....	52
3. Estimated date of exposure.....	54
4. Selection of unexposed cows.....	55
5. Reproductive performance parameters and data selection	56
6. Comparisons to quantify and determine the at-risk period of decreased fertility.....	57
6.1. Selection and classification of AIs according to exposure to investigate	

the spatio-temporal variations of estimated effects.....	57
6.2. Selection and classification of AIs to determine the at-risk period of decreased fertility when disease detection was not delayed.	57
7. Statistical models.....	57
Results.....	58
1. Cumulative prevalence in exposed cantons and unadjusted return-to-service rates.....	58
2. Increase of 90-day-return-to-service rates associated with BTV-8 exposure according to the date of exposure and the local geographical area	62
3. At-risk period of decreased fertility associated with exposure to BTV-8 detected in herds in September in highly exposed cantons.....	63
Discussion.....	68
Acknowledgements.....	71
References.....	71

Part 2: Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the
Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds..... 75

Résumé.....	75
Abstract.....	77
Introduction.....	78
Materials and methods.....	79
1. Study protocol and available data.....	79
2. Definition of BTV-8 exposure at the herd level according to the spatio-temporal distribution of the epizootic.....	80
3. Estimation of exposure dates.....	81
4. Selection of unexposed herds and cows.....	81
5. Estimation of abortion rate and data selection according to the zootechnical performance data.....	81
6. Selection and classification of cows according to the timing of exposure during the pregnancy and the exposure level of the canton.....	84
6.1. Incidence of return-to-service between 90 and 200 days.....	84
6.2. Rate of short gestation	84
7. Statistical models.....	84
7.1. Incidence of return-to-service between 90 and 200 days.....	85
7.2. Rate of short gestation	85
Results.....	86
1. Description of the occurrence of abortions and distribution of cantons, herds, and cows depending on the status and the BTV-8 exposure category.....	86
1.1. Incidence of return-to-service between 90 and 200 days.....	86
1.2. Rate of short gestation	87
2. Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the BTV-8 virus during pregnancy.....	88
2.1. Incidence of return-to-service between 90 and 200 days.....	88
2.2. Rate of short gestation	93
Discussion.....	97
Conclusion.....	100
Acknowledgements.....	101
References.....	101

<u>Partie 3</u> : Diminution de la production laitière associée à l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 dans des troupeaux bovins.....	105
Résumé.....	105
Introduction.....	105
Matériels et méthodes.....	107
1. Protocole de l'étude et données disponibles.....	107
2. Définition de l'exposition au BTV-8 au niveau troupeau selon la distribution spatio-temporelle de l'épizootie.....	108
3. Estimation des dates d'exposition.....	108
4. Sélection des contrôles laitiers et des lactations exposés selon le moment d'exposition par rapport à la lactation.....	109
5. Sélection des troupeaux et vaches non exposés.....	109
6. Sélection des données issues du contrôle laitier.....	109
7. Sélection des contrôles laitiers exposés selon l'intervalle entre les contrôles laitiers et la date d'exposition du troupeau.....	110
8. Stratification des analyses selon la parité des vaches, le mois d'exposition du troupeau et le niveau d'exposition du canton.....	110
9. Modèles statistiques.....	111
Résultats.....	112
1. Description de la production moyenne de lait par contrôle laitier et distribution des contrôle laitiers, vaches et troupeaux selon les facteurs de stratification.....	112
2. Diminution de la production de lait associée à l'exposition au BTV-8.....	113
3. Diminution de la production de lait associée à l'exposition au BTV-8 selon le mois d'exposition du troupeau.....	116
4. Diminution de la production de lait associée à l'exposition au BTV-8 selon le niveau d'exposition du canton.....	118
5. Quantification des pertes cumulées de production de lait associées à l'exposition au BTV-8.....	118
Discussion.....	122
Références.....	126

CHAPITRE 2: Effet secondaire de la vaccination contre le virus de la Bluetongue sérotype 8 sur la fertilité des vaches laitières..... 129

<u>Part 1</u> : A side effect of decreased fertility associated with vaccination against Bluetongue virus serotype 8 in Holstein dairy cows.....	131
Résumé	131
Abstract	133
Introduction.....	134
Materials and methods.....	135
1. General study design and available data.....	135
2. Data selection in relation to BTV exposure and vaccination.....	136
3. Assessment of reproductive performances and data selection in relation to reproductive performances.....	137
4. Comparison of reproductive performances between vaccinated and unvaccinated cows	138

5. Selection of unvaccinated cows.....	140
6. Statistical model.....	141
Results.....	143
1. Distribution of vaccination and return-to-service.....	143
2. Effect associated with a vaccine injection administered between 3 days before and 16 days after AI on 3-week-return-to-service rate	143
2.1. After a first vaccine injection.....	143
2.2. After a second vaccine injection.....	144
3. Effect associated with two vaccine injections administered between 3 days before and 42 days after AI on 90-day-return-to-service rate.....	145
Discussion.....	146
Conclusion.....	148
Acknowledgements.....	149
References.....	149

Partie 2: Comparaison des impacts de la vaccination contre BTV-8 et de l'exposition au BTV-8 sur la fertilité des vaches laitières..... 153

Introduction.....	153
Materials and methods.....	153
1. Simulated fertility losses associated with vaccination against BTV-8.....	153
2. Simulated fertility losses associated with exposure to BTV-8.....	153
Results and discussion.....	154
1. Simulated fertility losses associated with vaccination against BTV-8.....	154
2. Simulated fertility losses associated with exposure to BTV-8.....	154
3. Comparison of the fertility losses associated with vaccination against BTV-8 and exposure to BTV-8.....	154
References.....	156

CHAPITRE 3 : Variations de fertilité des vaches laitières dans les troupeaux sans notification de signe clinique du virus de la Bluetongue sérotype 8 situés en zone d'épizootie..... 157

Part 1: Using the reproductive performance data to evaluate the under-reporting of case herds during an epizootic : application to an outbreak of Bluetongue virus serotype 8.... 159

Résumé.....	159
Abstract.....	160
Introduction.....	161
Materials and methods.....	162
1. General study design and available data.....	162
2. Estimated date of exposure for reported herds	163
3. Interpolation of a date of detection of clinical signs for herds not reported located in exposed areas.....	164
4. Selection of unexposed herds and cows.....	164
5. Reproductive performance parameters and data selection.....	165
6. Selection and classification of AIs to evaluate the under-reporting.....	165
7. Statistical models.....	166

8. Selection of a cow population to check the specificity of the variations of the reproductive performance	166
Results.....	167
1. Location of herds and unadjusted return-to-service rates.....	167
2. Interpolated date of clinical signs detection for herds with uncertain BTV-8 status.....	168
3. Under-reporting evidenced using reproductive performance data.....	170
Discussion.....	173
References.....	174

<u>Partie 2</u> : Caractérisation des variations de fertilité au cours du temps dans les troupeaux détectés infectés sans notification de signes cliniques.....	177
---	-----

Introduction.....	177
Matériels et méthodes.....	178
1. Données disponibles.....	178
2. Utilisation du krigeage pour distinguer les troupeaux à suspicion sérologique.....	179
3. Comparaisons pour déterminer les périodes de diminution de la fertilité.....	179
Résultats.....	179
1. Distinction des troupeaux à suspicion sérologique.....	179
2. Périodes de baisses de fertilité autour des dates de détection de l'infection observées et interpolées	180
2.1. Baisses de fertilité autour de la date de détection observée.....	181
2.2. Baisses de fertilité autour de la date de détection interpolée.....	181
Discussion.....	181

DISCUSSION GENERALE.....	185
--------------------------	-----

1. Résultats principaux.....	187
1.1. Quantification des effets de l'exposition au BTV-8 sur les performances.....	187
1.1.1. Effets moyens et impacts de l'exposition sur les performances.....	187
1.1.2. Périodes de baisse des performances et hypothèses sur les effets biologiques du virus.....	190
1.1.2.1. Effet du virus selon le moment de l'infection.....	191
1.1.2.2. Diffusion progressive du virus dans le troupeau et hypothèses sur les durées d'effet de l'infection selon les performances.....	193
1.1.3. Périodes de variations des performances et hypothèses sur la détection des signes cliniques selon le moment d'exposition.....	193
1.1.4. Influence du niveau d'exposition local et du mois d'exposition et hypothèses sur la circulation du virus dans une population bovine.....	194
1.2. Quantification d'un potentiel effet secondaire de la vaccination contre le BTV-8 sur la fertilité.....	199
1.2.1. Impact de la vaccination contre BTV-8 sur la fertilité.....	199
1.2.2. Comparaison des impacts de la vaccination contre BTV-8 et de l'exposition au BTV-8 sur la fertilité au niveau troupeau.....	199
1.3. Utilisation des baisses de fertilité pour contribuer à décrire l'étendue d'une épizootie évaluer la capacité du système de surveillance à détecter précocement la circulation du virus dans un troupeau.....	200

2. Originalités et limites des approches méthodologiques retenues.....	201
2.1. Choix du niveau d'estimation des effets moyens de l'infection.....	201
2.2. Originalités des approches méthodologiques.....	201
2.2.1. Larges effectifs des populations comparées.....	201
2.2.2. Quantification des variations de performance sur un large intervalle autour de la date de détection de la maladie dans le troupeau... ..	202
2.2.3. Prise en compte du niveau d'exposition local et du mois d'exposition.....	202
2.3. Limites des données d'exposition disponibles.....	203
2.4. Stratégies d'analyses statistiques.....	204
2.4.1. Prise en compte des facteurs de variations des performances.....	204
2.4.2. Plusieurs populations de référence.....	205
2.4.3. Utilisation de modèles statistiques pour prendre en compte les structures de corrélation.....	205
2.5. Arguments en faveur de la causalité.....	206
3. Généralisation des résultats.....	207
4. Implications.....	209
4.1. Connaissances mobilisables pour l'évaluation des stratégies de maîtrise.....	209
4.2. Connaissances mobilisables pour l'évaluation de la capacité de détection du système de surveillance.....	209
5. Perspectives.....	210
5.1. Evaluation économique de l'épizootie de BTV-8 et de la vaccination contre le BTV-8.....	210
5.2. Système de surveillance syndromique.....	210
Références.....	211
CONCLUSION GENERALE.....	215
Liste des publications et communications.....	219
Remerciements.....	221
Résumé et mots clés.....	222

LISTE DES TABLES

INTRODUCTION GENERALE

Table 1 : Fréquence (%) des signes cliniques chez les bovins infectés par le virus de la Bluetongue sérotype 8 entre août et décembre 2007 dans le département des Ardennes (Le Gal et al., 2008).....29

CHAPITRE 1 :Effets de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 sur les performances des vaches laitières dans des troupeaux antérieurement naïfs

Part 1 : Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds

Table I. Return-to-service rates and distribution of cantons, herds and cows according to the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) exposure status (10,722 Holstein dairy herds; 2007; France). Cows in exposed herds with first artificial insemination (AI) between 10 weeks before and 4 weeks after the date of clinical detection in the herd. Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 ; Moderately exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.10 and < 0.25 ; Slightly exposed cantons: cantons with a peak incidence < 0.10 62

Table II. Effect of adjustment variables on risk of 90-day-return-to-service for cows which underwent artificial insemination (AI) during a period from 10 weeks before until 4 weeks after the date of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) detection in 10,722 (comparison 1) and 1,300 (comparison 2) Holstein dairy herds; 2007; France...66

Part 2: Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds

Table I. Incidence of return-to-service between 90 and 200 days and distribution of cantons, herds and cows according to the status of exposure to the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8), the exposure level and the reference population considered (in 10 766 Holstein dairy herds; 2005-2007; France). The AIs described of exposed herds were carried out from 6 months before to 1 month after the date of detection of BTV-8 in the herd..... 87

Table II. Rate of short gestation and distribution of cantons, herds and cows according to the status of exposure to the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8), the exposure level and the reference population considered (in 13 165 Holstein dairy herds; 2005-2007; France). The cows of exposed herds were inseminated between 260 days before and the date of detection of BTV-8 in the herd..... 88

Table III. Effects of adjustment variables on the risk of return-to-service between 90-200 days of cows with no return-to-service within 90 days having received a first artificial insemination (AI) from 6 months before to 1 month after the date of detection of the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) in 9 330 (comparison 1) and 1 436 (comparison 2) Holstein dairy cow herds; 2005-2007; France.....94

Table IV. Effects of adjustment variables on the risk of short gestation of cows inseminated between 260 days before and the date of detection of the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) were in in 13 165 (comparison 1) and 2 710 (comparison 2) Holstein dairy cow herds; 2005-2007; France.....97

Partie 3 : Diminution de la production laitière associée à l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 dans des troupeaux bovins

Tableau 1 : Production moyenne de lait par contrôle laitier et distribution des troupeaux, vaches et contrôles laitiers selon les facteurs de stratification (dans 3 016 troupeaux Holstein laitiers ; 2004-2008 ; France). La production de lait moyenne par contrôle laitier des vaches exposées a été calculée à partir de l'ensemble des contrôles des lactations pour lesquelles la date de détection des signes cliniques dans le troupeau est comprise entre 100 jours avant le premier et 120 jours après le dernier contrôle laitier..... 113

Tableau 2. Pertes cumulées de la production laitière associées à l'exposition au BTV-8 chez l'ensemble des vaches des troupeaux exposés situés dans les cantons fortement exposés selon les trois niveaux de production de lait de référence considérés (population exposée : 46 405 vaches dans 890 troupeaux ; population non exposée : 164 854 vaches dans 2974 troupeaux)..... 121

CHAPITRE 2: Effet secondaire de la vaccination contre le virus de la Bluetongue sérotype 8 sur la fertilité des vaches laitières

Part 1 : A side effect of decreased fertility associated with vaccination against Bluetongue virus serotype 8 in Holstein dairy cows

Table I. Return-to-service rates and distribution of cows and AI according to the Bluetongue virus serotype 8 vaccination status, independently of the interval between AI and vaccination (in 2,573 Holstein dairy herds unexposed to BTV; 2008; Brittany; France)..... 143

Table II. Relative risk of 3-week-return-to-service according to the interval between AI and Bluetongue virus serotype 8 vaccination, and the rank of vaccine injection in Holstein dairy herds unexposed to BTV in 2008; Brittany; France (two separate models for each vaccine injection)..... 144

Table III. Effect of adjustment variables on risk of 3-week-return-to-service of cows receiving a second vaccine injection against Bluetongue virus serotype 8 between 3 days before and 16 days after AI in Holstein dairy herds unexposed to BTV; 2008; Brittany; France..... 145

CHAPITRE 3 : Variations de fertilité des vaches laitières dans les troupeaux sans notification de signe clinique du virus de la Bluetongue sérotype 8 situés en zone d'épizootie

Part 1: Using the reproductive performance data to evaluate the under-reporting of case herds during an epizootic : application to an outbreak of Bluetongue virus serotype 8

Table I. Return-to-service rates and distribution of cantons, herds and cows according to the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) exposure status (17,524 Holstein dairy herds; 2007; France). Cows in case herds and cows in herds that were not reported and located in the exposed area with first artificial insemination (AI) between 10 weeks before and 4 weeks after the date of clinical detection (observed or predicted) in the herd..... 168

Table II. Effect of adjustment variables on risk of 90-day-return-to-service for cows which underwent artificial insemination (AI) between 10 weeks before and 14 weeks after the date of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) detection in 18,001 Holstein dairy herds; 2005 and 2007; France..... 172

DISCUSSION GENERALE

Table 1 : Synthèse des résultats de la caractérisation des effets de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 chez les vaches appartenant aux troupeaux ayant connu un épisode clinique..... 188

Table 2 : Influence du niveau d'exposition local sur l'effet de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) sur les performances. L'effet de l'exposition a été estimé pour des expositions pendant la période à risque de variations des performances. Pour toutes les analyses, la population de référence est composée des vaches appartenant à des troupeaux non exposés en 2007..... 197

Table 3 : Influence du mois de détection des signes cliniques sur l'effet de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) sur les performances. L'effet de l'exposition a été estimé pour des expositions pendant la période à risque de variations des performances. Pour toutes les analyses, la population de référence est composée des vaches appartenant à des troupeaux non exposés en 2007..... 197

Table 4 : Avantages et inconvénients de la quantification des variations de performance au niveau individuel et au niveau d'une population..... 201

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE

- Figure 1 : Routes d'introduction des différents sérotypes du virus de la Bluetongue depuis 1998 dans les deux systèmes épidémiologiques du bassin méditerranéen et en Europe du Nord (Saegerman et al., 2008a).....25
- Figure 2 : Echelles d'estimation des effets de l'infection par le virus de la Bluetongue sérotype 8 sur les performances et facteurs de variation de ces effets.....33
- Figure 3 : Comparaison des populations de bovins selon leurs statut vis-à-vis de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) et de la vaccination contre le BTV-8 selon l'effet étudié.....36
- Figure 4 : Articulation générale des chapitres de la thèse..... 37

CHAPITRE 1 :Effets de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 sur les performances des vaches laitières dans des troupeaux antérieurement naïfs

Part 1 : Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds

- Figure 1: Classification of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) case herds according to the level of exposure of cantons and the month of detection in the herd. Monthly incidence: number of new reported herds in a given month in a canton divided by the total number of herds in the canton in 2007.....54
* the herd case was detected during the month of peak incidence in the canton
- Figure 2: Cumulative herd prevalence of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) per canton at the end of 2007 in France. Cumulative prevalence was calculated for all cattle herds reported for clinical signs.....59
- Figure 3: Average monthly incidence of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) cattle case herds in 2007 for the whole exposed area in France (bars) and according to the peak level of exposure in the canton (lines). Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 ; Moderately exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.10 and < 0.25 ; Slightly exposed cantons: cantons with a peak incidence < 0.10 60

Figure 4: Classification of cantons according to exposure to Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) and location of unexposed cantons of the reference population in 2007; France. Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 ; Moderately exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.10 and < 0.25 ; Slightly exposed cantons: cantons with a peak incidence < 0.10 ; Unexposed cantons selected: cantons where no BTV-1 or BTV-8 cattle herd case was reported in 2007 and located in Brittany or in the South-Western part of France; Cantons not selected: either exposed or unexposed cantons that were not selected in the analyses..... 61

Figure 5: Hazard ratio (HR) of 90-day-return-to-service according to the time interval between the date of AI of cows and the date of detection in the herd and to the category of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) exposure of the canton (12,390 cows in 1,300 exposed dairy herds). The unexposed cow population was composed of cows inseminated in the same time period in herds located in unexposed cantons (173,235 cows in 9,422 unexposed dairy herds); 2007; France. Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 ; Moderately exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.10 and < 0.25 ; Slightly exposed cantons: cantons with a peak incidence < 0.10 64

Figure 6: Hazard ratio (HR) of 90-day-return-to-service according to the category of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) exposure of the canton and the time interval between the date of AI of cows and the date of disease detection in the herd (12,390 cows in 1,300 exposed dairy herds). The unexposed cow population was composed of cows from herds exposed in 2007 that were inseminated in 2005 or 2006 (49,220 cows in 1,300 unexposed dairy herds); France. Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 ; Moderately exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.10 and < 0.25 ; Slightly exposed cantons: cantons with a peak incidence < 0.10 65

Figure 7: Increase of 90-day-return-to-service rates before and after the date of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) detection in herds detected in September in highly exposed cantons (6,714 cows in 419 exposed dairy herds). Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 (a) The unexposed cow population was composed of cows inseminated in the same time period in herds located in unexposed cantons (173,235 cows in 9,422 unexposed dairy herds); (b) The unexposed cow population was composed of cows from herds exposed in 2007 that were inseminated in 2005 or 2006 (14,860 cows in 416 unexposed dairy herds). Hazard ratios (HR) are issued from adjusted models. % (percentage points) are estimated from significant HR. Non-significant results for cows inseminated from 14 to 5 weeks before the date of detection and from 6 to 14 weeks after are not shown; 2007; France..... 67

Part 2: Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds

Figure 1 : Stages of occurrence of the interruption of gestation and observed events according to decisions of the livestock farmer (abort=abortion; AI=artificial insemination). The stages of pregnancy are represented up to 270 days, the cut-off date after which a

pregnancy is considered to be premature (defined here as the mean value less 2 standard deviations)..... 83

* death of the foetus with immediate expulsion

** death of the foetus with delayed expulsion

Figure 2: Classification of cantons according to the level of exposure to Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) and location of non-exposed cantons in 2007; France. The level of exposure was attributed according to the value of the peak monthly incidence of cattle outbreaks. High exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.25 ; moderate exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.10 and < 0.25 ; low exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak < 0.10 ; non-exposed cantons: cantons where no BTV-1 or BTV-8 cattle outbreaks were reported in 2007 and located in Brittany or in the Southwestern region of France; cantons not selected: cantons exposed or not exposed that were not selected for analyses..... 86

Figure 3 : Hazard ratios (HR) of the incidence of return-to-service between 90 and 200 days according to the interval between the date of AI and the detection date of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) in the herd and the exposure category of the canton (8 108 Holstein cows with no return-to-service within 90 days in 1 436 exposed dairy herds). The reference population of cows is composed of cows inseminated in 2007 in the herds not exposed to BTV in 2007 (104 800 cows with no return-to-service before 90 days in 9 330 non-exposed dairy herds). High exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.25 ; moderate exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.10 and < 0.25 ; low exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak < 0.10 ; France..... 89

Figure 4 : Hazard ratios (HR) of the incidence of return-to-service between 90 and 200 days according to the interval between the date of AI and the detection date of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) in the herd and the exposure category of the canton (8 108 Holstein cows with no return-to-service before 90 days in 1 436 exposed dairy herds). The reference population of cows is composed of cows inseminated in 2007 or 2006 in the herds exposed to BTV in 2007 (31 226 cows with no return-to-service before 90 days in 1 429 non-exposed dairy herds). High exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.25 ; moderate exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.10 and < 0.25 ; low exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak < 0.10 ; France..... 90

Figure 5 : Increase of incidence of return-to-service between 90 and 200 days before and after the date of the detection of the Bluetongue serotype 8 virus (BTV-8) in the herds detected in September (6 946 cows in 851 exposed dairy herds) (HR: hazard ratio; CI95: 95% confidence interval; and increase in % points). The population of non-exposed cows was composed of (a) cows inseminated during the same period of the year in the herds located in the non-exposed cantons (98 749 cows in 9 392 non-exposed dairy cattle herds), (b) cows inseminated in 2005 or 2006 located in the herds exposed to BTV-8 in 2007 (17 971 cows in 844 non-exposed dairy cattle herds). The hazard ratios are produced by adjusted models. % (percentage points)

are calculated using significant HRs. The effects of exposure during the first trimester were not studied for this criterion.....92

Figure 6 : Hazard ratios (HR) of the rate of short gestation according to the interval between the assumed AI conception date and the date of outbreak detection and the exposure category of the canton to Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) (32 709 Holstein cows in 2 710 exposed dairy herds). The reference population of cows was composed of cows inseminated in 2007 in herds not exposed to BTV in 2007 (199 598 cows in 10 455 non-exposed dairy herds). High exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.25 ; moderate exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.10 and < 0.25 ; low exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak < 0.10 ; France..... 95

Figure 7 : Hazard ratios (HR) of the rate of short gestation according to the interval between the date of assumed conceiving AI and the date of outbreak detection and the exposure category of the canton to Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) (32 709 Holstein cows in 2 710 exposed dairy herds). The reference population of cows was composed of cows inseminated in 2005 or 2006 in herds exposed to BTV-8 in 2007 (79 665 cows in 2 671 non-exposed dairy herds). High exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.25 ; moderate exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.10 and < 0.25 ; low exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak < 0.10 ; France..... 96

Figure 8: Synthesis of effects of exposure to Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) on the occurrence of abortions depending on the criterion used. **NS** : Exposure period that was not associated with an increase in the occurrence of abortions; **?**: Exposure period not studied; **Not defined**: periods not selected because they take place after the events studied..... 99

Partie 3 : Diminution de la production laitière associée à l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 dans des troupeaux bovins

Figure 1: (a) Classification des cantons selon le niveau d'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) et localisation des cantons non exposés sélectionnés en 2007 ; France. (b) Distribution des dates de détection des signes cliniques dans le troupeau selon le niveau d'exposition au BTV-8 du canton. Le niveau d'exposition a été attribué selon la valeur du pic d'incidence mensuelle de foyers bovins. Cantons fortement exposés: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.25 ; cantons modérément exposés: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.10 et < 0.25 ; cantons faiblement exposés: cantons avec un pic d'incidence mensuelle < 0.10 ; cantons non exposés sélectionnés : cantons où aucun foyer bovin de BTV-1 ou BTV-8 n'a été rapporté en 2007 et localisés en Bretagne ou dans la région du sud-ouest de la France; cantons non sélectionnés: cantons exposés ou non exposés qui n'ont pas été sélectionnés dans les analyses..... 114

Figure 2. Variations estimées de la production de lait (en kg) par contrôles laitiers (et intervalles de confiance à 95%) autour de la date d'exposition du troupeau pour les

vaches de parité 2 dans les troupeaux situés dans les cantons fortement exposés (population exposée : 15 754 vaches dans 873 troupeaux ; population non exposée : 164 854 vaches dans 2974 troupeaux)..... 115

Figure 3. Variations estimées de la production de lait (en kg) selon le mois du contrôle laitier (et intervalles de confiance à 95%) pour les vaches de parité 2 dans les troupeaux situés dans les cantons fortement exposés (180 608 vaches dans 3847 troupeaux) 116

Figure 4. Variations estimées de la production de lait (en kg) par contrôles laitiers (et intervalles de confiance à 95%) autour de la date de détection de la maladie selon le mois de détection de la maladie dans le troupeau pour les vaches de parité 2 dans les troupeaux situés dans les cantons moyennement exposés (population exposée en septembre : 7961 vaches dans 404 troupeaux ; population exposée en octobre : 10 014 vaches dans 510 troupeaux ; population exposée en novembre : 5450 vaches dans 266 troupeaux ; population exposée en décembre : 2083 vaches dans 113 troupeaux ; population non exposée : 164 854 vaches dans 2974 troupeaux).... 117

Figure 5. Variations estimées de la production de lait (en kg) par contrôles laitiers (et intervalles de confiance à 95%) autour de la date d'exposition du troupeau pour les vaches de parité 2 dans les troupeaux exposés, selon le niveau d'exposition du canton (population exposée dans cantons niveaux exposition 1 : 15 754 vaches dans 873 troupeaux ; population exposée dans cantons niveaux exposition 2 : 25 915 vaches dans 1315 troupeaux ; population exposée dans cantons niveaux exposition 3 : 12 373 vaches dans 657 troupeaux ; population non exposée : 164 854 vaches dans 2974 troupeaux). Niveau exposition 1: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.25 ; Niveau exposition 2: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.10 et < 0.25 ; Niveau exposition 3: cantons avec un pic d'incidence mensuelle < 0.10 119

Figure 6. Définition du niveau de production de lait de référence selon les trois scénarios envisagés ; production de référence = (a) production des vaches de troupeaux non exposés ; (b) production de lait de vaches exposées 130 jours après la date d'exposition et (c) production de lait de vaches exposées 100 jours avant la date d'exposition. La courbe correspond aux variations estimées de la production de lait (en kg) par contrôles laitiers (et intervalles de confiance à 95%) autour de la date d'exposition du troupeau pour les vaches de parité 2 dans les troupeaux situés dans les cantons fortement exposés..... 120

Figure 7. Pertes cumulées de la production laitière associées à l'exposition au BTV-8 entre 63 avant et 118 jours après la date d'exposition du troupeau selon le niveau d'exposition du canton et le mois d'exposition du troupeau pour les vaches de parité 2 (production de référence = production des vaches de troupeaux non exposés) Niveau exposition 1: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.25 ; Niveau exposition 2: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.10 et < 0.25 ; Niveau exposition 3: cantons avec un pic d'incidence mensuelle < 0.10 122

CHAPITRE 2: Effet secondaire de la vaccination contre le virus de la Bluetongue sérotype 8 sur la fertilité des vaches laitières

Part 1: A side effect of decreased fertility associated with vaccination against Bluetongue virus serotype 8 in Holstein dairy cows

Figure 1. Distribution of the time interval between AI and return-to-service in Holstein dairy cows (102,178 first or second AI performed in 74,238 cows in 2,573 dairy herds unexposed to Bluetongue virus; 2008; Brittany; France)..... 140

Figure 2. Classification into three categories (a, b, c) of vaccinated cows according to the time interval between artificial insemination (AI) and vaccine injections (interval between two vaccine injections = 21 days), and corresponding return-to-service observation period occurring within 90 days after AI. Observation period started five days after second vaccine injections and lasted until 90 days after AI. In the figure, the latest possible starts of observation periods are represented (↑).. 141

Partie 2: Comparaison des impacts de la vaccination contre BTV-8 et de l'exposition au BTV-8 sur la fertilité des vaches laitières

Figure 8: (a) Simulated fertility losses in a herd according to the proportion of cows inseminated during the 9-week-at-risk period of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) exposure (plain lines) and the one-week-at-risk-period of adverse effects of vaccination against BTV-8 (dashed lines). The black and gray plain lines correspond to fertility losses attributable to BTV-8 exposure based on overall increases of 15.3 (highest exposure) and 9.6 (all exposure) percentage points for cows inseminated from 4 weeks before to 5 weeks after the date of detection in the herd, respectively. For the fertility losses attributable to vaccination against BTV-8, an increase of 4.2 percentage points was considered for cows receiving a second vaccine injection within 1 week after AI; (b) Ratio of the detrimental effects attributable to BTV-8 exposure and to vaccination against BTV-8 according to the proportion of cows inseminated during the at-risk periods. These simulations were based on an overall increase of 15.3 percentage points attributable to the BTV-8 exposure and an increase of 4.2 percentage points attributable to vaccination against BTV-8. The hatched area corresponded to herds for which the expected benefit of vaccination against BTV-8 would be smaller than the possible associated risks..... 155

CHAPITRE 3 : Variations de fertilité des vaches laitières dans les troupeaux sans notification de signe clinique du virus de la Bluetongue sérotype 8 situés en zone d'épizootie

Part 1: Using the reproductive performance data to evaluate the under-reporting of case herds during an epizootic : application to an outbreak of Bluetongue virus serotype 8

Figure 1: Geographical localisation of cattle herds in the exposed area: (a) 8633 reported case herds, (b) 74,169 herds with an uncertain Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) status (e.g., herds with an interpolated date of exposure); 2007; France..... 167

Figure 2: Variograms of the observed dates of detection of Bluetongue virus serotype 8 clinical signs of case herds (dotted line) and the fitted model of the variogram (plain line)..... 169

Figure 3: Kriging map of the dates of detection of Bluetongue virus serotype 8 clinical signs, expressed as a number of days since the first clinical case herd during the 2007 epizootic in France (31st July 2007), and location of reported cattle herds (black crosses). The hatched areas correspond to regions with no data..... 169

Figure 4: Hazard Ratio (HR) of 90-day-return-to-service before and after (a) the dates of Bluetongue Virus serotype 8 (BTV-8) detection in all dairy herds reported during the 2007 epizootic, (b) the interpolated dates of BTV-8 detection in dairy herds that were not reported and located in the exposed area in 2007, (c) a simulated date in a previous year free of BTV (2005) equal to the observed or interpolated date of clinical detection of the disease in 2007, France..... 171

Partie 2 : Caractérisation des variations de fertilité au cours du temps dans les troupeaux détectés infectés sans notification de signes cliniques

Figure 1 : Hypothèses de délais de détection de la maladie selon la modalité de détection de l'infection (n^{ième} vache infectée : vache infectée parmi l'ensemble du troupeau qui, ^a : exprime cliniquement la maladie ; ^b : est prélevée après séroconversion et ^c : est vendue ou transférée après séroconversion)..... 178

Figure 2 : Distribution de l'écart entre les dates de détection de l'infection observées et interpolées dans les troupeaux à suspicion sérologique ou pour lesquels la modalité de détection n'est pas renseignée (554 troupeaux foyers) ; 2007 ; France..... 180

Figure 3 : Baisse de fertilité (mesurées par des augmentations du taux de retours 90 jours) avant et après (a) la date de suspicion du virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) dans les troupeaux foyers cliniques (n=2646), (b) la date observée de détection de l'infection dans les troupeaux foyers à détection précoce (n=378) et (c) la date observée de détection de l'infection dans les troupeaux foyers à détection tardive (n=176) ; 2007 ; France..... 183

Figure 4 : Baisse de fertilité (mesurées par des augmentations du taux de retours 90 jours) avant et après (a) la date de suspicion du virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) dans les troupeaux foyers cliniques (n=2646), (b) la date interpolée de détection de l'infection dans les troupeaux foyers à détection précoce (n=378) et (c) la date interpolée de détection de l'infection dans les troupeaux foyers à détection tardive (n=176) ; 2007 ; France..... 184

DISCUSSION GENERALE

- Figure 1 : Périodes autour de la date de détection des signes cliniques associées à des baisses de performances..... 191
- Figure 2 : Variations de la fertilité (mesurée par le taux de retours 90 jours) avant et après la date de détection des signes cliniques du virus de la Bluetongue sérotype 8 dans le troupeau selon le mois de détection de ces signes cliniques ; (a) foyers détectés en septembre, (b) foyers détectés en octobre, (c) foyers détectés en novembre, (d) foyers détectés en décembre..... 195
- Figure 3 : Périodes supposées de la gestation (intervalles date IA des vaches – date de détection de la maladie dans le troupeau) pour lesquelles des baisses de performances de reproduction associées à l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 sont observées.....199
- Figure 4 : Variations des performances associées à l'exposition au BTV-8 selon le niveau d'exposition du canton et du mois de détection de la maladie..... 198
- Figure 5 : Durée d'incubation du virus de la Bluetongue sérotype 8, délai de détection des signes cliniques et diffusion du virus dans un troupeau..... 204
- Figure 6 : Hazard ratio des taux de retours en IA selon l'intervalle entre la date d'IA et la date de détection du virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) dans le troupeau et selon le type de retour (rang IA 1 et 2 ; population de référence : vaches appartenant à des troupeaux non exposés en 2007)..... 208

INTRODUCTION GENERALE

Depuis les années 1970, certaines maladies vectorielles humaines et animales ont ré émergé, comme l'illustrent les récentes épidémies de Dengue, de Chikungunya ou du virus West Nile (Tabachnick, 2009). Ces émergences sont notamment dues à l'augmentation des mouvements commerciaux et touristiques due à la mondialisation et aux changements climatiques.

Les maladies vectorielles sont une menace en santé animale, comme la fièvre de la vallée du Rift ou la peste équine qui ont de lourdes conséquences économiques (Tabachnick, 2009). De nombreux virus à transmission vectorielle ont évolué dans des zones tropicales, ont produit des souches virulentes et invasives qui ont causé d'importantes épidémies dans des zones tempérées, comme le virus West Nile ou l'encéphalite à tiques (Weaver and Reisen, 2010).

Les arboviroses sont constituées d'une large variété de virus à ARN incluant les virus de la famille des *Reoviridae*. Le genre *Orbivirus* est un des neuf genres qui constitue la famille des *Reoviridae*. C'est le genre *Orbivirus* qui a le plus d'importance en terme d'impact en santé animale, avec des maladies comme la Bluetongue (BT), la peste équine ou l'encéphalite équine (Verwoerd, 1979).

1. Cycle et transmission de l'infection par le virus de la Bluetongue

La Bluetongue, ou fièvre catarrhale ovine, est une maladie virale non contagieuse qui affecte les ruminants domestiques et sauvages. Vingt cinq sérotypes viraux ont été identifiés (Hofmann et al., 2008). La Bluetongue est transmise par un vecteur hématophage de la famille des *Ceratopogonidae* du genre *Culicoïdes*. Ce vecteur est un diptère de petite taille (de 1 à 3 mm), dont la femelle se nourrit de repas de sang. Environ 1300 espèces ont été décrites dans le monde (Borkent and Wirth, 1997 ; Tabachnick, 2004), dont 120 sont présentes en Europe et 32 sont impliquées dans la transmission du virus (Meiswinkel et al., 2008). Ces insectes sont également responsables de la transmission d'autres agents pathogènes tels que la peste équine et le virus de la maladie hémorragique épizootique. Les *Culicoïdes* se nourrissent sur un très large spectre d'animaux (mammifères, oiseaux, reptiles...), ce qui explique leur très large répartition dans le monde. Le principal vecteur du virus de la Bluetongue en Afrique et dans le bassin méditerranéen est *C. imicola*.

Le cycle de transmission du virus est complexe. Il n'y a pas de transmission directe par contagion. La transmission du virus entre le vecteur et l'hôte vertébré nécessite plusieurs étapes de réplication virale chez le vecteur et chez l'hôte vertébré qui expliquent le temps

nécessaire à la propagation du virus dans une population de ruminants. Le virus BT est transmis de l'hôte vertébré infecté à un *Culicoïde* via un repas de sang. Même durant le pic de virémie chez l'hôte vertébré, le taux de piqûres infectantes entraînant l'infection du vecteur est estimé à moins de 1% (Gerry et al., 2001). Ce taux de transmission dépend principalement de la virémie de l'hôte vertébré, de la compétence et du taux d'attaque du vecteur (EFSA, 2007). Le virus subit deux cycles de réplication chez le *Culicoïde*, le deuxième se faisant au niveau des glandes salivaires. La période d'incubation extrinsèque chez le vecteur, correspondant à l'intervalle de temps entre l'ingestion du virus et le moment où le vecteur devient infectant, dépend de la température. Cette période est de 2 jours à 30°C et de 16 jours à une température de 15°C, ce qui contribue à la saisonnalité de l'activité vectorielle (Wilson et al., 2007). Le virus est transmis à l'hôte vertébré lors d'un repas de sang par un vecteur infectant. Un *Culicoïde* reste infecté durant toute sa vie (3 semaines environ) et une seule de ses piqûres suffit à infecter un hôte sensible. Après l'inoculation du virus à l'hôte vertébré, le BTV se réplique dans les ganglions lymphatiques, entraînant une première virémie, faible et de courte durée (MacLachlan, 2004). La deuxième réplication a lieu dans les cellules sanguines mononuclées, les organes lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques), ainsi que d'autres organes, principalement dans les cellules endothéliales des poumons. Le virus se dissémine abondamment dans la circulation sanguine, entraînant une deuxième virémie, plus intense que la première et de plus longue durée, avec des conséquences épidémiologiques associées à une possible transmission virale au vecteur (Barratt-Boyes and MacLachlan, 1994, MacLachlan et al., 1990). Cette deuxième virémie est caractérisée par la circulation du virus en association avec les cellules sanguines. L'ARN viral du BTV est détecté à partir du cinquième jour post-infection, le pic étant observé vers le douzième jour (Di Gialleonardo et al., 2011). L'ARN viral peut être détecté dans les cellules sanguines jusqu'à 140-160 jours après l'infection, correspondant à la durée de vie des érythrocytes bovins (Katz et al., 1994, MacLachlan et al., 1994). Dans le cadre du contrôle de la maladie lors de mouvements d'animaux, la période maximale d'infectiosité est considérée par l'OIE comme durant 60 jours après l'infection.

2. Répartition géographique et émergence en Europe du nord

La BT a été identifiée pour la première fois en 1902 en Afrique du Sud. On considère que la maladie est enzootique dans une grande partie de la zone inter-tropicale. La limite supérieure de distribution oscille entre 40° et 50° de latitude Nord et 20° et 30° de latitude Sud.

Le premier foyer identifié en dehors d’Afrique était localisé en Europe, à Chypre, en 1943. Avant 1998, on considérait que la maladie pouvait seulement faire des incursions périodiques en Europe, comme au Portugal et en Espagne en 1956 ou en Grèce en 1979. Depuis 1998 (et jusqu’à 2005), l’Europe et le pourtour du bassin méditerranéen ont subi les incursions de plusieurs sérotypes, correspondant à deux systèmes épidémiologiques distincts (Figure 1) (Saegerman et al., 2008). Le premier système est situé à l’Est du bassin méditerranéen. Il a été touché en 1998 et les principaux sérotypes circulant dans ce bassin sont le BTV-1, BTV-4, BTV-9 et le BTV-16. Les vecteurs connus impliqués dans la transmission des différents sérotypes dans ce système sont *C. imicola*, *C. obsoletus*, *C. scoticus* et *C. pulicaris* (Caracappa et al., 2003, Savini et al., 2005). Le deuxième système est situé à l’Ouest du bassin méditerranéen et a été touché à partir de 2000 par 4 sérotypes (BTV-2, BTV-4, BTV-16 et BTV-1 par ordre d’émergence). Ce système a pour principal vecteur *C. imicola*.

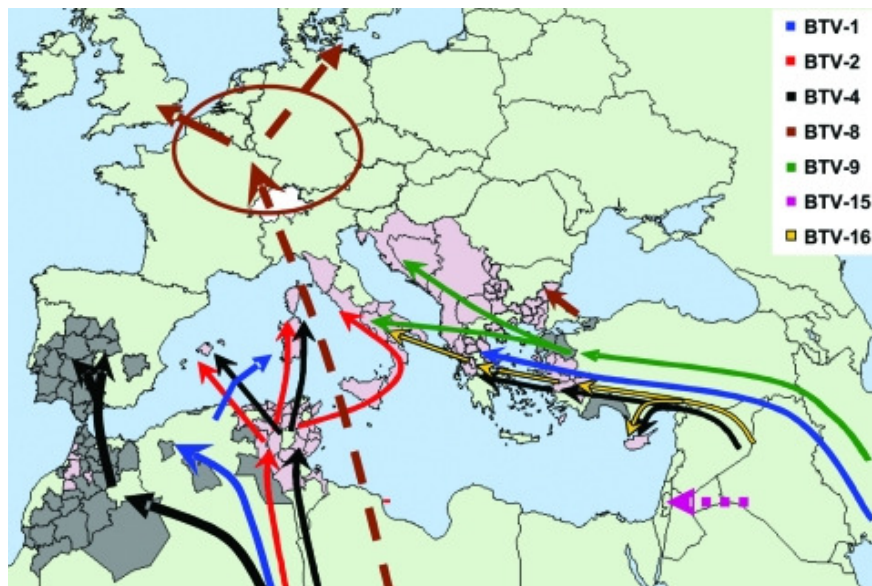


Figure 1 : Routes d’introduction des différents sérotypes du virus de la Bluetongue depuis 1998 dans les deux systèmes épidémiologiques du bassin méditerranéen et en Europe du Nord (Saegerman et al., 2008).

Le premier foyer de BTV-8 en Europe du nord a été identifié en Août 2006 aux Pays-Bas près de Maastricht (Enserink, 2006). Des foyers ont ensuite été notifiés en Belgique, dans l'Ouest de l'Allemagne, puis en France et au Luxembourg. Fin 2006, plus de 2000 foyers ont été déclarés. L'origine de l'incursion ainsi que la route d'introduction restent inconnus. Cependant, des études d'épidémiologie moléculaire ont montré que la souche à l'origine de cette épizootie est proche de souches BTV-8 isolées en Afrique de l'Ouest subsaharienne (International Society for Infectious Diseases, 2006). Avant cette émergence, le BTV-8 avait été identifié au Pakistan, en Inde, en Afrique de l'ouest et du sud et dans la région des Caraïbes.

Ce premier épisode épizootique s'est arrêté fin 2006. Fin avril 2007, un bovin issu d'un troupeau sentinelle a séroconverti dans le Nord Ouest de l'Allemagne. Cela a été le premier indice démontrant la capacité de persistance du virus BTV-8 pendant l'hiver en Europe du nord (overwintering). En 2007, l'épizootie s'est largement étendue, progressant principalement aux Pays-Bas, en Belgique, en Allemagne, en Grande Bretagne, au Luxembourg, en France et en Suisse, totalisant plus de 50 000 troupeaux foyers fin 2007, et causant des pertes économiques massives. En 2008, le BTV-8 a ré émergé, entraînant l'infection de plus de 30 000 troupeaux, notifiés principalement en France, en Belgique, aux Pays-Bas, en Allemagne et au Luxembourg. Durant cette année, 90% des foyers européens ont été notifiés en France.

Le principal vecteur du BTV, *C. imicola*, est totalement absent en Europe du nord. Sa répartition géographique en Europe semble se limiter au niveau de la latitude de l'Espagne (Boorman, 1986, Mellor et al., 1985). Plusieurs autres espèces locales de *Culicoides* sont considérées comme vectrices du BTV-8 comme *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* et *C. pulicularis* (Mehlhorn et al., 2007, Meiswinkel et al., 2008, Meiswinkel et al., 2007).

3. Maîtrise de l'épizootie en France

La gestion sanitaire d'une maladie émergente nécessite, conjointement aux stratégies de contrôle, la mise en place d'un système de surveillance.

3.1 Stratégies de contrôles

Le BTV a poursuivi son extension en France au cours de l'année 2007 malgré l'application de mesures de police sanitaire (traitements insecticides, instauration d'un zonage avec limitation de mouvements, sans application de mesures d'abattage total dans les troupeaux foyers)

(Calavas and Hendriks, 2010). Au vu de l'évolution épidémiologique de la maladie en 2007, la vaccination est apparue comme la seule mesure de lutte permettant le contrôle de la maladie. Elle a été mise en œuvre dès lors que des vaccins ont été disponibles. Durant l'hiver 2007/2008, la commission Européenne a décidé de subventionner les programmes de vaccination des pays concernés. Chaque pays pouvait organiser son propre programme de vaccination, à la condition qu'au moins 80% des bovins et ovins soient immunisés à la fin de 2008.

La première campagne de vaccination en France a débuté à partir de mars 2008. La vaccination contre le BTV-8 était facultative hors échange d'animaux (en complément d'une vaccination obligatoire contre le BTV-1 dans 18 départements du sud-ouest). La vaccination contre le BTV-8 est devenue obligatoire à partir de décembre 2008 (à réaliser avant le 30 juin 2009). Elle concernait tous les bovins de plus de 2,5 mois, avec possibilité de dérogation pour les animaux destinés à être abattus avant 10 mois ou les animaux destinés à être abattus directement après une période d'engraissement dans un bâtiment fermé et protégé contre les vecteurs. Pour les campagnes 2008/2009 et 2009/2010, la vaccination contre le BTV-1 et le BTV-8 était obligatoire sur tout le territoire.

3.2. Système de surveillance

L'objectif du dispositif de surveillance mise en place en France à partir de 2007 était de suivre précocement l'avancée du front épidémiologique. Cette surveillance a été réalisée à l'aide d'une surveillance sérologique par troupeaux sentinelles, d'une surveillance clinique, et d'une surveillance entomologique afin de déterminer l'aire de répartition des vecteurs impliqués dans la transmission du virus. Le dispositif de surveillance a permis de mettre en œuvre les mesures de gestion visant à limiter la diffusion de l'épizootie. Cependant, étant donné la fréquence des infections subcliniques chez les bovins et le faible nombre de troupeaux sentinelles, la surveillance épidémiologique n'a pas permis d'estimer précisément l'ampleur de l'épizootie dans les zones touchées. De plus, aucune mesure de surveillance n'était destinée à estimer le nombre d'animaux infectés par troupeau foyer (Calavas and Hendriks, 2010).

3.3 Evaluation des coûts et des bénéfices de la vaccination

Les conséquences économiques causées par l'émergence du BTV-8 en Europe du nord sont principalement dues aux impacts sanitaires causés par la maladie et aux coûts et pertes liés

aux mesures de contrôle. En France, en 2009, 98 millions d'euros ont été dépensés pour la mise en place de la campagne de vaccination. Etant donné l'investissement financier considérable, une estimation du coût/bénéfice de la vaccination est nécessaire. Celle-ci permet de justifier ou non le recours à une vaccination de masse lors d'une possible future épizootie de BTV. Aucune estimation du coût/bénéfice de la vaccination contre la BT n'a été faite en France malgré quatre années consécutives de campagnes de vaccination. Les coûts et pertes liés à la mise en place de la vaccination sont composés des coûts logistiques et des potentiels risques liés à la vaccination. Les coûts logistiques sont connus. On peut considérer en première approche que les bénéfices potentiels de la vaccination correspondent aux pertes causées par la maladie dans les troupeaux atteints et que les risques correspondent à de potentiels effets secondaires.

4. Etat de l'art

4.1. Effets de l'infection par le BTV-8

4.1.1. Impacts sanitaires associés à l'infection par le BTV-8

4.1.1.1. Expression clinique de l'infection par le BTV-8

L'expression clinique associée à l'infection par le BTV n'a été que très rarement observée chez les bovins avant l'émergence du BTV-8 en Europe du Nord (Nomikou et al., 2004, Shimshony, 2004). Deux explications sont envisageables (ou une combinaison de ces deux explications), soit le sérotype BTV-8 qui a émergé en Europe du nord est plus virulent que les autres sérotypes, soit l'expression clinique est plus marquée parce que le BTV-8 a émergé dans une population totalement naïve. Néanmoins, la majorité des infections chez les bovins sont subcliniques et les signes cliniques restent plus marqués chez les ovins (Elbers et al., 2008a, Elbers et al., 2008b). Les principaux signes cliniques notifiés par les vétérinaires ainsi que leur fréquences chez les bovins sont résumés dans le tableau 1 (Le Gal et al., 2008). Les données proviennent de 409 troupeaux bovins du département des Ardennes en 2007 (tirés aléatoirement parmi les 1500 troupeaux du département). Ce département a été un des premier et un des plus touché parmi les départements exposés en France en 2007.

Table 1 : Fréquence (%) des signes cliniques chez les bovins infectés par le virus de la Bluetongue sérotype 8 entre août et décembre 2007 dans le département des Ardennes (Le Gal et al., 2008)

Signes cliniques	Bovins (n=1297)	IC 95%
Abattement	25,9	23,5–28,4
Amaigrissement	24,0	21,6–26,4
Hyperthermie	23,1	20,7–25,4
Irritation muflle	22,1	19,8–24,4
Jetage	19,8	17,6–22,0
Lésions podales	19,7	16,5–20,9
Lésions oculaires	18,1	15,9–20,2
Ptyalisme	16,9	14,8–18,9
Raideur	16,3	14,3–18,4
Signes pulmonaires	9,4	7,7–11,0
Lésions buccales	9,4	7,7–11,0
Congestion bouche	7,8	6,3–9,3
Œdème de la face	6,7	5,3–8,1
Cyanose de la langue	1,5	0,8–2,1

4.1.1.2. Mortalité

L'infection par le BTV-8 est associée à un excès de mortalité chez les bovins. Le taux de mortalité des bovins a été estimé entre 0 et 5 pour une population à risque de 100 vaches-mois dans les troupeaux foyers confirmés après suspicion clinique en 2006 aux Pays-Bas (Elbers et al., 2008b). Les risques relatifs de mortalité ont été estimés entre 1,20 et 1,41 selon la catégorie d'âge des vaches dans les troupeaux Néerlandais confirmés après détection de signes cliniques (Santman-Berends et al., 2010a). Enfin, une étude française, basée sur la modélisation des fluctuations temporelles de mortalité, a analysé l'évolution de la mortalité dans des populations de bovins situées en zone d'épizootie (Perrin et al., 2010). Les taux de mortalité observés les années précédant l'épizootie ont permis de calculer un taux de mortalité attendu. Le ratio mortalité observée / mortalité attendue chez les bovins laitiers est compris entre 1,19 et 1,38 selon la catégorie d'âge.

4.1.2. Principaux impacts zootechniques associés à l'infection par le BTV-8

Les principaux impacts associés à l'infection par le BTV-8 chez les bovins sont l'augmentation des troubles de la reproduction et la diminution de la production de lait (Elbers et al., 2008a, Elbers et al., 2009, MacLachlan et al., 2000, Santman-Berends et al., 2010a, Santman-Berends et al., 2011a, Santman-Berends et al., 2011b).

4.1.2.1. Troubles de la reproduction

Le BTV-8 est capable de transmission trans-placentaire, contrairement aux autres sérotypes (De Clercq et al., 2008, Menzies et al., 2008, Santman-Berends et al., 2010b). Durant l'épizootie de BTV-8, la proportion de transmission trans-placentaire a été estimée entre 10 et 33% des vaches infectées pendant la gestation (Darpel et al., 2009, De Clercq et al., 2008).

Les troubles de reproduction causés par le virus BTV chez la vache sont une conséquence de (i) l'effet de l'infection chez la vache gestante (hyperthermie, contamination virale des voies génitales qui entraîne des lésions microvasculaires) et de (ii) l'effet de l'infection sur le conceptus si il y a transmission trans-placentaire du virus. L'hyperthermie est responsable d'une diminution de la sécrétion de GnRH, d'une diminution de la qualité des ovocytes et d'une altération du développement embryonnaire (Bridges et al., 2005, Hansen et al., 2001, Wolfenson et al., 2000). Les conséquences de l'infection par le BTV-8 dépendent du moment de l'infection pendant la gestation (MacLachlan et al., 2000). Des infections expérimentales de blastocystes par BTV-8 entraînent des effets délétères allant de l'arrêt de la croissance à l'apoptose (Vandaele et al., 2011).

Les effets du BTV-8 sur les performances de reproduction des bovins ont été identifiés mais peu quantifiés. Le virus BT est responsable de nombreux troubles de la reproduction, dont la diminution de la fertilité, l'augmentation du taux d'avortements, de naissance de veaux mort-nés ou prématurés et de malformations congénitales (Elbers et al., 2009, Elbers et al., 2008a, Osburn, 1994, Uhaa et al., 1990, Wouda et al., 2009). Il s'agit principalement d'études de cas descriptives et d'études expérimentales. Les vaches ayant séroconverti aux Pays-Bas pendant l'épizootie de 2008 avaient un taux de retours à 56 jours plus élevé, en comparaison avec des vaches non infectées (Santman-Berends et al., 2010a). Alors que plusieurs études ont rapporté une augmentation des avortements dans des troupeaux bovins exposés au BTV-8 (Elbers et al., 2009, Elbers et al., 2008a, Wouda et al., 2009), la seule étude analytique qui a cherché à quantifier cette augmentation chez des vaches laitières ayant séroconverti n'a pas permis de montrer d'association significative, du fait des faibles effectifs (Santman-Berends et al., 2010a). La mise en évidence d'une telle association et la quantification des variations du taux d'avortement nécessitent donc de plus grands effectifs.

4.1.2.2. Production de lait

La diminution de la production de lait associée à l'exposition au BTV peut être causée par une atteinte des mamelles ou des trayons (œdèmes mammaires ou ulcération des trayons) qui peut être vaste et sévère (MacLachlan et al., 2009). De plus, l'état d'abattement, ainsi que les

lésions buccales et podales entraînent une diminution de l'ingestion d'aliments qui contribuent à cette diminution (Osburn, 1994).

En 2007, des diminutions de la production de lait ont été observées dans 24% des troupeaux foyers Néerlandais confirmés après détection de signes cliniques (Elbers et al., 2009). La seule étude analytique qui a quantifié les variations de production de lait chez des vaches ayant séroconverti a montré que la diminution était en moyenne de 51 kg par vache, ce qui correspond à 0,6% de la production annuelle par vache aux Pays-Bas (Santman-Berends et al., 2011b). Cette estimation est probablement sous-estimée du fait que les vaches incluses dans l'analyse n'ont pas exprimé cliniquement la maladie.

La majorité des études concernant les effets de l'infection par le BTV-8 sur les performances des vaches sont des études visant à décrire les effets biologiques associés à l'infection (études expérimentales, études de cas descriptives). Les deux seules études qui ont cherché à quantifier les effets de l'infection par le BTV-8 sur les performances ont été menées avec de faibles effectifs (Santman-Berends et al., 2011a, Santman-Berends et al., 2010a). Les effets de l'infection par le BTV-8 sur les performances pourraient donc être précisés dans de larges populations.

4.2. Effets secondaires de la vaccination contre le BTV-8

4.2.1. Données issues de la pharmacovigilance

Les données de pharmacovigilance issues des déclarations de survenue d'effets indésirables lors des campagnes de vaccination mises en place en Europe depuis 2008 ne remettent pas en cause le ratio bénéfice/risque de la vaccination contre le BTV-8 avec des vaccins inactivés (European Medicines Agency, 2009). Cependant, les études les plus adaptées pour mettre en évidence l'existence d'une association entre un effet secondaire et la vaccination (d'autant plus dans le cas d'un faible effet) sont les analyses épidémiologiques observationnelles réalisées dans de larges populations (Glickman, 1999).

4.2.2. Etudes épidémiologiques

Des hyperthermies temporaires ont été observées chez le mouton après la deuxième injection de vaccin inactivés contre le BTV-8 (Gethmann et al., 2009). De plus, les conditions de la vaccination de masse ont été plus stressantes pour les animaux (Wouda et al., 2009). Or,

l'embryon, avant son implantation dans l'utérus, est fragile et particulièrement sensible à des facteurs comme l'hyperthermie ou le stress (Hansen et al., 2001). La vaccination pourrait donc affecter la fertilité. Une augmentation du taux de retour a été observée pour les vaches inséminées dans un intervalle de quelques jours autour de la deuxième injection dans une étude suisse réalisée dans 47 troupeaux bovins laitiers (Feyer et al., 2011). Les potentiels effets secondaires de la vaccination sur la fertilité pourraient être confirmés dans de plus larges populations.

5. Besoins de recherche identifiés

L'évaluation du ratio risque/bénéfice de la vaccination nécessite l'estimation des pertes causées par la maladie en conditions naturelles et l'estimation de potentiels effets secondaires de la vaccination. La quantification de l'effet moyen de l'infection de l'ensemble des vaches appartenant aux troupeaux infectés permet d'estimer les pertes causées par la maladie en conditions naturelles. Au niveau d'un troupeau, l'effet de l'infection par le BTV-8 sur les performances dépend de la proportion de vaches infectées (Figure 2). La prévalence intra-troupeau augmente quand la prévalence inter-troupeau est plus élevée (Durand et al., 2010). A la fin de l'hiver 2007 en France, la prévalence intra-troupeau variait entre 0.42 et 0.99 dans les départements où la prévalence inter-troupeau était estimée à 1 (IC95% 0,93–1,00), alors qu'elle était inférieure à 0.10 dans les départements avec un niveau intermédiaire de prévalence inter-troupeaux (d'environ 0.60). De plus, la proportion de vaches infectées dans les troupeaux dépend probablement du mois d'exposition. En effet, l'abondance des vecteurs varie selon la saison, avec un pic de l'activité vectorielle entre les mois de juillet et septembre, selon l'espèce. Par conséquent, l'effet de l'exposition au BTV-8 au niveau d'un troupeau sur les performances pourrait varier selon la proportion de troupeaux infectés localement et selon le mois d'exposition pendant l'épizootie.

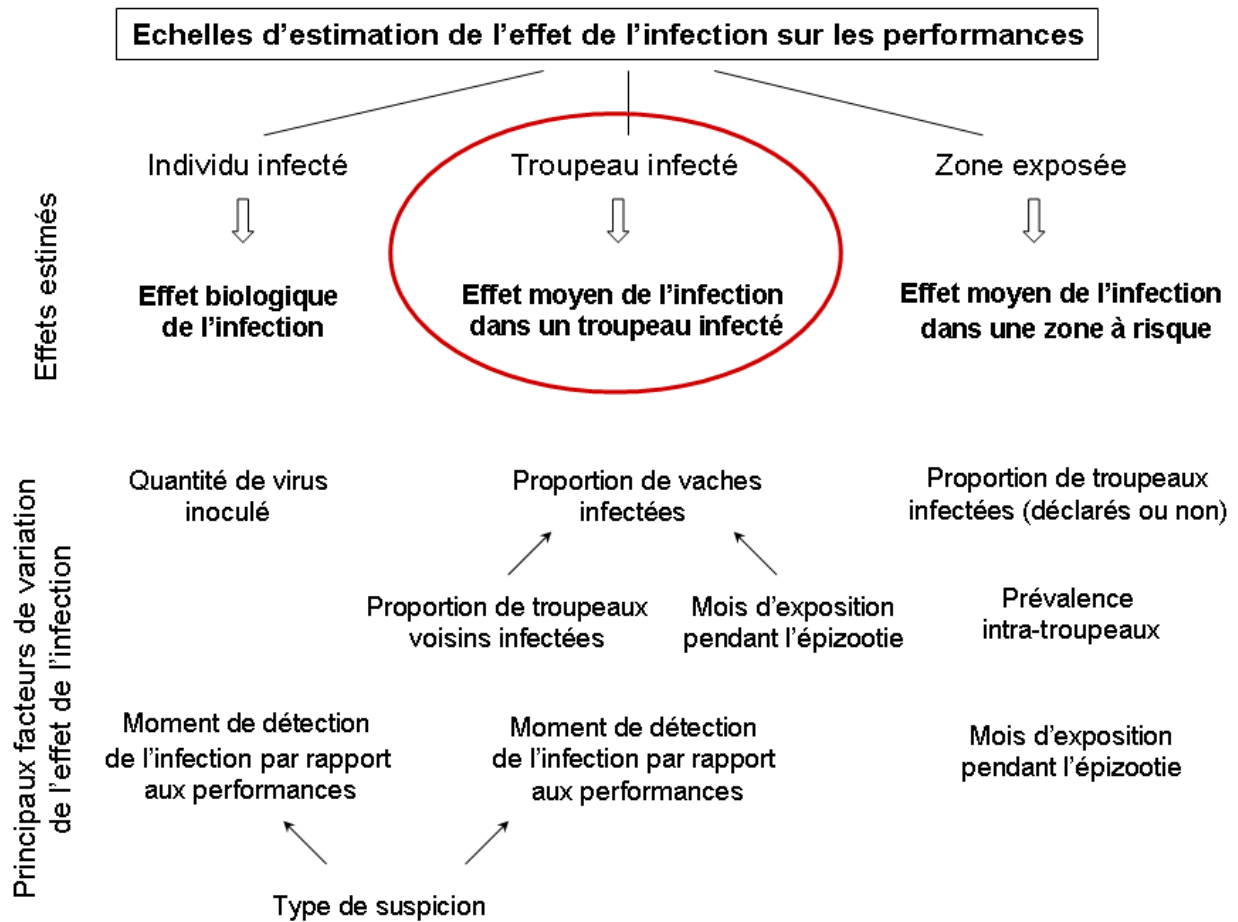


Figure 2 : Echelles d'estimation des effets de l'infection par le virus de la Bluetongue sérotype 8 sur les performances et facteurs de variation de ces effets.

Quand des signes cliniques sont détectés chez un animal, une diminution des performances pourrait être observée avant et après la date de détection de la maladie. En effet, la détection des signes cliniques est retardée par rapport à l'infection de la vache. L'intervalle entre l'infection par le BTV-8 et l'expression des signes cliniques a été estimé à quelques jours (l'expression clinique devient manifeste à partir du quatrième jour et la sévérité des signes cliniques augmente avec l'apparition de multiples signes à partir du septième jour post infection) (Dal Pozzo, 2009). De plus, l'effet de l'infection d'une vache sur ses performances persiste probablement plusieurs jours à plusieurs semaines. Au niveau troupeau, l'intervalle entre l'expression des premiers signes cliniques de la maladie et la notification du foyer a été estimée en moyenne à une ou deux semaines dans les foyers notifiés pendant l'épizootie de 2006 en Belgique et aux Pays-Bas (Elbers et al., 2008a, Saegerman et al., 2010). Sachant que l'intervalle moyen entre les dates de suspicion et de déclaration est d'environ une semaine, l'intervalle entre l'infection et la détection de la maladie est probablement d'environ deux

semaines. De plus, tous les animaux d'un troupeau ne sont pas infectés au même moment, la progression du virus au sein du troupeau est plus ou moins rapide selon l'abondance des vecteurs. Des infections peuvent donc avoir lieu longtemps après la date de détection de la maladie dans un troupeau. Ces éléments suggèrent que des variations de performances pourraient être observées sur un intervalle large autour de la date de détection de la maladie dans le troupeau. Dans le cas d'une détection réalisée dans le cadre d'un dépistage systématique (lors d'une vente d'animaux par exemple), la date de détection informe peu sur le moment d'infection (la vache peut avoir été infectée longtemps avant sans avoir exprimée cliniquement la maladie) et des variations de performances pourraient alors être observées plus longtemps avant la date de détection que dans les foyers cliniques.

Certains troupeaux infectés pourraient ne pas avoir été détectés ou déclarés pendant l'épizootie. En France, à la fin de l'hivers 2007, une faible proportion des troupeaux séropositifs a été déclarée après suspicion clinique (Durand et al., 2010). Aux Pays-Bas, l'augmentation du risque relatif de mortalité des vaches laitières appartenant à des troupeaux non déclarés situés en zone d'épizootie en 2007 a été estimée à 1,11 (IC95% : 1,08-1,13), et à 1,41 (IC95% : 1,22-1,63) pour les vaches appartenant à des troupeaux déclarés (Santman-Berends et al., 2011b). Ces résultats mettent en évidence l'importance de la sous-déclaration des foyers de BTV-8 et les limites de la surveillance passive basée sur la détection et la déclaration des signes cliniques dans le cas d'une maladie dont l'expression subclinique est fréquente.

Des variations de performances pourraient être observées dans les troupeaux non déclarés situés en zone exposée. La quantification de ces effets constituerait une information complémentaire pour l'estimation des pertes associées à l'infection. De plus, ces données pourraient être utilisées comme éléments d'évaluation du système de surveillance car la mise en évidence de variations de performances chez des vaches appartenant à des troupeaux non déclarés suggérerait que le virus a circulé dans ces troupeaux sans qu'ils aient été déclarés. Enfin, le monitoring des performances pourrait être utilisé dans le cadre de la détection d'agents pathogènes (à condition qu'ils affectent ces performances).

6. Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse comprend trois objectifs principaux. Le premier objectif est de quantifier l'effet moyen de l'exposition au BTV-8 dans des troupeaux antérieurement naïfs (non infectés et non vaccinés) sur les performances de reproduction (fertilité et risque d'avortement) et de

production laitière, dans des conditions naturelles d'infection. De plus, il s'agit de déterminer la période de variations de performances. En complément, l'influence de la proportion de troupeaux voisins infectés et du mois de détection de la maladie est évaluée. Le deuxième objectif est de quantifier un potentiel effet secondaire de la vaccination contre le BTV-8 avec un vaccin inactivé sur la fertilité des vaches laitières en conditions de terrain. Le troisième objectif est d'évaluer si les effets sur les performances peuvent apporter une information complémentaire au dispositif de surveillance pour décrire la propagation du virus.

7. Stratégie générale de la thèse

7.1. Principe / approche globale

La quantification des effets sur les performances, qu'ils soient associés à l'exposition au BTV-8 ou à la vaccination contre le BTV-8, repose sur la comparaison des performances dans des populations de bovins sélectionnés selon leurs statuts concernant l'exposition et la vaccination (Figure 3). Les performances sont influencées par des facteurs liés aux vaches et à la conduite d'élevage. L'utilisation de modèles statistiques multivariés permet la quantification des effets de l'exposition et de la vaccination sur les performances indépendamment des variations dues à ces facteurs.

7.2. Sources des données

Différents jeux de données ont été utilisés. Les données concernant l'exposition pour les années 2007 et 2008 ont été transmises par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI). Concernant la vaccination, les seules données disponibles étaient celles de la campagne facultative contre le BTV-8 de 2008 en Bretagne (collectées et transmises par l'Union Bretonne des Groupements de Défense Sanitaire - UBGDS). Enfin, les données de performances ont été obtenues auprès du Centre de Traitement de l'Information Génétique de Jouy-en-Josas (CTIG).

Il a été considéré dans ce travail que les bénéfices potentiels de la vaccination correspondent aux pertes causées par la maladie. Or, même si la vaccination est efficace, la réduction des pertes pourrait être inférieure aux pertes associées à l'exposition. La quantification de la réduction des pertes aurait nécessité la comparaison des performances de vaches exposées et vaccinées avec celles de vaches exposées et non vaccinées. Cela n'est donc possible qu'avec

les données collectées en 2008 puisque la vaccination contre le BTV-8 était facultative. Or, seules les données de vaccination réalisées en Bretagne étaient disponibles, et le faible nombre de foyers dans cette région ne permet pas la quantification de la réduction des pertes.

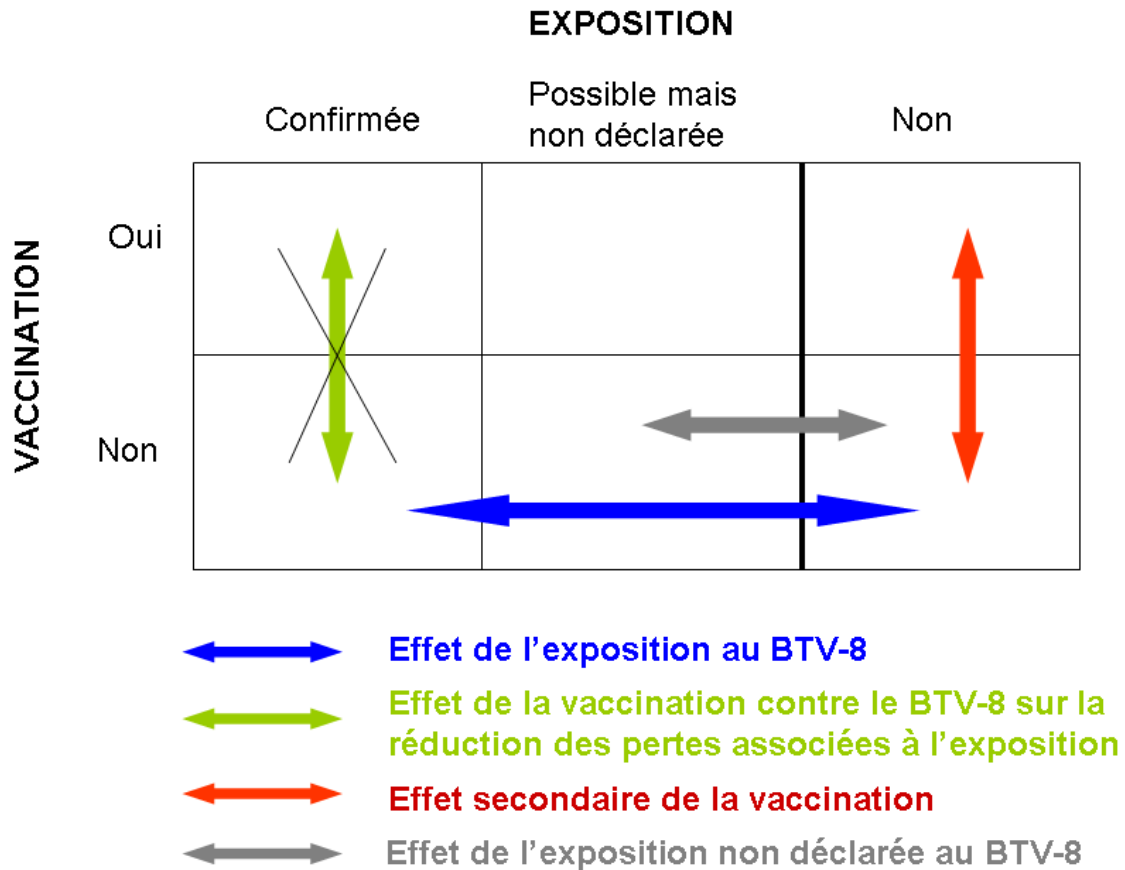


Figure 3 : Comparaison des populations de bovins selon leur statut vis-à-vis de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) et de la vaccination contre le BTV-8 selon l'effet étudié

8. Plan de la thèse

L'articulation générale de la thèse est présentée Figure 4. Cette thèse est composée de trois chapitres. Le premier chapitre, intitulé « Effets de l'exposition au BTV-8 sur les performances des vaches laitières dans des troupeaux antérieurement naïfs », comprend la quantification et la caractérisation de l'effet de l'exposition sur les performances dans des troupeaux naïfs exposés au BTV-8 sur (1) la fertilité, (2) le risque d'avortement et (3) la production laitière des vaches, en conditions naturelles d'exposition.

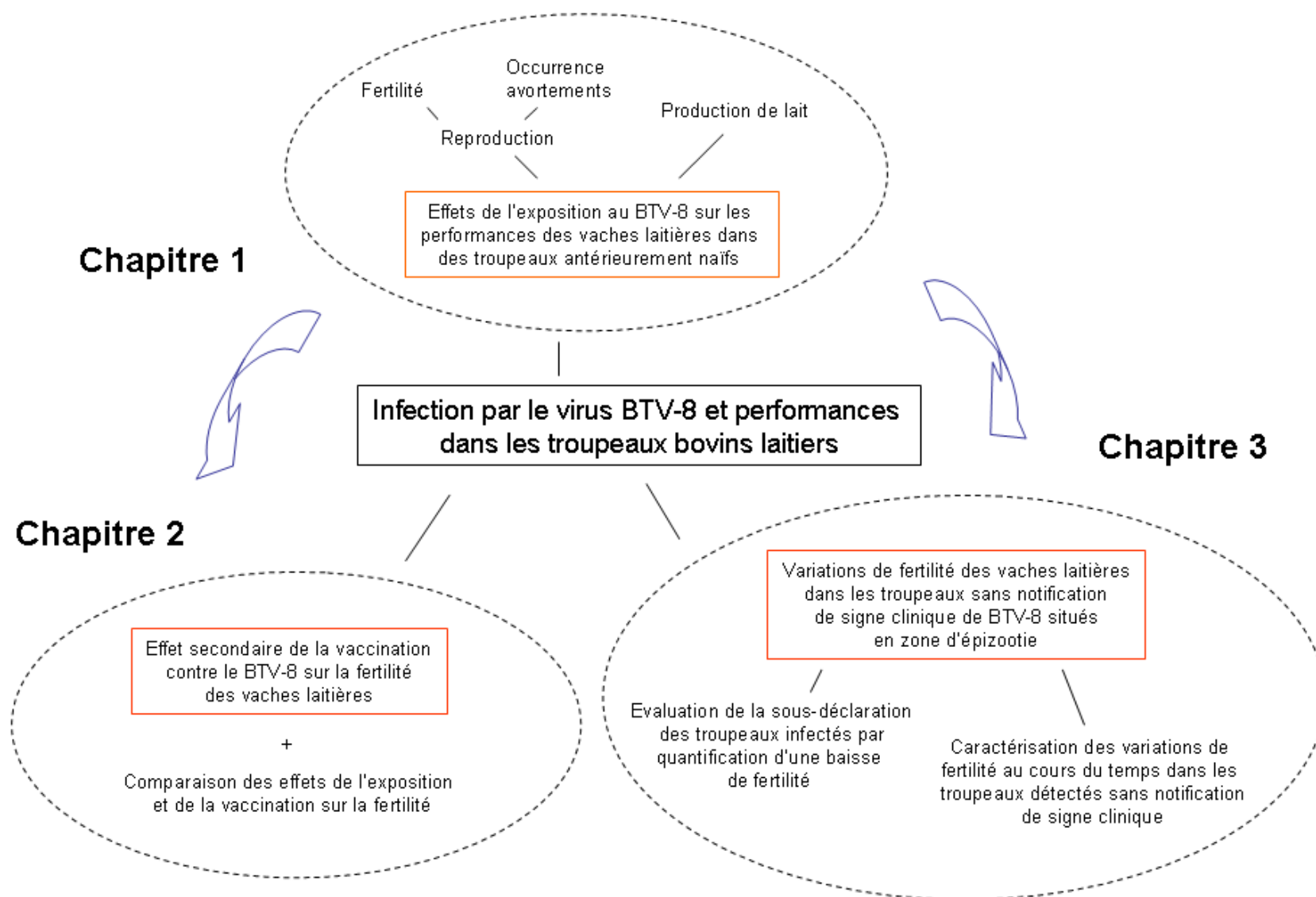


Figure 4 : Articulation générale des chapitres de la thèse

Le deuxième chapitre, intitulé « Effet secondaire de la vaccination contre le BTV-8 sur la fertilité des vaches laitières », concerne (1) la quantification d'un potentiel effet secondaire de la vaccination contre le BTV-8 sur la fertilité des vaches laitières et (2) la comparaison des effets de l'exposition et de la vaccination sur la fertilité des vaches.

Le dernier chapitre, intitulé « Variations de fertilité des vaches laitières dans les troupeaux sans notification de signe clinique de BTV-8 situés en zone d'épizootie », comprend (1) l'évaluation de la sous-déclaration des troupeaux infectés par quantification d'une baisse de fertilité et (2) la caractérisation des variations de fertilité au cours du temps dans les troupeaux détectés infectés sans notification de signe clinique.

REFERENCES

- Barratt-Boyes, S. M. and N. J. MacLachlan. 1994. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. *Vet. Microbiol.* 40(3-4):361-371.
- Boorman, J. 1986. Presence of bluetongue virus vectors on Rhodes. *Vet. Rec.* 118(1):21.
- Borkent, A. and W.W. Wirth. 1997. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Bull. Am. Museum Nat. Hist* 233, 1-257.
- Bridges, P. J., M. A. Brusie, and J. E. Fortune. 2005. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29(3):508-522.
- Calavas, D. and P. Hendrikx. 2010. Surveillance et gestion d'une épizootie imprévue – analyse et enseignements. *In* : Bulletin Epidémiologique AFSSA, 2010. N°35/Hors-Série/Mars 2010. Spécial FCO.
- Caracappa, S., A. Torina, A. Guercio, F. Vitale, A. Calabro, G. Purpari, V. Ferrantelli, M. Vitale, and P. S. Mellor. 2003. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Vet. Rec.* 153(3):71-74.
- Dal Pozzo, F., K. De Clercq, H. Guyot, E. Vandemeulebroucke, P. Sarradin, F. Vandebussche, E. Thiry, C. Saegerman. 2009. Experimental reproduction of bluetongue virus serotype 8 clinical disease in calves. *Vet. Microbiol.* 136 : 352-358.

- De Clercq, K., I. De Leeuw, B. Verheyden, E. Vandemeulebroucke, T. Vanbinst, C. Herr, E. Meroc, G. Bertels, N. Steurbaut, C. Miry, K. De Bleecker, G. Maquet, J. Bughin, M. Saulmont, M. Lebrun, B. Sustronck, R. De Deken, J. Hooyberghs, P. Houdart, M. Raemaekers, K. Mintiens, P. Kerkhofs, N. Goris, and F. Vandebussche. 2008. Transplacental infection and apparently immunotolerance induced by a wild-type bluetongue virus serotype 8 natural infection. *Transbound. Emerg. Dis.* 55(8):352-359.
- Di Gialleonardo, L., P. Migliaccio, L. Teodori, and G. Savini. 2011. The length of BTV-8 viraemia in cattle according to infection doses and diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 91(2):316-320.
- Durand, B., G. Zanella, F. Biteau-Coroller, C. Locatelli, F. Baurier, C. Simon, E. Le Drean, J. Delaval, E. Prengere, V. Beaute, and H. Guis. 2010. Anatomy of Bluetongue Virus Serotype 8 Epizootic Wave, France, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 16(12):1861-1868.
- EFSA, 2007. Scientific report of the scientific panel on animal health and welfare on request from the commission (EFSA-Q-2006-311) and EFSA selfmandate (EFSA-Q-2007-063) on bluetongue. *The EFSA journal*, 479, 1-29 and 480, 1-20.
- Elbers, A. R., A. N. van der Spek, and P. A. van Rijn. 2009. Epidemiologic characteristics of bluetongue virus serotype 8 laboratory-confirmed outbreaks in The Netherlands in 2007 and a comparison with the situation in 2006. *Prev. Vet. Med.* 92(1-2):1-8.
- Elbers, A. R. W., A. Backx, E. Meroc, G. Gerbier, C. Staubach, G. Hendrickx, A. van der Spek, and K. Mintiens. 2008a. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006: I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 87(1-2):21-30.
- Elbers, A. R. W., A. Backx, K. Mintiens, G. Gerbier, C. Staubach, G. Hendrickx, and A. van der Spek. 2008b. Field observations during the Bluetongue serotype 8 epidemic in 2006: II. Morbidity and mortality rate, case fatality and clinical recovery in sheep and cattle in the Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 87(1-2):31-40.
- Enserink, M. 2006. Emerging infectious diseases. During a hot summer, bluetongue virus invades northern Europe. *Science (New York, N.Y)* 313(5791):1218-1219.
- European Medicines Agency, 2009. Committee for medical products for veterinary use. An overview of field safety data from EU for bluetongue virus vaccines serotype 8 emerging from the 2008 national vaccination campaigns. pp. 1-17.

- Feyer, D., D. Kemper, M. Reist, and T. Kaufmann. 2011. [Bluetongue disease: impact of the 2008 vaccination on fertility in supervised dairy herds]. *Schweiz. Arch. Tierheilkund.* 153(6):257-262.
- Gerry, A. C., B. A. Mullens, N. J. Maclachlan, and J. O. Mecham. 2001. Seasonal transmission of bluetongue virus by *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at a southern California dairy and evaluation of vectorial capacity as a predictor of bluetongue virus transmission. *J. Med. Entomol.* 38(2):197-209.
- Gethmann, J., K. Huttner, H. Heyne, C. Probst, M. Ziller, M. Beer, B. Hoffmann, T. C. Mettenleiter, and F. J. Conraths. 2009. Comparative safety study of three inactivated BTV-8 vaccines in sheep and cattle under field conditions. *Vaccine* 27(31):4118-4126.
- Glickman, L. T. 1999. Weighing the risks and benefits of vaccination. *Adv. Vet. Med.* 41:701-713.
- Hansen, P. J., M. Drost, R. M. Rivera, F. F. Paula-Lopes, Y. M. al-Katanani, C. E. Krininger, 3rd, and C. C. Chase, Jr. 2001. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 55(1):91-103.
- Hofmann, M. A., S. Renzullo, M. Mader, V. Chagnat, G. Worwa, and B. Thuer. 2008. Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* 14(12):1855-1861.
- International Society for Infectious Diseases, 2006. Bluetongue – Netherlands, Belgium, Germany (06): BTV-8. ProMED-mail 2006; 28 August: 20060828.2448. <http://www.promedmail.org>.
- Katz, J., D. Alstad, G. Gustafson, and J. Evermann. 1994. Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6(2):139-142.
- Le Gal, M.C., B. Dufour, E. Geoffroy, G. Zanella, F. Moutou, Y. Milleman, J.N. Rieffel and F. Pouilly. 2008. Bluetongue virus serotype 8 in the Ardennes in 2007. *Vet. Rec.* 163, 668.
- MacLachlan, N. J. 2004. Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Vet. Ital.* 40(4):462-467.
- MacLachlan, N. J., A. J. Conley, and P. C. Kennedy. 2000. Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:643-651.

- Maclachlan, N. J., C. P. Drew, K. E. Darpel, and G. Worwa. 2009. The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Pathol.* 141(1):1-16.
- MacLachlan, N. J., G. Jagels, P. V. Rossitto, P. F. Moore, and H. W. Heidner. 1990. The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. *Vet. Pathol.* 27(4):223-229.
- MacLachlan, N. J., R. A. Nunamaker, J. B. Katz, M. M. Sawyer, G. Y. Akita, B. I. Osburn, and W. J. Tabachnick. 1994. Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*. *Arch. Virol.* 136(1-2):1-8.
- Mehlhorn, H., V. Walldorf, S. Klimpel, B. Jahn, F. Jaeger, J. Eschweiler, B. Hoffmann, and M. Beer. 2007. First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitol. Res.* 101(1):219-228.
- Meiswinkel, R., M. Goffredo, P. Leijts, and A. Conte. 2008. The *Culicoides* 'snapshot': a novel approach used to assess vector densities widely and rapidly during the 2006 outbreak of bluetongue (BT) in The Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 87(1-2):98-118.
- Meiswinkel, R., P. van Rijn, P. Leijts, and M. Goffredo. 2007. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet. Rec.* 161(16):564-565.
- Mellor, P. S., D. M. Jennings, P. J. Wilkinson, and J. P. Boorman. 1985. *Culicoides imicola*: a bluetongue virus vector in Spain and Portugal. *Vet. Rec.* 116(22):589-590.
- Menzies, F. D., S. J. McCullough, I. M. McKeown, J. L. Forster, S. Jess, C. Batten, A. K. Murchie, J. Gloster, J. G. Fallows, W. Pelgrim, P. S. Mellor, and C. A. Oura. 2008. Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Vet. Rec.* 163(7):203-209.
- Nomikou, K., O. Mangana-Vougiouka, and D. E. Panagiotatos. 2004. Overview of bluetongue in Greece. *Vet. Ital.* 40(3):108-115.
- Osburn, B. I. 1994. The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 17(3-4):189-196.
- Perrin, J. B., C. Ducrot, J. L. Vinard, E. Morignat, A. Gauffier, D. Calavas, and P. Hendrikx. 2010. Using the National Cattle Register to estimate the excess mortality during an epidemic: application to an outbreak of Bluetongue serotype 8. *Epidemics* 2(4):207-214.
- Saegerman, C., D. Berkvens, and P. S. Mellor. 2008. Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg. Infect. Dis.* 14(4):539-544.

- Saegerman, C., P. Mellor, A. Uytendaele, J. B. Hanon, N. Kirschvink, E. Haubruge, P. Delcroix, J. Y. Houtain, P. Pourquier, F. Vandebussche, B. Verheyden, K. De Clercq, and G. Czaplicki. 2010. The most likely time and place of introduction of BTV8 into Belgian ruminants. *PLoS One* 5(2):e9405.
- Santman-Berends, I. M., J. J. Hage, T. J. Lam, O. C. Sampimon, and G. van Schaik. 2011a. The effect of bluetongue virus serotype 8 on milk production and somatic cell count in Dutch dairy cows in 2008. *J. Dairy Sci.* 94(3):1347-1354.
- Santman-Berends, I. M., J. J. Hage, P. A. Rijn, J. A. Stegeman, and G. V. Schaik. 2010a. Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) infection reduces fertility of Dutch dairy cattle and is vertically transmitted to offspring. *Theriogenology* 74(8):1377-1384.
- Santman-Berends, I. M., G. van Schaik, C. J. Bartels, J. A. Stegeman, and P. Vellema. 2011b. Mortality attributable to bluetongue virus serotype 8 infection in Dutch dairy cows. *Vet. Microbiol.* 148(2-4):183-188.
- Santman-Berends, I. M., L. van Wuijckhuise, P. Vellema, and P. A. van Rijn. 2010b. Vertical transmission of bluetongue virus serotype 8 virus in Dutch dairy herds in 2007. *Vet. Microbiol.* 141(1-2):31-35.
- Savini, G., M. Goffredo, F. Monaco, A. Di Gennaro, M. A. Cafiero, L. Baldi, P. de Santis, R. Meiswinkel, and V. Caporale. 2005. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet. Rec.* 157(5):133-139.
- Shimshony, A. 2004. Bluetongue in Israel - a brief historical overview. *Vet. Ital.* 40(3):116-118.
- Tabachnick, W. J. 2004. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet. Ital.* 40(3):144-150.
- Tabachnick, W. J. 2009. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epizootics in a changing world. *J. Exp. Biol.* 213, 946-954.
- Uhaa, I. J., H. P. Riemann, M. C. Thurmond, and C. E. Franti. 1990. A cross-sectional study of bluetongue virus and *Mycoplasma bovis* infections in dairy cattle: II. The association between a positive antibody response and reproduction performance. *Vet. Res. Commun.* 14(6):471-480.
- Vandaele, L., W. Wesselingh, K. De Clercq, I. De Leeuw, H. Favoreel, A. Van Soom, and H. Nauwynck. 2011. Susceptibility of in vitro produced hatched bovine blastocysts to infection with bluetongue virus serotype 8. *Vet. Res.* 42(1):14.

- Verwoerd, D.W., H. Huisman and B.L. Erasmus. 1979. Orbiviruses. *In*: Fraenkel-Conrat, H. and R.K. Wagner. (eds). *Comprehensive Virology*, Vol. 14. New York: Plenum Press.
- Weaver, S. C. and W. K. Reisen. 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 85(2):328-345.
- Wilson, A., S. Carpenter, J. Gloster, and P. Mellor. 2007. Re-emergence of bluetongue in northern Europe in 2007. *Vet. Rec.* 161(14):487-489.
- Wolfenson, D., Z. Roth, and R. Meidan. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:535-547.
- Wouda, W., N. H. Peperkamp, M. P. Roumen, J. Muskens, A. van Rijn, and P. Vellema. 2009. Epizootic congenital hydranencephaly and abortion in cattle due to bluetongue virus serotype 8 in the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 134(10):422-427.

CHAPITRE 1

**Effets de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8
sur les performances des vaches laitières dans des
troupeaux antérieurement naïfs**

Partie 1 : Quantification et période à risque de diminution de fertilité associée à l'exposition au virus de la Bluetongue serotype 8 dans des troupeaux bovins laitiers

Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds

S. Nusinovici, H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau, C. Fourichon

RESUME

L'infection par le virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) entraîne de nombreux troubles de la reproduction, incluant la diminution de fertilité, l'augmentation des avortements et des malformations congénitales. L'effet de l'infection par le BTV-8 sur la fertilité a été quantifié pour des vaches ayant séroconverti. La quantification pour des vaches infectées informe sur l'effet biologique de l'infection, alors que la quantification de l'effet pour l'ensemble des vaches appartenant aux troupeaux infectés permet d'estimer les pertes moyennes causées par la maladie. L'effet de l'infection au niveau troupeau dépend de la proportion de vaches infectées dans le troupeau. Les objectifs de cette étude sont de quantifier l'effet moyen de l'exposition au BTV-8 en conditions naturelles sur la fertilité des vaches laitières dans des troupeaux antérieurement naïfs, et de déterminer la période à risque de diminution de la fertilité autour de la date de détection de la maladie dans le troupeau.

L'effet de l'exposition sur la fertilité a été mesuré par le taux de retours 90 jours après une première insémination artificielle (IA), calculé pour les vaches appartenant aux troupeaux exposés en 2007 et comparé à celui des vaches de troupeaux non exposés. Afin de déterminer la période à risque de diminution de fertilité, les variations de fertilité dans les troupeaux exposés ont été quantifiées selon l'intervalle de temps entre la date d'IA de la vache et la date de détection de la maladie dans le troupeau. Des analyses de survie ont été réalisées pour estimer le risque de diminution de fertilité associé à l'exposition au BTV-8, en ajustant sur les principaux facteurs connus influençant la fertilité.

La période de diminution de fertilité dépend du mois de détection de la maladie dans le troupeau. Pour les troupeaux détectés précocement durant l'épizootie, la fertilité est affectée pour les vaches inséminées entre 4 semaines avant et 5 semaines après la date de détection de la maladie. Selon l'intervalle entre la date d'IA de la vache et la date de détection du troupeau, l'augmentation du taux de retours 90 jours associé à l'exposition varie entre 8 et 21 points de pourcent. L'épisode de diminution de fertilité est vraisemblablement due à une combinaison de l'effet de l'infection sur la fécondation et sur le développement embryonnaire et de l'infection décalée des vaches due à la diffusion du virus dans le troupeau. Pour les troupeaux détectés durant la seconde moitié de l'épizootie, la fertilité est affectée pour les vaches inséminées plus de 2 mois avant la détection de la maladie, ce qui suggère une détection retardée des signes cliniques dans ces troupeaux. L'effet de l'exposition sur la fertilité ne dépend pas de la proportion de troupeaux voisins infectés.

Etant donné la durée de la période de diminution de fertilité et l'amplitude de l'effet, l'exposition au BTV-8 est associée à des pertes massives.

Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds

S. Nusinovici†‡, H. Seegers*†‡, A. Joly*†‡, F. Beaudeau*†‡, C. Fourichon*†‡*

*Oniris, UMR1300 Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, Nantes, France

†INRA, UMR1300, Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, Nantes, France

‡LUNAM, Université Nantes, Angers, Le Mans, France

Journal of Dairy Science – en révision

ABSTRACT

The detrimental effect of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) on fertility was quantified in seroconverting cows. Whilst the effect on individual cows provides information regarding the potential biological burden of infection, losses at a herd level are also dependent on the proportion of infected cows within the herd. The objectives of this study were to quantify the average effect of BTV-8 exposure in field conditions on the fertility of dairy cows in previously naïve herds, and to determine the at-risk period of decreased fertility related to the date of detection of the disease in the herd. The effect of BTV-8 exposure on fertility was assessed using the 90-day-return-to-service rate after the first artificial insemination (AI) calculated for cows in exposed herds (during the 2007 epizootic in France) and compared to that for cows in unexposed herds. In order to determine the at-risk period of decreased fertility, variations of fertility in exposed herds were quantified according to the time interval between the date of AI for individual cows and the date that disease was detected in the herd. Survival analyses were used to assess the risk of decreased fertility associated with BTV-8 exposure, adjusting for the main factors known to influence fertility. The episode at-risk of decreased fertility depended on the month of disease detection in the herd. For herds detected early in the epizootic, the fertility was decreased for cows inseminated from 1 month before to 1 month after the date of disease detection in the herd. Depending on time interval between the date of AI of cows and the date of detection in the herd, the increase of return-to-service rate associated with BTV-8 exposure varied from 8 to 21 percentage points of 90-day-return-to-service. The episode of reduced fertility is likely due to a combination of the effect of the infection at different stages of conception and early pregnancy and the delayed exposure of cows due to the spreading of the virus within herds. For herds detected during

the second half of the epizootic, the fertility was decreased for cows inseminated more than 2 months before detection, which suggests a delay in the detection of clinical signs following virus introduction in the herd. There was no correlation between the effect of BTV-8 exposure on fertility with the prevalence of BTV-8 in the local geographical area. Given the duration of the period that cows were at-risk of decreased fertility and the magnitude of the effect, the average BTV-8 exposure in naïve herds led to major losses.

INTRODUCTION

Bluetongue is a non-contagious, insect-transmitted disease of domestic and wild ruminants caused by the bluetongue virus (BTV). BTV-8 emerged in northern Europe in 2006 (mainly The Netherlands, Belgium and Germany). In continental France, the first BTV-8 clinical case was reported in August 2006 near the border with Belgium. Subsequently, the disease re-emerged in 2007 and 2008, resulting in a respective 10,500 and 26,500 herds officially reported with clinical signs.

The BTV-8 epizootic in northern Europe had a major economic impact due to control measures and production losses (Saegerman et al., 2008, Velthuis et al., 2009). Production losses included mortality, reduced milk production, weight loss and reduced reproductive performance (Velthuis et al., 2009). A quantitative appraisal of the production losses is required to help inform future decision-making regarding the control of the BTV-8 epizootic. The effects of BTV on reproductive performance in cattle have been identified but not precisely quantified. Bluetongue virus induces a wide range of reproductive disorders such as decreased fertility, abortions, stillbirth and congenital abnormalities (Dal Pozzo et al., 2009, Elbers et al., 2008, Elbers et al., 2009, Meroc et al., 2008, Osburn, 1994, Uhaa et al., 1990, Wouda et al., 2009). The ability to cross the placental barrier has been demonstrated for BTV-8 (Dal Pozzo et al., 2009, Menzies et al., 2008). A study conducted during the 2008 epizootic in the Netherlands quantified the effect of BTV-8 exposure on fertility in infected cows (Santman-Berends et al., 2010). Cows that seroconverted had higher return-to-service rate at 56 d after AI. Whilst the effect on individual cows provides information regarding the potential biological burden of infection, losses at a herd level are also dependent on the proportion of infected cows. In naïve herds, the proportion of infected cows may vary according to exposure to infected midges, whereas in herds previously infected or vaccinated, it is also influenced by the proportion of immune cows.

When a clinical case of Bluetongue is detected in a herd, a detrimental effect on fertility can be expected for AIs performed both before and after the date the clinical case was identified. Indeed the impact on the herd results from the combined effect of viral replication on different stages of conception and the progressive spreading of the virus within the herd. For AIs performed before the first clinical case was detected, a decrease in fertility may result from an increase in embryo or fetal mortality. Moreover, a number of cows could actually be infected before the detection of the disease in the herd. For AIs performed after the first clinical case was detected, a decrease in fertility may be due to either the delayed exposure of some cows or could result from a late effect of the viral replication and development in the uterus after infection. Therefore, the episode of decreased fertility associated with BTV-8 exposure starts before the date of disease detection in the herd and is likely to last for several weeks after this date. To determine the time period when the herd is at risk of decreased fertility, the effect of exposure can be quantified by assessing the time interval between dates of AI and dates of detection of the disease in a herd.

At the herd level, the effect of exposure depends on the proportion of infected cows in the herd. The within-herd prevalence has been shown to be related to the between-herd prevalence in a study conducted in France during the winter of 2007 (Durand et al., 2010). At the end of the 2007 epizootic, reported cattle herds located in the most affected areas (herd-level prevalence equal to 1) had a within-herd prevalence of between 0.42 and 0.99, while those located in areas with an intermediate herd-level prevalence (about 60% infected herds) had a within-herd prevalence which was lower than 0.10. Therefore, the average effect of BTV-8 exposure on fertility in a herd might be expected to vary according to the proportion of exposed herds in the local geographical area.

The objectives of this study were to quantify the average effect under field conditions of BTV-8 exposure on the fertility of dairy cows in previously naïve herds that notified clinical signs to the authorities and to determine the duration of the period when cows were at risk of decreased fertility both before and after the first detection of the disease in the herd. Furthermore, the influence of the level of exposure in the local geographical area of the herd on the effect of BTV-8 exposure on fertility was investigated. This study focused on effects of BTV-8 exposure on early pregnancy (ie from conception to the beginning of the fetal development).

MATERIALS AND METHODS

1. General study design and available data

The reproductive performance of cows inseminated before and after the date that disease was detected in exposed herds and of cows in unexposed herds was compared. Exposed herds from the 2007 French epizootic were selected in order to quantify the effect of BTV-8 exposure in a naïve cow population which had not been vaccinated against BTV-8. In 2006, only 6 exposed herds were reported in France.

Information about exposure to BTV-8 of herds was obtained from the official surveillance system. Herds were reported in 2 distinct situations: (i) in the event of clinical signs detected by the farmer or the veterinary practitioner, subsequently confirmed by a diagnostic test and (ii) in the event of a positive serological test performed either before animal transfer or sale, or in sentinel herds. Only herds with a confirmed detection which were reported after clinical suspicion (situation (i)) were included for the analyses as the date of a positive serological test did not necessarily identify the possible date of BTV-8 exposure of the herd. Herds reported after clinical signs in 2007 were located in 39 departments (French metropolitan territory is divided into 95 departments). Some of these departments were very slightly exposed. Reported herds located in 19 departments with an intermediate or high exposure were selected, corresponding to 92% of all cattle herds reported due to clinical suspicion during the 2007 epizootic. Information about BTV-8 exposure was available at the herd level only. Thus, a herd was considered exposed if at least 1 animal with clinical signs had tested positive for BTV-8. Herds reported after clinical suspicion and subsequently selected for this study will be referred to as 'case herds'.

Performance data were obtained for dairy herds enrolled in the official Milk Recording Scheme and where artificial insemination was used. Data obtained included the dates of AIs, rank of service and data used to adjust for factors known to influence fertility: cow and bull breeds, lactation number, calving date, milk production data at each milk record (record date, milk yield, protein content, fat content) and date of culling.

2. Definition of herd exposure according to the spatio-temporal pattern of the epizootic

For each case herd, available data included the dates that clinical signs of disease were first suspected and the dates that disease was confirmed with diagnostic tests. The proportion of

infected animals in reported herds was unknown. It was assumed that the proportion of infected cows in an exposed herd was related to the proportion of newly reported herds in a local geographical area (Durand et al., 2010). Thus, exposed herds were classified according to the level of BTV-8 exposure in their local area. The geographical unit considered to estimate the level of exposure was the canton (French district). The average number of cattle herds by canton was 47 in 2007. Cantons with a total number of cattle herds <10 were excluded, because it was assumed that the estimation of the level of exposure was less accurate in cantons with such a small number of herds. To account for the spatio-temporal pattern of the epizootic (for description, see Pioz et al., 2011), a level of exposure was attributed to each canton according to the peak monthly incidence of case herds. Cantons were classified in 3 categories of exposure: high and rapid (peak of monthly incidence ≥ 0.25), intermediate (peak of monthly incidence ≥ 0.10 and < 0.25) and, low and protracted (peak of monthly incidence < 0.10). Accordingly, cantons were termed highly, moderately and slightly exposed, respectively. The monthly incidence was defined as the number of newly reported herds in a given month in a canton divided by the total number of herds in the canton in 2007. A constant at-risk population enabled us to determine the period during which a local peak incidence (highest number of new case herds) occurred. The incidence was calculated by including all the cattle herds, both beef and dairy, in the canton.

As the vector density is seasonal, it was assumed that the effect of BTV-8 exposure could vary according to the month of the peak. Therefore, to more accurately identify the time of exposure, only case herds which were reported during the peak of the local monthly incidence were selected, as these herds were less likely to experience a delay in detection. However, as in the slightly exposed cantons, the incidence pattern was protracted and without a clear peak, this restriction was not applied. The criterion used to select and classify the case herds are summarized in the Figure 1.

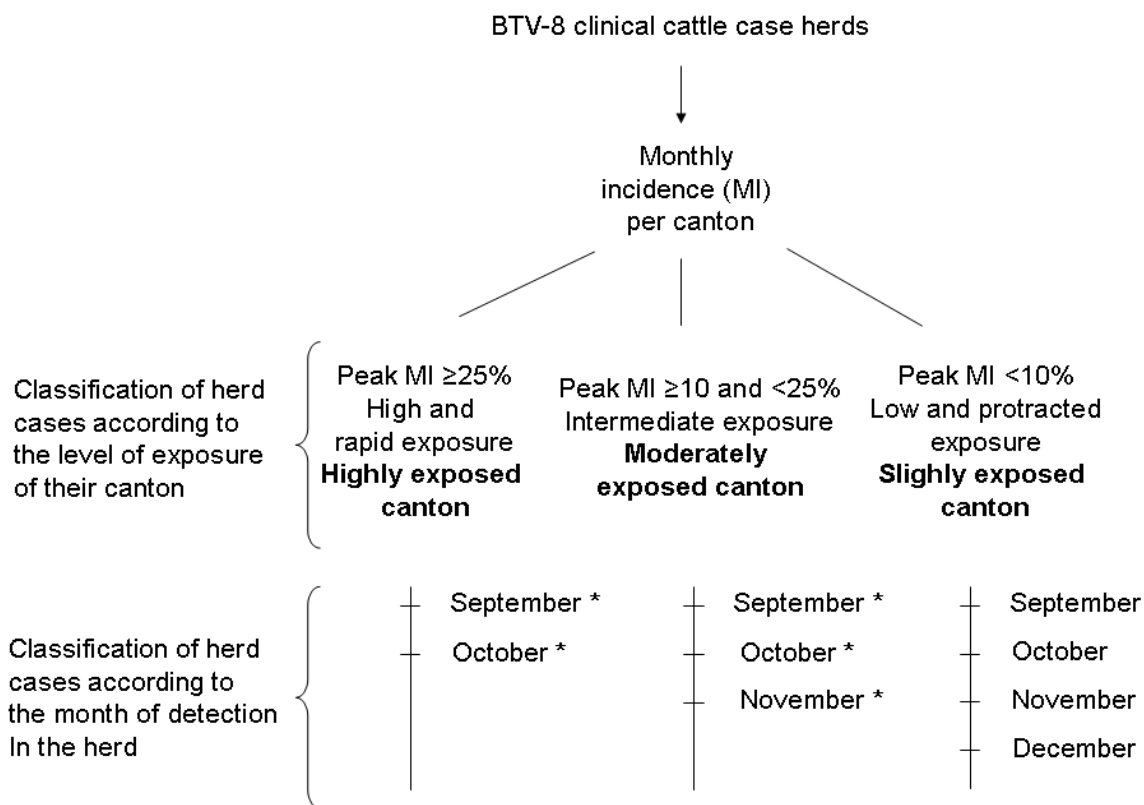


Figure 1: Classification of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) case herds according to the level of exposure of cantons and the month of detection in the herd. Monthly incidence: number of new reported herds in a given month in a canton divided by the total number of herds in the canton in 2007

* the herd case was detected during the month of peak incidence in the canton

3. Estimated date of exposure

The date of exposure was estimated as the recorded date of suspicion which corresponded to the first detection of clinical signs in the herd. The same date of exposure was assigned to all cows in a herd. In 6.1% of the case herds, the date of suspicion was missing (621 out of the 10,182 reported cattle herds with clinical signs) but a date of confirmation of BTV-8 (positive test after detection of clinical signs) was available. To include herds with missing dates of suspicion, and therefore increase the statistical power of the study, a date of suspicion was imputed. An imputation method based on the distribution of the time interval between dates of suspicion and confirmation was applied in order to interpolate the missing dates. Firstly, the time interval between dates of suspicion and confirmation was calculated

for each reported herd. Secondly, this time interval was fitted to a negative binomial function according to the month of confirmation, assuming that the time required to confirm a case could vary dependent upon the stage of the epizootic (e.g. with preparedness or capacity of the diagnostic laboratory). Then, a random selection was performed for each missing time interval in the fitted distributions and the corresponding missing dates of suspicion were calculated.

To improve accuracy, non-plausible time intervals between the dates of suspicion and confirmation were excluded. For 57 reported herds, the time interval between the date of suspicion and the date of confirmation was longer than 30 d. According to the BTV National Reference Laboratory for diagnostic tests, this time interval is not likely, therefore, these herds were excluded. Moreover, 124 herds were excluded because their dates of suspicion were later than the dates of confirmation. After these exclusions, the population of reported case herds based on clinical signs in 2007 included 8,279 cattle herds located in 534 cantons.

4. Selection of unexposed cows

Two reference populations of cows unexposed to BTV-8 were considered to limit selection bias and check the robustness of the results. The first reference population was composed of cows located in 2 regions unexposed to BTV-1 and BTV-8 viruses during 2007: Brittany and a south-western area of France. In France, herd management varies between areas. Therefore, unexposed cows from 2 different parts of France were selected in order to better represent the unexposed population. This comparison limited the impact of any possible confounding factors due to variations of herd management with time. The second reference population was composed of cows of case herds before exposure in 2007 (2005 and 2006). This comparison limited possible confounding factors due to variations of herd management between different regions. The fact that the fertility of Holstein cows remained stable in France between 2005 and 2007 permitted an unbiased comparison (Le Mezec et al, 2010). The 2 reference populations were termed area-based and time-based reference populations, respectively.

The month of AI is known to influence the reproductive performance (Malher et al., 2006, Marce et al., 2009). Consequently, unexposed cows were selected according to the date of AI such that cows from exposed herds and unexposed cows underwent AI during the same period in the year.

5. Reproductive performance parameters and data selection

Reproductive performance was assessed using the occurrence of a repeat AI following the first AI. As most farmers are likely to reinseminate the cow in the event of a return-to-oestrus after the first AI, a repeat AI (return-to-service) can be used as a proxy for infertility. A similar indicator has already been used in several studies to quantify the detrimental effect of disease on reproductive performances (Malher et al., 2006, Marce et al., 2009, Robert et al., 2004, Santman-Berends et al., 2010). The calving rate could also be used to assess the reproductive performance. Whilst the calving rate depends on all events that occur during the pregnancy, the return-to-service, observed soon after AI, is likely to be associated with conception failure or embryonic death. Therefore, use of this parameter helps identify when the reproductive dysfunction occurred.

The parameter used to quantify effect of BTV-8 exposure on fertility was the 90-day-return-to-service, defined as a return-to-service occurring between 18 and 90 d after AI. This interval included 91% of return-to-service. It was assumed that BTV-8 exposure could have 3 possible effects on fertility: conception failure, embryonic death and fetal death in early gestation, all resulting in the same outcome, return-to-service.

Classification bias for reproductive status can occur when cows are culled before the next calving because pregnancy status at culling is not routinely available. Therefore cows culled within 300 d following AI were excluded from analysis because their pregnancy status was uncertain. Cows with missing data (lactation number, milk yield or date of record), non-plausible or extreme data were excluded: calving to first AI interval <35 d or >180 d, AI to calving interval >297 d or <175 d, interval between AI >200 d or <3 d, interval between 2 milk test-days >85 d or <20 d, peak milk yield (expressed as the maximum at the 3 first milk records) >60 kg/day or <10 kg/day and minimum Protein:Fat ratio out of the first 3 milk records >1.5 or <0.25. Herds with unusual management (unusual demographic structure, delayed first service or very small herds) or herds likely to have used a bull also were excluded. Only data from Holstein cows inseminated with semen from Holstein bulls were selected because there is a strong effect of breed on reproductive performances (Heins et al., 2006, Lucy, 2007). Heifers were excluded because their fertility differs from that of cows (Raheja et al., 1989). After these exclusions, the study population was composed of 1,039,350 cows with a first AI from a total of 16,776 exposed herds.

6. Comparisons to quantify and determine the at-risk period of decreased fertility

6.1. Selection and classification of AIs according to exposure to investigate the spatio-temporal variations of estimated effects.

All AIs performed from 10 weeks before to 4 weeks after the date of BTV-8 detection in herds were selected. These were classified into categories according to the time interval between the date the AI was performed and the date of exposure to BTV-8 in the herd, the level of exposure at the canton level and the month of exposure of the herd. Between the dates of AIs of cows and the date of exposure in the herd, intervals of 15 d were considered (see results for categories).

6.2. Selection and classification of AIs to determine the at-risk period of decreased fertility when disease detection was not delayed.

All AIs performed from 14 weeks before to 14 weeks after the date of BTV-8 detection in the herd were selected. Time intervals each of one-week duration were considered to precisely determine the at-risk period. It was assumed that the interlude between the virus introduction and the disease detection was more homogeneous (with less risk of delayed detection) when the monthly incidence was high. Further, it was assumed that this interlude was probably shorter for herds reported earlier in the epizotic (September) than for herds reported later. Therefore, only herds for which disease was detected in September in highly exposed cantons were included.

7. Statistical models

The relationship between exposure and occurrence of a possible return-to-service was assessed using multivariable Cox models. To account for factors likely to influence the probability of return-to-service, the association between BTV-8 exposure and occurrence of return-to-service was adjusted for several independent variables already described as risk factors for fertility traits in the literature (Hillers et al., 1984, Malher et al., 2006, Marce et al., 2009, Robert et al., 2004, Seegers, 1998) as described by Eq. (1):

$$Y_{ijklmno} = \alpha + EXP_i + LN_j + MY_k + PF_l + CAII_m + MO_n + HERD_o + \varepsilon_{ijklmno} \quad (1)$$

where $Y_{ijklmno}$ is the 90-day-return-to-service following the first AI; α is the intercept; EXP_i is the exposure status (28 or 63 classes); LN_j is the lactation number (4 classes); MY_k is the peak milk yield expressed as the maximum at the 3 first milk records in the lactation (5 classes); PF_l is the minimum of Protein:Fat ratio out of the first 3 milk records (5 classes); $CAII_m$ is the calving-to-AI interval (7 classes); MO_n is the month of AI (8 classes), $HERD_o$ is the herd number (random) and $\varepsilon_{ijklmno}$ is the residual error term.

The random variable adjusted for clustering within the data. The effects in percentage points of return rate were calculated from estimated hazard ratio (HR). All statistical analyses were performed by using R[®] software (R Development Core Team, 2009) and Cox models were performed using the survival package¹.

RESULTS

1. Cumulative prevalence in exposed cantons and unadjusted return-to-service rates

The distribution of the cumulative prevalence in exposed cantons (at the end of 2007) showed wide variation (from 0.4% to 100%; median=17.9%). Cantons with the highest cumulative prevalence were observed behind the epizootic wave located near the border with Belgium and Germany (Figure 2). Almost 67% of the BTV-8 cases were reported during September and October (Figure 3). For exposed dairy herds included in the analyses, the dates of exposure ranged from the first September to the 26th December 2007. Figure 4 shows both the geographical distribution of exposed cantons according to the class of exposure and the area-based reference unexposed population of cantons in 2007 in France.

The overall 90-day-return-to-service rate for cows in exposed herds was 59.0%. In the reference populations, the overall 90-day-return-to-service rates for the area-based and time-based populations were 54.2% and 54.7% respectively (Table I).

¹ S original by Terry Therneau and ported by Thomas Lumley (2008). survival: Survival analysis, including penalised likelihood.. R package version 2.34-1.

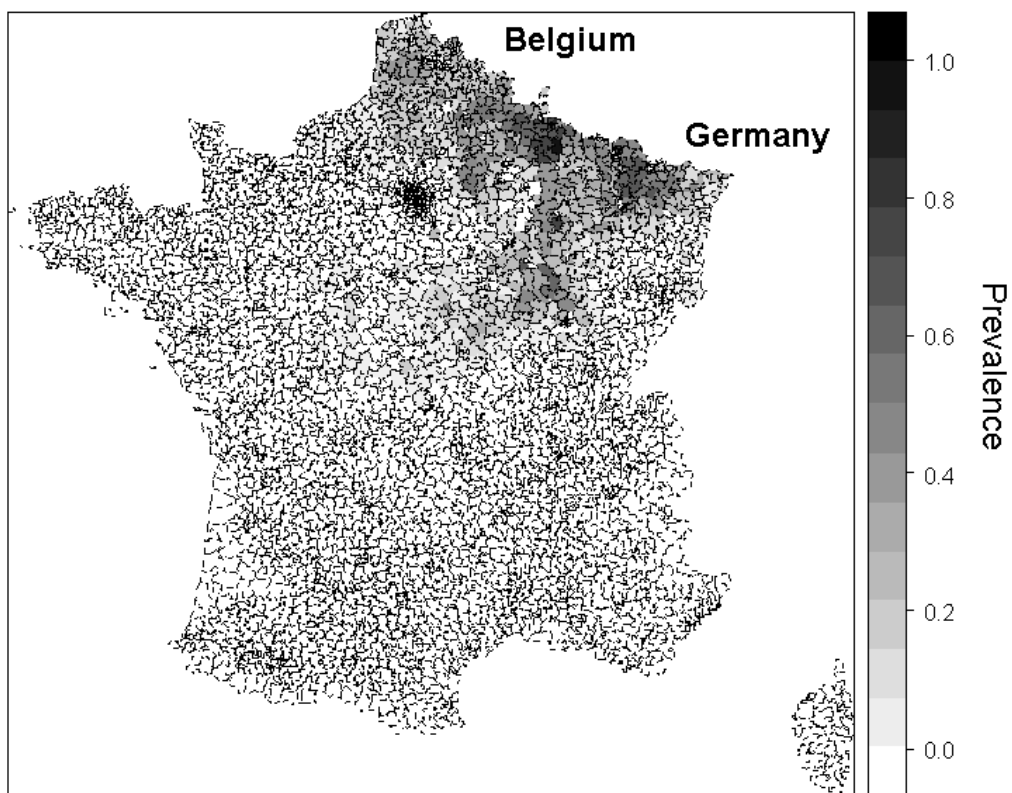


Figure 2: Cumulative herd prevalence of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) per canton at the end of 2007 in France. Cumulative prevalence was calculated for all cattle herds reported for clinical signs

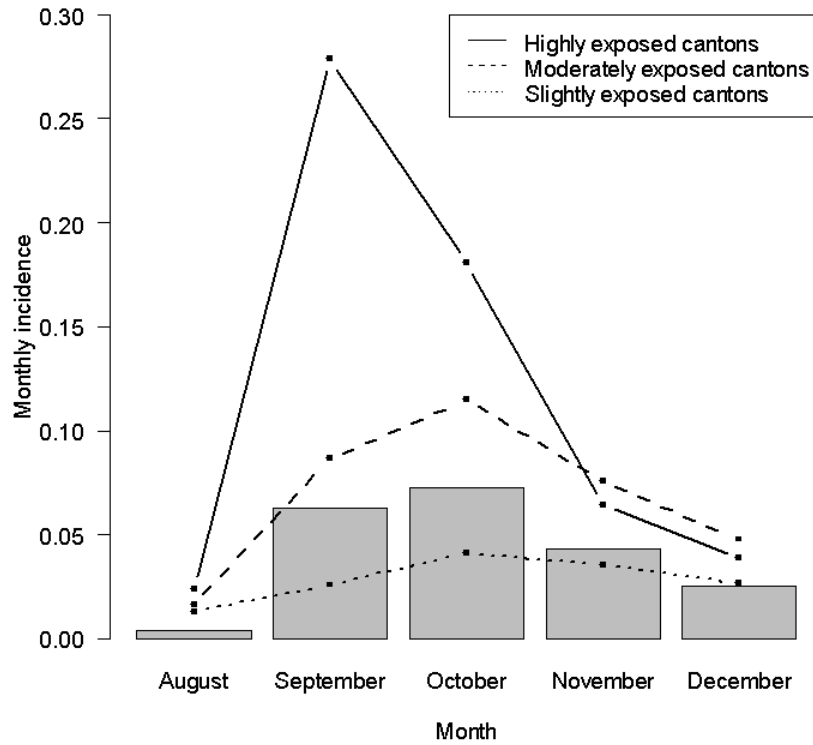


Figure 3: Average monthly incidence of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) cattle case herds in 2007 for the whole exposed area in France (bars) and according to the peak level of exposure in the canton (lines). Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 ; Moderately exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.10 and < 0.25 ; Slightly exposed cantons: cantons with a peak incidence < 0.10

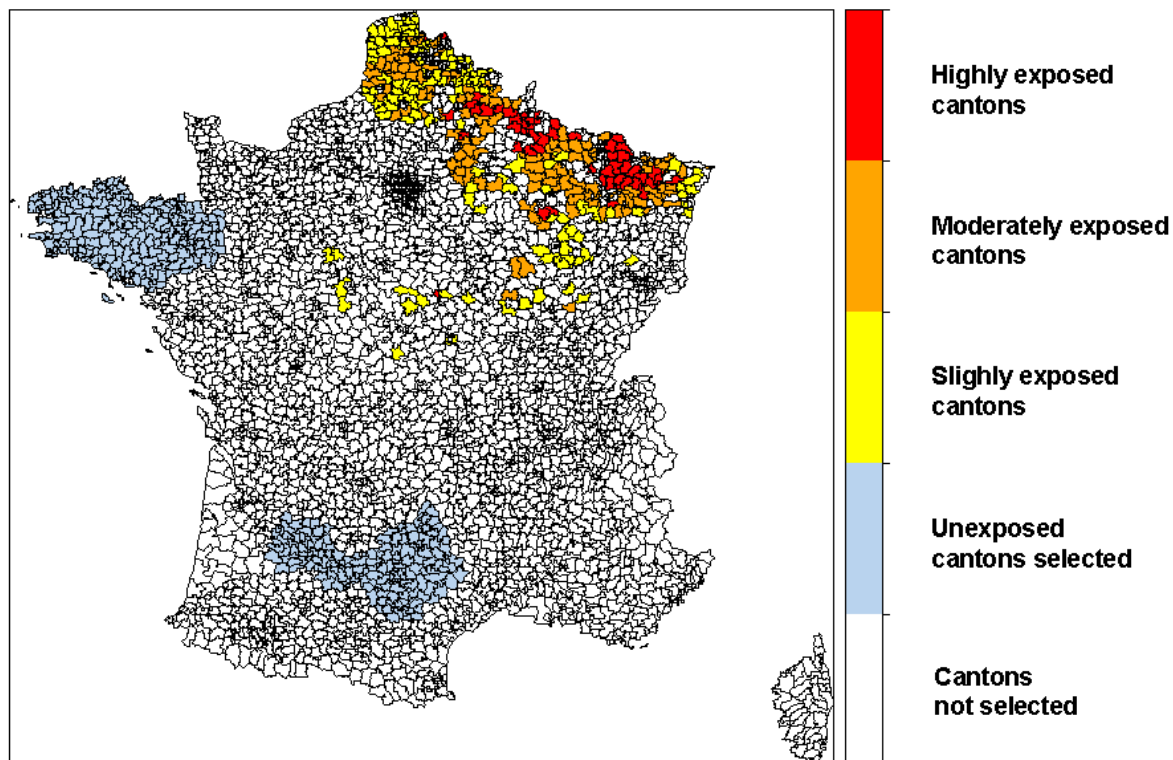


Figure 4: Classification of cantons according to exposure to Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) and location of unexposed cantons of the reference population in 2007; France. Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 ; Moderately exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.10 and < 0.25 ; Slightly exposed cantons: cantons with a peak incidence < 0.10 ; Unexposed cantons selected: cantons where no BTV-1 or BTV-8 cattle herd case was reported in 2007 and located in Brittany or in the South-Western part of France; Cantons not selected: either exposed or unexposed cantons that were not selected in the analyses

Table I. Return-to-service rates and distribution of cantons, herds and cows according to the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) exposure status (10,722 Holstein dairy herds; 2007; France). Cows in exposed herds with first artificial insemination (AI) between 10 weeks before and 4 weeks after the date of clinical detection in the herd. Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 ; Moderately exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.10 and < 0.25 ; Slightly exposed cantons: cantons with a peak incidence < 0.10

	Category of exposure	Number of cantons	Number of herds	Number of cows	90-day-return-to-service rates
Exposed	Highly exposed cantons	50	274	2,025	60.2
	Moderately exposed cantons	126	493	4,742	59.4
	Slightly exposed cantons	136	533	5,623	58.3
Unexposed	Herds in unexposed cantons in Brittany	180	8,170	154,703	54.9
	Herds in unexposed cantons in South-west	132	1,252	18,532	48.5
	Herds in exposed cantons before exposure (2005/2006)	311	1,296	49,220	54.7

2. Increase of 90-day-return-to-service rates associated with BTV-8 exposure according to the date of exposure and the local geographical area

Exposure to BTV-8 was associated with an increase of 90-day-return-to-service rates. The effect of exposure on fertility was similar when comparing with both reference populations. Nevertheless, HR were higher with the area-based reference population than with the time-based reference population (Figures 5 and 6).

Quantitatively, 90-day-return-to-service rates did not increase according to the level of exposure at the canton level. Thus, there was no correlation of the effect of exposure on fertility with the peak monthly incidence at the canton level during the epizootic (Figures 5 and 6).

The period of decreased fertility varied with the month of exposure. For herds in which disease was detected in September, exposure was associated with an increase of 90-day-

return-to-service rates for AIs performed during a period from 1 month before to 1 month after the date of exposure (HR between 1.15 and 1.36). For herds in which disease was detected in November or December, exposure was associated with an increase of 90-day-return-to-service rates for AIs performed between 10 and 4 weeks before the date of exposure (HR between 1.25 and 1.38). Interestingly, for the herds in which disease was detected in November or December, the AIs were performed during the same time period as those for herds detected in September or October (Figures 5 and 6). Irrespective of the month of exposure but depending on the interval to the date of exposure, the increase in 90-day-return-to-service rate associated with BTV-8 exposure varied from 8 to 21 percentage points.

The following adjustment variables were significantly associated with a risk of 90-day-return-to-service; lactation number, milk yield, Protein:Fat ratio and calving-to-AI interval. The risk was higher for multiparous cows and for cows with a higher milk yield. In contrast, the risk was lower for cows with a higher Protein:Fat ratio and for cows with a higher calving-to-AI interval (Table II).

3. At-risk period of decreased fertility associated with exposure to BTV-8 detected in herds in september in highly exposed cantons

The risk of 90-day-return-to-service was higher for those AIs performed from 4 weeks before to 5 weeks after the date of exposure in the herd compared to unexposed cows. The effect was non-significant for cows inseminated between 14 and 5 weeks before the date of exposure and from 6 to 14 weeks after the date of exposure to BTV-8. Similar effects were demonstrated, regardless of which reference cow population was considered (Figure 7). The estimated effects were increases of between 13.5 and 26.8 percentage points of 90-day-return-to-service.

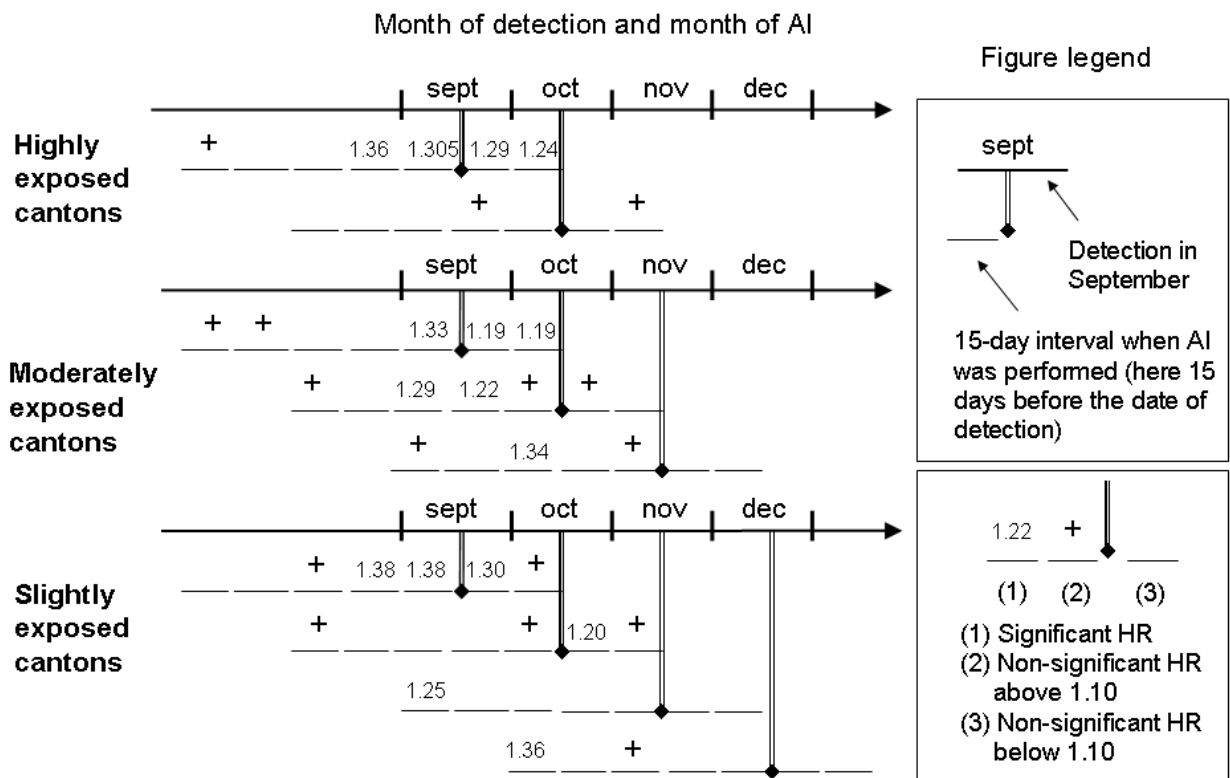


Figure 5: Hazard ratio (HR) of 90-day-return-to-service according to the time interval between the date of AI of cows and the date of detection in the herd and to the category of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) exposure of the canton (12,390 cows in 1,300 exposed dairy herds). The unexposed cow population was composed of cows inseminated in the same time period in herds located in unexposed cantons (173,235 cows in 9,422 unexposed dairy herds); 2007; France. Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 ; Moderately exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.10 and < 0.25 ; Slightly exposed cantons: cantons with a peak incidence < 0.10

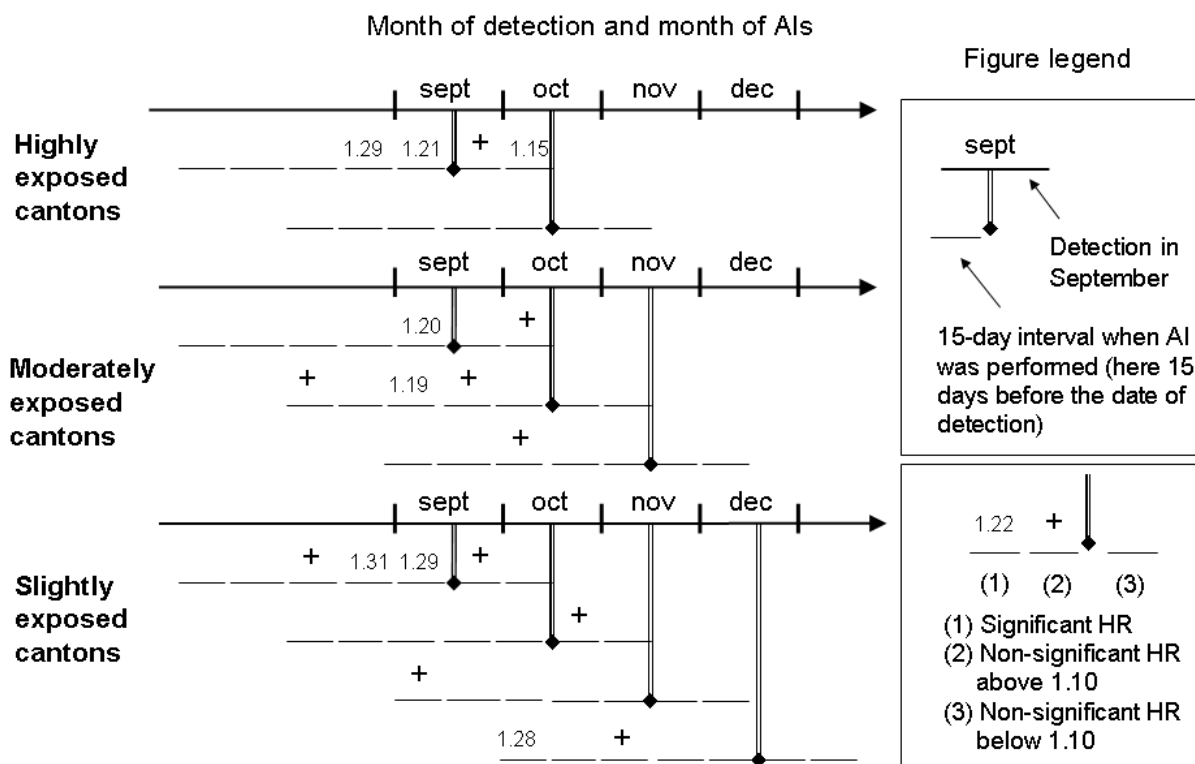


Figure 6: Hazard ratio (HR) of 90-day-return-to-service according to the category of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) exposure of the canton and the time interval between the date of AI of cows and the date of disease detection in the herd (12,390 cows in 1,300 exposed dairy herds). The unexposed cow population was composed of cows from herds exposed in 2007 that were inseminated in 2005 or 2006 (49,220 cows in 1,300 unexposed dairy herds); France. Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 ; Moderately exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.10 and < 0.25 ; Slightly exposed cantons: cantons with a peak incidence < 0.10

Table II. Effect of adjustment variables on risk of 90-day-return-to-service for cows which underwent artificial insemination (AI) during a period from 10 weeks before until 4 weeks after the date of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) detection in 10,722 (comparison 1) and 1,300 (comparison 2) Holstein dairy herds; 2007; France

Variable and classes	Comparison 1*			Comparison 2**		
	Number of AI	HR	95 CI	Number of AI	HR	95 CI
Lactation number						
1	65,225	1	<i>Ref</i>	39,735	1	<i>Ref</i>
2	49,013	1.105	[1.09-1.12]	25,616	1.10	[1.08-1.12]
3	33,836	1.14	[1.12-1.16]	15,106	1.10	[1.07-1.13]
4 or more	37,558	1.25	[1.23-1.27]	15,877	1.16	[1.13-1.19]
Milk yield (kg/day) [‡]						
1	23,958	0.94	[0.85-0.92]	9,668	0.97	[0.94-1.002]
2	47,036	0.97	[0.95-0.98]	22,985	0.98	[0.96-1.005]
3	57,148	1	<i>Ref</i>	30,353	1	<i>Ref</i>
4	38,427	1.05	[1.12-1.16]	21,995	1.02	[0.99-1.05]
5	19,063	1.10	[1.23-1.27]	11,333	1.06	[1.03-1.10]
Protein:Fat ratio						
>0; ≤0.58	21,123	1.04	[1.02-1.06]	8,944	1.025	[0.99-1.06]
>0.58; ≤0.66	40,375	1.03	[1.015-1.05]	18,150	1.03	[1.00-1.05]
>0.66; ≤0.75	64,533	1	<i>Ref</i>	32,908	1	<i>Ref</i>
>0.75; ≤0.83	40,308	0.98	[0.96-0.99]	23,202	0.98	[0.96-1.00]
>0.83; ≤1.5	19,293	0.97	[0.95-0.99]	13,130	0.96	[0.93-0.98]
Calving-to-AI interval (d)						
>35; ≤50	10,807	1.20	[1.16-1.23]	5,998	1.24	[1.19-1.28]
>50; ≤62	35,842	1.13	[1.11-1.15]	12,971	1.125	[1.09-1.16]
>62; ≤80	54,079	1.06	[1.045-1.08]	23,760	1.07	[1.04-1.09]
>80; ≤102	43,337	1	<i>Ref</i>	24,185	1	<i>Ref</i>
>102; ≤125	23,238	0.95	[0.93-0.97]	15,393	0.96	[0.94-0.99]
>125; ≤150	11,767	0.92	[0.89-0.945]	8,689	0.94	[0.91-0.98]
>150; ≤180	6,365	0.88	[0.85-0.92]	5,158	0.88	[0.84-0.915]
Month of service [§]						
June	15,010	0.92	[0.895-0.95]	3,236	0.805	[0.76-0.85]
July	14,989	0.97	[0.94-0.995]	3,228	0.98	[0.92-1.04]
August	17,357	0.99	[0.97-1.02]	6,651	0.94	[0.90-0.985]
September	21,485	1	<i>Ref</i>	10,596	1	<i>Ref</i>
October	27,458	1.01	[0.99-1.04]	16,813	0.99	[0.955-1.02]
November	31,631	0.99	[0.97-1.015]	20,874	0.96	[0.93-0.995]
December	31,115	1.01	[0.985-1.035]	19,222	0.95	[0.92-0.98]
January	26,587	1.01	[0.98-1.03]	15,714	0.92	[0.89-0.96]

* Area -based reference population: cows from herds located in unexposed areas

** Time-based reference population: cows from herds exposed in 2007 that were inseminated in 2005 or 2006

‡ Classes were constituted according to the distribution of the milk yield production and the lactation number

§ Area-based: month of service in 2007; time-based: month of service in 2007 for cows in exposed herds and month of service in 2005 or 2006 for cows in reference population

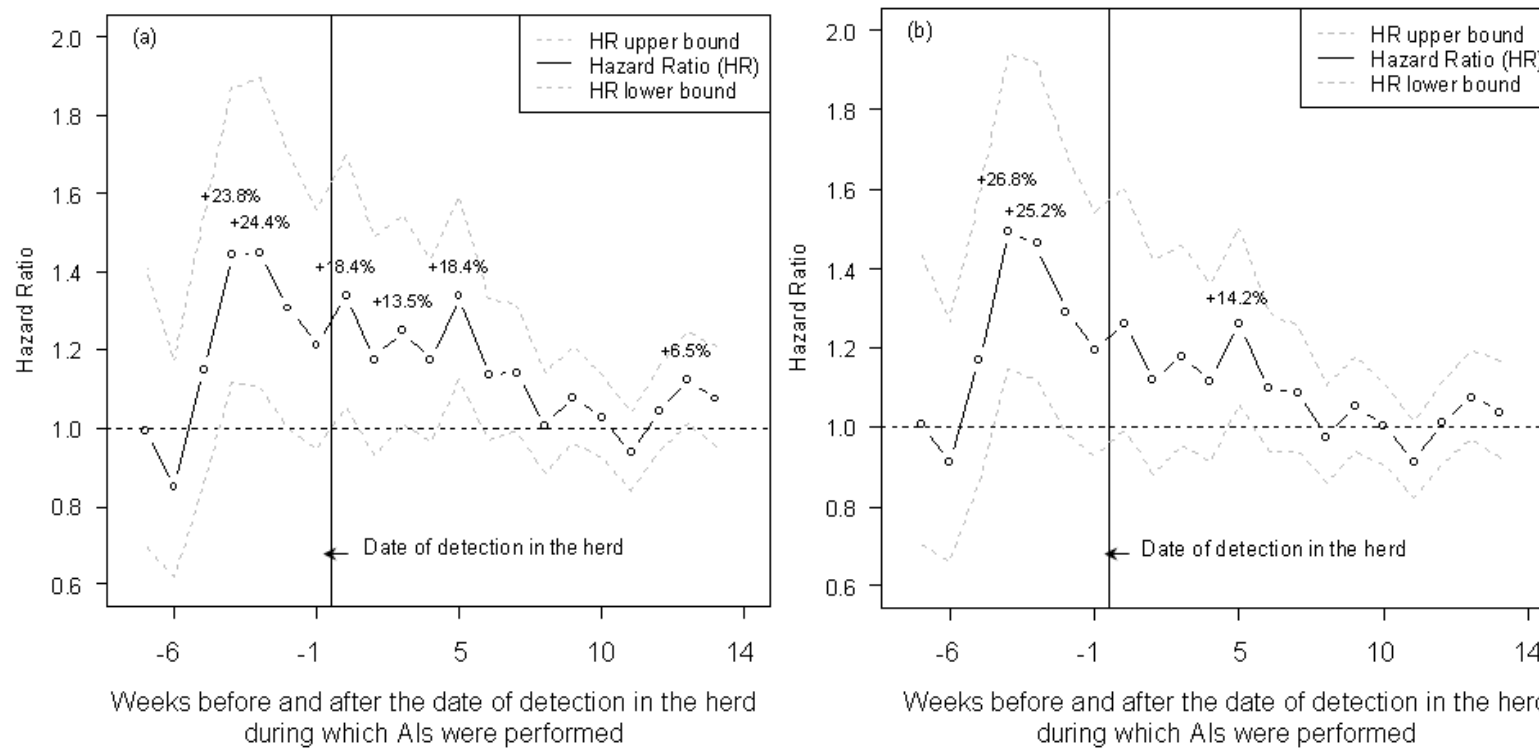


Figure 7: Increase of 90-day-return-to-service rates before and after the date of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) detection in herds detected in September in highly exposed cantons (6,714 cows in 419 exposed dairy herds). Highly exposed cantons: cantons with a peak incidence ≥ 0.25 (a) The unexposed cow population was composed of cows inseminated in the same time period in herds located in unexposed cantons (173,235 cows in 9,422 unexposed dairy herds); (b) The unexposed cow population was composed of cows from herds exposed in 2007 that were inseminated in 2005 or 2006 (14,860 cows in 416 unexposed dairy herds). Hazard ratios (HR) are issued from adjusted models. % (percentage points) are estimated from significant HR. Non-significant results for cows inseminated from 14 to 5 weeks before the date of detection and from 6 to 14 weeks after are not shown; 2007; France

DISCUSSION

Exposure to BTV-8 was associated with a decrease in fertility for cows in dairy herds confirmed seropositive after clinical suspicion during the 2007 epizootic. The period of decreased fertility around the date of suspicion depended upon the month of detection of the disease in the herd. The increase in return-to-service rate associated with BTV-8 exposure varied from 8 to 21 percentage points. This value represented an average effect in natural exposure conditions, for which the proportion of infected cows in the exposed herds was unknown.

The effect of BTV-8 exposure on fertility did not correlate with the prevalence of BTV-8 in the local geographical area. It was speculated that the number of newly exposed herds per month was related to the proportion of infected cows within the exposed herds. Thus, 3 categories of cantons were defined. However, for a fixed interval between AI and the date of detection (within a selected month), there was no difference between these categories of exposure. This suggests that the proportion of infected cows in selected exposed herds was relatively constant and was not related to the proportion of newly exposed herds per month in a canton.

In highly exposed cantons, fertility was decreased in herds detected in September for those cows inseminated from 4 weeks before to 5 weeks after the date of detection. Within an exposed herd, it is probable that a proportion of cows are rapidly infected at the time of detection of the disease with the rest of the herd either remaining uninfected or becoming infected at a later date. Exposure to BTV-8 could decrease the fertility of both cows infected around the time of AI (assuming an effect on conception failure or early embryonic mortality) and cows infected within 42 d of AI (assuming an effect on late embryonic mortality). BTV-8 infection is known to affect fetal development (Elbers et al, 2008 I, Elbers et al, 2009, Wouda et al, 2010). However, given that fetal development commences 42 d after insemination, and no decrease in fertility was observed for cows inseminated more than 42 d before bluetongue was detected this study did not demonstrate a detrimental effect of BTV-8 exposure on fetal viability. Fetal infection can induce lethal malformations or the mummification of the fetus leading to the birth of an abnormal calf or late pregnancy losses (possibly inducing a return-to-service occurring after 90 d post AI). This study was not designed to detect these late losses. Moreover, for such late losses, the farmer may decide not to reinseminate the cow. In addition, BTV-8 infection could have a delayed effect on fertility

related to the contamination and development of the virus in a cow's genital tract. Therefore, the variations of fertility in an exposed herd were likely due to the combined effect of the infection (both direct and delayed), and the delayed exposure of a proportion of cows due to the spreading of the virus within exposed herds. However, it was not possible to distinguish between these effects. Nevertheless, the effect of BTV-8 exposure on female fertility in herds detected in September lasted for an average of 5 weeks after the detection of clinical signs in a herd.

The date of exposure of a herd to BTV-8 was defined as the date of suspicion of clinical signs. However, this date did not actually correspond to the date of the first infection in exposed herds. The interval between first infection and the date of clinical suspicion is a composite of the viral incubation period and the time taken to detect the clinical signs and to subsequently report the case. The BTV incubation period is between 2 and 18 d in cattle (Thiry et al., 2008). Further, 2 studies conducted in Belgium and the Netherlands during the 2006 epizootic wave demonstrated that notification of new cattle outbreaks was made within 1 or 2 weeks of the first expressions of clinical signs (Elbers et al., 2008, Saegerman et al., 2010). Thus the virus is likely to have already spread within exposed herds between 2 and 4 weeks before the date of clinical suspicion. Therefore, for herds in which disease was reported in September 2007, the decreased fertility associated with AIs performed before the nominated date of exposure could partly be due to the effect of viral circulation before clinical detection.

In contrast to September, for exposed herds in highly exposed cantons with a peak of monthly incidence in October, no significant effect on fertility was demonstrated. However, only 11 cantons had a peak of incidence greater than 25% in October (714 cows in 74 exposed herds), in comparison to 39 cantons with a peak of incidence greater than 25% in September (1311 cows in 200 exposed herds). Therefore the HR for this population of cows may have failed to detect significance partly due to the lack of statistical power.

For cows in exposed case herds located in cantons with a peak of monthly incidence occurring in November and December, the estimated effects on fertility suggested that detection of exposure to BTV-8 was delayed. The episode of decreased fertility was associated with AIs performed between 2 and 3 months before the official date of detection in these herds. Indeed, the affected AIs were performed during the overall peak of exposure, i.e. in September or October. This suggests that the virus could have been spreading in these

herds before it was detected either because clinical signs were not observed or because the viral circulation was too low to induce the expression of clinical signs in infected cows. The effect on fertility may also be due to an increase of fetal mortality. However, because no effect of BTV-8 on fetal viability exposure was demonstrated for herds which were detected earlier, it is very unlikely that such an effect would then be found for herds detected later during the epizootic. Furthermore, for affected cows that were inseminated more than 4 weeks before the date of detection in herds detected in November and December, an average of 20% of the increase in percentage points of 90-day-return-to-service corresponded to return-to-service occurring before the date of detection in exposed herds (result not shown). This suggests that the decreased fertility occurred before the reported date of clinical detection.

The only published study which quantifies the effect of BTV-8 exposure on cows fertility was conducted in the Netherlands during the 2008 epizootic wave in herds that were not vaccinated (Santman-Berends et al., 2010). This study showed that cows which seroconverted to BTV-8 around the time of AIs experienced a decrease in fertility equivalent to an increase of between 39.2 and 32.3 percentage points of return-to-service within 56 d of the first insemination, depending on the reference population of cows who did not seroconvert (cows that did not seroconvert in that same year or cows inseminated prior to seroconversion respectively). Assuming a similar biological effect of BTV-8 infection in seroconverting cows reported here, the results would suggest that approximately 40% of the cows were infected in the French exposed herds (given an overall increase of 15% of return-to-service).

We considered 2 reference populations to limit misinterpretation due to variations in herd management between regions and variations of herd management over time within a given region. The effect on fertility and the duration of the at-risk periods associated with BTV-8 exposure when comparing to these 2 different reference populations was very similar. This confirms the robustness of the results.

In this study, the detrimental effect of BTV-8 exposure was demonstrated for the first AIs in Holstein cows. However, the negative effect of BTV-8 exposure on fertility is likely to be experienced for other breeds and subsequent AIs in all unvaccinated cows inseminated during the same at-risk time interval.

This study quantified a significant negative effect of BTV-8 exposure on female fertility in dairy herds in which clinical cases of Bluetongue were confirmed during the 2007 epizootic in France. In case herds detected early in the epizootic, the episode of decreased fertility started 4 weeks before the date of detection of the Bluetongue in the herd and lasted for 5 weeks after detection. The reduction in fertility during this period was due to a combination of the effect of infection (directly and delayed), and the spreading of the virus within exposed herds. For herds reported during the second half of the epizootic, the results suggested that clinical signs were detected late.

Acknowledgements

Financial support for this research was provided by INRA, Cemagref and Basse-Normandie, Bretagne, Pays de le Loire and Poitou-Charentes Regional Councils under SANCRE project, in the framework of “For and About Regional Development” programs. The authors gratefully acknowledge the Centre de Traitement de l’Information Génétique (INRA, Jouy-en-Josas, France) for providing the performance data and the Ministry of Agriculture (Direction Générale de l’Alimentation) for the BTV case herds data. The authors also acknowledge Renaud Lancelot (CIRAD, Montpellier, France) for support in designing the imputation method.

REFERENCES

- Dal Pozzo, F., C. Saegerman, and E. Thiry. 2009. Bovine infection with bluetongue virus with special emphasis on European serotype 8. *Vet. J.* 182:142-151.
- Durand, B., G. Zanella, F. Biteau-Coroller, C. Locatelli, F. Baurier, C. Simon, E. Le Drean, J. Delaval, E. Prengere, V. Beaute, and H. Guis. 2010. Anatomy of Bluetongue Virus Serotype 8 Epizootic Wave, France, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 16:1861-1868.
- Elbers, A. R. W., A. Backx, E. Meroc, G. Gerbier, C. Staubach, G. Hendrickx, A. van der Spek, and K. Mintiens. 2008. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006: I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 87:21-30.

- Elbers, A. R., A. N. van der Spek, and P. A. van Rijn. 2009. Epidemiologic characteristics of bluetongue virus serotype 8 laboratory-confirmed outbreaks in The Netherlands in 2007 and a comparison with the situation in 2006. *Prev. Vet. Med.* 92:1-8.
- Heins, B. J., L. B. Hansen, and A. J. Seykora. 2006. Fertility and survival of pure Holsteins versus crossbreds of Holstein with Normande, Montbeliarde, and Scandinavian Red. *J. Dairy Sci.* 89:4944-4951.
- Hillers, J. K., P. L. Senger, R. L. Darlington, and W. N. Fleming. 1984. Effects of production, season, age of cow, days dry, and days in milk on conception to first service in large commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 67:861-867.
- Le Mezec, P., A. Barbat-Leterrier, S. Barbier, R. de Cremoux, A. Gion, C. Ponsart. 2010. Evolution de la fertilité et impact de la FCO sur la reproduction du cheptel laitier français. Pages 157-160 in *Proc. Rencontre, Recherche, Ruminants*, Paris, France
- Lucy, M. C. 2007. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64:237-254.
- Malher, X., F. Beaudeau, and J. M. Philipot. 2006. Effects of sire and dam genotype for complex vertebral malformation (CVM) on risk of return-to-service in Holstein dairy cows and heifers. *Theriogenology* 65:1215-1225.
- Marce, C., F. Beaudeau, N. Bareille, H. Seegers, and C. Fourichon. 2009. Higher non-return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection at early stage in Holstein dairy cows. *Theriogenology* 71:807-816.
- Menzies, F. D., S. J. McCullough, I. M. McKeown, J. L. Forster, S. Jess, C. Batten, A. K. Murchie, J. Gloster, J. G. Fallows, W. Pelgrim, P. S. Mellor, and C. A. Oura. 2008. Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Vet. Rec.* 163:203-209.
- Meroc, E., C. Faes, C. Herr, C. Staubach, B. Verheyden, T. Vanbinst, F. Vandebussche, J. Hooyberghs, M. Aerts, K. De Clercq, and K. Mintiens. 2008. Establishing the spread of bluetongue virus at the end of the 2006 epidemic in Belgium. *Vet. Microbiol.* 131:133-144.
- Osburn, B. I. 1994. The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 17:189-196.

- Pioz, M., H. Guis, D. Calavas, B. Durand, D. Abrial, and C. Ducrot. 2011. Estimating front-wave velocity of infectious diseases: a simple, efficient method applied to bluetongue. *Vet. Res.* 42:60.
- Raheja, K. L., E. B. Burnside, and L. R. Schaeffer. 1989. Heifer fertility and its relationship with cow fertility and production traits in Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72:2665-2669.
- Robert, A., F. Beaudeau, H. Seegers, A. Joly, and J. M. Philipot. 2004. Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). *Theriogenology* 61:117-127.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2009.
- Saegerman, C., D. Berkvens, and P. S. Mellor. 2008. Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg. Infect. Dis.* 14:539-544.
- Saegerman, C., P. Mellor, A. Uyttenhoef, J. B. Hanon, N. Kirschvink, E. Haubruge, P. Delcroix, J. Y. Houtain, P. Pourquier, F. Vandebussche, B. Verheyden, K. De Clercq, and G. Czaplinski. 2010. The most likely time and place of introduction of BTV8 into Belgian ruminants. *PloS One* 5:e9405.
- Santman-Berends, I. M., J. J. Hage, P. A. Rijn, J. A. Stegeman, and G. V. Schaik. 2010. Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) infection reduces fertility of Dutch dairy cattle and is vertically transmitted to offspring. *Theriogenology*.
- Seegers, H. Performances de reproduction du troupeau bovin laitier: variations dues aux facteurs zootechniques autres que ceux liés à l'alimentation. 1998. *J Natl GTV*:57-66.
- Thiry, E., J.Y. Zimmer and E. Haubruge. 2008. *In*: Saegerman, C., F. Reviriego-Gordejo and P.-P. Pastoret. Fièvre catarrhale ovine en Europe du nord. 13-25.
- Uhaa, I. J., H. P. Riemann, M. C. Thurmond, and C. E. Franti. 1990. A cross-sectional study of bluetongue virus and *Mycoplasma bovis* infections in dairy cattle: II. The association between a positive antibody response and reproduction performance. *Vet. Res. Commun.* 14:471-480.
- Velthuis, A. G., H. W. Saatkamp, M. C. Mourits, A. A. de Koeijer, and A. R. Elbers. 2009. Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. *Prev. Vet. Med.* 93:294-304.

Wouda, W., N. H. Peperkamp, M. P. Roumen, J. Muskens, A. van Rijn, and P. Vellema. 2009. Epizootic congenital hydranencephaly and abortion in cattle due to bluetongue virus serotype 8 in the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 134:422-427.

Partie 2 : Augmentation de l'occurrence des avortements associée à l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 dans des troupeaux bovins laitiers

Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds

S. Nusinovici, H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau, C. Fourichon

RESUME

La capacité de transmission trans-placentaire du virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) chez les bovins est probablement associée à une augmentation de l'occurrence des avortements. Les objectifs de cette étude sont de quantifier l'effet moyen de l'exposition au BTV-8 en conditions naturelles sur l'occurrence des avortements dans des troupeaux bovins antérieurement naïfs, et de déterminer la période de la gestation possiblement associée à cette augmentation.

Deux critères ont été considérés afin d'estimer l'occurrence des avortements : les retours tardifs après une première insémination artificielle (IA) et les gestations de courte durée. Un retour tardif a été défini comme un retour intervenant entre 90 et 200 jours après l'IA. Ces critères ont été comparés entre les vaches appartenant aux troupeaux exposés pendant l'épizootie de 2007 en France et les vaches appartenant aux troupeaux non exposés. Pour déterminer la période à risque de la gestation, les variations d'occurrence des avortements ont été quantifiées selon le stade de la gestation pendant lequel l'exposition a eu lieu. Des analyses de survie ont été utilisées pour estimer le risque d'augmentation des avortements associés à l'exposition au BTV-8, en ajustant sur les principaux facteurs connus qui influencent ce risque.

L'exposition au BTV-8 est associée à une augmentation de l'occurrence des avortements parmi les vaches appartenant à des troupeaux exposés au BTV-8, déclarés après suspicion clinique en 2007. La période à risque de la gestation dépend du critère utilisé. L'effet moyen

de l'exposition au BTV-8 dans l'ensemble des troupeaux déclarés après suspicion clinique correspond à une augmentation de 6,7 points de pourcent de retours tardifs pour les vaches sans retours à 90 jours. Cet effet est plus élevé pour les troupeaux détectés précocement durant l'épizootie comparé aux troupeaux détectés plus tardivement. L'exposition au BTV-8 pendant les 3 premiers mois de gestation est associée à une augmentation de 15 points de pourcent de retours tardifs pour les vaches sans retours à 90 jours, alors que l'augmentation est de 6 points de pourcent pour des exposition à partir du troisième mois de gestation (pour les troupeaux détectés en septembre). L'exposition au BTV-8 à partir du troisième mois de gestation est associée à une augmentation de 1,9 points de pourcent de gestation de courte durée. L'augmentation de l'occurrence des avortements associée à l'exposition au BTV-8 est plus élevée pour les vaches des troupeaux situés dans les cantons les plus exposés.

Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds

S. Nusinovic^{abc}, H. Seegers^{abc}, A. Joly^{abc}, F. Beaudeau^{abc}, C. Fourichon^{abc}*

^aOniris, UMR1300 Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, Nantes, France

^bINRA, UMR1300, Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, Nantes, France

^cLUNAM, Université Nantes, Angers, Le Mans, France

Soumis à Theriogenology

ABSTRACT

The transplacental transmission capacity demonstrated for Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) in cattle probably is associated with an increased occurrence of abortions. The objectives of this study was to quantify the effect of BTV-8 exposure on the occurrence of abortions in previously naïve dairy herds under natural infection conditions, and to determine a possible risk period during pregnancy associated with this increase. Two criteria were considered in order to estimate the occurrence of abortion: late return-to-service after a first artificial insemination (AI), and short gestations. A late return-to-service was defined as a return taking place 90 to 200 days after a first AI. These criteria were compared between cows in herds exposed during the 2007 epizootic in France and cows in herds that were not exposed. To determine the risk period during a pregnancy, variations in the occurrence of abortions were quantified according to the stage of the pregnancy during which the exposure took place. Survival analyses were used to estimate the risk of increased occurrence of abortion associated with BTV-8 exposure, adjusted by the principal factors known to influence the risk of abortion. BTV-8 exposure was associated with an increase in the occurrence of abortions among dairy cows belonging to previously naïve herds exposed to BTV-8 in 2007, declared after clinical suspicion. The at-risk gestation period depended on the criteria used to detect abortions. The mean effect of BTV-8 exposure in the ensemble of detected outbreaks corresponded to an increase of 6.7 percentage points in late return-to-service for cows with no return-to-service at 90 days. The effect of exposure was more pronounced for outbreaks detected early in the epizootic compared with those detected later. BTV-8 exposure during the first 3 months of gestation was associated with a 15 percentage

point increase in late return-to-service for cows with no return-to-service at 90 days, while this increase is 6 percentage points for exposure starting from the third month of gestation (in outbreaks detected in September). BTV-8 exposure from the third month of gestation was associated with a 1.9 percentage point increase of short gestations. The risk of abortion associated with BTV-8 exposure is higher for cows in the most exposed cantons.

INTRODUCTION

Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) differs from other serotypes due to its transplacental transmission capacity in cattle and sheep which likely leads to an increased occurrence of abortions (De Clercq et al., 2008; Menzies et al., 2008; Vandaele et al., 2011). Until the emergence of BTV-8 in Northern Europe in 2006, the only known cases of transplacental infections with BTV were caused by modified live virus vaccine strains (MacLachlan et al., 2000). The infection of the conceptus by these virus strains during pregnancy in cattle and sheep was associated with an increased risk of abortion (MacLachlan et al., 2000; Osburn, 1994).

While numerous studies have reported cases of abortion in cattle herds exposed to BTV-8 (Elbers et al., 2008; Elbers et al., 2009; Wouda et al., 2009), only one study has sought to quantify their increase by comparing the abortion rates of seroconverted dairy cows with those of cows not infected by BTV-8 (Santman-Berends et al., 2010). This study did not allow a significant association to be demonstrated between BTV-8 infection and the risk of abortion due to the small numbers involved (7 abortions in 80 cows infected during pregnancy). The abortion rate observed nevertheless was high compared to rates in large populations mentioned in the reference literature (Fourichon et al., 2001). The demonstration of such an association and the corresponding quantification of variations in abortion rates therefore require larger samples. Among sheep, the abortion rate for ewes inseminated at the beginning of the vector activity period (July 2007 in Belgium) was 25.7% compared to 7.1% for ewes inseminated at the end of the vector activity period (October 2007) (Saegerman et al., 2009).

The consequences of BTV-8 infection very likely depend on the timing of infection during pregnancy. The sensitivity of conceptus in cattle and sheep to the deleterious effects of infection by BTV modified live virus vaccine strains (capable of transplacental transmission) is higher the younger the conceptus is at the moment of infection (MacLachlan et al., 2000).

BTV-8 infections of the conceptus early in a pregnancy thus may cause a higher increase in abortion rates than infections later in the pregnancy.

To describe the impact of the disease at the herd level, it is worthwhile to know the mean effect of exposure on the performance of cows in the herd. This effect of BTV-8 exposure on abortion rates depends on the proportion of cows infected. In a study carried out in France at the end of the winter of 2007, it was shown that the within-herd prevalence rate increased when the between-herd prevalence was higher (Durand et al., 2010). At the end of the epizootic, the within-herd prevalence varied between 0.42 and 0.99 in departments (French administrative districts) where prevalence had been estimated to be 1 (95% CI: 0.93-1.00), while it was less than 0.10 in departments with an intermediary level of between-herd prevalence (of about 0.60). Consequently, the effect of BTV-8 exposure at the herd level on the risk of abortion could vary according to the proportion of herds infected in the local geographic area.

The objectives of this study were to: (1) quantify the effect of BTV-8 exposure of previously naive herds (not infected and not vaccinated) on the occurrence of abortions in dairy cows under natural infection conditions, (2) determine the pregnancy period during which exposure to the BTV-8 virus may be associated with an increased occurrence of abortions, and (3) assess whether the effect of BTV-8 exposure increases when the proportion of infected neighbouring herds increases.

MATERIALS AND METHODS

1. Study protocol and available data

The occurrence of abortions in cows belonging to exposed herds was compared to the occurrence of abortions in cows belonging to unexposed herds. The effect of BTV-8 exposure on the occurrence of abortions was quantified in herds exposed to BTV-8 during the 2007 epizootic in France to quantify the effect of exposure in a population of naive cows that had not been vaccinated against BTV-8. In 2006, only 6 outbreak herds had been notified in France.

The information concerning BTV-8 exposure was provided by the official surveillance system. This information only was available at the herd level. BTV-8 outbreaks were notified either in the event of detection of clinical signs by a livestock farmer or veterinarian, in the event of a positive serological test result before the sale or transfer of animals, or in the event

of either the detection of clinical signs or a positive serological test result in sentinel herds. Only outbreaks notified following the detection of clinical signs were included in the analyses because in the other cases, the date of the serological test does not indicate the date of exposure, which may have occurred well before the test was carried out without clinical signs having been detected. A herd was considered to be an outbreak herd if at least one animal presenting clinical signs tested positive for BTV-8. The clinical outbreaks were selected in the departments that were most exposed in 2007 (19 of the 39 departments with at least one declared clinical outbreak). The population of clinical outbreaks selected corresponds to 92% of the clinical outbreaks declared in 2007.

The reproduction data were obtained on herds registered for milk controls in which artificial insemination (AI) was practiced. The data obtained were the AI, calving, and culling dates, as well as data serving to adjust factors known to influence reproductive performance: lactation number, milk production at each control (date of control, milk production, fat and protein content) and the breed of the cows and AI bulls.

2. Definition of BTV-8 exposure at the herd level according to the spatio-temporal distribution of the epizootic

For each outbreak notified following the detection of clinical signs, the dates of clinical suspicion and of diagnostic confirmation were available. The proportion of infected cows in an outbreak was unknown. We considered that the proportion of infected cows in an outbreak could be linked to the incidence of notified outbreaks in a local geographical area. The outbreaks therefore were classed according to the level of exposure in their local geographical area. The geographic unit considered was the canton (with a mean number of 47 herds per canton in 2007). Each canton was classed in one of three exposure categories according to the value of the peak monthly exposure incidence. The three exposure levels are: high exposure (peak monthly incidence ≥ 0.25), moderate exposure (peak monthly incidence ≥ 0.10 and < 0.25) and low exposure (peak monthly incidence < 0.10). The monthly incidence was defined as the number of new cattle outbreaks per month in a canton divided by the total number of cattle herds in the canton. All cattle herds, dairy and beef, were included in the calculation of monthly incidences per canton.

3. Estimation of exposure dates

The clinical suspicion dates were used as the estimated exposure dates. The same exposure date was assigned to all of the cows in the same outbreak herd. To attribute a suspicion date to outbreaks that did not have a recorded suspicion date (6.1% of total cattle outbreaks), an imputation procedure based on the distribution of the interval between the suspicion dates and confirmation dates was used. In addition, 181 outbreak herds with an aberrant interval between the suspicion and confirmation dates (an interval of over 30 days, or a confirmation date before the suspicion date) were excluded. Following these exclusions, the selected population of clinical outbreak cattle herds was composed of 8 279 herds located in 534 cantons.

4. Selection of unexposed herds and cows

To test the robustness of results and to limit possible selection bias, two reference populations were selected. The first was composed of cows belonging to herds situated in areas unexposed to BTV-8 or BTV-1 in 2007 (Britanny and the Southwest), BTV-1 being the only serotype other than BTV-8 present on mainland France. The second reference population was composed of cows inseminated in 2005 and 2006 belonging to herds exposed in 2007.

The month AI is conducted is a known variation factor of reproductive performance (Malher et al., 2006; Marce et al., 2009). Cows in unexposed herds therefore were selected according to the AI date so that the cows in exposed and unexposed populations were inseminated during the same period of the year.

5. Estimation of abortion rate and data selection according to the zootechnical performance data

The possible effects that could lead to abortion are on one hand linked to the effects of infection in the pregnant cow (hyperthermia), and, on the other, to the effects of infection in the foetus if the virus passes through the placenta. According to the biological definition, abortion is the death of the foetus followed by expulsion several days later, or a more delayed expulsion in the case, for example, of foetal mummification (Figure 1). From a regulatory perspective, under the Brucellosis surveillance framework, premature births and full-term

births of calves that die within 48 hours also are considered to be abortions. The declaration of an abortion in principal is required. However, due to under detection and under declaration, recorded data pertaining to abortions is incomplete. After an abortion, the farmer may either re-inseminate or cull the cow. Two complementary criteria were considered in this study to estimate the occurrence of abortion: return-to-service after the third month of pregnancy, which correspond to situations where a new AI is conducted after a long interval, and the lengths of short gestations.

The first criterion is the incidence of return-to-service between 90 and 200 days after a first AI. The relationship between BTV-8 exposure and returns within 90 days was studied separately, these returns possibly being the result of fertilization failure or embryonic loss (Nusinovici et al., Submitted). Returns-to-service after 200 days were not taken into account because they represent less than 1% of returns. This criterion was studied in cows that had not returned for service within 90 days.

The second criterion is the rate of pregnancies followed by a recorded calving, with a pregnancy length of between 175 and 270 days. The last AI per lactation was considered to be the insemination that led to conception. Gestation periods of over 270 days are considered normal because the theoretic gestation period for Holstein cows is 282 days with a standard deviation of 6 days (Guerrier et al., 2007). Abortions occurring after 175 days of gestation were considered here because the risk of not noticing an abortion before this stage (due to the size of the aborted foetus) and the risk that the abortion would not be registered as a calving date are high.

The incidence of return-to-service between 90 and 200 days after a first service allows the effect of exposure on the foetal mortality rate occurring in mid-pregnancy to be estimated. The rate of short gestations allows the effect of exposure on the premature birth rate (between 260 and 270 days of gestation) and on abortions occurring after 175 days of gestation to be estimated. A similar combination of two criteria (late return and length of short gestation) was used in a Dutch study to assess the effect of BTV-8 exposure on the abortion rate (Santman-Berends et al., 2010).

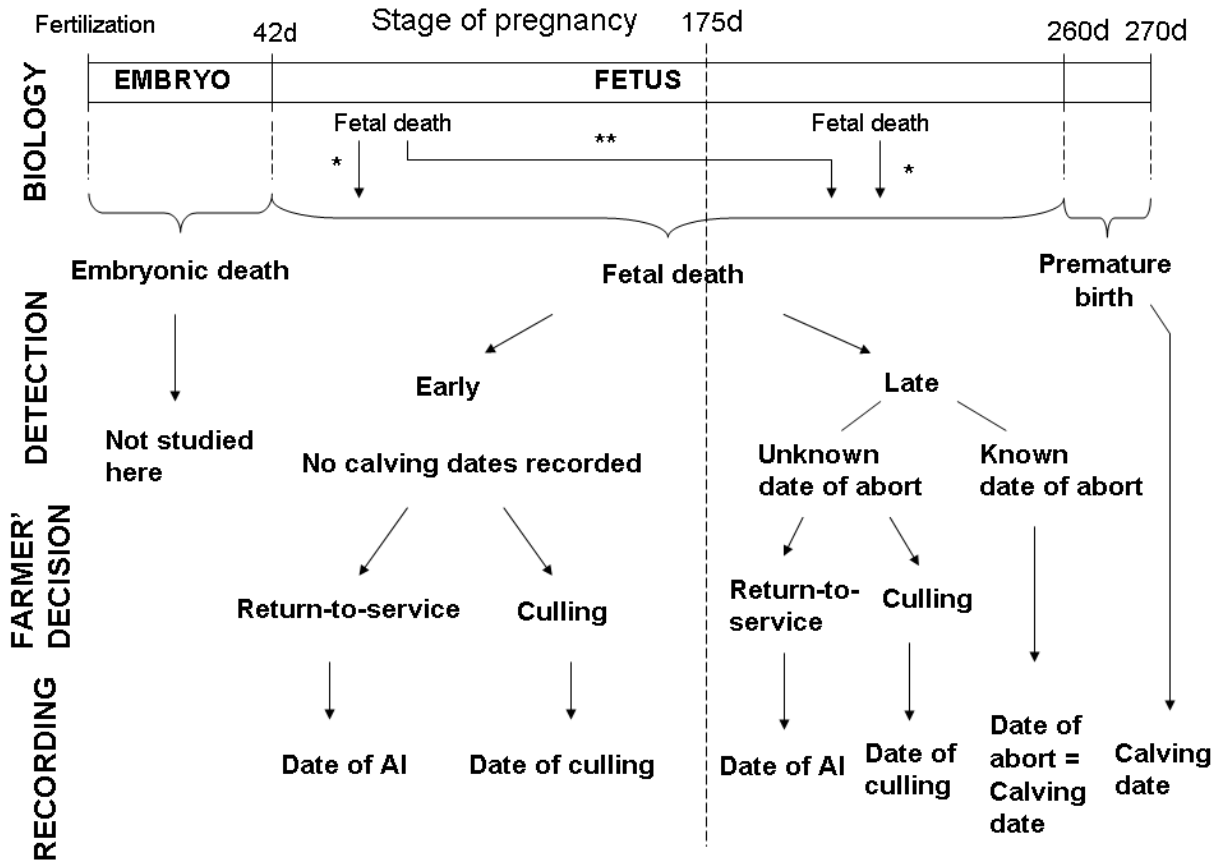


Figure 1 : Stages of occurrence of the interruption of gestation and observed events according to decisions of the livestock farmer (abort=abortion; AI=artificial insemination). The stages of pregnancy are represented up to 270 days, the cut-off date after which a pregnancy is considered to be premature (defined here as the mean value less 2 standard deviations).

* death of the foetus with immediate expulsion

** death of the foetus with delayed expulsion

Given the effect of breed on reproductive performance, only data on Holstein cows inseminated with the semen of Holstein bulls were included (Heins et al., 2006; Lucy, 2007). Cows with extreme or aberrant data were excluded: calving-first AI interval <35 or >180 days, assumed conceiving AI-calving interval >297 or <175 days, interval between 2 AIs >200 or <3 days, interval between 2 milk controls >85 or <20 days, milk production peak (maximum of first 3 dairy controls) >60 or <10 kg/day and minimum protein/fat ratio of first 3 dairy controls >1.5 or <0.25. Herds under special management (special demographic

structure, late breeding or a very small herd) and herds suspected of using a bull also were excluded.

6. Selection and classification of cows according to the timing of exposure during the pregnancy and the exposure level of the canton

6.1. Incidence of return-to-service between 90 and 200 days

All AIs carried out from 6 months before to 1 month after the date of disease detection in the herd were selected. They were classified in exposure categories according to the interval between the AI date of the cow and the exposure date of the herd, the level of exposure of the canton, and the month of exposure of the herd. The intervals between the AI date and the herd exposure date were grouped in classes of 15 days.

6.2. Rate of short gestation

All cows exposed between the date of assumed AI conception and up to 260 days of gestation were selected. They were classed according to the interval between the date of assumed conceiving AI of the cow and the exposure date of herd, and according to the canton's level of exposure. These intervals were grouped into classes of 3 months in order to study the effects of exposure at the beginning, middle, and end of pregnancy.

7. Statistical models

The relation between the occurrence of abortions and BTV-8 exposure was estimated using survival analyses (Cox model). Two models were considered according to the criterion used to estimate the abortion rate. The adjustment variables differ in the two models because the factors influencing the risk of return-to-service between 90 and 200 days and the risk of short gestation are different. The random variable herd number was integrated in the two models to take into account the non-independence of cows of the same herd.

7.1. Incidence of return-to-service between 90 and 200 days

The statistical unit is the AI. Equation (1) describes the model used:

$$Y_{ijklmno} = \alpha + EXP_i + LN_j + MP_k + PF_l + CAII_m + MO_n + HERD_o + \varepsilon_{ijklmno} \quad (1)$$

where $Y_{ijklmno}$ is the variable of interest (return-to-service between 90 and 200 days vs no return-to-service); α is the intercept; EXP_i is the exposure variable (126 classes according to the level of exposure at the level of the canton and the interval between the first AI of the cow and the outbreak exposure date), LN_j is the lactation number (4 classes), MP_k is the peak milk production (maximum of 3 first milk controls - 5 classes), PF_l is the minimum protein/fat ratio of the 3 first milk controls (5 classes), $CAII_m$ is the calving-AI interval (7 classes), MO_n is the AI month (11 classes) and $HERD_o$ is the herd number (random effect) and $\varepsilon_{ijklmno}$ is the residual error term.

7.2. Rate of short gestation

The statistical unit is the pregnancy. Equation (2) describes the model used:

$$Y_{ijkl} = \alpha + EXP_i + LN_j + MO_k + HERD_l + \varepsilon_{ijkl} \quad (2)$$

where Y_{ijkl} is the variable of interest (short pregnancy duration vs pregnancy of over 270 days); α is the intercept; EXP_i is the exposure variable (9 classes according to the level of exposure at the level of the canton and the interval between the assumed conceiving service date of the cow and the outbreak exposure date), LN_j is the lactation number (4 classes), MO_k is the month of the assumed conception (13 classes) and $HERD_l$ is the herd number (random effect) and ε_{ijkl} is the residual error term.

Increases in percentage points of returns between 90 and 200 days and of short gestation were calculated using hazard ratios (HR) estimated in the statistical models. All of the analyses were carried out using R[®] (R Development Core Team) software².

² R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2009.

RESULTS

1. Description of the occurrence of abortions and distribution of cantons, herds, and cows depending on the status and the BTV-8 exposure category

1.1. Incidence of return-to-service between 90 and 200 days

The spatial distribution of the cantons selected and their level of exposure are presented in Figure 2. In the BTV-8 outbreaks, the rate of return-to-service between 90 and 200 days after a first AI was 8.7%, corresponding to an incidence of 19.7% (calculated among the cows that had no return within 90 days). In the entire 2007 reference population, the rate was 6.4%, or an incidence of 13.9% (Table 1).

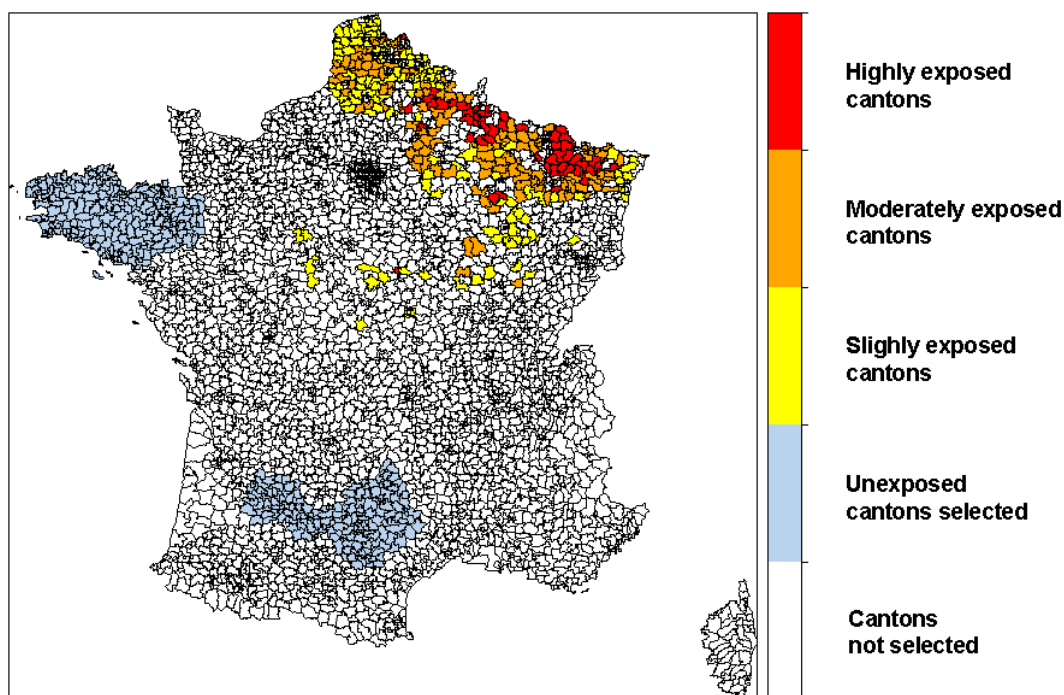


Figure 2: Classification of cantons according to the level of exposure to Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) and location of non-exposed cantons in 2007; France. The level of exposure was attributed according to the value of the peak monthly incidence of cattle outbreaks. High exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.25 ; moderate exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.10 and < 0.25 ; low exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak < 0.10 ; non-exposed cantons: cantons where no BTV-1 or BTV-8 cattle outbreaks were reported in 2007 and located in Brittany or in the Southwestern region of France;

cantons not selected: cantons exposed or not exposed that were not selected for analyses.

Table I. Incidence of return-to-service between 90 and 200 days and distribution of cantons, herds and cows according to the status of exposure to the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8), the exposure level and the reference population considered (in 10 766 Holstein dairy herds; 2005-2007; France). The AIs described of exposed herds were carried out from 6 months before to 1 month after the date of detection of BTV-8 in the herd.

Exposure categories		Number of cantons	Number of herds	Number of cows with no return-to-service before 90d	Incidence of return-to-service between 90 and 200d [§]
Exposed	High exposure cantons *	55	365	1 593	23.4
	Moderate exposure cantons*	132	534	3 082	20.1
	Low exposure cantons*	138	537	3 433	17.7
Not exposed	Herds in unexposed cantons in Brittany**	180	8 078	92 665	14.0
	Herds in unexposed cantons in the Southwest**	131	1 252	12 135	13.4
	Herds in 2005/2006 in exposed cantons	324	1 429	31 226	12.8

[§] Incidence of return-to-service between 90 and 200 days calculated after exclusion of cows with a return-to-service falling within 90 days.

*Incidence of return-to-service between 90 and 200 days for all cows with no return-to-service within 90 days in herds situated in cantons exposed in 2007=19.7% (the rate calculated using all cows of herds situated in cantons exposed in 2007 being 8.7%).

**Incidence of return-to-service between 90 and 200 days for all cows with no return-to-service within 90 days in herds situated in cantons not exposed in 2007=13.9% (the rate calculated using all cows of herds situated in cantons not exposed in 2007 being 6.4%).

1.2. Rate of short gestation

The rate of short gestation for the ensemble of cows in the outbreaks was 6.4%. In the entire 2007 reference population, the rate of short gestation was 5.1% (Table II).

Table II. Rate of short gestation and distribution of cantons, herds and cows according to the status of exposure to the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8), the exposure level and the reference population considered (in 13 165 Holstein dairy herds; 2005-2007; France). The cows of exposed herds were inseminated between 260 days before and the date of detection of BTV-8 in the herd.

	Exposure categories	Number of cantons	Number of herds	Number of cows of known gestation length	Rate of short gestation
Exposed	High exposure cantons*	57	794	8 929	6.8
	Moderate exposure cantons*	158	1 287	15 642	6.1
	Low exposure cantons*	143	629	7 110	6.3
Not exposed	Herds in unexposed cantons in Brittany**	180	9 030	177 281	5.0
	Herds in unexposed cantons in the Southwest**	136	1 425	22 317	5.3
	Herds in 2005/2006 in exposed cantons	358	2 671	79 665	5.1

*Rate of short gestation for all herds situated in high exposure cantons in 2007=6.4%

**Rate of short gestation for all herds situated in non-exposed cantons in 2007=5.1%

2. Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the BTV-8 virus during pregnancy

2.1. Incidence of return-to-service between 90 and 200 days

BTV-8 exposure was associated with an increase in the incidence of return-to-service between 90 and 200 days (late return-to-service). The effects of exposure were similar according to the reference population considered (Figures 3 and 4).

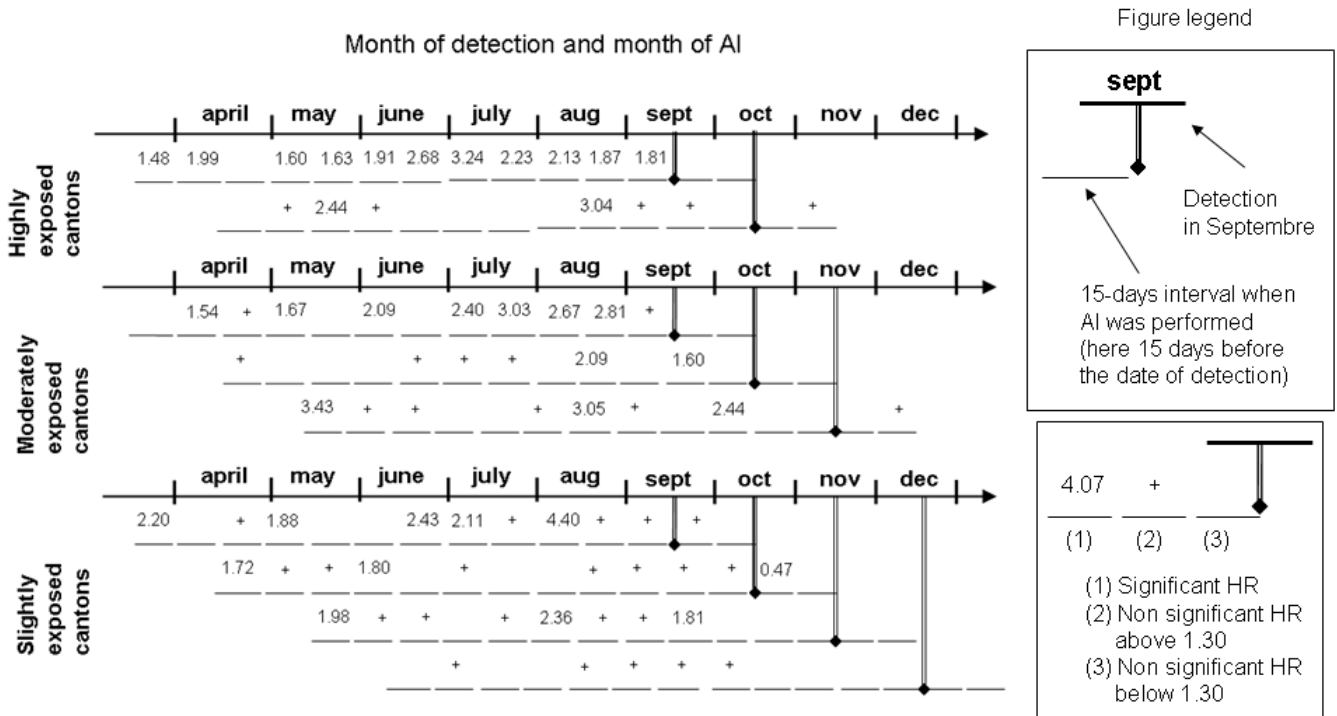


Figure 3 : Hazard ratios (HR) of the incidence of return-to-service between 90 and 200 days according to the interval between the date of AI and the detection date of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) in the herd and the exposure category of the canton (8 108 Holstein cows with no return-to-service within 90 days in 1 436 exposed dairy herds). The reference population of cows is composed of cows inseminated in 2007 in the herds not exposed to BTV in 2007 (104 800 cows with no return-to-service before 90 days in 9 330 non-exposed dairy herds). High exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.25 ; moderate exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.10 and < 0.25 ; low exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak < 0.10 ; France

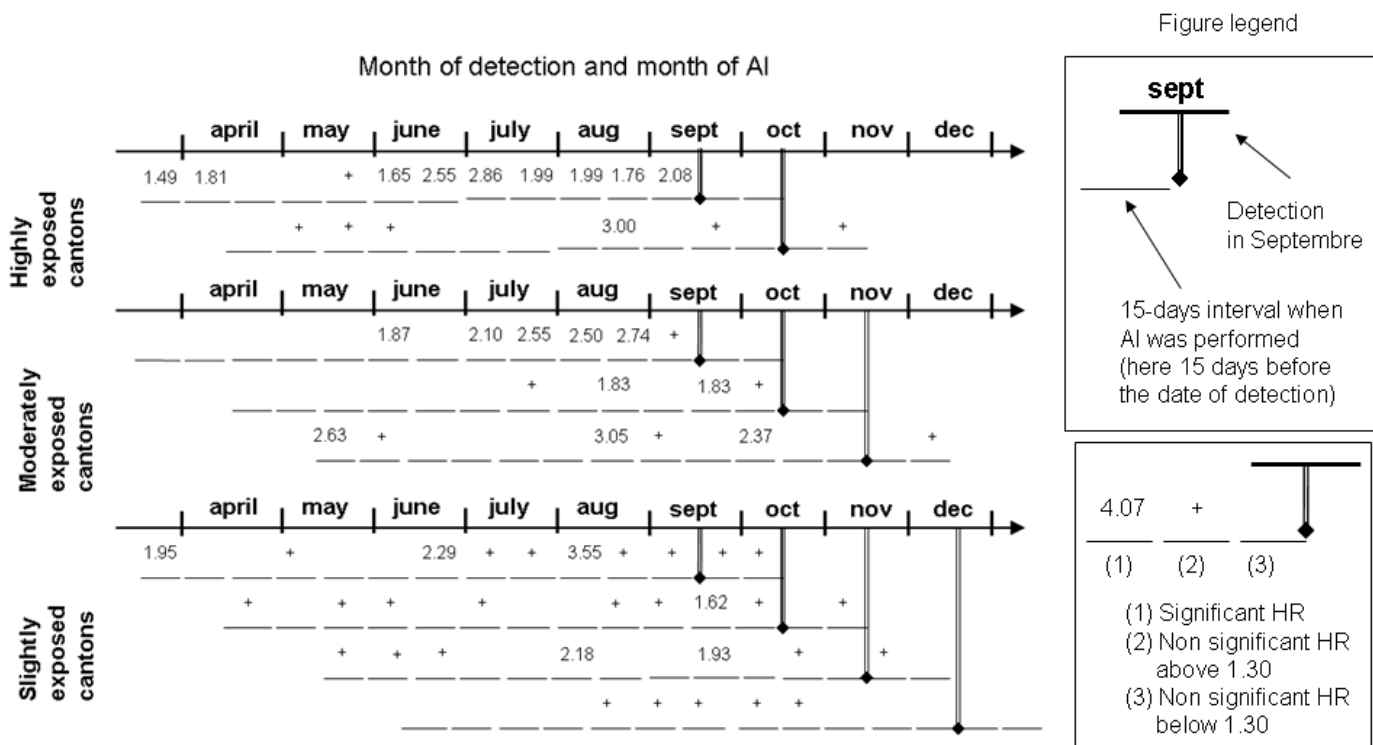


Figure 4 : Hazard ratios (HR) of the incidence of return-to-service between 90 and 200 days according to the interval between the date of AI and the detection date of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) in the herd and the exposure category of the canton (8 108 Holstein cows with no return-to-service before 90 days in 1 436 exposed dairy herds). The reference population of cows is composed of cows inseminated in 2007 or 2006 in the herds exposed to BTV in 2007 (31 226 cows with no return-to-service before 90 days in 1 429 non-exposed dairy herds). High exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.25 ; moderate exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.10 and < 0.25 ; low exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak < 0.10 ; France

The effect was significant for exposure during the first 6 months following the AI. The mean effect estimated in all of the exposed cantons during this period corresponded to an increase of 6.7 percentage points of late return-to-service for cows with no returns within 90 days. There was no increase in the incidence of late return-to-service for exposure the month before the AI (Figures 3 and 4). The estimated effects per intervals of 15 days could attain an increase of 47 percentage points in late return-to-service.

The effect of exposure varied according to the month of detection in the herd. It diminished for later detections compared to earlier detections during the epizootic (Figures 3 and 4). Over the entire period at risk, the HRs were estimated at 1.78 and 1.55 for outbreaks detected in September and October in the high exposure cantons, 1.69, 1.29 and 1.37 for outbreaks detected in September, October and November in medium exposure cantons, and 1.70, 1.42, 1.41 and 1.16 for outbreaks detected in September, October, November and December in low exposure cantons (compared to cows in non-exposed herds in 2007).

Exposure to BTV-8 during the first trimester of pregnancy was associated with a higher increase in the incidence of late return-to-service than exposure during the second trimester. Figure 5 shows the variations by 15 day intervals of the incidence of late return-to-service for exposure up to 6.5 months of gestation in all of the outbreaks detected in September. Exposure between 1 and 3 months and between 3 and 6 months respectively were associated with an average increase of 15 percentage points and of 6 percentage points in late return-to-service.

The mean effect was more important in the most highly exposed cantons compared to the cantons with medium or low exposure. For each exposure category, independent of the month of disease detection and for the entire period at risk, the HRs are 1.60 (IC95%: 1.44-1.77); 1.40 (IC95% : 1.30-1.51) and 1.45 (IC95% : 1.31-1.60) for high, medium, and low exposure cantons, respectively (in comparison with cows of herds not exposed in 2007).

Among the adjustment variables, the lactation number, milk production, protein/fat content ratio, calving-AI interval, and AI month were significantly associated with a risk of late return-to-service. The risk is greater for multiparous cows and cows with higher milk production. The risk was lower for cows with a higher protein/fat content ratio and for cows with a longer calving-AI interval (Table III).

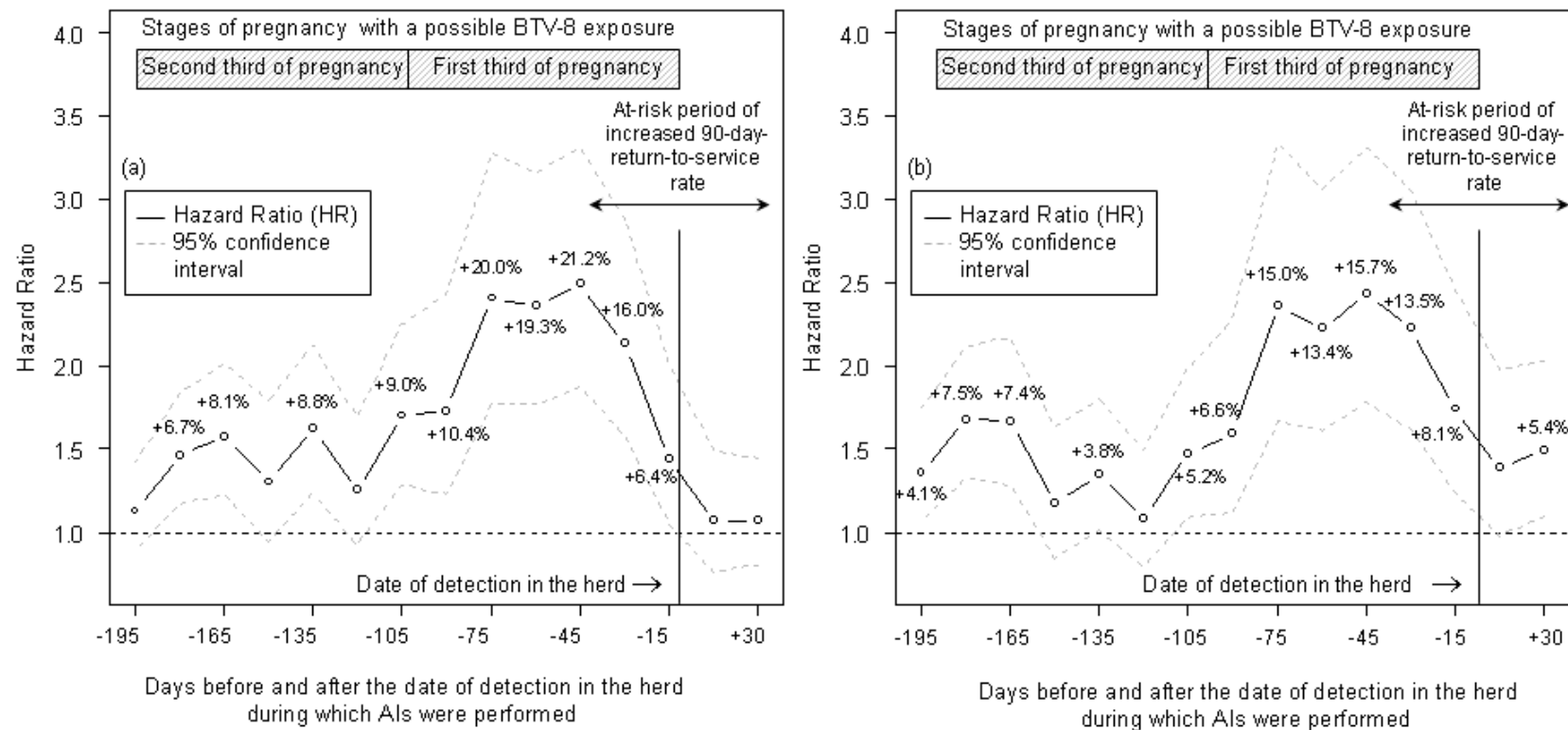


Figure 5 : Increase of incidence of return-to-service between 90 and 200 days before and after the date of the detection of the Bluetongue serotype 8 virus (BTV-8) in the herds detected in September (6 946 cows in 851 exposed dairy herds) (HR: hazard ratio; CI95: 95% confidence interval; and increase in % points). The population of non-exposed cows was composed of (a) cows inseminated during the same period of the year in the herds located in the non-exposed cantons (98 749 cows in 9 392 non-exposed dairy cattle herds), (b) cows inseminated in 2005 or 2006 located in the herds exposed to BTV-8 in 2007 (17 971 cows in 844 non-exposed dairy cattle herds). The hazard ratios are produced by adjusted models. % (percentage points) are calculated using significant HRs. The effects of exposure during the first trimester were not studied for this criterion.

2.2. Rate of short gestation

BTV-8 exposure was associated with an increase in short gestation rates. The effects of exposure on short gestation rates were similar according to the reference population considered (Figures 6 and 7).

For the high and medium exposure cantons, the period at risk of an increase in short gestation rates corresponded to an exposure between 90 and 260 days of gestation. For low exposure cantons, the period at risk of an increase in short gestation rates corresponded to an exposure between only 180 and 260 days of gestation (Figures 6 and 7). The average effect on the entire period at risk corresponded to an increase of 1.9 percentage points in short gestation. The average increase was 1.2 and 2.2 percentage points for an exposure between 3 and 6 months of gestation and after 6 months of gestation, respectively. The variation in short gestation rates was not significant for exposure during the first 90 days of gestation (first 180 days of gestation for low exposure cantons).

The mean effect was more important in the most highly exposed cantons compared to the cantons with medium or low exposure. For each exposure category, the HRs were 1.37 (IC95%: 1.25-1.50); 1.26 (IC95%: 1.17-1.35); and 1.28 (IC95%: 1.15-1.41) for high, medium, and low exposure cantons, respectively (in comparison with cows of herds not exposed in 2007).

The lactation number and the month of the assumed AI conception were significantly associated with a risk of a short gestation. The risk of a short gestation was significantly higher among primiparous cows compared with multiparous cows (Table IV).

Table III. Effects of adjustment variables on the risk of return-to-service between 90-200 days of cows with no return-to-service within 90 days having received a first artificial insemination (AI) from 6 months before to 1 month after the date of detection of the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) in 9 330 (comparison 1) and 1 436 (comparison 2) Holstein dairy cow herds; 2005-2007; France

Variable and classes	Comparison 1*			Comparison 2**		
	Number of AI	HR	95% CI	Number of AI	HR	95% CI
Lactation number						
1	42 861	1	<i>Ref</i>	18 331	1	<i>Ref</i>
2	30 510	1.18	[1.13-1.23]	11 590	1.11	[1.04-1.18]
3	19 951	1.27	[1.21-1.32]	6 928	1.09	[1.01-1.17]
4 and over	19 657	1.39	[1.33-1.45]	6 915	1.07	[0.99-1.15]
Milk production (kg/d)[‡]						
1	14 121	0.91	[0.86-0.97]	4 385	0.87	[0.79-0.96]
2	27 785	0.92	[0.88-0.96]	10 289	0.91	[0.85-0.98]
3	34 697	1	<i>Ref</i>	13 619	1	<i>Ref</i>
4	24 019	1.07	[1.03-1.12]	10 083	1.13	[1.05-1.21]
5	12 357	1.21	[1.15-1.28]	5 388	1.24	[1.14-1.35]
Protein/fat content ratio						
>0; ≤0.58	13 427	1.24	[1.18-1.30]	4 329	1.09	[0.99-1.19]
>0.58; ≤0.66	24 883	1.09	[1.04-1.14]	8 555	1.06	[0.99-1.14]
>0.66; ≤0.75	38 997	1	<i>Ref</i>	14 867	1	<i>Ref</i>
>0.75; ≤0.83	24 136	0.95	[0.91-0.99]	10 346	0.92	[0.85-0.98]
>0.83; ≤1.5	11 536	0.93	[0.87-0.98]	5 667	0.88	[0.81-0.96]
Calving-AI interval (d)						
>35; ≤50	5 630	1.39	[1.30-1.49]	2 766	1.38	[1.24-1.54]
>50; ≤62	19 521	1.03	[0.98-1.08]	6 489	1.12	[1.03-1.22]
>62; ≤80	31 582	0.97	[0.92-1.01]	11 729	1.03	[0.96-1.11]
>80; ≤102	27 261	1	<i>Ref</i>	11 132	1	<i>Ref</i>
>102; ≤125	15 710	1.04	[0.99-1.10]	6 218	0.92	[0.85-1.00]
>125; ≤150	8 421	1.06	[0.99-1.13]	3 333	0.96	[0.87-1.06]
>150; ≤180	4 752	1.08	[1.00-1.17]	2 012	0.83	[0.74-0.94]
Month of AI[§]						
March	9 737	0.99	[0.92-1.08]	3 805	1.07	[0.94-1.22]
April	8 805	1.09	[1.01-1.18]	2 555	1.50	[1.31-1.72]
May	8 370	1.13	[1.04-1.22]	2 333	1.63	[1.41-1.88]
June	7 862	1.28	[1.19-1.39]	1 726	1.66	[1.42-1.94]
July	7 290	1.20	[1.11-1.30]	1 472	1.56	[1.32-1.84]
August	8 070	1.09	[1.01-1.18]	2 609	1.32	[1.15-1.51]
September	9 623	1	<i>Ref</i>	3 665	1	<i>Ref</i>
October	12 230	0.89	[0.83-0.96]	5 901	0.84	[0.74-0.96]
November	14 614	0.84	[0.78-0.91]	7 730	0.78	[0.69-0.88]
December	14 265	0.82	[0.76-0.88]	6 801	0.73	[0.64-0.83]
January	12 113	0.87	[0.80-0.94]	5 167	0.72	[0.63-0.83]

* Reference population 1: cows of herds situated in areas not exposed to BTV in 2007

** Reference population 2: cows inseminated in 2005 and 2006 belonging to herds exposed in 2007.

‡ Classes constructed according to the distribution of milk production and the lactation number

§ Population exposed and reference population 1: month of AI in 2007 or 2008; Reference population 2: month of AI in 2005 or 2006

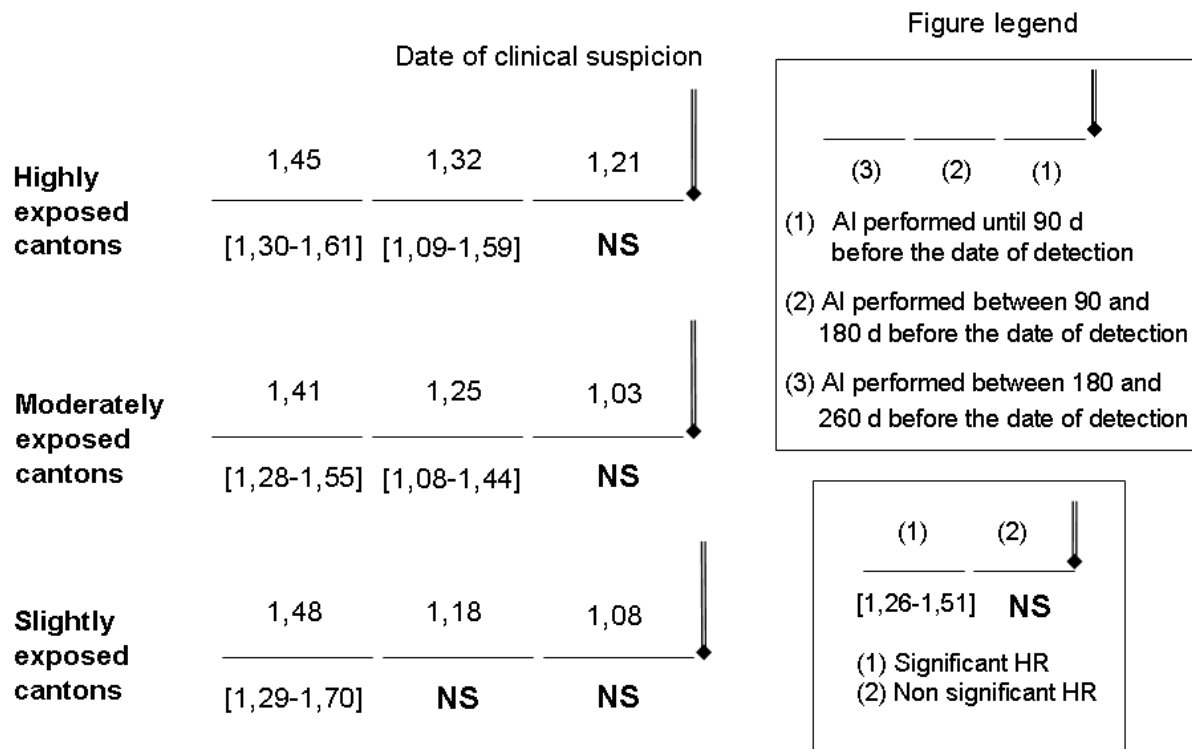


Figure 6 : Hazard ratios (HR) of the rate of short gestation according to the interval between the assumed AI conception date and the date of outbreak detection and the exposure category of the canton to Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) (32 709 Holstein cows in 2 710 exposed dairy herds). The reference population of cows was composed of cows inseminated in 2007 in herds not exposed to BTV in 2007 (199 598 cows in 10 455 non-exposed dairy herds). High exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.25 ; moderate exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.10 and < 0.25 ; low exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak < 0.10 ; France

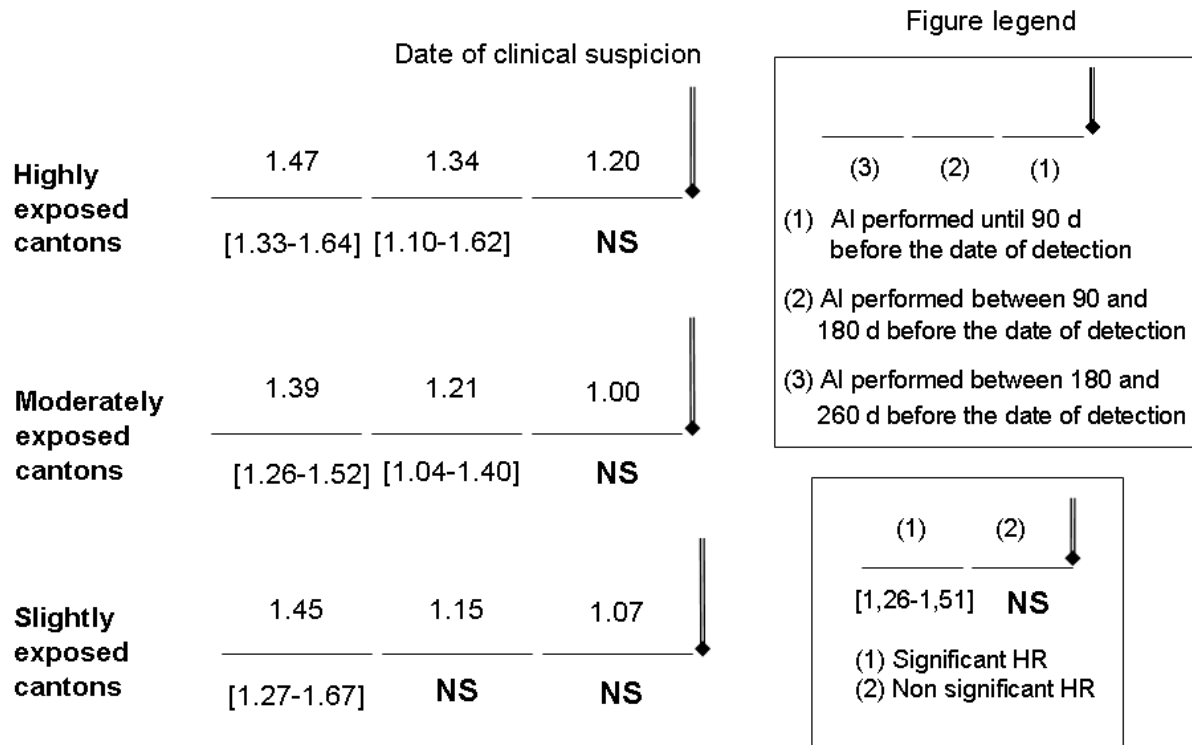


Figure 7 : Hazard ratios (HR) of the rate of short gestation according to the interval between the date of assumed conceiving AI and the date of outbreak detection and the exposure category of the canton to Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) (32 709 Holstein cows in 2 710 exposed dairy herds). The reference population of cows was composed of cows inseminated in 2005 or 2006 in herds exposed to BTV-8 in 2007 (79 665 cows in 2 671 non-exposed dairy herds). High exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.25 ; moderate exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak ≥ 0.10 and < 0.25 ; low exposure cantons: cantons with a monthly incidence peak < 0.10 ; France

Table IV. Effects of adjustment variables on the risk of short gestation of cows inseminated between 260 days before and the date of detection of the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) were in in 13 165 (comparison 1) and 2 710 (comparison 2) Holstein dairy cow herds; 2005-2007; France

Variable and classes	Comparison 1*			Comparison 2**		
	Number of AI	HR	95% CI	Number of AI	HR	95% CI
Lactation number						
1	92 399	1	<i>Ref</i>	54 291	1	<i>Ref</i>
2	66 383	0.87	[0.83-0.91]	35 393	0.82	[0.77-0.87]
3	41 271	0.86	[0.81-0.90]	20 958	0.81	[0.75-0.87]
4 and over	40 572	0.83	[0.78-0.87]	20 510	0.75	[0.69-0.80]
Month of AI [§]						
December	21 314	1.10	[1.00-1.21]		£	
January	22 865	1.11	[1.02-1.22]	21 872	1.06	[0.94-1.20]
February	21 513	1.01	[0.92-1.11]	19 447	0.99	[0.88-1.12]
March	21 549	0.92	[0.84-1.01]	17 510	0.95	[0.84-1.07]
April	17 754	0.89	[0.80-0.98]	9 831	0.90	[0.78-1.03]
May	16 117	0.83	[0.75-0.93]	7 624	0.77	[0.66-0.90]
June	14 303	0.87	[0.78-0.97]	5 279	0.90	[0.77-1.06]
July	13 251	0.81	[0.73-0.91]	3 955	0.90	[0.76-1.08]
August	13 702	0.99	[0.89-1.10]	5 995	0.99	[0.86-1.16]
September	15 237	1	<i>Ref</i>	7 476	1	<i>Ref</i>
October	18 283	1.10	[0.99-1.20]	11 519	1.07	[0.94-1.22]
November	21 714	1.11	[1.02-1.22]	9 640	1.01	[0.89-1.16]
December	23 023	1.08	[0.99-1.19]	11 004	1.11	[0.97-1.26]

* Reference population 1: cows of herds situated in areas not exposed to BTV in 2007

** Reference population 2: cows inseminated in 2005 and 2006 belonging to herds exposed in 2007.

§ Population exposed and reference population 1: month of assumed AI conception in 2006 or 2007; Reference population 2: month of assumed AI conception in 2005 or 2006

£ AIs of months of December 2005 and 2006 were regrouped

DISCUSSION

BTV-8 exposure was associated with an increase in the occurrence of abortions among dairy cows belonging to previously naive herds exposed to BTV-8 in 2007, regardless of the pregnancy stage (Figure 8). The effect of exposure was more pronounced for outbreaks detected early in the epizootic compared with those detected later. Furthermore, the effect of exposure depends on the pregnancy stage. Exposure during the first trimester of pregnancy was associated with an increase in the incidence of late return-to-service while no significant increase in short gestation rates was demonstrated. This corresponded on average to an additional 15 percentage points of late return-to-service for cows with no return-to-service up to 90 days (in outbreaks detected in September). Exposure in mid-pregnancy (between 3 months and 6 months) was associated with an increase in both the rate of late return-to-

service and the rate of short gestation. This increase corresponded on average to 6 percentage points of late return-to-service (in outbreaks detected in September) and to 1.2 percentage points of short gestations (in all of the outbreaks). Lastly, exposure during the last trimester was associated with an increase in the short gestation rate corresponding on average to 2.2 percentage points in all of the outbreaks (the study of late return-to-service not being relevant in the case of late exposures). These values corresponded to average effects under natural exposure conditions for which the proportion of infected cows per herd exposed was unknown. These effects probably underestimated the effect of infection at the individual level, the within-herd prevalence probably being less than 1, including in the most exposed cantons. The susceptibility of the foetus to the deleterious effects of the BT virus capable of infecting it during the pregnancy is higher when the foetus is younger (MacLachlan et al., 2000). In this study, the risk of a late return-to-service was higher for exposures during the first trimester of pregnancy compared with exposures in the middle of the pregnancy, suggesting a deleterious effect of the virus on the foetus that is stronger when the foetus is young. Exposure during the first month of pregnancy resulted in less abortions than exposure during the second or third month. Exposure very early in the pregnancy therefore seems to most frequently translate into an increase of return-to-service within 90 days (Nusinovici et al., Submitted). However, the significant effect of an early exposure on late return-to-service seems to indicate that the observation of a deleterious effect of the virus may be delayed, perhaps following the mummification of the foetus. Some of the lag may be attributed to a non-detection of heat after the interruption of the pregnancy. Severe defects of the foetus leading to its death at the beginning of pregnancy are probably associated with precocious abortions. The criterion 'length of short gestation' did not allow the effect of exposure on precocious abortions to be estimated. This probably is the reason that no increase of short gestation rates was demonstrated for exposures during the first trimester. For exposure later in the pregnancy, there was either a rapid interruption of pregnancy (observation of a return-to-service), or a shorter pregnancy, including for exposures during the second trimester.

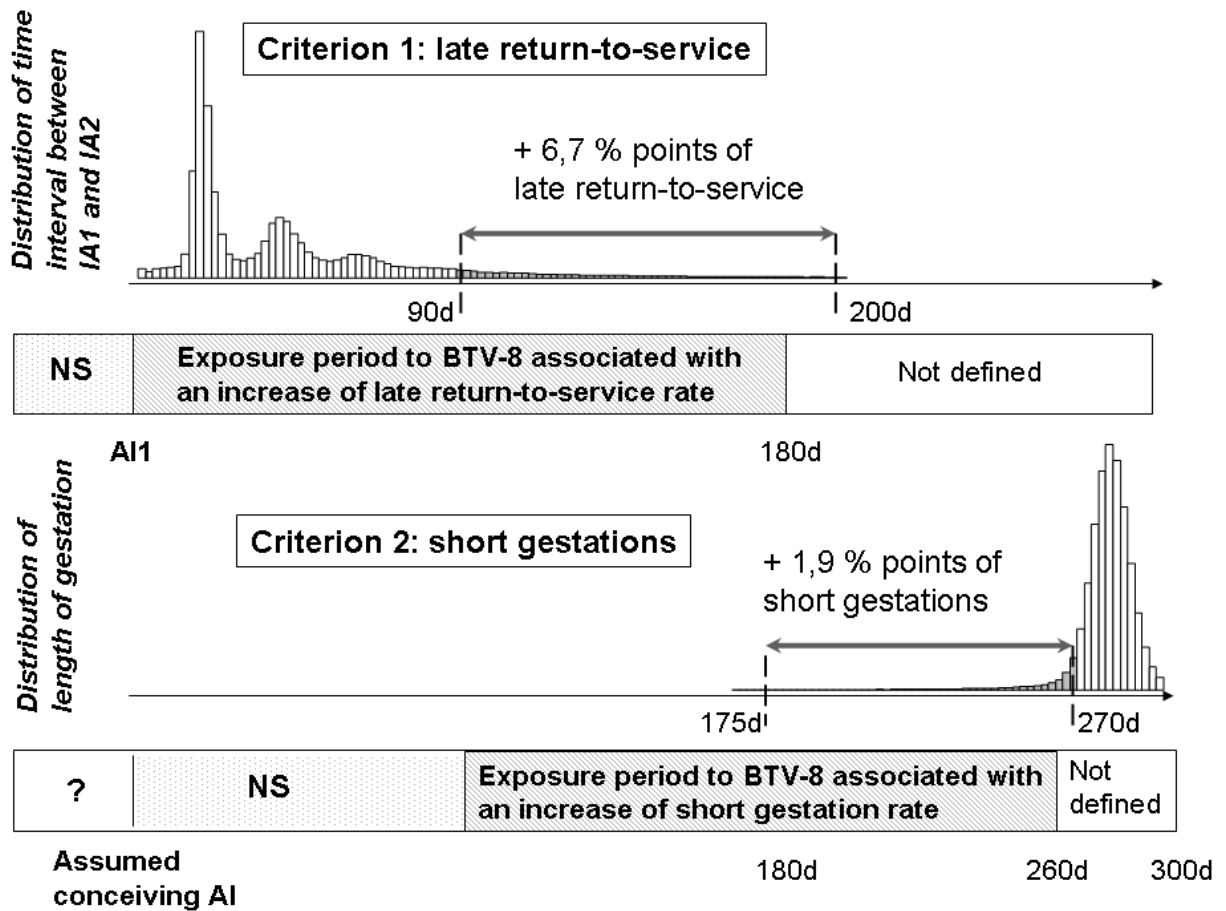


Figure 8: Synthesis of effects of exposure to Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) on the occurrence of abortions depending on the criterion used. **NS** : Exposure period that was not associated with an increase in the occurrence of abortions; **?**: Exposure period not studied; **Not defined**: periods not selected because they take place after the events studied.

The overall effect of exposure on the occurrence of abortions was stronger in highly exposed cantons compared with cantons with low and medium exposure. The difference of effect according to the level of exposure at a local level could be due to the higher within-herd prevalence in the most exposed cantons, or to the higher quantity of the virus in cows situated in these cantons.

The mean estimated effect of exposure in the herds exposed to BTV-8 on the incidence of return-to-service between 90 and 200 days was lower when the month of disease detection was late. A reduction in effect according to the month of exposure was shown in relation to the effect of Epizootic Hemorrhagic Disease (caused by an Orbivirus genus virus like BTV)

on milk production (Kedmi et al., 2010). As for the differences associated with local prevalence, this could be due to a lower exposure of outbreaks detected late.

It is possible that a cow may be culled following an abortion without the calving date having been recorded and without the cow having been re-inseminated. This could have led to an underestimation of the abortion rate. Of the cows selected that had received a first AI and did not return to service for up to 90 days, 88.2% calved or were re-inseminated and 5.9% were culled without a return date or a calving date being recorded. This percentage was 8.6% in cows belonging to an exposed herd and 5.3% in cows belonging to a non-exposed herd in 2007. It therefore was possible that again in our study there was an underestimation of the effect of BTV-8 exposure on the incidence of late return-to-service.

Two reference populations were considered to limit possible confusion due to variations in livestock management between regions and to variations of livestock management in the same region over time. The results were similar according to the reference population, which indicates the results were robust.

The effects of BTV-8 exposure were quantified in a population of unvaccinated Holstein cows in the case of a primary exposure to the BTV-8 virus. A priori, there is no reason for these effects to be different in other breeds under similar livestock management conditions and equivalent exposure conditions.

CONCLUSION

Exposure to the BTV-8 virus under natural conditions was associated with an increase in the occurrence of abortions in cows in previously naive dairy herds, declared after clinical suspicion during the 2007 epizootic, regardless of the stage of pregnancy. The average effect of BTV-8 exposure in all of the detected outbreaks corresponded to an increase of 6.7 percentage points in late return-to-service (or 3.1 percentage points for all cows with a first AI). The effect of exposure was more pronounced for outbreaks detected early in the epizootic compared with those detected later. BTV-8 exposure during the first 3 months of pregnancy was associated with a 15 percentage point increase of late return-to-service for cows with no return-to-service at 90 days, while the increase corresponded to 6 percentage points for an exposure after the third month of gestation (in outbreaks detected in September). BTV-8 exposure from the third month of gestation was associated with a 1.9 percentage point increase of short gestations. The risk of abortion associated with BTV-8 exposure was higher for cows in the most exposed cantons.

Acknowledgements

Financial support for this research was provided by INRA, Cemagref and Basse-Normandie, Bretagne, Pays de la Loire and Poitou-Charentes Regional Councils under SANCRES project, in the framework of "For and About Regional Development" programs. The authors gratefully acknowledge the Centre de Traitement de l'Information Génétique (INRA, Jouy-en-Josas, France) for providing the performance data and the Ministry of Agriculture (Direction Générale de l'Alimentation) for the BTV case herds data. The authors also acknowledge Renaud Lancelot (CIRAD, Montpellier, France) for support in designing the imputation method.

REFERENCES

- De Clercq K, De Leeuw I, Verheyden B, Vandemeulebroucke E, Vanbinst T, Herr C, Meroc E, Bertels G, Steurbaut N, Miry C, De Bleeker K, Maquet G, Bughin J, Saulmont M, Lebrun M, Sustronck B, De Deken R, Hooyberghs J, Houdart P, Raemaekers M, Mintiens K, Kerkhofs P, Goris N, Vandebussche F. Transplacental infection and apparently immunotolerance induced by a wild-type bluetongue virus serotype 8 natural infection. *Transbound. Emerg. Dis.* 2008; 55:352-359.
- Durand B, Zanella G, Biteau-Coroller F, Locatelli C, Baurier F, Simon C, Le Drean E, Delaval J, Prengere E, Beaute V, Guis H. Anatomy of Bluetongue Virus Serotype 8 Epizootic Wave, France, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16:1861-1868.
- Elbers AR, van der Spek AN, van Rijn PA. Epidemiologic characteristics of bluetongue virus serotype 8 laboratory-confirmed outbreaks in The Netherlands in 2007 and a comparison with the situation in 2006. *Prev. Vet. Med.* 2009; 92:1-8.
- Elbers ARW, Backx A, Meroc E, Gerbier G, Staubach C, Hendrickx G, van der Spek A, Mintiens K. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006: I Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 2008; 87:21-30.
- Fourichon C, Beaudeau F, Bareille N, Seegers H. Incidence of health disorders in dairy farming systems in western France. *Livest. Prod. Sci.* 2001; 68:157-170.
- Guerrier J, Journaux L, Chatelin YM, Ledos H. Gestation length of French bovine breeds. In *Proceedings of Rencontre, Recherche, Ruminants (3R)*, December 2007, Paris, France.

- Heins BJ, Hansen LB, Seykora AJ. Fertility and survival of pure Holsteins versus crossbreds of Holstein with Normande, Montbeliarde, and Scandinavian Red. *J. Dairy Sci.* 2006; 89:4944-4951.
- Kedmi M, Van Straten M, Ezra E, Galon N, Klement E. Assessment of the productivity effects associated with epizootic hemorrhagic disease in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2010; 93:2486-2495.
- Lucy MC. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007; 64:237-254.
- MacLachlan NJ, Conley AJ, Kennedy PC. Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion. *Anim. Reprod. Sci.* 2000 60-61:643-651
- Malher X, Beaudeau F, Philipot JM. Effects of sire and dam genotype for complex vertebral malformation on risk of return-to-service in Holstein dairy cows and heifers. *Theriogenology* 2006; 65:1215-1225.
- Marce C, Beaudeau F, Bareille N, Seegers H, Fourichon C. Higher non-return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection at early stage in Holstein dairy cows. *Theriogenology* 2009; 71:807-816.
- Menzies FD, McCullough SJ, McKeown IM, Forster JL, Jess S, Batten C, Murchie AK, Gloster J, Fallows JG, Pelgrim W, Mellor PS, Oura CA. Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Vet. Rec.* 2008;163:203-209.
- Nusinovici S, Seegers H, Joly A, Beaudeau F, Fourichon C. Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy cattle herds. Submitted
- Osburn BI. The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1994; 17:189-196.
- Saegerman C, Bolkaerts B, Baricalla C, Raes M, Wiggers L, de Leeuw I, Vandebussche F, Zimmer JY, Haubruge E, Cassart D, De Clercq K, Kirschvink N. The impact of naturally-occurring, trans-placental bluetongue virus serotype-8 infection on reproductive performance in sheep. *Vet. J.* 2009; 187:72-80.
- Santman-Berends IM, Hage JJ, Rijn PA, Stegeman JA, Schaik GV. Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) infection reduces fertility of Dutch dairy cattle and is vertically transmitted to offspring. *Theriogenology* 2010; 74:1377-84.

Vandaele L, Wesselingh W, De Clercq K, De Leeuw I, Favoreel H, Van Soom A, Nauwynck H. Susceptibility of in vitro produced hatched bovine blastocysts to infection with bluetongue virus serotype 8. *Vet. Res.* 2011; 42:14.

Wouda W, Peperkamp NH, Roumen MP, Muskens J, van Rijn A, Vellema P. Epizootic congenital hydranencephaly and abortion in cattle due to bluetongue virus serotype 8 in the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 2009; 134:422-427.

Partie 3 : Diminution de la production laitière associée à l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 dans des troupeaux bovins

Les analyses de ce travail ont été réalisées par Cécile Souty dans le cadre de son stage de fin d'étude d'ingénieur agronome (Agrocampus Ouest) réalisé dans l'unité.

RESUME

La quantification des pertes pour l'ensemble des vaches appartenant aux troupeaux infectés permet d'estimer un effet moyen de l'infection par le BTV-8 sur la production de lait. La quantification de cet effet moyen est nécessaire dans le cadre de l'évaluation économique de la vaccination. Les objectifs de cette étude sont (1) de quantifier l'effet moyen de l'exposition au BTV-8 sur la production de lait de l'ensemble des vaches de troupeaux antérieurement naïfs dans des conditions naturelles d'exposition, (2) de déterminer la durée de la période de diminution de la production de lait avant et après la date d'exposition du troupeau afin d'estimer la perte cumulée de production de lait sur cette période et (3) d'évaluer l'influence de la proportion de troupeaux voisins infectés sur l'effet de l'exposition au BTV-8 sur la production de lait. Les effets de l'exposition au BTV-8 ont été quantifiés à l'aide de modèles mixtes qui ont permis de prendre en compte la non indépendance des données et d'ajuster sur les principaux facteurs de variations de la production de lait. Dans les troupeaux déclarés après suspicion clinique durant l'épizootie de 2007, l'exposition au virus BTV-8 est associée à une diminution de production de lait sur une période de 6 mois (de 60 jours avant à 120 jours après la date d'exposition du troupeau). La perte cumulée de production de lait correspond à environ 3% de la production annuelle. Dans les troupeaux exposés tardivement durant l'épizootie, la période de diminution de la production de lait est plus précoce, suggérant une détection retardée des signes cliniques dans ces troupeaux. Enfin, la diminution de la production de lait est plus forte dans les troupeaux foyers situés dans les zones les plus fortement exposées.

INTRODUCTION

L'épizootie causée par le virus de la Bluetongue sérotype 8 en Europe du Nord a eu un impact économique majeur, due principalement aux pertes de production et aux mesures de contrôles

(Saegerman et al., 2008, Velthuis et al., 2009). Bien que la vaccination ait été la principale stratégie de contrôle mise en place pour contenir la progression de l'épizootie, aucune évaluation économique de cette mesure de contrôle n'a été faite. Cette évaluation nécessite l'estimation des bénéfices potentiels de la vaccination. Ces bénéfices potentiels correspondent aux pertes de production causées par l'infection dans les troupeaux atteints. La quantification des pertes chez l'ensemble des vaches des troupeaux infectés permet d'estimer un effet moyen de l'infection dans ces troupeaux.

Quand des signes cliniques sont détectés dans un troupeau, une diminution de la production de lait pourrait être observée avant et après la date de première détection d'un cas clinique. La détection de la maladie est retardée par rapport à l'infection des vaches, ce qui pourrait expliquer une diminution de la production de lait avant la détection dans le troupeau. En outre, tous les animaux d'un troupeau ne sont pas infectés au même moment, la progression du virus au sein du troupeau est plus ou moins rapide selon l'abondance des vecteurs et l'exposition des bovins à leurs piqûres. Enfin, l'effet de l'infection d'une vache sur sa production persiste probablement plusieurs jours à plusieurs semaines. La détermination de la durée de la diminution de la production de lait nécessite donc de quantifier cette diminution sur un large intervalle autour de la date de détection des signes cliniques.

Une diminution de la production de lait dans des troupeaux bovins exposés au BTV-8 a été rapportée sans être quantifiée (Elbers et al., 2009, Saegerman et al., 2010). Une seule étude a cherché à quantifier cette diminution en comparant la production de lait chez des vaches ayant séroconverti et chez des vaches non infectées par BTV-8 (Santman-Berends et al., 2011). La perte de production moyenne associée à l'infection au BTV-8 a été estimée entre 28 et 94 kg de lait par lactation, ce qui représente moins de 1% de la production totale pendant une lactation. Les effectifs étaient limités (91 vaches dans 15 troupeaux), ce qui rend l'estimation peu précise. Les auteurs ont estimé que la période pendant laquelle la production de lait est affectée était comprise entre 30 jours avant et la date de séroconversion.

L'effet moyen détectable de l'infection par le BTV-8 sur la production de lait dans un troupeau dépend de la proportion de vaches infectées. En France à la fin de l'épizootie de 2007, il a été montré que la prévalence intra-troupeau augmentait quand la prévalence inter-troupeau était plus élevée (Durand et al., 2010). A la fin de l'épizootie, la prévalence intra-troupeau variait entre 0.42 et 0.99 dans les régions où la prévalence était estimée à 1 (IC95% 0,93–1,00), alors qu'elle était inférieure à 0.10 dans les régions avec un niveau intermédiaire de prévalence inter-troupeaux (d'environ 0.60). Par conséquent, l'effet moyen de l'infection par le BTV-8 au niveau d'un troupeau sur la production de lait pourrait augmenter avec la

proportion de troupeaux infectés dans la zone géographique locale. De plus, la proportion de vaches infectées par troupeau dépend probablement du mois d'exposition pendant l'épizootie car l'abondance des vecteurs varie selon la saison. L'effet moyen de l'infection au niveau d'un troupeau sur la production de lait pourrait donc également varier selon le mois d'exposition.

Les objectifs de cette étude sont (1) de quantifier l'effet moyen de l'exposition au BTV-8 sur la production de lait de l'ensemble des vaches de troupeaux antérieurement naïfs dans des conditions naturelles d'exposition, (2) de déterminer la durée de la période de diminution de la production de lait avant et après la date d'exposition du troupeau afin d'estimer la perte cumulée de production de lait sur cette période et (3) d'évaluer l'influence de la proportion de troupeaux voisins infectés sur l'effet de l'exposition au BTV-8 sur la production de lait.

MATERIEL ET METHODES

1. Protocole de l'étude et données disponibles

La production de lait de vaches appartenant à des troupeaux exposés a été comparée à la production de vaches appartenant à des troupeaux non exposés. L'effet de l'exposition au BTV-8 sur la production de lait a été quantifié dans des troupeaux foyers durant l'épizootie de 2007 en France afin de quantifier l'effet de l'exposition dans une population de vaches naïves non vaccinées contre BTV-8. En 2006, seulement 6 troupeaux foyers avaient été notifiés en France.

L'information concernant l'exposition au BTV-8 provient du système de surveillance officiel. Cette information n'est disponible qu'au niveau troupeau. Les foyers de BTV-8 ont été notifiés soit en cas de détection de signes cliniques par l'éleveur ou le vétérinaire, soit en cas de test sérologique positif réalisé avant la vente ou le transfert d'animaux, ou dans des troupeaux sentinelles. Seuls les foyers notifiés dans le cas de détection de signes cliniques ont été inclus dans les analyses car pour les autres, la date de test sérologique n'informe pas sur la date d'exposition, celle-ci pouvant avoir eu lieu longtemps avant la réalisation d'un test, sans que des signes cliniques n'aient été détectés. Un troupeau est considéré foyer si au moins un animal présentant des signes cliniques a été testé positivement vis-à-vis de BTV-8. Les foyers cliniques ont été sélectionnés dans les départements les plus exposés en 2007 (19 parmi 39 départements au total avec au moins un foyer clinique déclaré). La population de foyers cliniques sélectionnés correspond à 92% de l'ensemble des foyers cliniques déclarés en 2007.

Les données de production de lait ont été obtenues dans les troupeaux enregistrés au contrôle laitier. Les données obtenues sont la production de lait à chaque contrôle (date du contrôle et production de lait en 24h) et les dates de vêlage, ainsi que les données servant à ajuster des facteurs connus influençant les performances de production de lait: le numéro de lactation, l'index laitier (estimation du potentiel génétique au niveau vache calculé à partir des valeurs de production des lactations antérieures de la vache ainsi que les valeurs du potentiel génétique de chacun de ses parents) et la race des vaches.

2. Définition de l'exposition au BTV-8 au niveau troupeau selon la distribution spatio-temporelle de l'épizootie

Pour chaque foyer notifié dans le cas de détection de signes cliniques, la date de suspicion clinique et la date de confirmation diagnostique étaient disponibles. La proportion de vaches infectées dans un foyer est inconnue. Il a été considéré que la proportion de vaches infectées dans un foyer peut être liée à l'incidence des foyers notifiés dans une zone géographique locale. Les foyers ont donc été classés selon le niveau d'exposition dans leur zone géographique locale. L'unité géographique considérée est le canton (avec un nombre moyen de 47 troupeaux par canton en 2007). Chaque canton a été classé dans une des trois catégories d'exposition selon la valeur du pic d'incidence mensuelle de l'exposition. Les trois niveaux d'exposition sont : fortement exposé (pic d'incidence mensuelle ≥ 0.25), modérément exposé (pic d'incidence mensuelle ≥ 0.10 et < 0.25) et faiblement exposé (pic d'incidence mensuelle < 0.10). L'incidence mensuelle a été définie comme le nombre de nouveaux foyers bovins par mois dans un canton divisé par le nombre total de troupeaux bovins dans le canton. Tous les troupeaux bovins, laitiers et allaitants, ont été inclus dans le calcul des incidences mensuelles par cantons.

3. Estimation des dates d'exposition

Les dates de suspicion clinique ont été utilisées comme dates d'exposition estimées. La même date d'exposition a été attribuée à toutes les vaches d'un même troupeau foyer. Afin d'attribuer une date de suspicion aux foyers n'ayant pas de date de suspicion renseignée (6,1% de l'ensemble des foyers bovins), une procédure d'imputation basée sur la distribution de l'intervalle entre les dates de suspicion et de confirmation a été utilisée. De plus, 181 troupeaux foyers ayant un intervalle aberrant entre les dates de suspicion et de confirmation (intervalle supérieur à 30 jours, ou date de confirmation antérieure à la date de suspicion) ont

été exclus. Après ces exclusions, la population de troupeaux foyers bovins cliniques sélectionnée était composée de 8279 troupeaux, localisés dans 534 cantons. Les dates de suspicion sont comprises entre le 31 juillet et le 28 décembre 2007.

4. Sélection des contrôles laitiers et des lactations exposés selon le moment d'exposition par rapport à la lactation

Afin de suivre les modifications de production laitière d'un animal dans le temps, tous les contrôles laitiers renseignés pour une lactation considérée exposée ont été conservés. Parmi les vaches des troupeaux exposés, les lactations ont été considérées exposées si la date d'exposition du troupeau est comprise entre 100 jours avant le premier et 120 jour après le dernier contrôle laitier. A l'issue de cette sélection, les dates de vêlages correspondantes aux lactations sélectionnées sont comprises entre le 27 avril 2006 et le 15 mars 2008.

5. Sélection des troupeaux et vaches non exposés

La population de référence à laquelle est comparée la population de vaches appartenant à des troupeaux exposés est composée des vaches en lactation entre 2004 et 2006 appartenant aux troupeaux exposés en 2007. Cette population de référence permet de comparer des animaux appartenant aux mêmes troupeaux, ce qui permet de comparer deux populations de vaches dont la conduite d'élevage et les conditions climatiques sont identiques (sauf si changement d'éleveur durant la période de l'étude).

Le mois de vêlage est un facteur de variation connu de la production de lait (Detilleux et al., 1994, Grohn et al., 1999). Les vaches dans les troupeaux non exposés ont donc été sélectionnées selon la date de vêlage afin que la répartition du mois des contrôles laitiers soit semblable entre la population exposée et la population de référence. Les dates de vêlage de la population de référence sont donc comprises entre le 27 avril 2004 et le 15 mars 2006.

6. Sélection des données issues du contrôle laitier

Etant donné l'effet de la race sur les performances de production de lait, seules les données de vaches de race Holstein ont été incluses (Lescourret and Coulon, 1994). Les vaches dont les données sont particulières ou non plausibles ont été exclues : parité >7 , intervalle de temps entre 2 contrôles laitiers >73 jours (permet d'inclure les contrôles consécutifs malgré l'absence d'un contrôle, souvent due à l'interruption estivale), nombre de contrôles laitiers par

lactation <3 (pour permettre le suivi de la production de lait pendant la lactation), production de lait 24h >60 kg/jour, âge au premier vêlage pour les vaches primipares <23 ou >37 mois et intervalle de temps entre le contrôle laitier et la date de vêlage >365 jours (durée maximum attendue d'une lactation en France).

7. Sélection des contrôles laitiers exposés selon l'intervalle entre les contrôles laitiers et la date d'exposition du troupeau

Afin d'étudier l'effet de l'exposition au BTV-8 sur la production de lait autour de la date de suspicion, la variable d'exposition est construite en prenant en compte l'intervalle de temps entre la date du contrôle laitier de la vache et la date d'exposition du troupeau. Les contrôles laitiers ont été sélectionnés sur un intervalle de 259 jours avant à 265 jours après la date d'exposition, permettant d'estimer la durée de l'effet de l'exposition. Pour disposer d'effectifs suffisants pour chaque modalité, des pas de temps de 7 jours sont définis pour cet intervalle (ce qui correspond à 75 modalités). De plus, deux modalités supplémentaires ont été considérées pour les contrôles réalisés plus de 260 jours avant la date d'exposition et plus de 266 jours après la date d'exposition.

8. Stratification des analyses selon la parité des vaches, le mois d'exposition du troupeau et le niveau d'exposition du canton

La forme de la courbe de lactation et la quantité de lait produit varient selon la parité de l'animal. De plus, l'effet de l'exposition pourrait varier selon la parité. Il a donc été choisi de stratifier les analyses par parité. Trois strates sont considérées : primipares, parité 2 et parités 3 à 7 (parités 3+).

L'effet moyen au niveau d'un troupeau de l'exposition au BTV-8 sur la production de lait pourrait augmenter avec la proportion de troupeaux infectés dans la zone géographique locale et varier selon le mois d'exposition. Différents modèles ont donc été considérés selon le niveau d'exposition au niveau canton (3 strates correspondant aux 3 niveaux d'exposition : fortement, modérément et faiblement exposés) et selon le mois d'exposition (5 strates correspondant aux mois d'août à décembre).

9. Modèles statistiques

L'unité statistique est le contrôle laitier. Ce niveau a été retenu afin d'étudier l'effet de l'exposition durant la lactation et prendre en compte les facteurs de variation temporelle de la production laitière. L'analyse de ces données longitudinales est en général plus informative que les analyses basées sur les productions cumulées par animal (Grohn et al., 1999). Ces données répétées permettent également d'étudier la période à risque de baisse de production due à l'exposition au virus.

La relation entre la production de lait et l'exposition au BTV-8 a été estimée à l'aide de modèles mixtes permettant de prendre en compte la non indépendance (i) des vaches d'un même troupeau et (ii) des contrôles laitiers d'une même lactation (mesures répétées dans le temps). Il a été choisi de prendre en compte ces caractéristiques des données par l'ajout dans le modèle (i) d'une variable aléatoire correspondant au numéro de troupeau et (ii) d'une structure d'autocorrélation d'ordre 1. Le principe de cette structure d'autocorrélation, dite autorégressive, est de considérer que la production de lait à un contrôle donné est corrélée avec la production du contrôle précédent (Grohn et al., 1999). La structure de corrélation d'ordre 1 entre les mesures de production laitière d'une même vache au cours d'une lactation nécessite l'estimation d'un unique paramètre Φ . Le résidu au temps t est modélisé par une fonction du résidu au temps $t-1$ et d'un bruit résiduel (1) :

$$\epsilon_t = \Phi * \epsilon_{t-1} + \eta_t \quad (1)$$

avec ϵ_t : résidu du contrôle laitier t ; ϵ_{t-1} : résidu du contrôle laitier $t-1$; Φ : paramètre de corrélation et η_t : bruit résiduel du contrôle laitier t . Ainsi, plus deux contrôles laitiers d'une même lactation sont proches dans le temps, plus leur corrélation sera importante.

L'équation (2) décrit le modèle utilisé pour les vaches de parité 2 :

$$Y_{lmt} = \alpha + EXP_i + SL_j + MC_k + IL_l + RAND_m + \underbrace{(\Phi * \epsilon_{lm(t-1)} + \eta_{lmt})}_{= \epsilon_{lmt}} \quad (2)$$

où Y_{lmt} est la production de lait au contrôle t de la vache l du troupeau m ; α est l'intercept ; EXP_i est la variable d'exposition (78 classes) ; SL_j est le stade de lactation (41 classes correspondant à des pas de temps de 5 jours en début de lactation, de 10 jours en milieu de lactation et de 15 jours en fin de lactation) ; MC_k est le mois du contrôle laitier (12 classes) ; IL_l est l'index laitier (quantitative, relation linéaire avec la production de lait vérifiée) ; $RAND_m$ est le numéro de troupeau (variable aléatoire) ; Φ est le paramètre de corrélation

entre deux contrôles laitiers consécutifs d'une même lactation ; $C_{lm(t-1)}$ est le résidu associé au contrôle $t-1$ et η_{lmt} est le terme d'erreur associé au contrôle t .

Pour les primipares, une variable supplémentaire a été ajoutée au modèle décrit par l'équation (3) afin de prendre en compte l'âge au vêlage (quantitative, relation linéaire avec la production de lait vérifiée). Enfin, pour les parités supérieures à 3, une variable numéro de lactation a été rajoutée (5 classes).

RESULTATS

1. Description de la production moyenne de lait par contrôle laitier et distribution des contrôle laitiers, vaches et troupeaux selon les facteurs de stratification

La production moyenne de lait par contrôle laitier est de 26,7 kg/jour pour l'ensemble de la population exposée, et de 26,5 kg/jour pour la population de référence (Tableau 1). Le nombre de troupeaux exposés au virus est presque deux fois plus important dans les cantons modérément exposés par rapport aux cantons fortement et faiblement exposés. Le nombre de troupeaux exposés varie fortement avec le mois d'exposition, les effectifs étant très faibles en août et maximum en septembre et octobre. Parmi les vaches sélectionnées, la répartition des effectifs est homogène selon la parité. La répartition spatiale des cantons sélectionnés et leur niveau d'exposition est présentée Figure 1-a. Les cantons les plus fortement exposés sont répartis de manière homogène dans le nord-est de la France alors que les cantons modérément et faiblement exposés sont répartis sur une plus grande surface allant jusqu'au centre de la France.

Tableau 1 : Production moyenne de lait par contrôle laitier et distribution des troupeaux, vaches et contrôles laitiers selon les facteurs de stratification (dans 3 016 troupeaux Holstein laitiers ; 2004-2008 ; France). La production de lait moyenne par contrôle laitier des vaches exposées a été calculée à partir de l'ensemble des contrôles des lactations pour lesquelles la date de détection des signes cliniques dans le troupeau est comprise entre 100 jours avant le premier et 120 jours après le dernier contrôle laitier.

Facteurs de stratification		Nombre de troupeaux	Nombre de vaches	Nombre de CL*	Moyenne PL [£] par CL* (kg/jour)
Niveau d'exposition au niveau canton	Fortement exposés	890	46 405	548 649	26,0
	Modérément exposés	1 341	75 070	894 023	26,9
	Faiblement exposés	669	35 329	414 285	27,1
	Non exposés	2 974	164 854	2 044 456	26,5
Mois d'exposition	Août	82	5 006	56 313	27,1
	Septembre	1 050	57 339	680 733	26,5
	Octobre	1 003	54 645	653 641	26,5
	Novembre	538	28 183	331 265	27,0
	Décembre	232	12 168	141 405	26,7
Parité	Primipares	2 997	154 358	1 427 977	24,4
	Parité 2	2 988	114 103	1 039 180	27,3
	Parités 3 +	2 989	104 979	1 441 240	28,3

* CL : contrôle laitier ; [£] PL : production de lait

2. Diminution de la production de lait associée à l'exposition au BTV-8

L'exposition au BTV-8 est associée à une forte diminution de la production de lait autour de la date d'exposition du troupeau. Les variations estimées de la production de lait par contrôle laitier sont représentées Figure 2 en fonction de l'intervalle de temps entre le contrôle et la date d'exposition du troupeau pour les vaches en deuxième lactation dans les troupeaux foyers situés dans les cantons les plus exposés. Les abscisses négatives et positives correspondent aux contrôles laitiers réalisés avant et après la date d'exposition du troupeau, respectivement. La diminution de la production de lait persiste longtemps après la date d'exposition du troupeau. A partir de 120 jours après cette date, la production de lait se stabilise puis diminue de nouveau pour les contrôles réalisés à partir de 200 jours. Le début de la diminution de la production de lait correspond aux contrôles laitiers réalisés à partir de 150 jours avant la date d'exposition du troupeau. Deux diminutions marquées de la production de lait sont à noter, correspondant aux contrôles réalisés 126 et 63 jours avant la date d'exposition du troupeau. La diminution maximale de la production de lait par contrôle laitier

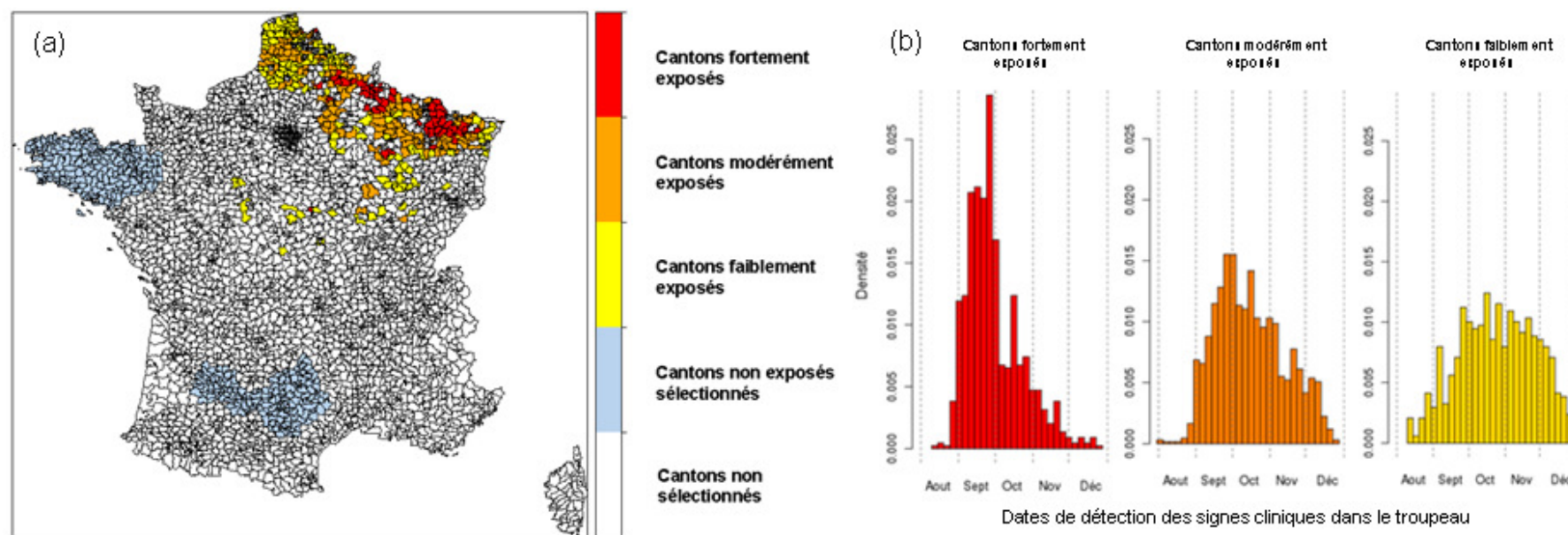


Figure 1: (a) Classification des cantons selon le niveau d'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) et localisation des cantons non exposés sélectionnés en 2007 ; France. (b) Distribution des dates de détection des signes cliniques dans le troupeau selon le niveau d'exposition au BTV-8 du canton. Le niveau d'exposition a été attribué selon la valeur du pic d'incidence mensuelle de foyers bovins. Cantons fortement exposés: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.25 ; cantons modérément exposés: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.10 et < 0.25 ; cantons faiblement exposés: cantons avec un pic d'incidence mensuelle < 0.10 ; cantons non exposés sélectionnés : cantons où aucun foyer bovin de BTV-1 ou BTV-8 n'a été rapporté en 2007 et localisés en Bretagne ou dans la région du sud-ouest de la France; cantons non sélectionnés: cantons exposés ou non exposés qui n'ont pas été sélectionnés dans les analyses

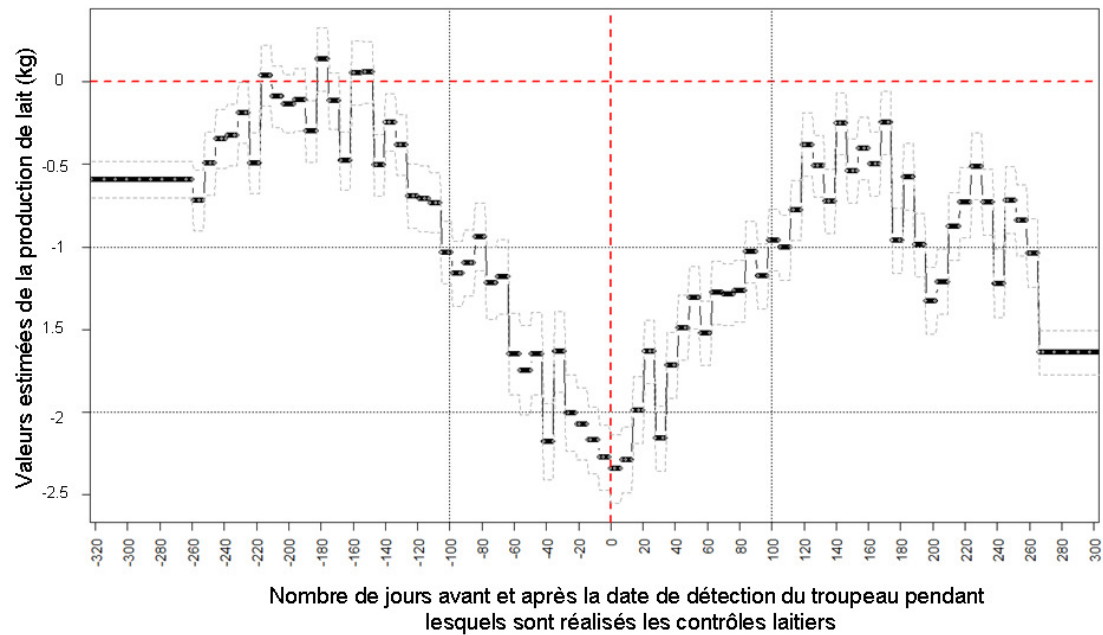


Figure 2. Variations estimées de la production de lait (en kg) par contrôles laitiers (et intervalles de confiance à 95%) autour de la date d'exposition du troupeau pour les vaches de parité 2 dans les troupeaux situés dans les cantons fortement exposés (population exposée : 15 754 vaches dans 873 troupeaux ; population non exposée : 164 854 vaches dans 2974 troupeaux)

est de 2,3 kg, et correspond aux contrôles réalisés la semaine suivant la date d'exposition du troupeau. Du fait du faible nombre de contrôles laitiers réalisés 260 jours avant et après la date d'exposition du troupeau, les contrôles ont été regroupés en 2 modalités (plus de 260 avant et plus de 260 jours après la date d'exposition), ce qui explique que les intervalles de confiance soient resserrés autour de la valeur estimée de production de lait.

Afin de tester la robustesse des résultats et de limiter les possibles biais de sélection, une deuxième population de vaches de référence appartenant aux troupeaux situés dans des zones non exposées en 2007 (Bretagne et sud-ouest) a été sélectionnée (résultats non présentés). La forme de la courbe des valeurs estimées de production de lait est similaire.

Toutes les variables d'ajustement ont un effet significatif sur la production de lait, conformément aux connaissances antérieures, avec des amplitudes de variations importantes par rapport à l'effet de l'exposition au BTV-8 (Bareille et al., 2003. Beudeau et al., 2007. Fourichon et al., 1999). La production de lait aux contrôles réalisés entre janvier et mai est supérieure à celle aux contrôles réalisés entre juin et décembre (Figure 3). L'évolution de la production laitière au cours de la lactation est conforme avec les connaissances biologiques.

Les valeurs de la production de lait par contrôle varient entre 35 kg au pic de production (environ un mois après le vêlage) et 17,4 kg en fin de lactation. La production de lait augmente avec la valeur de l'index laitier (coefficient de régression=0,05). Dans l'échantillon étudié, l'amplitude maximum de variation de la production de lait associée aux différences d'index vaut 11 kg. Chez les primipares, la production de lait augmente avec l'âge au vêlage (coefficient de régression=0,08).

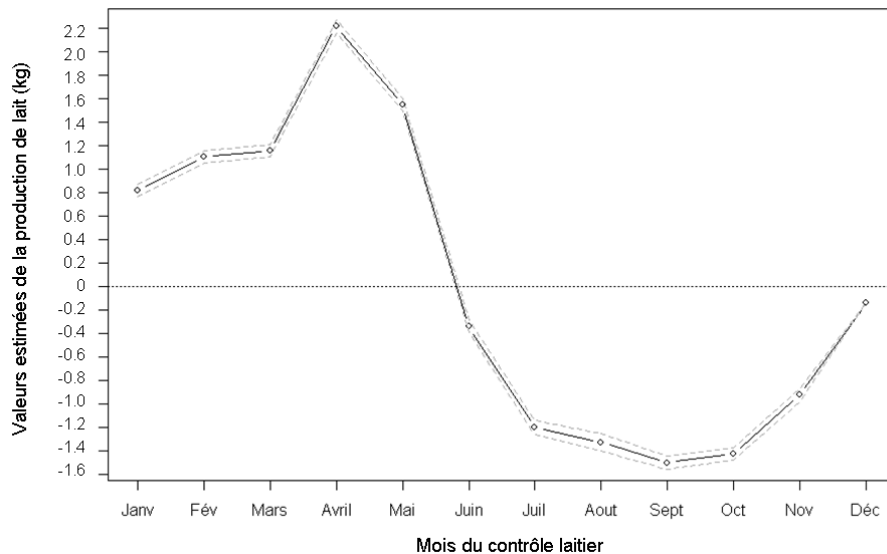


Figure 3. Variations estimées de la production de lait (en kg) selon le mois du contrôle laitier (et intervalles de confiance à 95%) pour les vaches de parité 2 dans les troupeaux situés dans les cantons fortement exposés (180 608 vaches dans 3847 troupeaux)

3. Diminution de la production de lait associée à l'exposition au BTV-8 selon le mois d'exposition du troupeau

La figure 4 représente les variations estimées de production laitière en fonction de l'intervalle de temps entre le contrôle et la date d'exposition du troupeau pour chaque mois d'exposition. Les vaches en deuxième lactation dans les troupeaux foyers situés dans les cantons moyennement exposés ont été sélectionnées pour cette analyse en raison des trop faibles effectifs de troupeaux exposés en novembre et en décembre dans les cantons fortement exposés (Figure 1). L'amplitude de la diminution de production de lait est similaire selon le

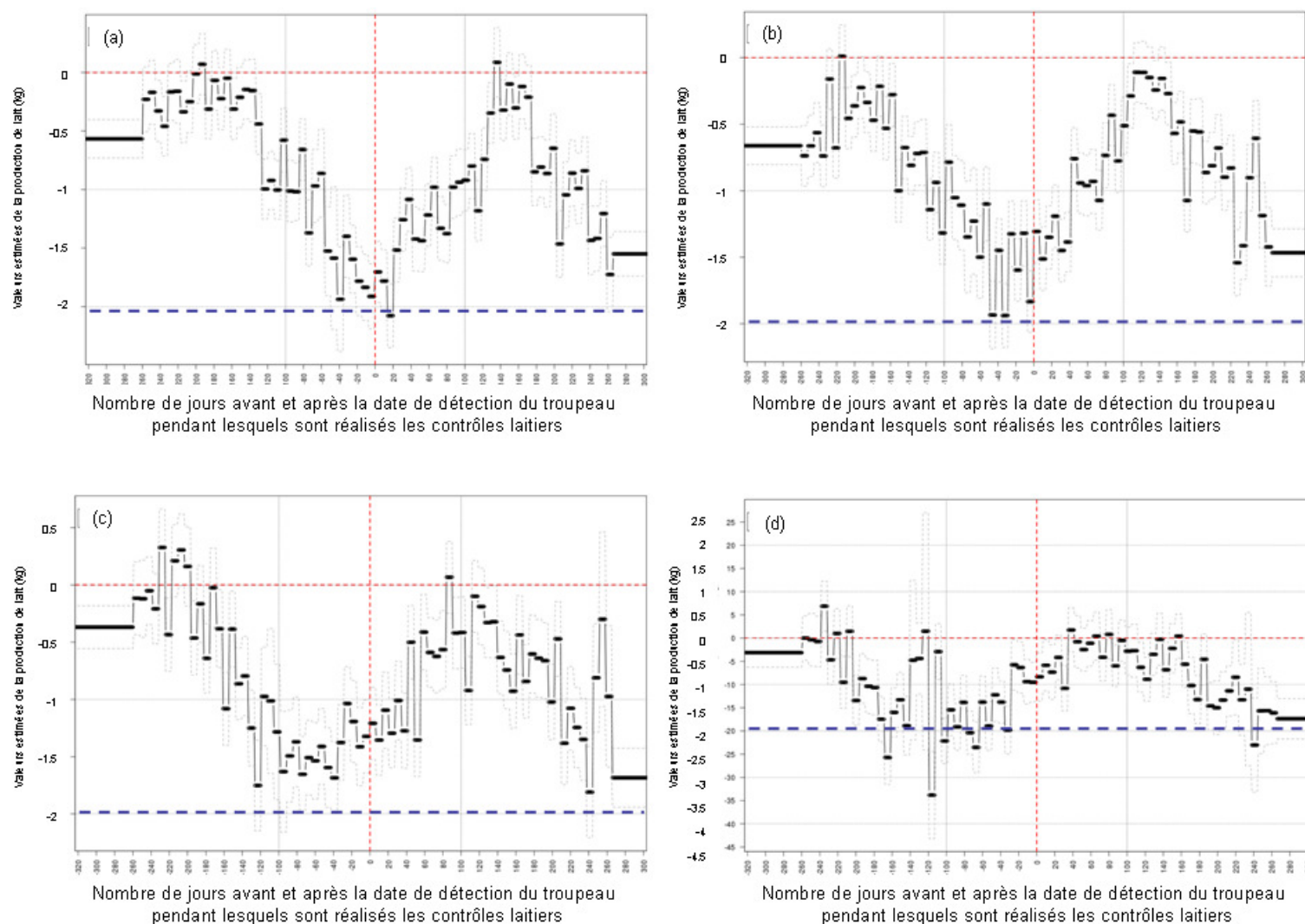


Figure 4. Variations estimées de la production de lait (en kg) par contrôles laitiers (et intervalles de confiance à 95%) autour de la date de détection de la maladie selon le mois de détection de la maladie dans le troupeau pour les vaches de parité 2 dans les troupeaux situés dans les cantons moyennement exposés ((a) détection en septembre : 7961 vaches dans 404 troupeaux ; (b) détection en octobre : 10 014 vaches dans 510 troupeaux ; (c) détection en novembre : 5450 vaches dans 266 troupeaux ; (d) détection en décembre : 2083 vaches dans 113 troupeaux ; population non exposée : 164 854 vaches dans 2974 troupeaux)

mois d'exposition. Cependant, la période de diminution de la production de lait est d'autant plus précoce par rapport à la date d'exposition du troupeau que l'exposition est tardive.

4. Diminution de la production de lait associée à l'exposition au BTV-8 selon le niveau d'exposition du canton

La figure 5 représente les variations estimées de la production laitière en fonction de l'intervalle de temps entre le contrôle et la date d'exposition du troupeau pour les vaches en deuxième lactation selon les trois niveaux d'exposition des cantons, quel que soit le mois d'exposition. L'amplitude de la diminution de la production de lait est plus grande pour les vaches des troupeaux foyers situés dans les cantons les plus exposés par rapport aux vaches des troupeaux foyers situés dans les cantons moyennement et faiblement exposés. La diminution de la production de lait est plus précoce pour les vaches des troupeaux foyers situés dans les cantons moyennement exposés. Enfin, il n'y a pas de diminution de la production de lait 2 mois avant la date d'exposition du troupeau pour les vaches des troupeaux foyers situés dans les cantons faiblement exposés.

5. Quantification des pertes cumulées de production de lait associées à l'exposition au BTV-8

Les pertes cumulées de production de lait associées à l'exposition au BTV-8 ont été quantifiées à partir des valeurs estimées par les modèles statistiques. Ces pertes dépendent de l'amplitude de l'effet de l'exposition et de la durée de cet effet. L'amplitude de l'effet dépend de la valeur de la production de référence. Au vu des estimations des pertes de production journalières, trois scénarios ont été envisagés, considérant la production de référence comme : (1) la production des vaches de troupeaux non exposés (Figure 6a), (2) la production de lait de vaches exposées 130 jours après la date d'exposition (Figure 6b) et (3) la production de lait de vaches exposées 100 jours avant la date d'exposition (Figure 6c). Les pertes de production ont été calculées sur une période de -63 jours avant à +118 jours après la date d'exposition du troupeau.

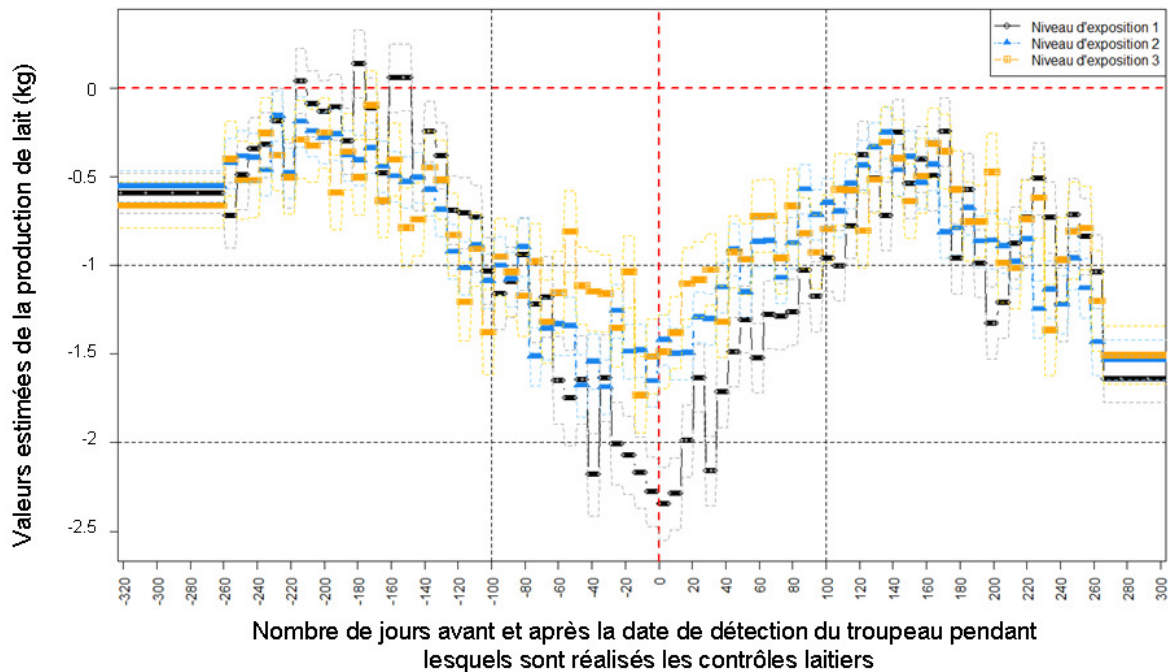


Figure 5. Variations estimées de la production de lait (en kg) par contrôles laitiers (et intervalles de confiance à 95%) autour de la date d'exposition du troupeau pour les vaches de parité 2 dans les troupeaux exposés, selon le niveau d'exposition du canton (population exposée dans cantons niveaux exposition 1 : 15 754 vaches dans 873 troupeaux ; population exposée dans cantons niveaux exposition 2 : 25 915 vaches dans 1315 troupeaux ; population exposée dans cantons niveaux exposition 3 : 12 373 vaches dans 657 troupeaux ; population non exposée : 164 854 vaches dans 2974 troupeaux). Niveau exposition 1: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.25 ; Niveau exposition 2: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.10 et < 0.25 ; Niveau exposition 3: cantons avec un pic d'incidence mensuelle < 0.10

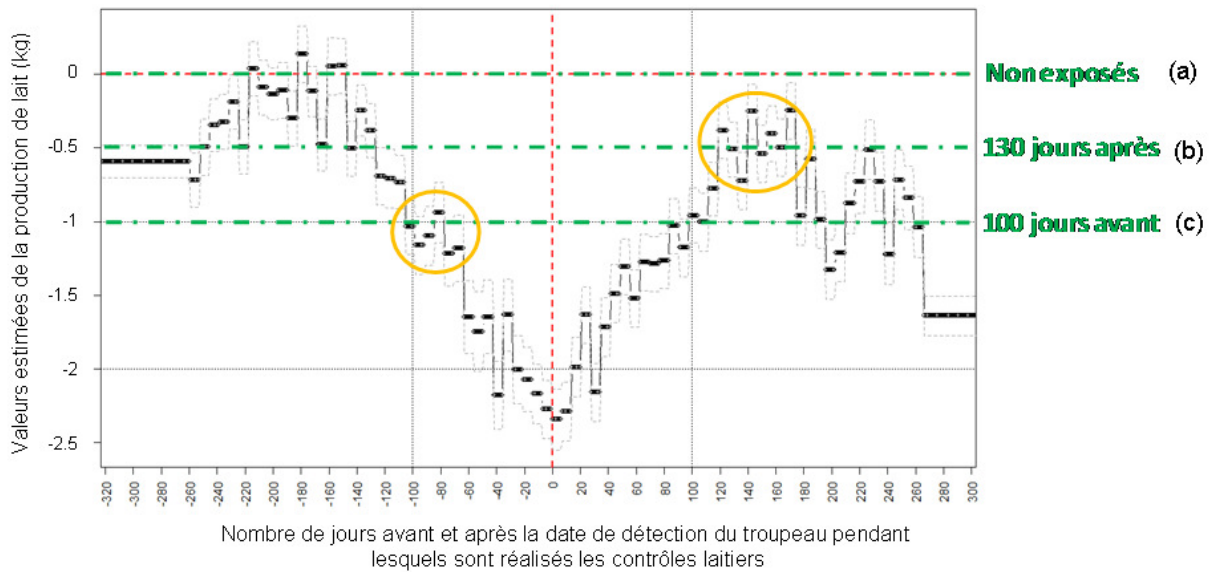


Figure 6. Définition du niveau de production de lait de référence selon les trois scénarios envisagés ; production de référence = (a) production des vaches de troupeaux non exposés ; (b) production de lait de vaches exposées 130 jours après la date d'exposition et (c) production de lait de vaches exposées 100 jours avant la date d'exposition. La courbe correspond aux variations estimées de la production de lait (en kg) par contrôles laitiers (et intervalles de confiance à 95%) autour de la date d'exposition du troupeau pour les vaches de parité 2 dans les troupeaux situés dans les cantons fortement exposés

Le tableau 2 présente les estimations des pertes cumulées de production de lait entre 63 avant et 118 jours après la date d'exposition du troupeau selon la parité pour les vaches des troupeaux situés dans les cantons les plus exposés. Les pertes ont été calculées en sommant l'intercept de chaque modèle aux valeurs estimées de l'effet du stade de lactation sur la production de lait et en les cumulant sur les 305 premiers jours de lactation. La perte de production laitière estimée pour les primipares est plus faible que pour les multipares. Les pertes moyennes estimées pour les animaux de parité 2 et les animaux de parité 3 et plus sont très proches. Dans le scénario le plus pessimiste (production de référence = production des vaches non exposées), les animaux des troupeaux les plus exposés ont perdu en moyenne 3,4% de leur production totale, quelle que soit la classe de parité considérée, et 2,8% pour l'ensemble des vaches appartenant aux troupeaux exposés. Dans le scénario le plus conservateur (production de référence = production des vaches exposées 100 jours avant la

date d'exposition), les animaux des troupeaux les plus exposés ont perdu en moyenne 1,2% de leur production totale. Les pertes cumulées ont également été rapportées à la production cumulée sur la durée définie de l'effet de l'exposition, à savoir 182 jours. Sur cette période, la perte moyenne de production atteint 6% dans le scénario le plus pessimiste.

Tableau 2. Pertes cumulées de la production laitière associées à l'exposition au BTV-8 chez l'ensemble des vaches des troupeaux exposés situés dans les cantons fortement exposés selon les trois niveaux de production de lait de référence considérés (population exposée : 46 405 vaches dans 890 troupeaux ; population non exposée : 164 854 vaches dans 2974 troupeaux)

Production de lait de référence	Non exposées*	130 jours après**	100 jours avant***	
Parité	Production moyenne à 305 jours (kg)	Pertes cumulées (kg) et pertes rapportées à la production moyenne à 305 jours (%)		
Primipares	7 240	249 (3,4)	158 (2,2)	67 (0,9)
Parité 2	8 291	298 (3,6)	207 (2,5)	116 (1,4)
Parités 3+	9 015	293(3,2)	202 (2,2)	111 (1,2)

* Non exposées : production de référence = production des vaches de troupeaux non exposés

** 130 jours après : production de référence = production de lait de vaches exposées 130 jours après la date d'exposition

*** 100 jours avant : production de référence = production de lait de vaches exposées 100 jours avant la date d'exposition

La Figure 7 présente une estimation des pertes cumulées de production de lait associées à l'exposition au BTV-8 entre 63 avant et 118 jours après la date d'exposition du troupeau selon le niveau d'exposition du canton et le mois d'exposition du troupeau pour les vaches de parité 2. Quel que soit l'incidence de l'infection au BTV-8 dans le canton, les pertes estimées sont d'autant plus faibles que le mois d'exposition est tardif (299, 249, 218, 159 et 128 kg pour les vaches appartenant aux troupeaux détectés en août, septembre, octobre, novembre et décembre, respectivement). Plus l'incidence de l'infection dans le canton est élevée, plus les pertes de production associées à l'exposition sont importantes, pour les troupeaux détectés de août à octobre.

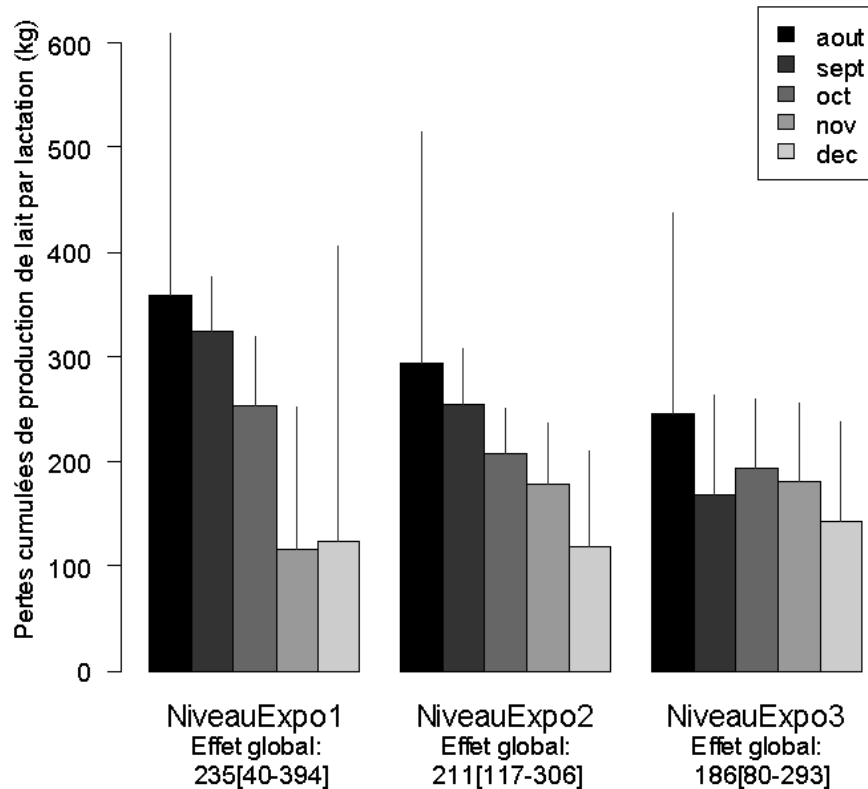


Figure 7. Pertes cumulées de la production laitière associées à l'exposition au BTV-8 entre 63 avant et 118 jours après la date d'exposition du troupeau selon le niveaux d'exposition du canton et le mois d'exposition du troupeau pour les vaches de parité 2 (production de référence = production des vaches de troupeaux non exposés) Niveau exposition 1: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.25 ; Niveau exposition 2: cantons avec un pic d'incidence mensuelle ≥ 0.10 et < 0.25 ; Niveau exposition 3: cantons avec un pic d'incidence mensuelle < 0.10

DISCUSSION

L'exposition au BTV-8 est associée à une forte diminution de la production de lait chez les vaches appartenant à des troupeaux antérieurement naïfs exposés au BTV-8 en 2007. Cette diminution a été mise en évidence sur une période de 6 mois autour de la date de détection de la maladie dans les troupeaux foyers. La diminution maximale de la production de lait par contrôle laitier est de 2,3 kg, et correspond aux contrôles réalisés la semaine suivant la date de détection de la maladie dans le troupeau. Pour les vaches dans des troupeaux exposés tardivement durant l'épizootie, la période de diminution de la production de lait est plus précoce. Enfin, l'amplitude de la diminution de la production de lait est plus grande pour les vaches des troupeaux foyers situés dans les cantons les plus exposés par rapport aux vaches

dans des troupeaux foyers situés dans des cantons moins exposés. Les valeurs estimées correspondent à des effets moyens en condition naturelles d'exposition pour lesquels la proportion de vaches infectées par troupeau exposé était inconnue. Ces effets sous-estiment probablement l'effet de l'infection au niveau individuel, les prévalences intra-troupeaux étant vraisemblablement inférieures à 1, y compris dans les cantons les plus exposés.

Dès 126 jours avant la date de détection de la maladie, une diminution de la production de lait est mise en évidence. Cette diminution correspond à des contrôles réalisés majoritairement en mai 2007. Or, le BTV-8 n'a pas été détecté en mai dans la zone géographique étudiée. Il semble donc très peu probable qu'il y ait eu des troupeaux infectés à cette période là, la durée d'installation du cycle de transmission du virus étant relativement longue. Cet écart à la production de référence pourrait être liée à un facteur météorologique propre à l'année 2007 dans la région Nord-est de la France. Il a donc été considéré que l'effet sur la production de lait attribuable à l'exposition au BTV-8 commençait à partir de 63 jours avant la date de détection de la maladie dans les troupeaux détectés précocement. Ce résultat suggère qu'une circulation virale a eu lieu avant la détection des signes cliniques dans les troupeaux exposés. En effet, la date de détection des signes cliniques ne correspond pas à la date de la première infection dans un troupeau exposé. L'intervalle entre la première infection et la date de détection des signes cliniques dépend du délai d'expression clinique de la maladie dans le troupeau et du délai de détection des signes cliniques par l'éleveur. Des variations de la production de lait ont été mises en évidence jusqu'à un mois avant la date de séroconversion pour des vaches infectées au BTV-8 aux Pays-Bas en 2008 (Santman-Berends et al, 2011). L'étude de l'effet de l'exposition au BTV-8 sur la fertilité a montré des variations de fertilité 1 mois avant la date de détection de la maladie dans les troupeaux détectés précocement (Nusinovici et al, soumis).

La stabilisation de la production de lait à partir de 118 jours après la date de détection de la maladie dans le troupeau a été considéré comme la fin de l'effet de l'exposition. Cette durée d'effet peut s'expliquer par la persistance de l'effet de l'infection au niveau individuel et par le temps nécessaire au virus pour se diffuser au sein d'un troupeau exposé. La persistance de l'effet pourrait être due au temps de guérison des signes cliniques affectant les trayons ou les mamelles des vaches ou des signes cliniques entraînant une diminution de l'ingestion d'aliments comme les congestions de la bouche ou les lésions podales. Cette durée est cohérente avec la durée de la diminution de la production de lait associée à l'exposition au virus de la maladie hémorragique épizootique (du même genre *Orbivirus* que le BTV). Les vaches exposées au début de l'épizootie ont montré une baisse significative de leur production

de lait durant les 4 mois suivants l'apparition du virus (Kedmi et al., 2010). Le fait qu'aucune diminution de la production de lait n'ait été observé chez les vaches infectées par le BTV-8 après la date de séroconversion s'explique probablement par l'absence d'expression clinique de ces vaches.

La diminution de production de lait observée plus de 260 jours après la date de détection de la maladie pourrait correspondre à la ré émergence du virus en 2008. En effet, les contrôles laitiers concernés par cette diminution ont été réalisés majoritairement pendant la période de circulation du virus en 2008, entre juillet 2008 et janvier 2009.

L'effet de l'exposition varie selon le mois de détection de la maladie dans les troupeaux exposés. Les pertes de production laitière plus faibles associées aux détections tardives pourraient résulter de la diminution de la prévalence intra-troupeau au cours de l'épizootie. En effet, le mois de décembre correspond à la fin de l'épizootie car c'est le début de l'inactivité vectorielle. Cependant, les pertes cumulées ont été calculées sur la même période (entre 63 jours avant et 118 jours après la date de détection de la maladie) alors que cette période varie selon le mois de détection de la maladie dans le troupeau. Le fait que la diminution de la production de lait soit plus précoce dans les troupeaux foyers détectés tardivement suggère que la détection des signes cliniques de la maladie a été retardée dans ces foyers. Ce résultat est cohérent avec les effets de l'exposition au BTV-8 en 2007 sur la fertilité de vaches laitières (Nusinovici et al., soumis). Des diminutions de la fertilité ont été quantifiées plus de 2 mois avant la date de détection des signes cliniques dans les troupeaux détectés en novembre et en décembre, alors que dans les foyers détectés en septembre, cette diminution commençait 4 semaines avant la date de détection de la maladie. Enfin, l'étude visant à quantifier les effets de l'exposition au virus de la maladie hémorragique épizootique a également mis en évidence une durée d'effet plus courte pour les vaches exposées plus tardivement. Bien que l'effet précédant la période d'exposition n'ait pas été testé, ce résultat pourrait résulter d'un décalage de la période de diminution de la production de lait pour ces vaches exposées plus tardivement (Kedmi et al., 2010).

L'effet global de l'exposition sur la production de lait est plus fort dans les troupeaux foyers situés dans les cantons les plus exposés. La différence d'effet selon le niveau d'exposition à une échelle locale pourrait être due à la prévalence intra-troupeau plus élevée dans les cantons les plus exposés. Cette différence pourrait également être due à une quantité de virus inoculée plus élevée chez les vaches situées dans ces cantons. Cet effet du niveau d'exposition au niveau canton a été trouvé dans une étude quantifiant l'effet de l'exposition au BTV-8 en 2007 sur le risque d'avortement (Nusinovici et al., soumis). L'étude visant à quantifier les

effets de l'exposition au virus de la maladie hémorragique épizootique a également montré que les pertes moyennes de production estimées sont d'autant plus importantes que le niveau de séroprévalence intra-troupeau est élevé (Kedmi et al., 2010).

L'amplitude de l'effet de l'exposition au BTV-8 sur la production de lait dépend de la valeur de la production de référence. Comme la chute précoce de production de lait (plus de 2 mois avant la date de détection de la maladie) n'est vraisemblablement pas imputable à l'exposition au BTV-8, trois scénarios ont été envisagés afin d'estimer les pertes associées à l'exposition au BTV-8 selon différentes valeurs de la production de référence. Selon ces scénarios, la perte cumulée de production de lait est comprise entre 1,2 et 3,4% de la production annuelle. Si l'on considère le scénario le plus conservateur (production de référence = production des vaches exposées 100 jours avant la date d'exposition), la perte de production cumulée sur la durée d'exposition (6 mois) des vaches de parité 2 situés dans les cantons faiblement exposés est de 7 kg (baisse non significative). Etant donné qu'au moins un animal a présenté des signes clinique de la maladie dans le troupeau, la baisse de production correspondant à ce scénario semble donc peu plausible. Une étude Néerlandaise a mis en évidence une perte de production moyenne associée à des infections au BTV-8 qui représente moins de 1% de la production totale pendant une lactation (Santman-Berends et al., 2011). Ces valeurs sont plus faibles que celles trouvées dans notre étude probablement car aucune des vaches ayant séroconverti n'a présenté de signes cliniques.

Afin de vérifier que la diminution de production de lait est bien attribuable à l'exposition, et non à des facteurs environnementaux, il a été vérifié qu'il n'y a pas de variation du même ordre de grandeur en l'absence d'exposition. La production de lait des vaches avant l'exposition a été quantifiée autour de dates de mêmes répartition que les dates d'exposition observées (dates « fictives » d'exposition), en comparaison à la production de lait des vaches appartenant à des troupeaux non exposés en 2007. Les variations mises en évidence sont de faible amplitude avec des intervalles de confiance centrés autour de zéro.

Une deuxième population de référence a été utilisée afin de tester la robustesse des résultats et de limiter les possibles biais de sélection. Le fait que l'on retrouve la même forme de la diminution de la production de lait autour de la date de détection de la maladie montre la robustesse des résultats (résultats non présentés).

L'exposition au virus BTV-8 en conditions naturelles est associée à une diminution de production de lait chez les vaches de troupeaux bovins laitiers antérieurement naïfs, déclarés après suspicion clinique durant l'épizootie de 2007. La durée de l'effet a été estimée à 6 mois

autour de la date de détection des signes cliniques du troupeau, de 2 mois avant à 4 mois après. La perte cumulée de production de lait est estimée à environ 3% de la production de lait annuelle. Pour les vaches dans des troupeaux exposés tardivement durant l'épizootie, la période de l'effet est plus précoce, suggérant une détection retardée des signes cliniques dans ces troupeaux. Enfin, la diminution de la production de lait est plus grande pour les vaches des troupeaux foyers situés dans les cantons les plus exposés.

REFERENCES

- Bareille N., Beaudéau F., Billon S., Robert A., Favardin P. 2003. Effects of health disorders on feed intake and milk production in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.*, 83: 53-62.
- Beaudéau, F., M. Belliard, A. Joly, H. Seegers. 2007. Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) infection in dairy cows. *Vet. Res.* 38: 625-634
- Detilleux, J. C., Y. T. Grohn, and R. L. Quaas. 1994. Effects of clinical ketosis on test day milk yields in Finnish Ayrshire cattle. *J. Dairy Sci.* 77(11):3316-3323.
- Durand, B., G. Zanella, F. Biteau-Coroller, C. Locatelli, F. Baurier, C. Simon, E. Le Drean, J. Delaval, E. Prengere, V. Beaute, and H. Guis. 2010. Anatomy of Bluetongue Virus Serotype 8 Epizootic Wave, France, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 16(12):1861-1868.
- Elbers, A. R., A. N. van der Spek, and P. A. van Rijn. 2009. Epidemiologic characteristics of bluetongue virus serotype 8 laboratory-confirmed outbreaks in The Netherlands in 2007 and a comparison with the situation in 2006. *Prev. Vet. Med.* 92(1-2):1-8.
- Fourichon, C., H. Seegers, N. Bareille, and F. Beaudéau. 1999. Effects of disease on milk production in the dairy cow: a review. *Prev. Vet. Med.* 41(1):1-35.
- Grohn, Y. T., J. J. McDermott, Y. H. Schukken, J. A. Hertl, and S. W. Eicker. 1999. Analysis of correlated continuous repeated observations: modelling the effect of ketosis on milk yield in dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 39(2):137-153.
- Kedmi, M., M. Van Straten, E. Ezra, N. Galon, and E. Klement. 2010. Assessment of the productivity effects associated with epizootic hemorrhagic disease in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 93(6):2486-2495.
- Lescourret, F. and J. B. Coulon. 1994. Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77(8):2289-2301.

- Nusinovici, S., H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau, and C. Fourichon. Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds. Soumis.
- Nusinovici, S., H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau, and C. Fourichon. Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds. Soumis.
- Saegerman, C., D. Berkvens, and P. S. Mellor. 2008. Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg. Infect. Dis.* 14(4):539-544.
- Saegerman, C., P. Mellor, A. Uyttenhoef, J. B. Hanon, N. Kirschvink, E. Haubruge, P. Delcroix, J. Y. Houtain, P. Pourquier, F. Vandebussche, B. Verheyden, K. De Clercq, and G. Czaplicki. 2010. The most likely time and place of introduction of BTV8 into Belgian ruminants. *PloS One* 5(2):e9405.
- Santman-Berends, I. M., J. J. Hage, T. J. Lam, O. C. Sampimon, and G. van Schaik. 2011. The effect of bluetongue virus serotype 8 on milk production and somatic cell count in Dutch dairy cows in 2008. *J. Dairy Sci.* 94(3):1347-1354.
- Velthuis, A. G., H. W. Saatkamp, M. C. Mourits, A. A. de Koeijer, and A. R. Elbers. 2009. Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. *Prev. Vet. Med.* 93(4):294-304.

CHAPITRE 2

**Effet secondaire de la vaccination contre le virus de la
Bluetongue sérotype 8 sur la fertilité des vaches laitières**

Partie 1: Légère diminution de fertilité des vaches laitières associée à la vaccination contre le virus de la Bluetongue sérotype 8

A side effect of decreased fertility associated with vaccination against Bluetongue virus serotype 8 in Holstein dairy cows

S. Nusinovici, H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau, C. Fourichon

RESUME

Les vaccins inactivés ont été largement utilisés pour contrôler le virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) après son introduction en Europe du nord en 2006. Pour évaluer la vaccination, des connaissances sont nécessaires sur de possibles effets secondaires. L'hyperthermie est une réaction fréquemment observée après l'injection d'un vaccin inactivé. L'hyperthermie peut affecter les performances de reproduction. L'objectif de cette étude est de quantifier un possible effet secondaire de la vaccination en condition de terrain sur la fertilité des vaches laitières avant l'implantation de l'embryon.

Cette étude a été réalisée dans des troupeaux non exposés au BTV. La fertilité a été estimée à l'aide de taux de retours. Les hypothèses biologiques associées à un possible effet secondaire de la vaccination sur la fertilité sont l'échec de la fécondation et la mortalité embryonnaire. Les associations entre les taux de retours et les injections de vaccin ont été estimées à l'aide de modèles logistiques mixtes et de modèles de survie. Deux modèles ont été considérés : un modèle retours 3 semaines comparant les vaches vaccinées entre 3 jours avant et 16 jours après l'insémination artificielle (IA) avec les vaches non vaccinées (en supposant un effet sur l'échec de fécondation et sur la mortalité embryonnaire précoce), et un modèle retours 90 jours comparant les vaches vaccinées entre 3 jours avant et 42 jours après l'IA avec les vaches non vaccinées (en supposant un effet sur l'échec de fécondation, sur la mortalité embryonnaire précoce et tardive).

Seules les vaches ayant reçu une deuxième injection de vaccin entre 2 et 7 jours après l'IA ont une augmentation de risque de retours 3 semaines (RR=1,19 [1,07-1,33]). Cet effet correspond à une augmentation de 4 point de pourcent de retours 3 semaines. Cet effet secondaire pourrait être dû à une augmentation de la mortalité embryonnaire.

La comparaison des pertes de fertilité attribuables à la vaccination et à l'exposition au BTV-8 au niveau troupeau indique que l'impact de la vaccination sur la fertilité est très limité par rapport à celui de l'exposition.

A side effect of decreased fertility associated with vaccination against
Bluetongue virus serotype 8 in Holstein dairy cows

S. Nusinovici^{1,2*}, *H. Seegers*^{1,2,3}, *A. Joly*^{1,2}, *F. Beaudeau*^{1,2,3}, *C. Fourichon*^{1,2,3}

¹Oniris, UMR1300 Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, Nantes, France

²INRA, UMR1300 Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, Nantes, France

³LUNAM, Université Nantes, Angers, Le Mans, France

Published in Preventive Veterinary Medicine 101 (2011) 42-50

ABSTRACT

Inactivated virus vaccines have been widely used to control bluetongue after introduction of serotype 8 of the bluetongue virus (BTV) in northern Europe in 2006. To evaluate vaccination, quantitative knowledge of its possible side effects is needed. One current adverse reaction with inactivated vaccines is a rise in body temperature, which could reduce cow reproductive performance. The objective of this study was to quantify a possible side effect of vaccination on fertility before the implantation of the embryo of dairy cows under field conditions. The study was performed on herds that were not exposed to BTV. Fertility was assessed by return-to-service following artificial insemination (AI). Biological assumptions for a possible side effect of vaccination were conception failure and embryonic death. Associations between return-to-service rates and vaccine injections were assessed using mixed-logistic regression models and survival analysis. Two models were considered: a 3-week-return-to-service model comparing cows vaccinated between 3 days before and 16 days after AI and unvaccinated cows (assuming an effect on conception failure or early embryonic death), and a 90-day-return-to-service model comparing cows vaccinated between 3 days before and 42 days after AI and unvaccinated cows (assuming an effect on conception failure, early or late embryonic death). Only cows receiving a second vaccine injection between 2 and 7 days after AI had a significantly higher risk of 3-week-return-to-service (RR = 1.19 [1.07 – 1.33]). This corresponds to an increase of return-to-service by 4 percentage points. A side effect of vaccination could be due to early embryonic death. The slight side effect on fertility associated with vaccination was low compared to effects of BTV-8 exposure on fertility.

INTRODUCTION

Bluetongue (BT) is a non-contagious, insect-transmitted disease of domestic and wild ruminants caused by the bluetongue virus (BTV). BT has a heavy economic impact, mainly due to the disease effect on animals and to the disruption of international animal trade. (Saegerman et al., 2008). In Mediterranean Europe, five different BTV serotypes have been spreading, mainly since 1998, and BTV serotype 8 emerged in northern Europe in 2006 (Savini et al., 2008). In continental France, two BTV serotypes (serotypes 1 and 8) have been spreading since 2007. In order to control the progression of the disease in cattle and sheep herds, annual vaccination campaigns, voluntary in 2008 against BTV-8 and compulsory in 2009 and 2010 against BTV-8 and BTV-1, have been implemented.

Vaccination is considered as the most practical and effective control measure against BTV. The aim of vaccinating against BTV is to limit direct losses, minimize the circulation of BTV, and allow the safe movement of animals (Savini et al., 2008). Both attenuated and inactivated vaccines have been used after the emergence of BTV in non-endemic areas. To evaluate BTV vaccination programs, an appraisal of both protection provided and possible side effects is needed. Although live attenuated vaccines can generate strong protective immunity, they also are known to provoke side effects, including teratological effects, depressed milk production and abortion in vaccinated animals (Veronesi et al., 2005; Saegerman et al., 2007). Inactivated virus vaccines have been used widely in Europe since 2005. Based on clinical and virological data as well as on immunogenicity, inactivated virus vaccines are considered highly efficacious (Di Emidio et al., 2004; Savini et al., 2008; Schwartz-Cornil et al., 2008). Experimental studies have demonstrated that inactivated vaccines against BTV-2 and BTV-4 are very well tolerated in both sheep (Hamers et al., 2009) and cattle (Di Emidio et al., 2004; Savini et al., 2009). These results were based on the monitoring of systemic reactions such as fever or weight loss, abortions, anaphylactic shock and local reactions at the inoculation site. However, very few studies have been conducted to assess vaccination safety in field conditions. A field study conducted in Germany on sheep and cattle using three different BTV-8 vaccines demonstrated a high level of safety of the BTV-8 vaccination. General health condition, injection site reactions, abortions, teratogenic defects, milk production and somatic cell count were monitored. Following the second vaccine injection, several sheep developed distinct local reactions and a temporary rise in body temperature (Gethmann et al., 2009). Based on adverse events reports, a review of the safety data of the field use of inactivated BTV-8 vaccines during the mass 2008 vaccination campaign carried out in 12 European

countries was performed (European Medicines Agency, 2009). These pharmacovigilance data were consistent with the overall good safety record for all vaccines used. A very low frequency of adverse effects, including abortions, spontaneous death, some effects on milk production and injection site reactions were reported.

Vaccination also could impair fertility through a systemic reaction due to the immunisation (inducing hyperthermia) or stress caused by the manipulation of animals. Thermal stress can affect many reproductive parameters in cows including oocyte quality (leading to a possible higher conception failure), embryo development and increased embryo mortality (Wolfenson et al., 2000; Hansen et al., 2001; Bridges et al., 2005). Before becoming implanted in the uterus, embryos are fragile and particularly sensitive to factors such as hyperthermia or stress (Hansen et al., 2001). This could result in an increase in the return-to-oestrus rate in cows vaccinated around the time of AI or before the implantation of the embryo.

If such an adverse effect does exist, it may not have been reported in pharmacovigilance data for several reasons: (i) the time-lag between the vaccination and the return-to-oestrus may be long, (ii) such an effect might be small and might not systematically occur and (iii) return-to-oestrus is very frequent and highly multifactorial. The objective of this study was to quantify a possible side effect of vaccination against BTV-8 using inactivated vaccines on the fertility of dairy cows in field conditions. Cows were assumed to be exposed to a possible side effect of vaccination according to the interval between artificial insemination (AI) and vaccination. This study focused on the possible effect of vaccination before the implantation of the embryo.

MATERIALS AND METHODS

1. General study design and available data

The general design of this study involved the comparison of the reproductive performance of vaccinated and unvaccinated dairy cows, none of which were exposed to BTV-1 or BTV-8 during 2008. Cows were selected from herds located in Brittany (western France) for two reasons: vaccination data were available and BTV exposure in this region was low in 2008, with some areas free of reported cases at the end of 2008.

Three vaccines were used in Brittany during the 2008 voluntary vaccination campaign against BTV-8: Bovilis[®] BTV8 (Intervet, The Netherlands), BTVPUR[®] Alsap 8 (Merial, France); and Zulvac[®] 8 Bovis (Fort Dodge, The Netherlands). For bovines, vaccine administration involves two injections. The second injection was performed 21 days after the first for Bovilis[®] BTV8

and Zulvac[®] 8 Bovis, and 28 days for BTVPUR[®] Alsap 8. Vaccination data, which included the date of the second vaccine injection and the vaccine name, were collected for each cow by a regional farmers' organization (UBGDS - Union Bretonne des Groupements de Défense Sanitaire).

The performance data were obtained from herds enrolled in the official Milk Recording Scheme that used artificial insemination in 2008. Available data were AI date, inseminator, bull identification number, cow and bull breeds, lactation number, calving date, milk data at each milk record (record date, milk yield, protein content, fat content and somatic cell count) and date and cause of culling.

Information about BTV-1 and BTV-8 exposure of herds during 2008 was obtained from the official French surveillance system. For each reported case herd, available data were dates of suspicion (date of clinical suspicion or date of blood sampling in case of animals sale or transfer) and dates of confirmation (dates of the results of diagnostic tests), BTV serotypes and ruminant species.

2. Data selection in relation to BTV exposure and vaccination

The first step was the selection of herds that were not exposed to BTV. In France, diagnostic tests were performed in case of BTV clinical suspicion by the farmer or the veterinarian, and in case of animal sale or transfer. Most BT infections in cattle are subclinical (Elbers et al., 2008; Durand et al., 2010). Therefore, this surveillance system probably led to under-reporting of infected herds. A strategy based on the spatial distribution of reported herds consequently was applied to define unexposed cantons (French districts) in Brittany during 2008. There was an average of 84 cattle herds per canton in Brittany in 2008. A herd was considered unexposed if it was located in a canton where no BTV-1 or BTV-8 bovine or ovine case was reported during 2008. Herds located in unexposed cantons that were surrounded entirely by exposed cantons (where at least one outbreak was reported in 2008) were excluded from the study population. Overall 150,891 cows in 3,360 herds were selected from the 15,000 herds for which performance data were available.

Only cows vaccinated before December 15, 2008 were selected because after this date, the vaccination program became mandatory. Only 28 cows were vaccinated with BTVPUR[®] Alsap 8, out of the 740,000 vaccinated cows in Brittany. For cows vaccinated with this

vaccine, the interval between the two vaccine injections was four weeks. These data were thus simply excluded.

3. Assessment of reproductive performances and data selection in relation to reproductive performances

Reproductive performance was assessed by the occurrence of a repeat AI. The date of a cow insemination after a calving depends on farmers. In Brittany, AI are generally not synchronized. It usually is recommended to wait at least 50 days post calving before inseminating cows. In case of a return-to-oestrus after AI, a new insemination is needed. In the study area, the great majority of the farmers pay a fixed price for 3 AI for each cow in the same lactation. They therefore pay the same price whether 1, 2 or 3 AI are performed per cow. If a fourth insemination is needed, the farmer must decide whether or not to pay for a new round. In such a context, the occurrence of a repeat AI (return-to-service) after a first or a second AI can be used as an indicator of fertility. Such a fertility indicator already has been used in several studies to quantify the detrimental effect of disease on reproductive performances (Robert et al., 2004; Malher et al., 2006; Marce et al., 2009; Santman-Berends et al., 2010).

There are three causes of return-to-service before the implantation of an embryo: conception failure, early embryonic death (before 16 days) and late embryonic death (after 16 days). In case of conception failure and early embryonic death, the oestrus cycle is not modified and thus still lasts three weeks. Therefore, both conception failure and early embryonic death lead to a new heat 3 weeks after AI, and, if the heat is detected, a 3-week-return-to-service. A 3-week-return-to-service was defined as a return-to-service occurring between 18 and 26 days after AI. A late embryonic death leads to a longer oestrus cycle and thus is followed by a late return-to-service, defined here by a return-to-service occurring after 26 days post AI. If a new heat 3 weeks after AI is not detected, that would lead as well to a late return-to-service. Therefore, both late embryonic death and missed heat 3 weeks after AI lead to a late return-to-service.

Classification bias for reproductive status can occur when cows are culled before the next calving. Their pregnancy status at culling is not routinely available. In the study, cows culled within 250 days following AI were excluded from analysis because their pregnancy status was uncertain, whereas we assumed that cows kept more than 250 days after AI were likely to be pregnant. Cows with missing data (lactation number, herd identification, milk yield or date of

record) or lactations with non-plausible or extreme data were excluded: calving to first AI interval <35 days or >180 days, AI to calving interval >297 days or <175 days (abortions are less likely to be detected and recorded below 175 days), interval between AI >200 days or <3 days, interval between two milk test-days >85 days or <20 days, peak milk yield (expressed as the maximum at the three first milk records) >60 kg/day and minimum Protein:Fat Content ratio out of the first three milk records >1.5. Herds with unusual management (unusual demographic structure, delayed first service) or herds suspected of using a bull also were excluded. Only data from Holstein cows inseminated with semen from Holstein bulls (84% of the population) were selected because there is a strong effect of breed on reproductive performances (Heins et al., 2006; Lucy, 2007). Heifers were excluded because their fertility differs from that of cows (Raheja et al., 1989). After these exclusions, the study population was composed of 74,238 cows in 2,573 herds in 2008.

4. Comparison of reproductive performances between vaccinated and unvaccinated cows

It was assumed in this study that if vaccination has a side effect on cattle fertility, the effect would occur within a few days (i.e. failure to conceive or death of the embryo). In addition, the effect could differ depending on the time interval between AI and vaccination.

In order to test an effect of vaccination on conception failure or early embryonic death, a comparison of 3-week-return-to-service rates was performed between cows vaccinated between 3 days before and 16 days after the AI and unvaccinated cows (3-week-return-to-service model). The vaccinated cows were divided into three categories according to the time interval between when they underwent AI and vaccination. Categories were constituted as follows: from 3 days before to 1 day after AI (assuming an effect on conception failure), from 2 to 7 days after AI (assuming an effect on the embryo viability in its first week) and from 8 to 16 days after AI (assuming an effect on the embryo viability in its second week). The first and second vaccine injections could differ due to the fact that the second manipulation is likely to be more stressful for animals. Given the short time interval of interest between AI and vaccination in this model and the time interval between the two vaccine injections, two analyses were conducted separately after each vaccine injection. Three categories of vaccinated cows were considered for each analysis. Nevertheless, effect of the second vaccine injection cannot be studied fully independently of the first one due to the fact that a residual

effect of the first vaccine injection, if any, could be detected after the date of the second vaccine injection (3 weeks after AI).

A more general model was considered in order to take into account a possible effect of vaccination on conception failure and early and late embryonic death. In this second model, vaccination was considered as a single process including two injections. Moreover, this model made it possible to take into account the return-to-service occurring more than 26 days after AI in case of undetected heat after a conception failure or an early embryonic death. Only animals having received the two vaccine injections before 42 days after the AI were selected. The 42nd day of pregnancy was considered as the physiological upper bound for the implantation of the embryo. This analysis involved the comparison of the whole return-to-service rate occurring between 5 days after the second injection and 90 days after AI (90-day-return-to-service model). If vaccination results in the loss of the embryo, it is assumed that 5 days is the minimum delay for the observation of a return-to-service. Moreover, the majority of return-to-service occurs within 90 days after AI (Figure 1). Three categories were considered in order to take into account the time interval between AI and vaccination (Figure 2). In the first category (category a), the second vaccine injection was administered between 3 days before and 17 days after AI (corresponding to a first vaccine injection more than 3 days before AI). In this case, the assumption tested was an increase in conception failure or early embryonic death associated with the second vaccine injection. In the second category (category b), the second vaccine injection was administered between 18 and 36 days after AI (first vaccine injection between 3 days before and 15 days after AI). In this case, the assumptions tested were an increase in conception failure or early embryonic death leading to an undetected oestrus associated with the first vaccine injection or an increase in late embryonic death associated with the second vaccine injection. For the last category (category c), the second vaccine injection was administered between 37 and 42 days after AI (first vaccine injection between 16 and 21 days after AI). In this case, the assumption tested was an increase in late embryonic death associated with the first or second vaccine injection.

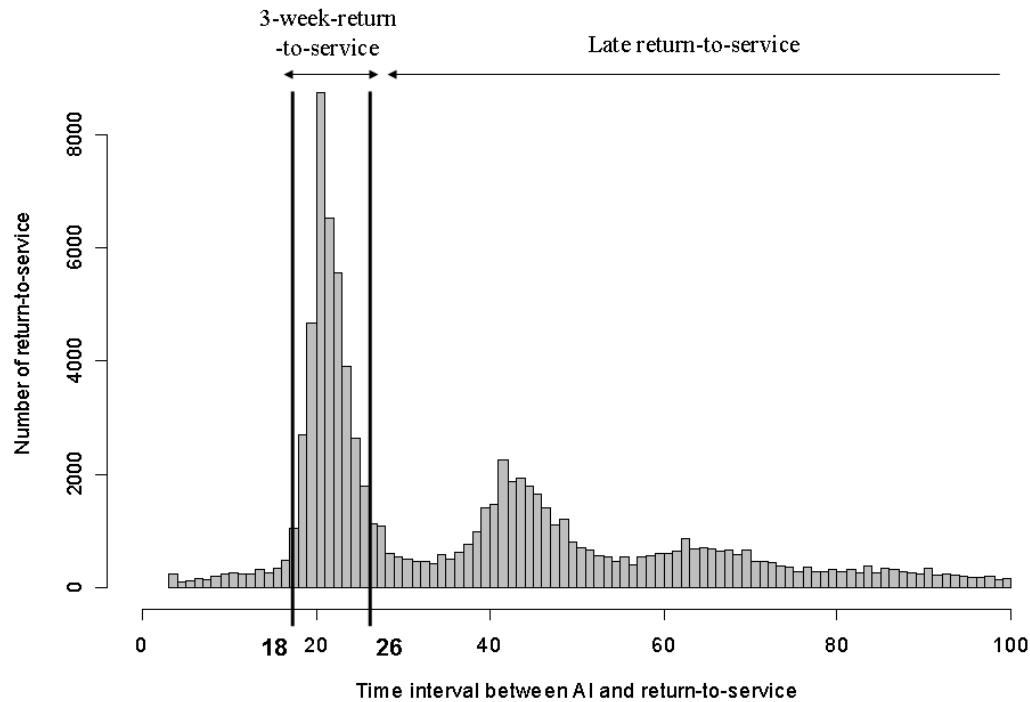


Figure 1. Distribution of the time interval between AI and return-to-service in Holstein dairy cows (102,178 first or second AI performed in 74,238 cows in 2,573 dairy herds unexposed to Bluetongue virus; 2008; Brittany; France)

5. Selection of unvaccinated cows

Studies conducted in the same geographic area have shown that there is an effect associated with month of AI on reproductive performance (Malher et al., 2006; Marce et al., 2009). Consequently, unvaccinated cows were selected according to the date of AI so that both vaccinated and unvaccinated cows underwent AI during the same period in 2008.

The length of return-to-service observation periods for vaccinated and unvaccinated cows had to be identical to allow an unbiased comparison. Indeed, the probability of observing a return-to-service is highly correlated with the length of the observation period, independently of vaccination. In the 3-week-return-to-service model, this observation period was between 18 and 26 days after AI for both groups. In the 90-day-return-to-service model, the return-to-service observation period was determined by the vaccination dates of the vaccinated cows, with the period beginning 5 days after the second injection. This procedure could not be followed to determine the start of the observation period for the unvaccinated cows.

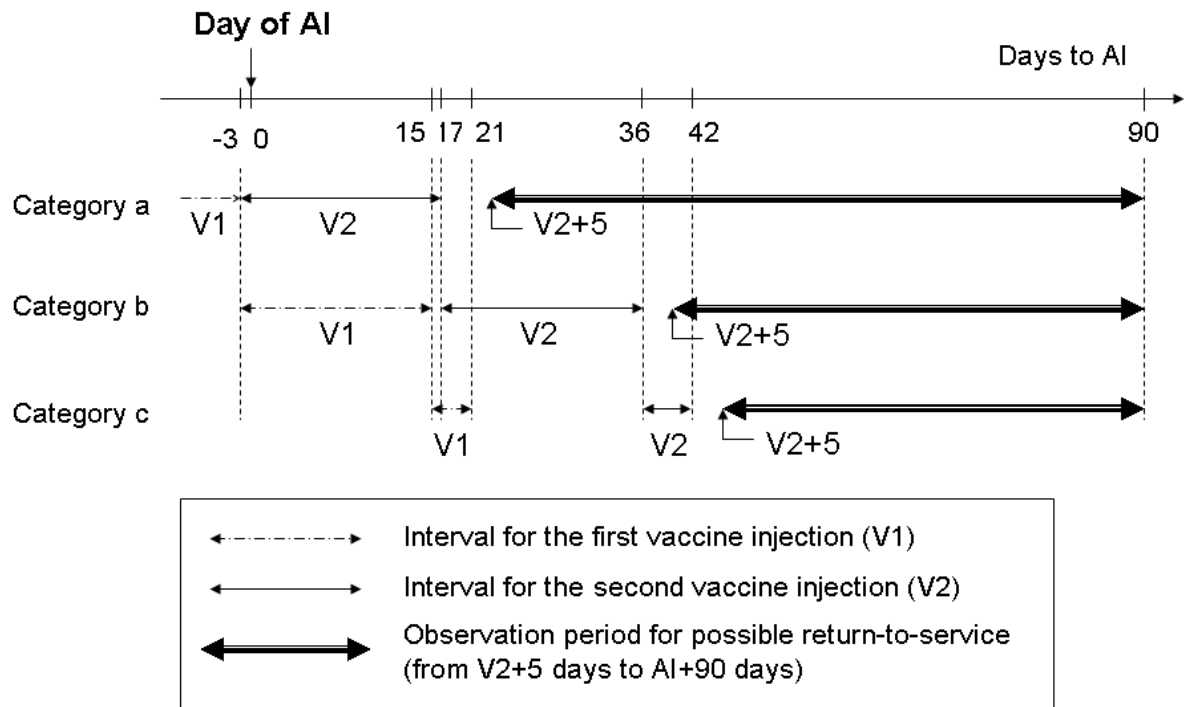


Figure 2. Classification into three categories (a, b, c) of vaccinated cows according to the time interval between artificial insemination (AI) and vaccine injections (interval between two vaccine injections = 21 days), and corresponding return-to-service observation period occurring within 90 days after AI. Observation period started five days after second vaccine injections and lasted until 90 days after AI. In the figure, the latest possible starts of observation periods are represented (\uparrow).

Therefore, observation periods for unvaccinated cows were determined through a multi-step process. A first or second AI from unvaccinated cow was selected at random for each vaccinated cow. A date for the beginning of the observation period was assigned to this AI corresponding to the start of the observation period for the matched vaccinated cow. For both vaccinated and unvaccinated populations, AI followed by a return-to-service before the observation periods were excluded. The selection of AI from unvaccinated cows and statistical analyses were conducted separately for each of the three categories.

6. Statistical model

The relationship between vaccination and occurrence of a possible return-to-service was assessed using multivariable statistical models. The statistical unit was the AI, possibly followed by a new AI. To account for factors likely to influence the probability of return-to-

service, the association between vaccination status and occurrence of return-to-service was adjusted for several independent variables already described as risk factors for fertility traits in the literature (Hillers et al., 1984; Seegers, 1998; Robert et al., 2004; Malher et al., 2006; Marce et al., 2009) as described by Eq. (1):

$$Y_{ijklmnop} = \alpha + VAC_i + SR_j + LN_k + MY_l + PF_m + CAII_n + MO_o + EN_p + RAND_q + \varepsilon_{ijklmnop} \quad (1)$$

where outcome Y is the 3-week or 90-day-return-to-service following a first or a second AI; α is the intercept; VAC_i is the vaccination status (2 or 4 categories according to the model considered); SR_j is the service rank (number of the AI performed on one cow within one lactation - two levels); LN_k is the lactation number (four levels); MY_l is the peak milk yield expressed as the maximum at the three first milk records in the lactation (quantitative, after having checked the linearity between the risk of return-to-service and milk yield); PF_m is the minimum of Protein:Fat Contents ratio out of the first three milk records (three levels); $CAII_n$ is the calving-to-AI interval (six levels); MO_o is the month of AI (between three and four categories according to the model considered); EN_p is the proportion of exposed neighbour canton (three levels), $RAND_q$ is a composite variable (random) combining herd number and inseminator number and $\varepsilon_{ijklmnop}$ is the residual error term. The proportion of exposed neighbouring cantons was taken into account in the analysis as an indirect measure of the possible under-reporting of infected herds. Three kinds of cantons were distinguished: those with (i) no neighbouring cantons exposed to the disease; (ii) >0 and $\leq 40\%$ of neighbouring cantons exposed; (iii) over 40% of neighbouring cantons exposed.

To assess the risk of 3-week-return-to-service, a mixed-logistic regression model was used (R[®] software, lme4 package³). For the 90-day-return-to-service model, survival analyses were performed using Cox model (R[®] software, survival package⁴). The random variable in both mixed-logistic and survival models allowed to adjust for herd clustering. As odds-ratio (OR) overestimate the true relative risk (RR) when the incidence of the study event is high (return-to-service), OR were converted into relative risks using Beaudéau and Fourichon's method (Beaudéau and Fourichon, 1998). The effects in percentage points of return rate were

³ Douglas Bates, Martin Maechler and Bin Dai (2008). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4 classes. R package version 0.999375-18.

⁴ S original by Terry Therneau and ported by Thomas Lumley (2008). survival: survival analysis, including penalised likelihood.. R package version 2.34-1.

calculated from RR estimates. All statistical analysis was performed by using R[®] software (R Development Core Team, 2007).

RESULTS

1. Distribution of vaccination and return-to-service

In the study population and during the 2008 vaccination campaign, 62.2% of cows were vaccinated (Table I). Vaccinations were performed from 21 July 2008 to 15 December 2008. Overall return-to-service rates at 3 weeks, 90 days and 200 days after AI were 21.9%, 51.3% and 56.7% respectively for the 74,238 cows in herds that were not exposed to BTV in 2008 (Table I).

Interval distribution between an AI and a possible return-to-service is displayed in Figure 1. The first peak corresponds to the 3-week-return-to-service. The two secondary peaks observed around 6 and 9 weeks after AI corresponds to a mix between late return-to-service and return-to-service due to a conception failure or an early embryonic death followed by an undetected heat.

Table I. Return-to-service rates and distribution of cows and AI according to the Bluetongue virus serotype 8 vaccination status, independently of the interval between AI and vaccination (in 2,573 Holstein dairy herds unexposed to BTV; 2008; Brittany; France)

	Number of cows (%)	Number of AI (%)	3-week-return-to-service rate (%)	90-day-return-to-service rate (%)	200-day-return-to-service rate (%)
Unvaccinated	28,072 (37.8%)	38,520 (37.7%)	22.1	52.7	58.3
Vaccinated	46,166 (62.2%)	63,658 (62.3%)	21.7	50.4	55.7
Total	74,238	102,178	21.9	51.3	56.7

2. Effect associated with a vaccine injection administered between 3 days before and 16 days after AI on 3-week-return-to-service rate

2.1. After a first vaccine injection

Selection of AI from cows receiving a first vaccine injection between 3 days before and 16 days after that AI resulted in 3,435 selected AI. These AI were compared to 10,298 AI from

unvaccinated cows in the same time period from 2 August 2008 to 27 November 2008. After adjustment, the 3-week-return-to-service rates of vaccinated cows did not differ significantly from unvaccinated cows whatever the time interval between AI and vaccination (Table II).

2.2. After a second vaccine injection

Selection of AI from cows receiving a second vaccine injection between 3 days before and 16 days after that AI resulted in 3,780 selected AI. These AI were compared to 10,594 AI from unvaccinated cows in the same time period from 1 September 2008 to 17 December 2008. After adjustment, the 3-week-return-to-service rate was significantly higher for cows vaccinated for the second time between 2 days and 7 days after AI compared to unvaccinated cows (Table II). This difference corresponded to an increase of 4.2 percentage points of 3-week-return-to-service rate (4.2 [1.5–7.3]). The increase was similar for both vaccines used (results not shown). Among adjustment variables, rank of service, milk yield, Protein:Fat Contents ratio and calving-to-AI interval were significantly associated with a risk of three-week-return-to-service. Risk was higher for shorter calving-to-AI intervals and after a second AI. The risk was also higher for cows with a higher milk yield and an intermediate Protein:Fat Content ratio (Table III).

Table II. Relative risk of 3-week-return-to-service according to the interval between AI and Bluetongue virus serotype 8 vaccination, and the rank of vaccine injection in Holstein dairy herds unexposed to BTV in 2008; Brittany; France (two separate models for each vaccine injection).

Vaccination status	Vaccination timing (days since AI)	3-week-return-to-service rates (%)	Number of AI	RR	95 CI	<i>p</i>
Unvaccinated	NA	22.1	10,298	1	<i>Ref</i>	
Receiving a first vaccine injection *	- 3 to + 1	21.1	973	0.98	[0.90–1.05]	0.70
	+ 2 to + 7	21.1	1022	0.97	[0.90–1.04]	0.67
	+ 8 to + 16	21.8	1440	1.00	[0.94–1.05]	0.98
Unvaccinated	NA	22.1	10,594	1	<i>Ref</i>	
Receiving a second vaccine injection **	- 3 to + 1	23.1	996	1.08	[0.94–1.21]	0.25
	+ 2 to + 7	25.8	1112	1.19	[1.07–1.33]	0.002
	+ 8 to + 16	22.2	1672	1.03	[0.93–1.14]	0.55

* 11,786 cows in 2,030 herds; ** 12,364 cows in 2,089 herds

NA : not applicable

Table III. Effect of adjustment variables on risk of 3-week-return-to-service of cows receiving a second vaccine injection against Bluetongue virus serotype 8 between 3 days before and 16 days after AI in Holstein dairy herds unexposed to BTV; 2008; Brittany; France

Variables and classes	Number of AI	RR	95 CI	p
Rank of service				
1	10,197	1	Ref	
2	4,177	1.16	[1.08–1.24]	0.0001
Lactation number				
1	4815	1	Ref	
2	3783	0.96	[0.90–1.05]	0.48
3	2651	0.98	[0.90–1.07]	0.64
4	3125	0.95	[0.87–1.03]	0.19
Milk yield (kg/day)	14,374	1.01*	[1.005–1.02]	0.001
Protein Content:Fat Content ratio				
≥0; ≤0.65	3550	0.91	[0.84–0.98]	0.02
>0.65; ≤0.75	5776	1	Ref	
>0.75; ≤1.5	5048	0.94	[0.88–1.02]	0.12
Calving-to-AI interval (days)				
>35; ≤50	680	1.12	[0.96–1.29]	0.15
>50; ≤65	2705	1.06	[0.96–1.17]	0.23
>65; ≤80	2860	1.02	[0.93–1.13]	0.65
>80; ≤100	2951	1	Ref	
>100; ≤120	2189	0.94	[0.84–1.04]	0.22
>120; ≤180	2977	0.84	[0.76–0.93]	0.0005
Proportion of neighbour cantons exposed to BTV during 2008 (%)				
0	8435	1	Ref	
≥40; <80	4378	0.99	[0.92–1.06]	0.77
≥80	1561	0.93	[0.83–1.04]	0.18
Month of service				
September	3012	1	Ref	
October	5166	0.96	[0.88–1.05]	0.40
November	4055	0.99	[0.91–1.08]	0.84
December	2141	0.95	[0.86–1.06]	0.38

* OR for 1 kg/day milk yield

3. Effect associated with two vaccine injections administered between 3 days before and 42 days after AI on 90-day-return-to-service rate

Selection of AI from cows receiving a second vaccine injection between 3 days before and 42 days after that AI resulted in 14,310 selected AI. These AI were compared to 14,310 AI from unvaccinated cows in the same time period from 2 August 2008 to 17 December 2008. The

overall 90-day-return-to-service rate was 42.7% for cows vaccinated between 3 days before and 42 days after AI and 44.3% for the unvaccinated cows without adjustment. After adjustment the overall 90-day-return-to-service rate of vaccinated cows did not differ significantly from unvaccinated cows (hazard ratio (HR) of 0.96 [0.91;1.02]). Whatever the date of vaccination, 90-day-return-to-service was not associated with the vaccination status (HR of 1.07 [0.99;1.14] with N=7,862 for the category a, HR of 0.98 [0.88;1.09] with N=5,081 for the category b and HR of 0.90 [0.72;1.13] with N=1,333 for the category c).

DISCUSSION

A slight side effect of vaccination against BTV-8 with inactivated vaccines on dairy cow fertility was found for cows receiving a second vaccine injection from 2 to 7 days after insemination. The only detectable effect was an increase in 3-week-return-to-service rate. This result indicates that the side effect of vaccination is likely to be due to early embryonic death. This study did not highlight any effect of vaccination on conception failure or late embryonic death. For late embryonic death, the non-significant HR was below 1, whereas for conception failure, a non-significant RR above 1 was found. In the latter case, it could either be an absence of effect or a very small effect not detectable with the statistical power of our study. Based on the comparison of the return-to-service rates between vaccinated cows and unvaccinated cows for AIs done before the vaccination period (results not shown), the decision to vaccinate did not seem to be related to fertility issues. Therefore, the decision to vaccinate did not bias the result of this study.

No published study is available on the effect of BTV-8 vaccination with inactivated vaccines on fertility in field conditions. A Swiss⁵ study conducted in 47 cattle herds investigated a possible side effect of BTV-8 vaccination on service success rates. The overall analysis of services success rate did not show any side effect of vaccination. The authors mention that some models were able to detect a slight decrease in service success rates when second vaccine injections were administered during the service period, but no details were provided on methods or results in this report. Very few studies have evaluated the safety of BTV-8 vaccination with inactivated vaccines in field conditions. A rise of temperature was shown after the second vaccine injection only in sheep (Gethmann et al., 2009). Acute clinical signs

⁵ OVF (Office Vétérinaire Fédéral), Bluetongue disease in Switzerland, report of the current situation (September 2009) http://www.bvet.admin.ch/gesundheit_tiere/01973/02437/index.html?lang=fr

were detected 2-8 days only after the second injection of both BTV-1 and BTV-8 vaccines (Zulvac[®] 1 and Zulvac[®] 8 Bovis, Fort Dodge, The Netherlands) in 22 out of 100 vaccinated sheep flocks (Gonzalez et al., 2010).

Based on the results of this study and our review of the literature, it can be speculated that two factors could be involved in fertility decrease following vaccination: hyperthermia and stress. Immunisation induced by vaccination can lead to systemic reactions including a wide range of clinical signs as well as fever, malaise, hypoglycaemia and reduced cardiac output (Roth, 1999). Moreover, a short-term hyperthermia very often is observed after vaccination (Martinod, 1995). An increase of 1°C or more in body temperature can compromise reproductive functions (Hansen et al., 2001). In the German study, the increase in body temperature after the vaccination against BTV-8 in sheep was between 0.5 and 1.5°C during 1 to 2 days after the second vaccine injection (Gethmann et al., 2009). An experimental study showed that an application of heat stress on days 1-7 after insemination can lead to reduced embryonic development (Putney et al., 1988). Accordingly, hyperthermia might partly explain the effect of vaccination on fertility when administered within the week following insemination. Animal restraint during vaccination is also a stressful procedure. Furthermore, the 2008 French vaccination campaign was the first BTV-8 vaccination and therefore involved two injections. Veterinary practitioners report that this is likely to have been more stressful for animals compared to a single injection such as an annual booster vaccination (personal communication). Stress during vaccination, including fear and anxiety, could have a direct negative impact on fertility. Moreover, an increase in body temperature may be a response to psychological stress such as displacement and containment of animals for the vaccination procedure (Parrott and Brown, 1999). It is impossible here to distinguish effect of immunisation and a possible effect of stress due to manipulation. Nevertheless, it would be possible that both were associated with the decrease in fertility of vaccinated cows.

Other effects of other killed vaccines on body temperature and production performances have been demonstrated. Under controlled field conditions, two commercial, multivalent killed vaccines including bovine herpesvirus 1, bovine viral diarrhoea virus, parainfluenza-3 virus and bovine respiratory syncytial virus, induced a small but significant rise in body temperature for <48 hours and a small and transitory drop in milk production following an annual vaccination (Scott et al., 2001). A side effect of vaccination on reproductive performances was suspected with the Foot and Mouth Disease (FMD) vaccinations that were performed in Europe. Post-vaccinal disturbance of pregnancy were observed during the period 1967-1970.

Abortions were one of the most commonly reported adverse reactions (Baljer and Mayr, 1971; Lorenz and Straub, 1973).

The BT virus was spreading widely in France when the vaccination program was implemented. BTV has a negative impact on cattle fertility, including an increase in 56-day-return-to-service rates after a first insemination and an increase in the number of inseminations needed for an assumed pregnancy (Santman-Berends et al., 2010). The strategy based on spatial distribution of reported herds that was applied in this study allowed for studying of the effect of vaccination on fertility independent of exposure. That strategy took into account the fact that some infected cattle herds may have not been reported during 2008. The proportion of exposed neighbouring cantons was included as a proxy of a putative undetected BTV herds. There was no significant variation of fertility between regions according to the percentage of exposed neighbouring cantons. Accordingly, it is reasonable to assume that the proportion of BTV-infected undetected herds was probably very low or null in our study population.

In this study, only Holstein cows from one French region were selected. However, if hyperthermia and stress are involved in the decreased fertility, the side effect of vaccination is likely to be experienced in other contexts. Similar consequences are likely to be expected in case of a first immunisation with BTV-8 inactivated vaccines including the same adjuvants. However, it is not possible to extrapolate results of a primo-vaccination as shown here to annual booster vaccinations.

A single field study cannot prove a causal relation between vaccination and a decrease in fertility. However, the relationship found here was supported by statistical association, the existence of plausible biological mechanisms and the temporality between the vaccination and zootechnical parameters studied.

CONCLUSION

This study under field conditions allowed us to quantify a significant but low adverse side effect on fertility after the second BTV-8 vaccine injection given one week after AI in herds that were not exposed to BTV. The side effect is thus likely to pass undetected on a farm. Compared to the negative effect of BTV exposure on fertility, this side effect is small and therefore should not be an obstacle to vaccination. Nevertheless, it can be recommended not to perform a second vaccine injection within one week after AI using current BTV-8 inactivated vaccines.

Acknowledgements

Financial support for this research was provided by INRA, Cemagref and Basse-Normandie, Bretagne, Pays de le Loire and Poitou-Charentes Regional Councils under SANCRE project, in the framework of “For and About Regional Development” programs. The authors gratefully acknowledge the Centre de Traitement de l’Information Génétique (INRA, Jouy-en-Josas, France) for providing the performance data and the Union Bretonne des Groupements de Défense Sanitaire for providing the vaccination data.

REFERENCES

- Baljer, G., Mayr, A., 1971. Statistical studies on pregnancy complications following foot and mouth vaccination in Bavaria 1967-1970 (Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B). J. Vet. Med. 18, 293-305.
- Beaudeau, F., Fourichon, C., 1998. Estimating relative risk of disease from outputs of logistic regression when the disease is not rare. *Prev. Vet. Med.* 36, 243-256.
- Bridges, P.J., Brusie, M.A., Fortune, J.E., 2005. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 508-522.
- Di Emidio, B., Nicolussi, P., Patta, C., Ronchi, G.F., Monaco, F., Savini, G., Ciarelli, A., Caporale, V., 2004. Efficacy and safety studies on an inactivated vaccine against bluetongue virus serotype 2. *Vet. Ital.* 40, 640-644.
- Durand, B., Zanella, G., Biteau-Coroller, F., Locatelli, C., Baurier, F., Simon, C., Le Drean, E., Delaval, J., Prengere, E., Beaute, V., Guis, H., 2010. Anatomy of bluetongue virus serotype 8 epizootic wave, France, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1861-1868.
- Elbers, A.R.W., Backx, A., Meroc, E., Gerbier, G., Staubach, C., Hendrickx, G., van der Spek, A., Mintiens, K., 2008. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006: I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and The Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 87, 21-30.
- European Medicines Agency, 2009. Committee for medical products for veterinary use. An overview of field safety data from EU for bluetongue virus vaccines serotype 8 emerging from the 2008 national vaccination campaigns. pp. 1-17.

- Gethmann, J., Huttner, K., Heyne, H., Probst, C., Ziller, M., Beer, M., Hoffmann, B., Mettenleiter, T.C., Conraths, F.J., 2009. Comparative safety study of three inactivated BTV-8 vaccines in sheep and cattle under field conditions. *Vaccine* 27, 4118-4126.
- Gonzalez, J.M., Figueras, L., Ortega, M.E., Lozano, M., de Arcaute, M.R., Royo, R., Cebrian, L.M., Ferrer, L.M., Farinas, F., de Jalon, J.A., De las Heras, M., 2010. Possible adverse reactions in sheep after vaccination with inactivated BTV vaccines. *Vet. Rec.* 166, 757-758.
- Hamers, C., Galleau, S., Chery, R., Blanchet, M., Besancon, L., Cariou, C., Werle-Lapostolle, B., Hudelet, P., Goutebroze, S., 2009. Use of inactivated bluetongue virus serotype 8 vaccine against virulent challenge in sheep and cattle. *Vet. Rec.* 165, 369-373.
- Hansen, P.J., Drost, M., Rivera, R.M., Paula-Lopes, F.F., al-Katanani, Y.M., Krininger, C.E. 3rd, Chase, C.C. Jr., 2001. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 55, 91-103.
- Heins, B.J., Hansen, L.B., Seykora, A.J., 2006. Fertility and survival of pure Holsteins versus crossbreds of Holstein with Normande, Montbeliarde, and Scandinavian Red. *J. Dairy Sci.* 89, 4944-4951.
- Hillers, J.K., Senger, P.L., Darlington, R.L., Fleming, W.N., 1984. Effects of production, season, age of cow, days dry, and days in milk on conception to first service in large commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 67, 861-867.
- Lorenz, R.J., Straub, O.C., 1973. [Statistical evaluation of allergic reactions following vaccinations against foot-and-mouth disease in 1970]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale* 223, 1-14.
- Lucy, M.C., 2007. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64, 237-254.
- Malher, X., Beaudeau, F., Philipot, J.M., 2006. Effects of sire and dam genotype for complex vertebral malformation (CVM) on risk of return-to-service in Holstein dairy cows and heifers. *Theriogenology* 65, 1215-1225.
- Marce, C., Beaudeau, F., Bareille, N., Seegers, H., Fourichon, C., 2009. Higher non-return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection at early stage in Holstein dairy cows. *Theriogenology* 71, 807-816.
- Martinod, S., 1995. Risk assessment related to veterinary biologicals: side-effects in target animals. *Rev. Sci. Tech. (International Office of Epizootics)* 14, 979-989.

- Parrott R.F., L.D.M., Brown D., 1999. Transport stress and exercise hyperthermia recorded in sheep by radiotelemetry. *Animal Welfare* 8, 27-34.
- Putney, D.J., Drost, M., Thatcher, W.W., 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 30, 195-209.
- R Development Core Team, 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Raheja, K.L., Burnside, E.B., Schaeffer, L.R., 1989. Heifer fertility and its relationship with cow fertility and production traits in Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72, 2665-2669.
- Robert, A., Beaudreau, F., Seegers, H., Joly, A., Philipot, J.M., 2004. Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). *Theriogenology* 61, 117-127.
- Roth, J.A., 1999. Mechanistic bases for adverse vaccine reactions and vaccine failures. *Adv. Vet. Med.* 41, 681-700.
- Saegerman, C., Hubaux, M., Urbain, B., Lengele, L., Berkvens, D., 2007. Regulatory issues surrounding the temporary authorisation of animal vaccination in emergency situations: the example of bluetongue in Europe. *Rev. Sci. Tech. (International Office of Epizootics)* 26, 395-413.
- Saegerman, C., Berkvens, D., Mellor, P.S., 2008. Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 539-544.
- Santman-Berends, I.M., Hage, J.J., Rijn, P.A., Stegeman, J.A., Schaik, G.V., 2010. Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) infection reduces fertility of Dutch dairy cattle and is vertically transmitted to offspring. *Theriogenology*.
- Savini, G., MacLachlan, N.J., Sanchez-Vizcaino, J.M., Zientara, S., 2008. Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 101-120.
- Savini, G., Hamers, C., Conte, A., Migliaccio, P., Bonfini, B., Teodori, L., Di Ventura, M., Hudelet, P., Schumacher, C., Caporale, V., 2009. Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle. *Vet. Microbiol.* 133, 1-8.
- Schwartz-Cornil, I., Mertens, P.P., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Breard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, N.J., Zientara, S., 2008. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res.* 39, 46.

- Scott, H.M., Atkins, G., Willows, B., McGregor, R., 2001. Effects of 2 commercially-available 9-way killed vaccines on milk production and rectal temperature in Holstein-Friesian dairy cows. *Can. Vet. J.* 42, 793-798.
- Seegers, H., 1998. Performances de reproduction du troupeau bovin laitier: variations dues aux facteurs zootechniques autres que ceux liés à l'alimentation. *Journal of the National GTV*, 57-66.
- Veronesi, E., Hamblin, C., Mellor, P.S., 2005. Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep, before and after passage in vector midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Vaccine* 23, 5509-5516.
- Wolfenson, D., Roth, Z., Meidan, R., 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 535-547.

Partie 2: Comparaison des impacts de la vaccination contre BTV-8 et de l'exposition au BTV-8 sur la fertilité des vaches laitières

INTRODUCTION

A detrimental effect of vaccination on fertility has been demonstrated only for cows receiving a second vaccine injection within 1 week following AI (Nusinovici et al, 2011). To help inform future decision-making, this effect has to be evaluated with regards to fertility losses associated with exposure to BTV-8. In herds early exposed to BTV-8 during the epizootic, fertility was adversely affected from an average of 4 weeks before to 5 weeks after the date of detection in the herd, corresponding to a decrease in fertility of between 8 and 21% (Nusinovici et al, Submitted). The objective was to compare the detrimental effect of vaccination and the fertility losses associated with exposure to BTV-8 on fertility.

MATERIALS AND METHODS

1. Simulated fertility losses associated with vaccination against BTV-8

Once the at-risk period was identified, the fertility losses in an vaccinated herd were simulated according to the proportion of cows inseminated during this time interval. This proportion varies according to the management of the calving season in the herd. The fertility loss was defined as the average increase of return-to-service rate expressed in percentage points multiplied by the proportion of cows inseminated during the at-risk period of decreased fertility.

2. Simulated fertility losses associated with exposure to BTV-8

The fertility loss attributable to the exposure to BTV-8 was calculated in a similar way. The average increase in return-to-service rate was calculated for 2 scenarios. Firstly, to estimate an overall effect of BTV-8 exposure, the average increase was calculated using HR estimated across the at-risk period in all case herds which were detected in September including all

exposed cantons (assuming September to have the most accurate dates of exposure). Secondly, to estimate an effect of BTV-8 exposure only in highly exposed herds, the average increase was calculated using HR estimated across the at-risk period in herds detected in September in only highly exposed cantons.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Simulated fertility losses associated with vaccination against BTV-8

Given that 4.5% of the cows received a second vaccine injection within 1 week following an AI in 2008 in Brittany and that the effect corresponded to an increase of 4.2 percentage points of 3-week-return-to-service, the attributable fertility loss was equal to 0.19% (Figure 8-a).

2. Simulated fertility losses associated with exposure to BTV-8

An average increase of 15.3 percentage points of 90-day-return-to-service was calculated for AIs in herds for which disease was detected in September in highly exposed cantons. Given that 27.8% of the cows were inseminated during the at-risk period during the 2007 epizootic, the overall loss of fertility for the herd attributable to BTV-8 exposure was 4.2% (Figure 8-a). When considering all the exposed herds detected in September, irrespective of exposure at the canton level, the overall effect of BTV-8 exposure corresponded to an increase of 9.6 percentage points of 90-day-return-to-service and thus the attributable fertility loss was 2.7% (Figure 8-a).

3. Comparison of the fertility losses associated with vaccination against BTV-8 and exposure to BTV-8

Considering the overall detrimental effects of vaccination against BTV-8 in 2008 and exposure to BTV-8 in 2007, both in field conditions, the detrimental effect of BTV-8 exposure on fertility was 22 times higher than the adverse effect of vaccination against BTV-8. However, if only 2% of the cows received a second vaccine injection during the period at risk of reduced fertility due to vaccination, this ratio increased to 50 (Figure 8-b). The hatched area Figure 8-b corresponded to herds for which the expected benefit of vaccination against

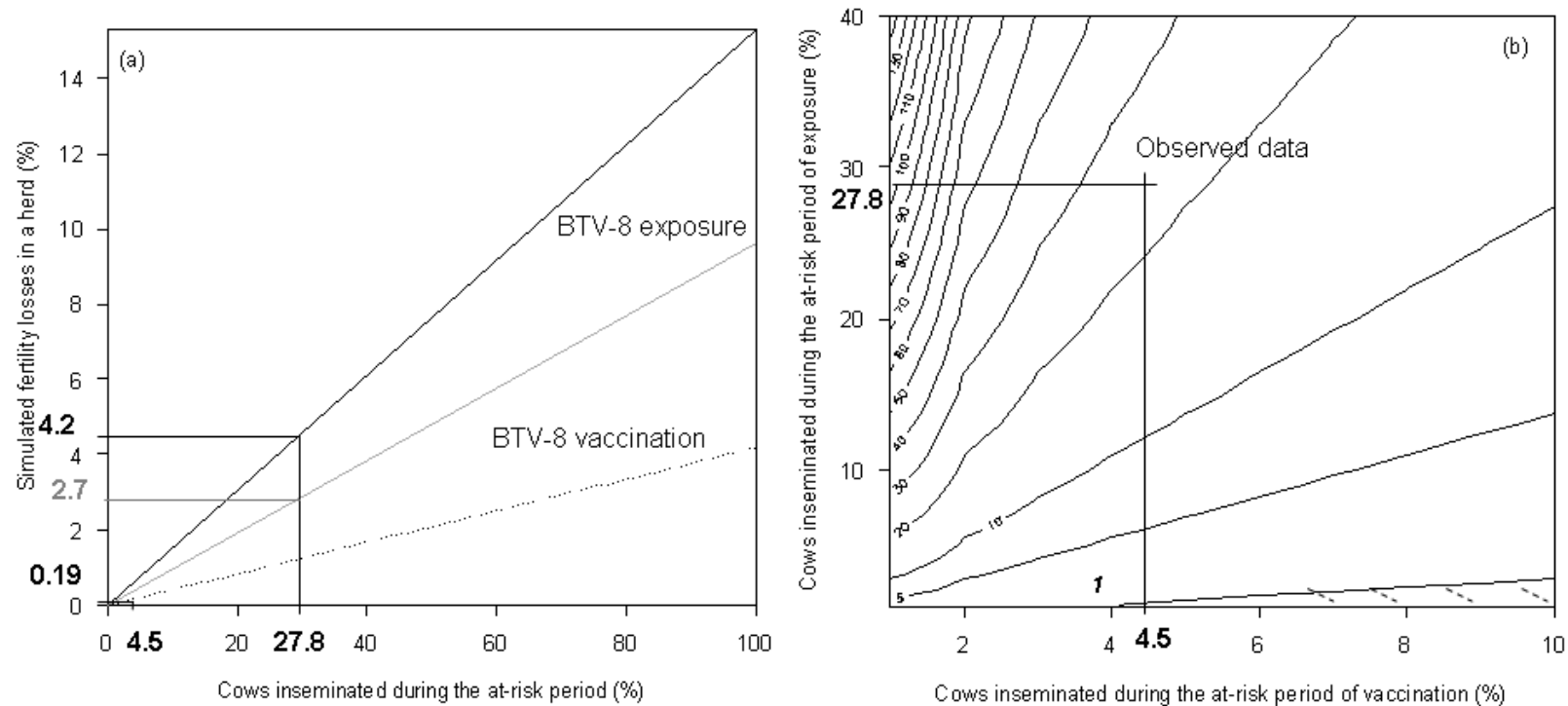


Figure 8: (a) Simulated fertility losses in a herd according to the proportion of cows inseminated during the 9-week-at-risk period of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) exposure (plain lines) and the one-week-at-risk-period of adverse effects of vaccination against BTV-8 (dashed lines). The black and gray plain lines correspond to fertility losses attributable to BTV-8 exposure based on overall increases of 15.3 (highest exposure) and 9.6 (all exposure) percentage points for cows inseminated from 4 weeks before to 5 weeks after the date of detection in the herd, respectively. For the fertility losses attributable to vaccination against BTV-8, an increase of 4.2 percentage points was considered for cows receiving a second vaccine injection within 1 week after AI; (b) Ratio of the detrimental effects attributable to BTV-8 exposure and to vaccination against BTV-8 according to the proportion of cows inseminated during the at-risk periods. These simulations were based on an overall increase of 15.3 percentage points attributable to the BTV-8 exposure and an increase of 4.2 percentage points attributable to vaccination against BTV-8. The hatched area corresponded to herds for which the expected benefit of vaccination against BTV-8 would be smaller than the possible associated risks

BTV-8 by prevention of fertility losses would be smaller than the possible associated side effect on fertility. When considering all the BTV-8 exposed herds detected in September, the detrimental effect of BTV-8 exposure on fertility was 14 times higher than the side effect of vaccination against BTV-8.

Given the number of cows inseminated during these at-risk periods, situations that increase the detrimental effect on fertility associated with the vaccination against BTV-8 are very unlikely, whereas infection is more likely to have a greater impact on fertility.

REFERENCES

- Nusinovici S, Seegers H, Joly A, Beaudeau F, Fourichon C. 2011. A side effect of decreased fertility associated with vaccination against bluetongue virus serotype 8 in Holstein dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 101 42-50.
- Nusinovici S, Seegers H, Joly A, Beaudeau F, Fourichon C. Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy cattle herds. Under revision.

CHAPITRE 3

Variations de fertilité des vaches laitières dans les troupeaux sans notification de signe clinique du virus de la Bluetongue sérotype 8 situés en zone d'épizootie

Partie 1: Utilisation des données de performance de reproduction pour évaluer la sous-déclaration des troupeaux foyers pendant une épizootie

RESUME

Durant l'épizootie causée par le virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) en France en 2007, une proportion importante des troupeaux bovins infectés n'a pas été notifiée. Les données de reproduction, collectées pour l'évaluation des performances des animaux, sont disponibles dans la plupart des troupeaux. L'objectif de cette étude est d'évaluer si les baisses de fertilité peuvent être utilisées pour mettre en évidence la sous déclaration de foyers pendant une épizootie et contribuer à décrire l'étendue d'une épizootie. La fertilité a été estimée à l'aide du taux de retours 90 jours. Les variations de fertilité ont été quantifiées pour les vaches des troupeaux déclarés et pour les vaches des troupeaux dont le statut infectieux est incertain (troupeaux situés dans la zone exposée et non déclarés foyers durant l'épizootie de 2007), et comparées à celles des vaches de troupeaux non exposés en 2007. Une date d'exposition au BTV-8 a été interpolée pour les vaches des troupeaux dont le statut infectieux est incertain à l'aide d'une approche spatiale (krigeage). Cette interpolation est basée sur la dynamique spatio-temporelle des troupeaux foyers déclarés après suspicion clinique en 2007. Les variations de fertilité dans les troupeaux déclarés et dans les troupeaux dont le statut infectieux est incertain ont été quantifiées autour de la date d'exposition (observée ou interpolée). Dans les troupeaux dont le statut infectieux est incertain, des baisses de fertilité ont été mises en évidence pour les vaches inséminées entre 6 semaines avant et 10 semaines après la date d'exposition interpolée. Cet effet correspond à une augmentation de 3 points de pourcent de retours 90 jours. Dans les troupeaux déclarés après suspicion clinique, cette augmentation est de 5,2 points de pourcent. Pour vérifier si ces variations sont bien attribuables à l'exposition au BTV-8, les variations ont également été quantifiées pour les vaches de troupeaux n'ayant pas été exposés au BTV-8. Aucune baisse de fertilité n'a été mise en évidence pour ces vaches, indiquant que les baisses de fertilité observées dans les troupeaux situés en zone d'épizootie sont bien attribuables à l'exposition. Cette étude suggère que les données de fertilité peuvent contribuer à évaluer la sous-déclaration des foyers pendant une épizootie et peuvent être utilisées comme indicateur de l'émergence de pathogènes qui affectent la reproduction.

Using the reproductive performance data to evaluate the under-reporting of case herds during an epizootic : application to an outbreak of Bluetongue virus serotype 8

ABSTRACT

Control measures implemented to limit the spread of infectious diseases greatly rely on the follow-up of disease cases. During the epizootic of BTV-8 in France in 2007, a high proportion of infected cattle herds was not reported. Reproductive data are available in most herds for breeding management and animal health care purposes. The objective of this study was to evaluate whether decrease in reproductive performance can be used to highlight the under-reporting of cases during an epizootic and to quantify to what extent non-reported cases contribute to the total burden of the epizootic. Variations in reproductive performance were quantified for cows in reported case herds and cows in herds with uncertain infectious status (i.e. located in exposed areas and not reported as cases during the 2007 epizootic), compared to cows in herds unexposed to BTV-8 in 2007. A date of exposure to BTV-8 was interpolated for cows in herds with uncertain BTV-8 status, using a spatial based approach (kriging). This interpolation was based on the spatiotemporal dynamic of confirmed case herds that reported clinical signs in 2007. Variations in reproductive performance in both reported case herds and herds with uncertain BTV-8 status were quantified around the date of exposure (observed or predicted). Decreased fertility was evidenced for cows inseminated between 6 weeks before and 10 weeks after the predicted date of exposure in herds with uncertain BTV-8 status. This effect corresponded to a decreased fertility rate of 3.0 percentage points. In reported case herds, this decrease was of 5.2 percentage points. To test whether these variations are likely to be attributable to BTV-8 exposure, variations were also investigated for cows in herds that were not exposed to BTV-8. No decreased fertility was found for these cows, indicating that the decrease of fertility for cows in herds located in the epizootic area was associated with exposure to BTV-8. This study suggests that reproductive performance data can be used as a non-specific indicator of the emergence of pathogens that affect reproductive performance and provides an innovative method to account for underreporting while evaluating the total burden of an epizootic.

INTRODUCTION

Control measures implemented to limit the spread of infectious diseases during an epidemic greatly rely on the follow-up of disease cases. In animal health, strategies implemented to detect disease cases are either passive or active, or result of a combination of both systems. Passive surveillance system relies on the farmer's ability to detect clinical signs of the disease, subsequently confirmed or not by a diagnostic test. However, in the event of an emerging disease, symptoms of the disease are ignored by farmers (at least at the beginning of the outbreak), and therefore, passive surveillance system can lead to under-notification of clinical cases. Active surveillance system is usually based on the monitoring of the disease status in specific populations. Diagnostics tests are used in both active and passive surveillance systems. They are costly and time-consuming and are thus usually used in small scale populations. Moreover, in the event of an emerging of a new disease, a delay is expected to develop and manufacture the diagnostics tests. Because of these limits, a syndromic surveillance could complete the existent surveillance systems.

In animal health, production data could be used for a syndromic surveillance. These data are used to evaluate genetic characteristics of cows and are thus easily available in many herds. In dairy cattle, national data bases concerning production data are available, including milk yield and reproductive performance at the cow level.

The monitoring of these data could probably be used as indicator to detect the spreading of pathogens in a population of naive herds for diseases that are responsible of detectable production losses (e.g. decrease in milk production or affected reproduction performance). For instance, in dairy cattle herds, bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds is associated with an increased risk of late embryonic and fetal death (Robert et al., 2004) and with a decrease in milk yield (Beaudeau et al., 2004). Epizootic hemorrhagic disease, a Bluetongue-like disease, is associated with a decrease in milk yield and with an excess of mortality (Kedmi et al., 2010). The exposure to Bluetongue Virus serotype 8 (BTV-8) is associated with a decrease of fertility (Santman-Berends et al., 2010; Nusinovici et al., Submitted). For cows in herds reported during the BTV-8 epizootic in 2007 in France, fertility was adversely affected from an average of 1 month before to 1 month after the date of detection of clinical signs in the herd, corresponding to a decrease in fertility of between 8 and 21% (Nusinovici et al., Submitted).

During the BTV-8 epizootic in northern Europe in 2007, under-reporting of cases was demonstrated (Durand et al., 2010). A cross-sectional serologic study has been conducted in

exposed areas characterised by different levels of exposure. Results shown that only a low proportion of seropositive herds reported clinical cases. A follow-up survey of 50 dairy herds in Belgium conducted between December 2007 and February 2008 indicated that only 20 were officially notified as BT outbreaks whereas all had been infected with BTV-8. The authors indicated that similar discrepancies occurred in all provinces (Saegerman et al., 2010). A study conducted in the Netherlands in 2007 quantified an increase of mortality of dairy cows in non-reported herds located in areas exposed to BTV-8 (Santman-Berends et al., 2011). This effect corresponded to an increase of 1.11 (95%CI: 1.08-1.13) of the mortality rate ratio for cows >1 year. For cows in confirmed herds, the mortality rate ratio was equal to 1.41 (95%CI: 1.22-1.63). These results suggested that some of the herds that were not notified in exposed areas probably had suffered from BTV-8 infection.

Decrease in reproductive performance could be used as non-specific indicator to evaluate the existence of under-reporting of BTV-8 cases in exposed areas. Moreover, quantifying such losses in non-reported herds would enable to obtain a more comprehensive evaluation of the burden of an epizootic in a newly infected area than when accounting only for case herds. In the great majority of dairy cattle, artificial inseminations (AI) are used for reproduction. The occurrence of repeated AI can be used as proxy of cow infertility (Robert et al., 2004; Santman-Berends et al., 2010; Malher et al., 2006; Marce et al., 2009). Decrease in reproductive performance can be expected for cows in herds not reported during the epizootic, if a proportion of these herds are in fact infected. The magnitude is likely to be lower compared to the variations quantified in case herds. The objective of this study was to evaluate whether decrease in reproductive performance can be used to highlight the under-reporting of cases during an epizootic and to quantify to what extent non-reported cases contribute to the total burden of the epizootic.

MATERIALS AND METHODS

1. General study design and available data

Variations in reproductive performance were quantified for cows in reported case herds and cows in herds with uncertain infectious status (i.e. located in exposed areas and not reported as cases during the 2007 epizootic), compared to cows in herds unexposed to BTV-8 in 2007. Information about exposure to BTV-8 of herds was obtained from the official veterinary surveillance system. Herds were reported in 2 distinct situations: (i) in the event of clinical signs detected by the farmer or the veterinary practitioner, subsequently confirmed by a

diagnostic test and (ii) in the event of a positive serological test performed either before animal transfer or sale, or in sentinel herds. Among herds reported during 2007, only herds with a confirmed detection reported after clinical suspicion (situation (i)) were included as the date of a positive serological test did not necessarily identify the possible date of BTV-8 exposure of the herd. Information about BTV-8 exposure was available at the herd level only. Thus, a herd was considered exposed if at least 1 animal with clinical signs had tested positive for BTV-8. The proportion of infected animals in reported herds was unknown. Herds reported after clinical suspicion and subsequently selected for this study will be referred to as 'case herds'. Case herds located in 23 departments were selected, corresponding to 96.2% of the all cattle herds reported due to clinical suspicion during the 2007 epizootic (n=8994). All herds that were not reported during 2007 in these departments were considered to have an uncertain infectious status, and were thus referred as 'herds with uncertain BTV-8 status' (n=13,804).

The performance data were obtained in dairy herds enrolled in the official Milk Recording Scheme and where artificial insemination was used. For each cow, obtained data were dates of AIs, rank of service, date of culling (if it had occurred during the study period) and data used to adjust for factors known to influence fertility: cow and bull breeds, lactation number, calving date, milk production data at each milk record (record date, milk yield, protein content, fat content).

A date of exposure to BTV-8 was either estimated from recorded data for cows in case herds, or interpolated for cows in herds with uncertain BTV-8 status. This interpolation was based on the spatio-temporal dynamics of detection of confirmed case herds that reported clinical signs in 2007. Variations in reproductive performance in both reported case herds and herds with uncertain BTV-8 status were quantified around the date of exposure (observed or predicted). The geographical coordinates of herds were available at the municipality level.

2. Estimated date of exposure for reported herds

For each case herd, available data included the dates that clinical signs of disease were first suspected and the dates that disease was confirmed via diagnostic tests. The estimated date of exposure for reported herds was defined as the recorded date of suspicion which corresponded to the first detection of clinical signs in the herd. The same date of exposure was assigned to all cows in a herd. For 6,1% of the case herds, the date of clinical suspicion was missing but the date of confirmation by a diagnostic test was known. In order to assign a date of

suspicion, an imputation method based on the distribution of the time interval between dates of suspicion and confirmation was applied. Moreover, 181 case herds had a non-plausible time interval between dates of suspicion and confirmation (interval >30 days or date of suspicion posterior to the date of confirmation) were excluded. After these exclusions, the population of case herds was composed of 8633 cattle herds located in 615 cantons.

3. Interpolation of a date of detection of clinical signs for herds not reported located in exposed areas

A date of exposure to BTV-8 for each dairy herd with uncertain BTV-8 status during 2007 was interpolated, assuming that all cattle herds were exposed to BTV-8 in the selected area during the 2007 epizootic.

A spatial based approach, the kriging, was used to estimate a date of detection of clinical signs for herds with uncertain BTV-8 status. This method assumed that the time interval between the introduction of the virus and the date of the detection of clinical signs in case herds was similar to the time interval between the introduction of the virus and the interpolated dates of the disease detection in herds with uncertain BTV-8 status. Dates were expressed as the number of days since the first case herd reported in 2007. Kriging is a statistical interpolation method that uses single data sample (case herds) to predict values at unsampled locations (herds with uncertain BTV-8 status). This method is based on assumptions regarding the form of the trend of the sample data, its variance and spatial correlation. The first step consisted in modelling the spatial correlation of the data. A combination of a Gaussian and an exponential semivariogram models was used. A cross-validation process using observed data was used to determine the goodness of model fit. The gradient of the viral diffusion was also included in the model to account for the non stationarity of the BTV-8 spreading process (universal kriging).

4. Selection of unexposed herds and cows

A reference population was used to quantify both variations of reproductive performance of cows in case herds and cows in herds with uncertain BTV-8 status. It was composed of cows located in 2 regions unexposed to BTV-8 during 2007: Brittany and a south-western area of France. In France, herd management varies between areas. Therefore, unexposed cows from 2 different parts of France were selected in order to better represent the unexposed population.

This comparison limited the impact of any possible confounding factors due to variations of herd management with time.

The month of AI is known to influence the reproductive performance (Malher et al., 2006; Marce et al., 2009). Consequently, unexposed cows were selected according to the date of AI such that cows from exposed herds and unexposed cows underwent AI during the same period in the year.

5. Reproductive performance parameters and data selection

Reproductive performance was assessed by the occurrence of a repeat AI after the first AI. In case of a return-to-oestrus after the first AI in a lactation, the great majority of the farmers are likely to decide to reinseminate the cow. In such a context, the occurrence of a repeat AI (return-to-service) after a first AI can be used as a proxy for infertility. The criteria used to quantify effect of BTV-8 exposure on fertility was the 90-d-return-to-service, defined as a return-to-service occurring between 18 and 90 d after AI. It was assumed that BTV-8 exposure could have 3 possible effects on fertility: conception failure, embryonic death and fetal death in early gestation, all resulting in the same outcome. Cows with non-plausible or extreme data (check for consistency of calving to first AI interval, AI to calving interval, interval between AI, interval between 2 milk test-days, peak milk yield and minimum Protein:Fat ratio) and herds with unusual management (unusual demographic structure, delayed first service or very small herds, low rate of IA indicative of the use of a bull) were excluded. After these exclusions, the study population was composed of 1,177,189, cows with a first AI performed between 2005 and 2008 in 19,458 herds located in the 23 exposed departments or in the 2 regions unexposed to BTV-8.

6. Selection and classification of AIs to evaluate the under-reporting

To evaluate the under-reporting of BTV-8 exposure, 90-d-return-to-service of cows in case herds and cows in herds with uncertain BTV-8 status were compared to those of cows in the reference population. All first AIs performed from 10 weeks before to 14 weeks after the date of BTV-8 exposure (observed or predicted) in herds were selected. The AIs were classified into categories according to the time interval between the date of the AI of cows and the date

of exposure (observed or predicted). Intervals of 15 d were considered (see results for categories).

7. Statistical models

The relationship between exposure and occurrence of a possible return-to-service was assessed with multivariable Cox models. To account for factors likely to influence the probability of return-to-service, the association between BTV-8 exposure and occurrence of return-to-service was adjusted for several independent variables already described as risk factors for fertility traits in the literature (Robert et al., 2004; Malher et al., 2006; Marce et al., 2009; Hillers et al., 1984 ; Seegers, 1998) as described by Eq. (1):

$$Y_{ijklmno} = \alpha + EXP_i + LN_j + MY_k + PF_l + CAII_m + MO_n + HERD_o + \varepsilon_{ijklmno} \quad (1)$$

where $Y_{ijklmno}$ is the 90-d-return-to-service following the first AI; α is the intercept; EXP_i is the exposure status (36 classes); LN_j is the lactation number (4 classes); MY_k is the peak milk yield expressed as the maximum at the 3 first milk records in the lactation (5 classes); PF_l is the minimum of Protein:Fat ratio out of the first 3 milk records (5 classes); $CAII_m$ is the calving-to-AI interval (7 classes); MO_n is the month of AI (8 or 10 classes), $HERD_o$ is the herd number (random) and $\varepsilon_{ijklmno}$ is the residual error term.

The random variable made it possible to adjust for clustering within the data. The effects in percentage points of return rate were calculated from estimated hazard ratio (HR). All statistical analyses were performed by using R[®] software (13) and Cox models were performed using the survival package⁶.

8. Selection of a cow population to check the specificity of the variations of the reproductive performance

To check whether variations of reproductive performance in case herds and in herds with uncertain BTV-8 status can be attributable to BTV-8 exposure, variations were also quantified for cows in herds that were not exposed to BTV-8. Indeed, variations could be related to the

⁶ S original by Terry Therneau and ported by Thomas Lumley (2008). survival: Survival analysis, including penalised likelihood.. R package version 2.34-1.

climate or food. This population was considered to demonstrate the specificity of the reproductive performance variations regarding to the BTV-8 exposure, reported or not. This population was composed of cows inseminated in 2005 in herds that were reported after clinical signs in 2007. The date around which variations of fertility were quantified corresponded to the same day within the year than the date of exposure (observed or predicted).

RESULTS

1. Location of herds and unadjusted return-to-service rates

Cattle case herds reported after clinical signs in 2007 were located in the northeastern part of France (Figure 1-a). Whereas a date of exposure to BTV-8 was interpolated for all the cattle herds located in this part of France (Figure 1-b), only dairy herds were included for the analyses. This population was composed of 2646 case herds, 5237 herds with uncertain BTV-8 status, and 9,485 unexposed herds in 2007.

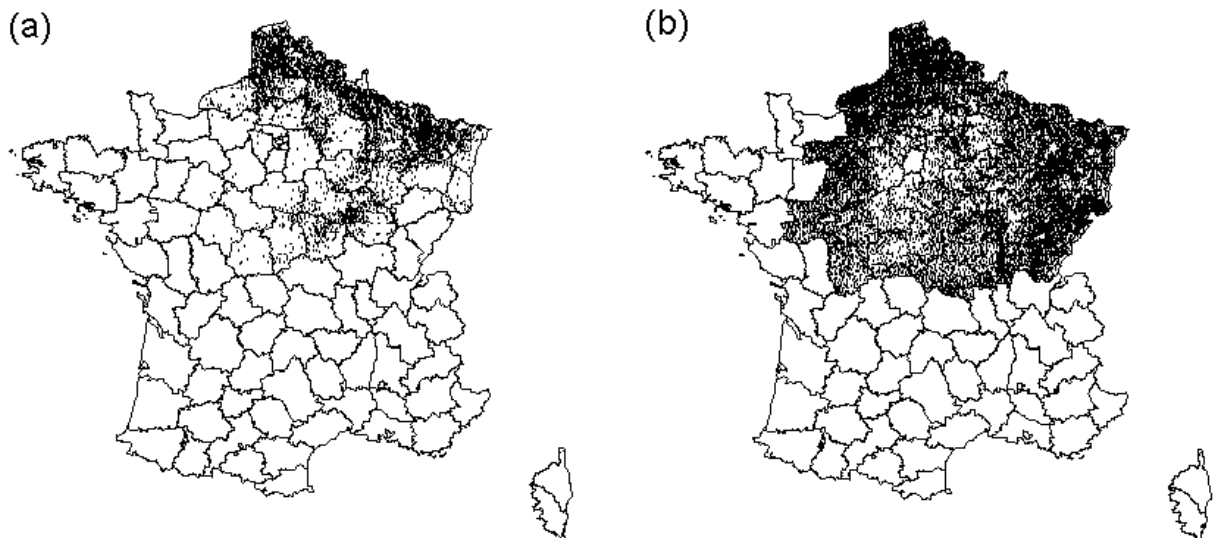


Figure 1: Geographical localisation of cattle herds in the exposed area: (a) 8633 reported case herds, (b) 74,169 herds with an uncertain Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) status (e.g., herds with an interpolated date of exposure); 2007; France

The overall 90-day-return-to-service rates were 56.9% for cows in case herds and 56.0% for cows in herds with uncertain BTV-8 status. The overall 90-day-return-to-service rate was

54.2% in the reference populations and 54.3% for cows inseminated in 2005 in herds that were reported after clinical signs in 2007 (Table I).

Table I. Return-to-service rates and distribution of cantons, herds and cows according to the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) exposure status (17,524 Holstein dairy herds; 2007; France). Cows in case herds and cows in herds that were not reported and located in the exposed area with first artificial insemination (AI) between 10 weeks before and 4 weeks after the date of clinical detection (observed or predicted) in the herd.

	Number of cantons	Number of herds	Number of cows	90-day-return-to-service rates (%)
Reported case herds with clinical signs	408	2646	43,786	56.9
Herds not reported and located in the exposed area	648	5237	78,293	56.0
Unexposed herds in 2007	312	9485	211,578	54.2
Herds in 2005 that were reported in 2007	715	8215	126,362	54.3

2. Interpolated date of clinical signs detection for herds with uncertain BTV-8 status

The data were spatially correlated over a distance of about 150 km, as shown in the Figure2. Some case herds were located in the same municipality and though have been detected at different period of the epizootic. These point pairs had thus a large semivariance, as showed in Figure 2. Moreover, the figure 2 shows the suitability of the fitted model of the variogram, suggesting that the spatial correlation was correctly accounted in the kriging model. The figure 3 shows the location of the 8,994 cattle herds used as the data sample and the predicted values by the kriging model of the date of clinical detection of the disease in the exposed area. Predicted dates of clinical suspicion were expressed as the number of days since the first observed clinical case detected the 31st July 2007 among cattle herds.

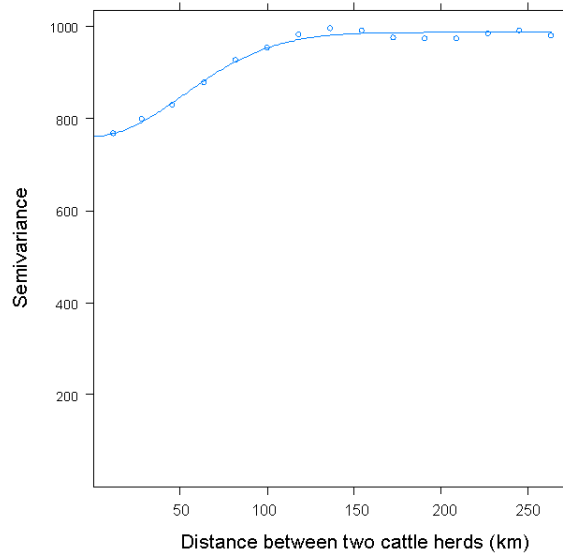


Figure 2: Variograms of the observed dates of detection of Bluetongue virus serotype 8 clinical signs of case herds (dotted line) and the fitted model of the variogram (plain line)

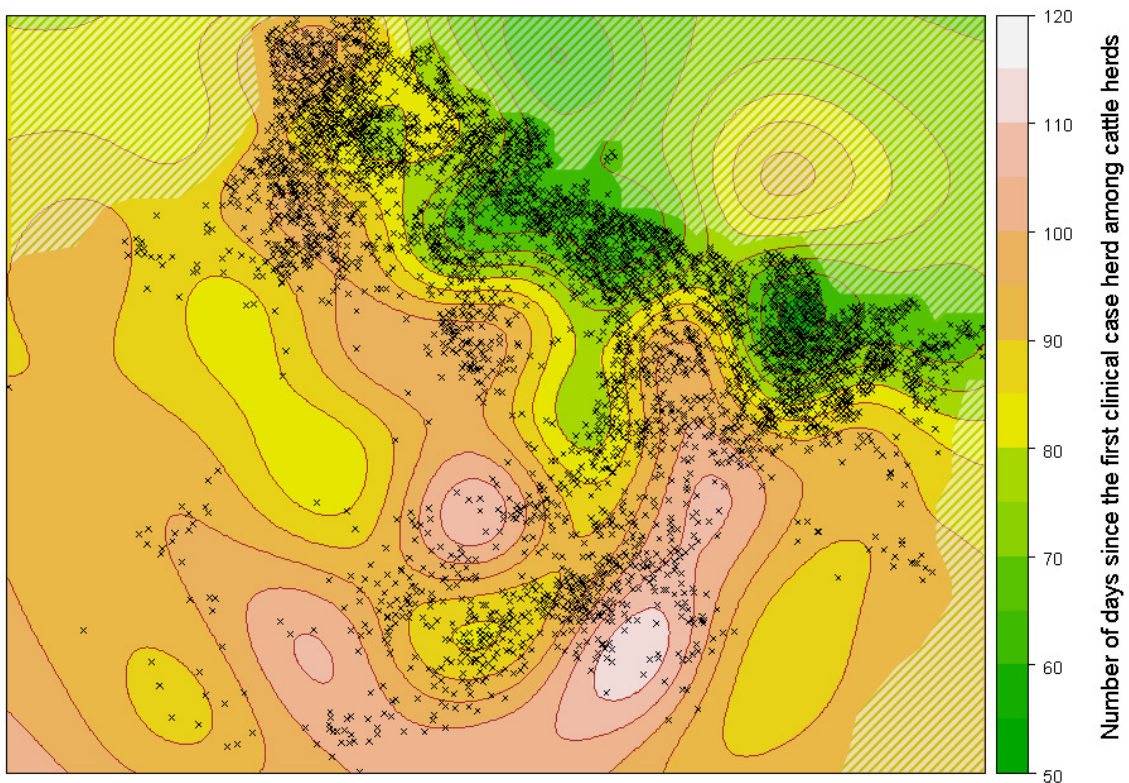


Figure 3: Kriging map of the dates of detection of Bluetongue virus serotype 8 clinical signs, expressed as a number of days since the first clinical case herd during the 2007 epizootic in France (31st July 2007), and location of reported cattle herds (black crosses). The hatched areas correspond to regions with no data.

3. Under-reporting evidenced using reproductive performance data

Exposure to BTV-8 was associated with an increase of 90-day-return-to-service rate for cows in case herds (Figure 4-a). The period of decreased fertility corresponded to AIs performed between 6 weeks before to 10 weeks after the date of exposure (HR between 1.05 and 1.18). During this episode of decreased fertility, the effect of BTV-8 exposure corresponded to an overall increase of 5.2 percentage points of 90-day-return-to-service, compared to cows in herds unexposed in 2007. For cows in herds with uncertain BTV-8 status, an increase of 90-day-return-to-service rates was found for AIs performed around the interpolated date of clinical detection (Figure 4-b). The period of decreased fertility corresponded to AIs performed between 6 weeks before and 8 weeks after the interpolated date (HR between 1.04 and 1.08). During this episode of decreased fertility, the overall increase of 90-day-return-to-service rate was equal to 3.5 percentage points, compared to cows in herds unexposed in 2007. Finally, for cows inseminated in 2005 in herds that were reported after clinical signs in 2007, the increase of 90-day-return-to-service rate was only observed for AIs performed until 2 weeks before the date of reference and corresponded to an increase of 2.2 percentage points, compared to cows in herds unexposed in 2007 (Figure 4-c). If assuming a similar within-herd prevalence between case herds and herds possible exposed, these results would suggested that almost 60% of the herds that were not reported and located in the exposed area were exposed to the virus in 2007.

The following adjustment variables were significantly associated with a risk of 90-day-return-to-service: lactation number, milk yield, Protein:Fat ratio and calving-to-AI interval. The risk was higher for multiparous cows and for cows with a higher milk yield. In contrast, the risk was lower for cows with a higher Protein:Fat ratio and for cows with a higher calving-to-AI interval (Table II).

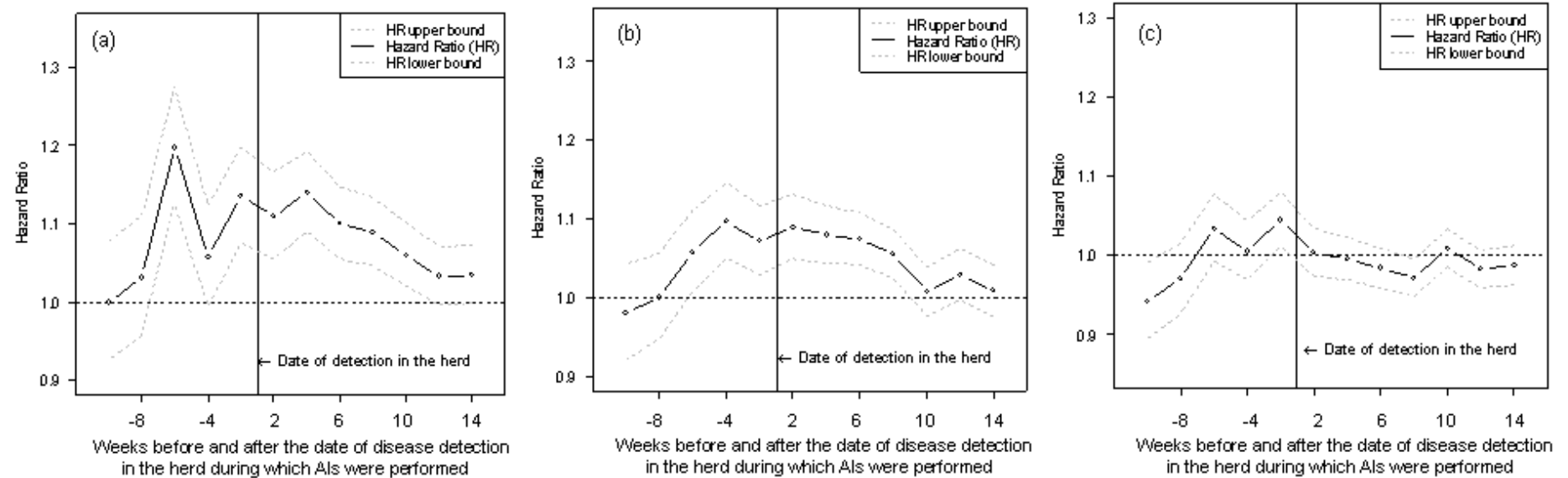


Figure 4: Hazard Ratio (HR) of 90-day-return-to-service before and after (a) the dates of Bluetongue Virus serotype 8 (BTV-8) detection in all dairy herds reported during the 2007 epizootic, (b) the interpolated dates of BTV-8 detection in dairy herds that were not reported and located in the exposed area in 2007, (c) a simulated date in a previous year free of BTV (2005) equal to the observed or interpolated date of clinical detection of the disease in 2007, France

Table II. Effect of adjustment variables on risk of 90-day-return-to-service for cows which underwent artificial insemination (AI) between 10 weeks before and 14 weeks after the date of Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) detection in 18,001 Holstein dairy herds; 2005 and 2007; France

Variable and classes	Number of AI	HR	95 CI
Lactation number			
1	179,508	1	<i>Ref</i>
2	120,951	1.10	[1.09-1.12]
3	77,463	1.12	[1.11-1.13]
4 or more	82,137	1.21	[1.19-1.22]
Peak milk yield (category) [£]			
1	58,772	0.94	[0.93-0.95]
2	115,175	0.97	[0.96-0.98]
3	140,240	1	<i>Ref</i>
4	96,807	1.04	[1.03-1.05]
5	49,065	1.10	[1.08-1.11]
Protein:Fat ratio			
>0; ≤0.58	47,239	1.04	[1.02-1.05]
>0.58; ≤0.66	93,475	1.03	[1.02-1.04]
>0.66; ≤0.75	159,567	1	<i>Ref</i>
>0.75; ≤0.83	105,573	0.98	[0.97-0.99]
>0.83; ≤1.5	54,205	0.97	[0.96-0.99]
Calving-to-AI interval (days)			
>35; ≤50	35,134	1.25	[1.23-1.27]
>50; ≤62	85,366	1.13	[1.12-1.15]
>62; ≤80	133,327	1.07	[1.05-1.08]
>80; ≤102	109,056	1	<i>Ref</i>
>102; ≤125	55,126	0.95	[0.94-0.97]
>125; ≤150	26,909	0.92	[0.90-0.94]
>150; ≤180	14,366	0.88	[0.86-0.91]
Month of service [§]			
May	16,198	0.92	[0.90-0.95]
June	16,167	0.89	[0.87-0.92]
July	21,238	0.95	[0.93-0.97]
August	34,268	0.96	[0.94-0.98]
September	46,444	1	<i>Ref</i>
October	71,011	1.01	[0.99-1.02]
November	99,904	0.97	[0.95-0.99]
December	86,194	0.98	[0.96-1.01]
January	45,041	0.98	[0.96-0.99]
February	23,594	1.01	[0.99-1.03]

[£] Classes were constituted according to the distribution of the milk yield production and the lactation number

[§] Month of service in 2007 for cows in exposed herds and month of service in 2005 for cows inseminated in 2005 in herds that were located in exposed areas in 2007

DISCUSSION

The results indicated that decrease in reproductive performance to be used to highlight the under-reporting of cases during an epizootic. Decreased fertility were found for both cows in reported case herds and non-reported herds located in the exposed area (herds with uncertain BTV-8 status) during the 2007 epizootic in France. In reported case herds, the decreased fertility corresponded to an increase of 5.2 percentage points of 90-day-return-to-service. In herds with uncertain BTV-8 status, the decreased fertility corresponded to an increase of 3.0 percentage points of 90-day-return-to-service if considering the same duration of effect. No decreased fertility was found when comparing two populations of cows in unexposed herds, indicating that variations of fertility evidenced for cows in herds located in the exposed area were associated with exposure to BTV-8.

The magnitude and duration of the episode of decreased fertility for cows in herds with uncertain BTV-8 status suggested that some of these herds have been infected with the virus during 2007. If assuming a similar average effect between case herds and herds with uncertain BTV-8 status, around 60% of herds with uncertain BTV-8 status would have been infected (if the effect is lower in these herds, the percentage would be greater). This result indicate that production losses in non-reported infected herds could contribute to an important part of the total burden of the epizootic.

Moreover, the absence of variations of fertility when comparing two populations of cows unexposed to BTV-8 indicated that the episodes of decreased fertility in herds located in the exposed area (reported or not) were likely attributable to BTV-8 exposure. Several reasons could explain the fact that some herds exposed to BTV-8 were not reported during the epizootic. Firstly, because most infected cattle herds showed no evidence of clinical signs, their infections were not systematically noticed by farmers and veterinary practitioner (Durand et al., 2010; Saegerman et al., 2010; Elbers et al., 2008). Secondly, the fact that BTV-8 was absent in this part of Europe complicated the recognition of the disease because of the low level of awareness (only 6 case herds were reported in 2006 in mainland France). Therefore, even in case of clinical expression of the disease, farmers could have not detect them. Finally, they could have detect clinical signs but not notified them. As suggested by Elbers, there is some reluctance to report suspect clinical situations in general by farmers and veterinary practitioners to the veterinary authorities in fear of anticipated social and economic consequences (Elbers et al., 2008).

The results of this study are consistent with the excess of mortality found in non reported herds located in exposed areas in the Netherlands (Santman-Berends et al., 2011). However, compared to the effect of exposure, the decreased fertility was relatively greater than the excess of mortality in herds with uncertain BTV-8 status. An explanation could be that cow mortality lead more easily to a suspicion of BTV-8 exposure than a decrease of fertility (with a delay between the effect of exposure and the event observed). There was possibly less infected herds not reported that experienced a excess of mortality due to BTV-8 exposure than those which experienced a decrease of fertility for some cows.

Whereas surveillance systems are costly and time-consuming (in France in 2009, the BTV-8 surveillance system cost 3.4 million euros), under-notification of case diseases is frequently experienced, specially in the event of an emerging disease. In dairy cattle, national data bases including reproductive performance are available at the cow level. The monitoring of reproductive performance could be used for a syndromic surveillance in order to detect the emergence of pathogens that affect reproductive performance.

REFERENCES

- Beaudeau, F., C. Fourichon, A. Robert, A. Joly, and H. Seegers. 2004. Milk yield of cows and Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) infection in 7,252 dairy herds in Bretagne (western France). Proceedings Annual Meeting of the European Association for Animal Production.
- Durand B, Zanella G, Biteau-Coroller F, Locatelli C, Baurier F, Simon C, et al. Anatomy of Bluetongue Virus Serotype 8 Epizootic Wave, France, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 2010 Dec;16(12):1861-8.
- Elbers ARW, Backx A, Meroc E, Gerbier G, Staubach C, Hendrickx G, et al. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006: I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 2008;87(1-2):21-30.
- Hillers JK, Senger PL, Darlington RL, Fleming WN. Effects of production, season, age of cow, days dry, and days in milk on conception to first service in large commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 1984 Apr;67(4):861-7.
- Kedmi M, Van Straten M, Ezra E, Galon N, Klement E. Assessment of the productivity effects associated with epizootic hemorrhagic disease in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2010 Jun;93(6):2486-95.

- Malher X, Beaudeau F, Philipot JM. Effects of sire and dam genotype for complex vertebral malformation (CVM) on risk of return-to-service in Holstein dairy cows and heifers. *Theriogenology*. 2006 Apr 1;65(6):1215-25.
- Marce C, Beaudeau F, Bareille N, Seegers H, Fourichon C. Higher non-return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection at early stage in Holstein dairy cows. *Theriogenology*. 2009 Mar 15;71(5):807-16.
- Robert A, Beaudeau F, Seegers H, Joly A, Philipot JM. Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). *Theriogenology*. 2004 Jan 1;61(1):117-27.
- Santman-Berends IM, Hage JJ, Rijn PA, Stegeman JA, Schaik GV. Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) infection reduces fertility of Dutch dairy cattle and is vertically transmitted to offspring. *Theriogenology*. 2010 Aug 4.
- Nusinovici S, Seegers H, Joly A, Beaudeau F, Fourichon C. Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy cattle herds.
- Saegerman C, Mellor P, Uyttenhoef A, Hanon JB, Kirschvink N, Haubruge E, et al. The most likely time and place of introduction of BTV8 into Belgian ruminants. *PloS One*. 2010;5(2):e9405.
- Santman-Berends IM, van Schaik G, Bartels CJ, Stegeman JA, Vellema P. Mortality attributable to bluetongue virus serotype 8 infection in Dutch dairy cows. *Vet. Microbiol.* 2011 Mar 24;148(2-4):183-8.
- Seegers H. Performances de reproduction du troupeau bovin laitier: variations dues aux facteurs zootechniques autres que ceux liés à l'alimentation. *J Natl GTV*. 1998:57-66.
- Team RDC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. 2007.

Partie 2 : Caractérisation des variations de fertilité au cours du temps dans les troupeaux détectés infectés sans notification de signe clinique

INTRODUCTION

Depuis l'émergence du virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8), le système français de surveillance du BTV-8 repose sur la notification des foyers de BTV soit en cas de détection des signes cliniques par l'éleveur ou le vétérinaire, soit en cas de test sérologique positif réalisé avant la vente ou le transfert d'animaux entre zones ou pays à statuts différents vis-à-vis du BTV-8. De plus, dans des troupeaux sentinelles (entre 10 et 15 troupeaux par département), 10 à 15 prélèvements sont réalisés par troupeau de façon à obtenir mensuellement un total de 150 prélèvements. Initialement, ces troupeaux étaient destinés à suivre de manière précoce l'avancée du front épizootique, actuellement, ils servent à surveiller une éventuelle ré émergence.

Pour les foyers déclarés après suspicion clinique, la date de suspicion informe sur la date probable d'exposition du troupeau (au moins pour les foyers détectés les plus précocement dans leur canton). Dans ces foyers, la période à risque de diminution de la fertilité a été estimée dans le chapitre 1 (en moyenne entre 4 semaines avant et 5 semaines après la date de détection des signes cliniques pour les troupeaux détectés en septembre). Dans les troupeaux sentinelles infectés, la détection de l'infection pourrait être précoce du fait de la fréquence des tests diagnostiques réalisés. Au contraire, dans les troupeaux détectés dans le cadre de ventes ou de transfert d'animaux, la détection pourrait être tardive puisqu'aucun signe clinique n'a été détecté ou déclaré (un animal peut être détecté avant sa vente ou son transfert longtemps après avoir été infecté) (Figure 1).

En faisant l'hypothèse que l'infection du troupeau se traduit par une baisse décelable des performances de reproduction, les baisses de fertilité par rapport à la date de détection de l'infection peuvent être utilisées comme indicateur pour évaluer la précision de la détection par rapport à la circulation du virus dans le troupeau. Dans les troupeaux foyers ayant connu un épisode clinique et détectés tardivement pendant l'épizootie, la baisse précoce indique que la détection de la maladie a été retardée (Chapitre 1). Pour les troupeaux détectés dans le cadre du système de surveillance actif (troupeaux sentinelles ou troupeaux détectés en cas de ventes ou transfert d'animaux), les périodes de baisses de la fertilité pourraient présenter des

profils différents en fonction du moment de détection de l'infection. L'objectif de ce travail est de déterminer si une détection précoce ou tardive par rapport à celle des troupeaux voisins se traduit ou non par un profil temporel différent de diminution de la fertilité.

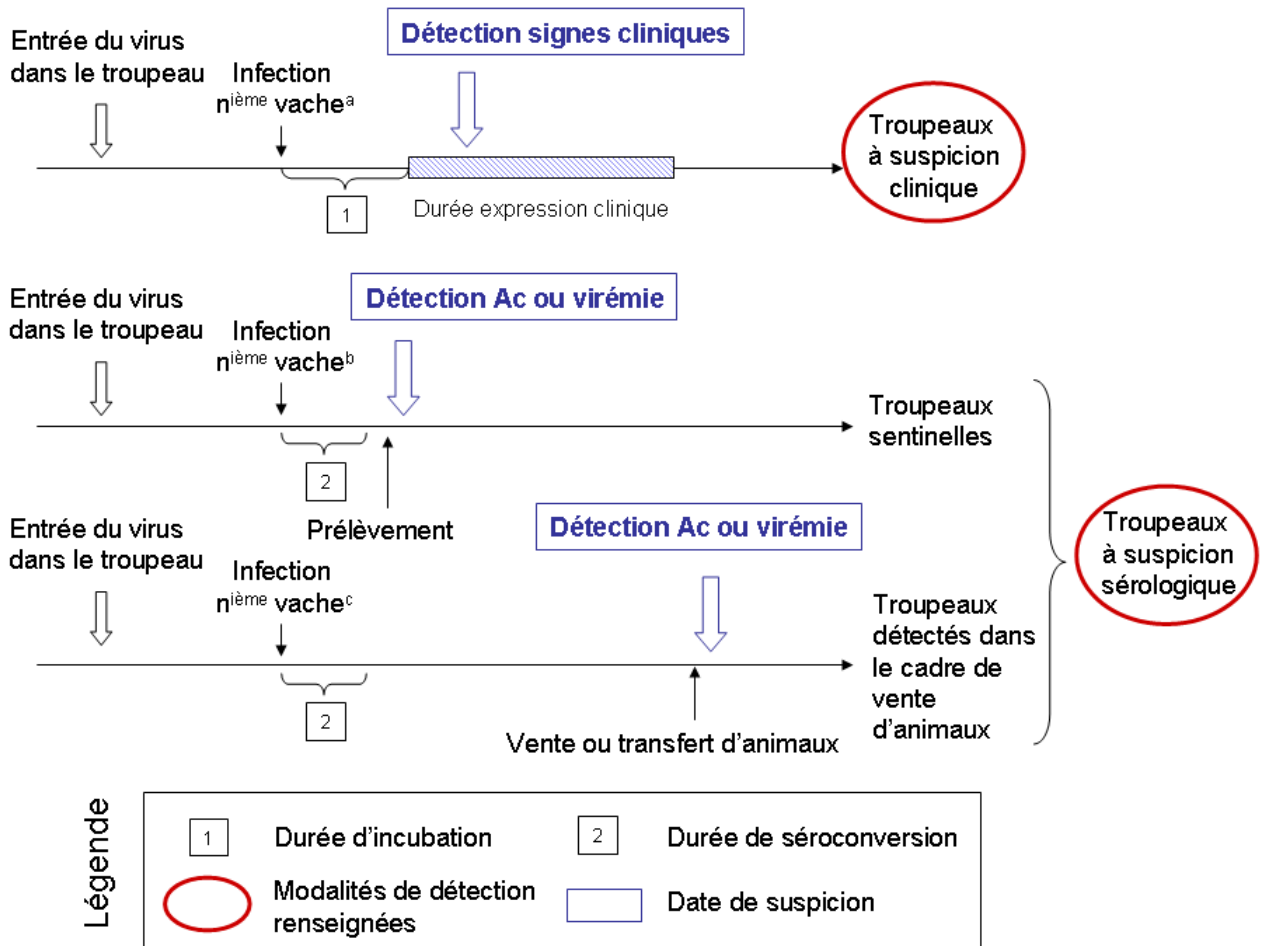


Figure 1 : Hypothèses de délais de détection de la maladie selon la modalité de détection de l'infection ($n^{\text{ième}}$ vache infectée : vache infectée parmi l'ensemble du troupeau qui, a : exprime cliniquement la maladie ; b : est prélevée après séroconversion et c : est vendue ou transférée après séroconversion)

MATERIELS ET METHODES

1. Données disponibles

Les dates de suspicion des foyers ont été transmises par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI). Ces données ne permettent pas de distinguer les deux modalités de détection du système de surveillance active : détection dans les troupeaux sentinelles et

détection dans les troupeaux détectés avant un transfert ou une vente d'animaux. Les modalités renseignées de détection des foyers permettent seulement de distinguer les suspicions cliniques (n=9184 parmi 12 190 foyers bovins déclarés en 2007) des suspicions sérologiques réalisées dans le cadre de la surveillance active (n=1970), la modalité de détection n'étant pas renseignée pour 1036 foyers.

2. Utilisation du krigeage pour distinguer les troupeaux à suspicion sérologique

Une date de détection simulée de la maladie a été interpolée pour les troupeaux déclarés après suspicion sérologique et ceux pour lesquels aucun type de suspicion n'est renseigné. Cette interpolation a été réalisée à partir des dates de suspicion des troupeaux foyers déclarés après suspicion clinique. La même méthode de krigeage universel que pour la première partie de ce chapitre a été utilisée.

Les troupeaux foyers à suspicion sérologique ont été classés en deux catégories selon l'écart entre les dates de détection observées et interpolées : (i) troupeaux à détection précoce si la date interpolée est postérieure à la date de suspicion observée, (ii) troupeaux à détection tardive si la date interpolée est antérieure à la date de suspicion observée.

3. Comparaisons pour déterminer les périodes de diminution de la fertilité

Pour les troupeaux foyers à suspicion sérologique et ceux sans modalité de détection, la diminution de fertilité a été quantifiée séparément autour des dates de détection observées, et interpolées. Les périodes de diminution de la fertilité ont été comparées à celles correspondant aux troupeaux foyers déclarés après suspicion clinique.

Les modèles statistiques utilisés ainsi que les variables d'ajustement sont les mêmes que les modèles utilisés dans la première partie de ce chapitre. La population de référence utilisée est composée de vaches appartenant à des troupeaux non exposés en 2007.

RESULTATS

1. Distinction des troupeaux à suspicion sérologique

La distribution de l'écart entre les dates de détection observées et interpolées des troupeaux à suspicion sérologique (et ceux dont la modalité de détection n'est pas renseignée) indique que

la majorité de ces troupeaux ont été détectés plus précocement que les prédictions du modèle (Figure 2). Les troupeaux pour lesquels la date de détection interpolée est postérieure à la date de détection observée ont été détectés pour la majorité de 20 à 50 jours avant la date de détection interpolée. A l'inverse, les troupeaux pour lesquels la date de détection interpolée est antérieure à la date de détection observée ont été détectés tardivement, jusqu'à 70 jours après la date de détection interpolée. Sur la base de cet écart, les foyers ont été classés comme troupeaux à détection précoce (n=378) ou troupeaux à détection tardive (n=176).

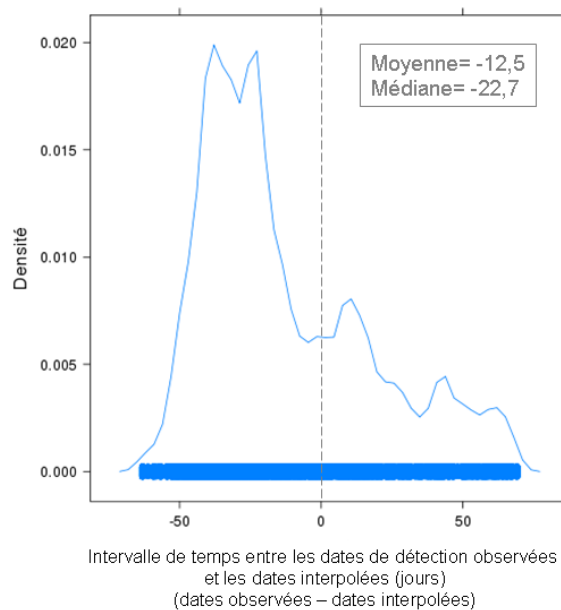


Figure 2 : Distribution de l'écart entre les dates de détection de l'infection observées et interpolées dans les troupeaux à suspicion sérologique ou pour lesquels la modalité de détection n'est pas renseignée (554 troupeaux foyers) (la moyenne et la médiane se rapportent à l'ensemble de la distribution) ; 2007 ; France

2. Périodes de baisses de fertilité autour des dates de détection de l'infection observées et interpolées

Dans les troupeaux à détection précoce et tardive, des baisses de fertilité sont observées sur une période allant de 8 semaines avant jusqu'à 12 semaines après la date de détection de l'infection (observée ou interpolée) (Figures 3 et 4). Certaines périodes sont associées à des baisses non significatives, mais les effectifs étant limités, ils ne permettent pas une estimation précise de ces baisses (les IC95% sont larges autour des valeurs estimées).

2.1. Baisses de fertilité autour de la date de détection observée

Les périodes de baisses de fertilité dans les troupeaux à détection précoce et tardive sont décalées par rapport à la date de détection observée, en comparaison à celles des foyers à suspicion clinique (Figure 3). Dans l'ensemble des troupeaux à suspicion clinique, les périodes de diminution de fertilité sont comprises entre 6 semaines avant et 10 semaines après la date de suspicion clinique (Figure 3-a). Cette période est comprise entre 2 semaines avant et 12 semaines après la date de suspicion sérologique dans les troupeaux à détection précoce (Figure 3-b), et entre 8 semaines avant et 8 semaines après la date de suspicion sérologique dans les troupeaux à détection tardive, avec un pic de diminution de fertilité correspondant aux IA réalisées entre 4 et 8 semaines avant cette date (Figure 3-c).

2.2. Baisses de fertilité autour de la date de détection interpolée

Les périodes de baisses de fertilité dans les troupeaux à détection précoce et tardive sont centrées autour des dates de détection interpolées sur une période similaire à celle des foyers à suspicion clinique (Figure 4). Les périodes de diminution de fertilité sont comprises entre 6 semaines avant et 8 semaines après la date de détection interpolée pour les foyers à détection précoce et tardive (Figure 4-b et 4-c).

DISCUSSION

Les troupeaux dont la détection est précoce ou tardive par rapport à celles des troupeaux voisins à suspicion clinique présentent des profils temporels différents de baisse de fertilité. Dans les troupeaux détectés précocement, les baisses de fertilité commencent peu de temps avant la date de détection alors que dans les troupeaux détectés tardivement, ces variations commencent 2 mois avant.

L'écart entre les dates de détection observées et interpolées indique que la majorité des troupeaux à suspicion sérologique ou sans modalité de détection renseignée ont été détectés précocement par rapport à leurs troupeaux voisins à suspicion clinique. Le fait que le début de la période de baisse de fertilité dans ces troupeaux soit proche de la date de détection suggère qu'il s'agit probablement de troupeaux sentinelles et semble confirmer le potentiel de ce dispositif à détecter l'infection peu de temps après l'introduction du virus dans le troupeau. Pour les autres troupeaux, les résultats suggèrent qu'ils ont probablement été détectés dans le cadre de vente ou de transfert d'animaux, et que la détection a été tardive par rapport à

l'introduction du virus dans le troupeau (baisse de fertilité à partir de 2 mois avant la date de détection).

Les amplitudes de baisse de fertilité dans les troupeaux à suspicion sérologique sont élevées par rapport à celles des troupeaux à suspicion clinique. L'ensemble des troupeaux à suspicion clinique ont été inclus sans distinction concernant le mois de détection de la maladie. Or, les baisses de fertilité dans ces troupeaux varient selon le mois de détection de la maladie. Pour les troupeaux détectés en septembre (ce qui correspond aux foyers dont la détection est supposée proche de l'exposition du troupeau), l'amplitude des baisses est similaire à celles des troupeaux à suspicion sérologique. Les vaches des troupeaux à suspicion sérologique n'ont a priori pas exprimé cliniquement la maladie, sauf en cas de non détection ou de non déclaration des signes cliniques par l'éleveur. L'expression de signes cliniques pourrait être associée à des baisses de fertilité plus élevées. La fertilité d'une vache ayant une forte hyperthermie pourrait être plus affectée que celle d'une vache n'exprimant aucun signe clinique. Deux hypothèses pourraient expliquer que les amplitudes de baisse de fertilité sont du même ordre de grandeur dans les troupeaux à suspicion sérologique et ceux à suspicion clinique : (i) certaines vaches des troupeaux à suspicion sérologique pourraient avoir exprimé cliniquement la maladie et ne pas avoir été détectées ou déclarées, (ii) l'effet de l'infection sur la baisse de fertilité pourrait peu varier selon l'expression clinique de la maladie. La deuxième hypothèse paraît néanmoins moins vraisemblable.

Les variations de fertilité sont centrées autour de la date de détection interpolée. Ceci suggère que le krigeage fait une bonne estimation de la date à laquelle aurait été détectée ces troupeaux en cas d'expression clinique de la maladie.

Ces résultats suggèrent que l'étude des profils temporels de variations de fertilité peut contribuer à évaluer le potentiel du dispositif de surveillance à détecter ou non précocement la circulation du virus.

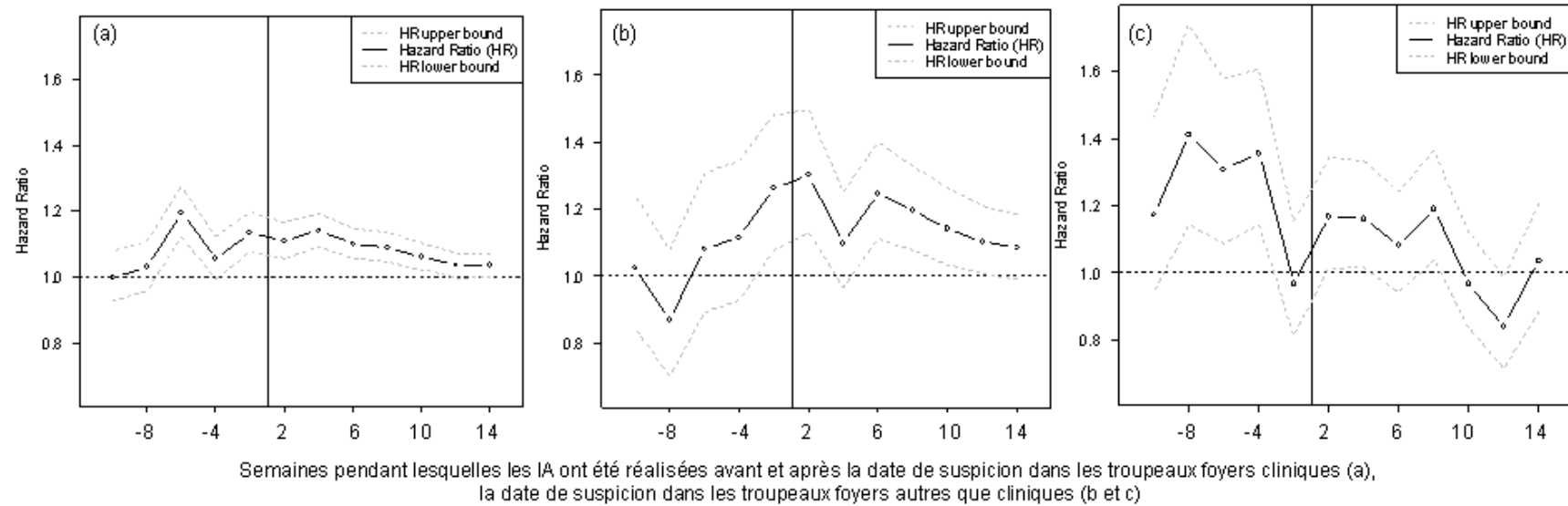


Figure 3 : Baisses de fertilité (mesurées par des augmentations du taux de retours 90 jours) avant et après (a) la date de suspicion du virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) dans les troupeaux foyers cliniques (n=2646), (b) la date observée de détection de l'infection dans les troupeaux foyers à détection précoce (n=378) et (c) la date observée de détection de l'infection dans les troupeaux foyers à détection tardive (n=176) ; 2007 ; France

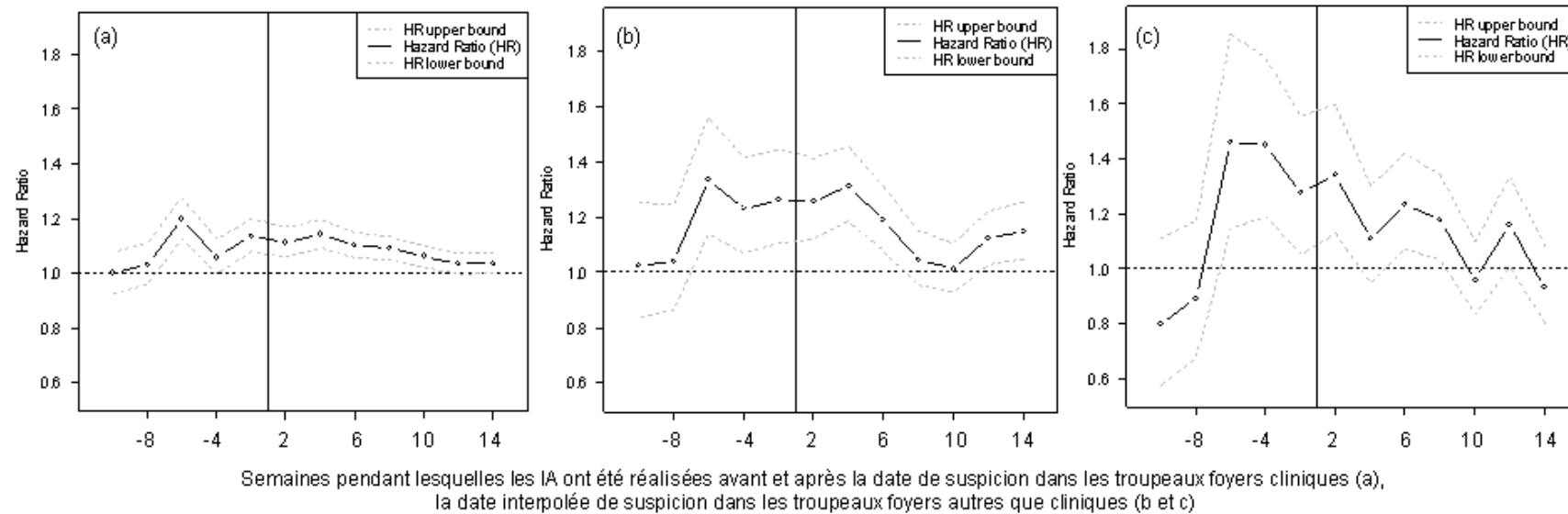


Figure 4 : Baisses de fertilité (mesurées par des augmentations du taux de retours 90 jours) avant et après (a) la date de suspicion du virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) dans les troupeaux foyers cliniques (n=2646), (b) la date interpolée de détection de l'infection dans les troupeaux foyers à détection précoce (n=378) et (c) la date interpolée de détection de l'infection dans les troupeaux foyers à détection tardive (n=176) ; 2007 ; France

DISCUSSION GENERALE

Les objectifs de cette thèse sont (1) de quantifier et caractériser les effets moyens de l'exposition au BTV-8 en conditions naturelles sur les performances des vaches appartenant à des troupeaux antérieurement naïfs, (2) de quantifier l'effet de la vaccination contre le BTV-8 en condition de terrain sur la fertilité des vaches laitières dans des troupeaux non exposés au virus et (3) d'évaluer si les effets de l'exposition sur les performances peuvent apporter une information complémentaire au dispositif de surveillance pour détecter la propagation du virus.

Le plan de la discussion est la suivant : (i) synthèse des résultats principaux, (ii) originalité et limites des approches méthodologiques retenues, (iii) généralisation des résultats, (iiii) implications et (iiiii) perspectives de ce travail.

1. Résultats principaux

1.1. Quantification des effets de l'exposition au BTV-8 sur les performances

1.1.1. Effets moyens et impacts de l'exposition sur les performances

L'exposition au BTV-8 est associée à une diminution de la fertilité et de la production de lait, et à une augmentation du risque d'avortement des vaches appartenant à des troupeaux exposés au virus en conditions naturelles. Ces quantifications ont été réalisées pour l'ensemble des vaches appartenant à des troupeaux ayant connu un épisode clinique durant l'épizootie de 2007, et correspondent donc aux pertes moyennes subies. Le table 1 présente une synthèse des résultats des quantifications des effets de l'exposition au BTV-8 sur les performances étudiées. La diminution moyenne de production de lait des vaches des troupeaux situés dans les cantons les plus exposés correspond à plus de 3% de la production 305 jours. Cet effet a un impact économique direct car la diminution de production de lait impacte directement les revenus de l'éleveur. Toutes les performances de reproduction étudiées sont affectées par l'exposition au BTV-8. Comme la majorité des éleveurs ré insémine une vache après un

Table 1 : Synthèse des résultats de la quantification et de la caractérisation des effets de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 chez les vaches appartenant aux troupeaux ayant connu un épisode clinique en 2007 en France

Performance	Critère	Performances moyennes de référence	Effet moyen (IC 95%) [§]	Effet moyen dans la population la plus touchée ^{&}	Durée période à risque autour de la date de détection	Effet mois de détection	Effet niveau exposition
Fertilité	Retours 90 jours	54,2% [£]	Augmentation de 6,6 points de % (IC95 [5,2-8,0])	Augmentation de 15,7 points de % ^a (IC95 [10,3-21,1])	<i>Foyers les plus précoces</i> : de 4 semaines avant à 5 semaines après <i>Foyers les plus tardifs</i> : de 8 à 10 semaines avant	Effet plus faible pour détection tardive	Pas d'effet
Avortements	Retours tardifs (90-200 jours)	13,9% [£]	Augmentation de 6,3 points de % (IC95 [5,2-7,5])	Augmentation de 10,8 points de % (IC95 [7,8-14,5])	6 premiers mois de gestation	Effet plus faible pour détection tardive	Effet augmente quand incidence mensuelle augmente
			Augmentation de 6,4 points de % (IC95 [4,9-7,9])	Augmentation de 15,3 points de % (IC95 [9,6-21,8])	3 premiers mois de gestation		
	Gestations courtes	5,1% [£]	Augmentation de 1,9 points de % (IC95 [1,5-2,4])	Augmentation de 2,6 points de % (IC95 [1,7-3,6])	6 derniers mois de gestation	Effet plus faible pour détection tardive	Effet augmente quand incidence mensuelle augmente
Production de lait	Production de lait	26,5 kg/jour ^{££}	Diminution de 2,8% de la production de lait 305 jours [#]	Diminution de 3,4% de la production de lait 305 jours ^b	<i>Foyers les plus précoces</i> : de -63 jours avant à +118 jours après <i>Foyers les plus tardifs</i> : de -170 jours avant à +40 jours après	Effet plus faible pour détection tardive	Effet augmente quand incidence mensuelle augmente

[£] population de référence : vaches appartenant à des troupeaux non exposés en 2007

^{££} population de référence : vaches en lactation entre 2004 et 2006 appartenant aux troupeaux exposés en 2007

[§] effet moyen estimé sur l'ensemble de la période d'exposition à risque, pour l'ensemble des vaches des troupeaux cliniques

[#] niveau de production de référence = production des vaches non exposées

[&] effet moyen estimé sur la période d'exposition à risque pour les foyers détectés en septembre dans les cantons les plus exposés

^a effet moyen estimé de 4 semaines avant à 5 semaines après la date d'exposition pour les foyers détectés en septembre dans les cantons les plus exposés

^b perte cumulée rapportée à la production moyenne à 305 jours, estimée pour l'ensemble des vaches des troupeaux situés dans les cantons les plus fortement exposés (niveau de production de référence = production des vaches non exposées)

retour en IA qui intervient après une première IA, l'augmentation du taux de retours entraîne un décalage de la gestation et donc une augmentation de l'intervalle vêlage-vêlage. Ceci a pour conséquence une baisse de la productivité. Les effets de l'exposition au BTV-8 sur la reproduction dépendent du stade pendant lequel intervient l'interruption de gestation et de la viabilité du fœtus. Si le fœtus est non viable, l'éleveur peut ré inséminer la vache ou décider de la réformer, ce qui a un impact économique. Si le fœtus est viable (naissance prématurée), les conséquences dépendent des possibles lésions ou malformations. Si l'on considère ces effets moyens de l'exposition au BTV-8 sur les performances à l'échelle d'une population ou d'une région, les impacts économiques sont massifs. Ils le sont d'autant plus qu'il faut prendre en compte les effets de l'infection dans les troupeaux qui n'ont pas été détectés durant l'épizootie.

Les effets associés à l'exposition au BTV-8 sont plus élevées que ceux quantifiés dans les troupeaux atteints de diarrhée virale bovine (BVD). En effet, dans les troupeaux dont le taux d'anticorps contre la BVD dans le lait de tank est élevé, la diminution de la production de lait par contrôle a été estimée à 0,58 kg (Beaudeau et al., 2004) et l'augmentation des retours tardifs à 6,6 points de pourcent (RR=1,11 [1,05-1,17]) (Robert et al., 2004). Les effets de l'exposition au BTV-8 sont proches des effets quantifiés pour des vaches atteintes de boiteries. Les pertes de production de lait associées aux boiteries ont été estimées entre 80 et 350 kg sur la durée de la lactation (correspondant à des diminutions par contrôle laitier entre 0,3 et 3,3 kg) (Bareille et al., 2003 ; Coulon et al., 1996, Deluyker et al., 1991, Fourichon et al., 1999 ; Lucey et al., 1986, Tranter and Morris, 1991). Pour la fertilité, les risques de retours tardifs (à 56 et 90 jours) sont 1,56 plus élevés chez les vaches atteintes de boiteries comparé à des vaches non atteintes (Argaez-Rodriguez et al., 1997, Tranter and Morris, 1991).

Il est à noter un biais dans la quantification des effets de l'exposition sur les performances. Il s'agit d'un biais de sélection qui résulte de la sélection des troupeaux foyers à suspicion clinique. Les effets moyens de l'exposition pourraient être plus élevés dans ces troupeaux que dans les troupeaux foyers sans suspicion clinique. En effet, certaines diminutions de performances peuvent être considérées par les éleveurs comme un critère d'alerte ou de suspicion d'une maladie (particulièrement en cas d'avortement ou de chute brutale de la production de lait). Les variations de performances associées à l'exposition au BTV-8 pourraient être plus élevées chez les vaches qui ont des signes cliniques de la maladie. Par exemple, la production de lait et la fertilité d'une vache infectée présentant des signes

d'abattement et d'hyperthermie pourraient être plus affectées qu'une vache ne présentant pas ces signes. De plus, les signes cliniques comme les congestions de la bouche ou les lésions podales sont probablement associés à une diminution de l'ingestion d'aliments, ce qui risque de diminuer l'ensemble des performances. Cependant, dans les troupeaux sans notification de signes cliniques, des baisses de fertilité du même ordre de grandeur que dans les troupeaux ayant connu un épisode clinique ont été observées. Ceci pourrait être due en partie à la non détection ou non déclaration de signes cliniques dans ces troupeaux.

L'absence d'information sur la proportion de vaches infectées dans les troupeaux déclarés est une limite concernant la connaissance de l'effet individuel de l'infection. Il est probable que les effets moyens quantifiés en conditions naturelles d'exposition sous-estiment l'effet de l'infection au niveau individuel puisque les prévalences intra-troupeaux sont probablement inférieures à 1, même dans les troupeaux foyers situés dans les cantons les plus fortement exposés. Ce sont les effets estimés dans ces troupeaux qui se rapprochent le plus des effets de l'infection individuel puisque l'incidence intra-troupeau est probablement plus élevée que dans les autres cantons.

1.1.2. Périodes de baisse des performances et hypothèses sur les effets biologiques du virus

Les périodes de baisse de performances autour de la date de détection des signes cliniques du troupeau sont variables selon le critère étudié (Figure 1). Ces périodes correspondent aux moments où sont réalisées les IA et les contrôles laitiers par rapport à la date de détection des signes cliniques dans le troupeau. Alors que la production de lait est mesurée directement à un instant donné, les performances de reproduction sont mesurées par l'occurrence d'un évènement (retour en IA ou vêlage) intervenant après un intervalle de temps variable (intervalle entre IA1 et IA2 pour la fertilité et les retours tardifs et intervalle entre l'IA présumée fécondante et la date de vêlage pour les gestations de courte durée). Pour la fertilité, étant donné la distribution de l'intervalle entre la première et la deuxième IA, les performances sont majoritairement mesurées sur un intervalle de quelques semaines suivant l'IA1. Dans le cas des avortements, les performances mesurées sont très décalées par rapport à la date d'IA puisqu'il s'agit de retours tardifs ou de durées de gestation courtes. Selon les performances étudiées, les périodes de part et d'autre de la date de détection de la maladie correspondent à des stades physiologiques différents. Les stades impliqués dans la mesure du critère de fertilité étudié ici sont la fécondation ainsi que les stades précoces de gestation (développement

embryonnaire et début du développement fœtal). Pour les avortements, il s'agit de l'ensemble de la gestation.

Les durées des périodes de variation des performances sont dues (i) à l'effet du virus qui est variable selon le moment de l'infection, (ii) à la diffusion progressive du virus dans le troupeau et (iii) au moment de détection des signes cliniques par l'éleveur.

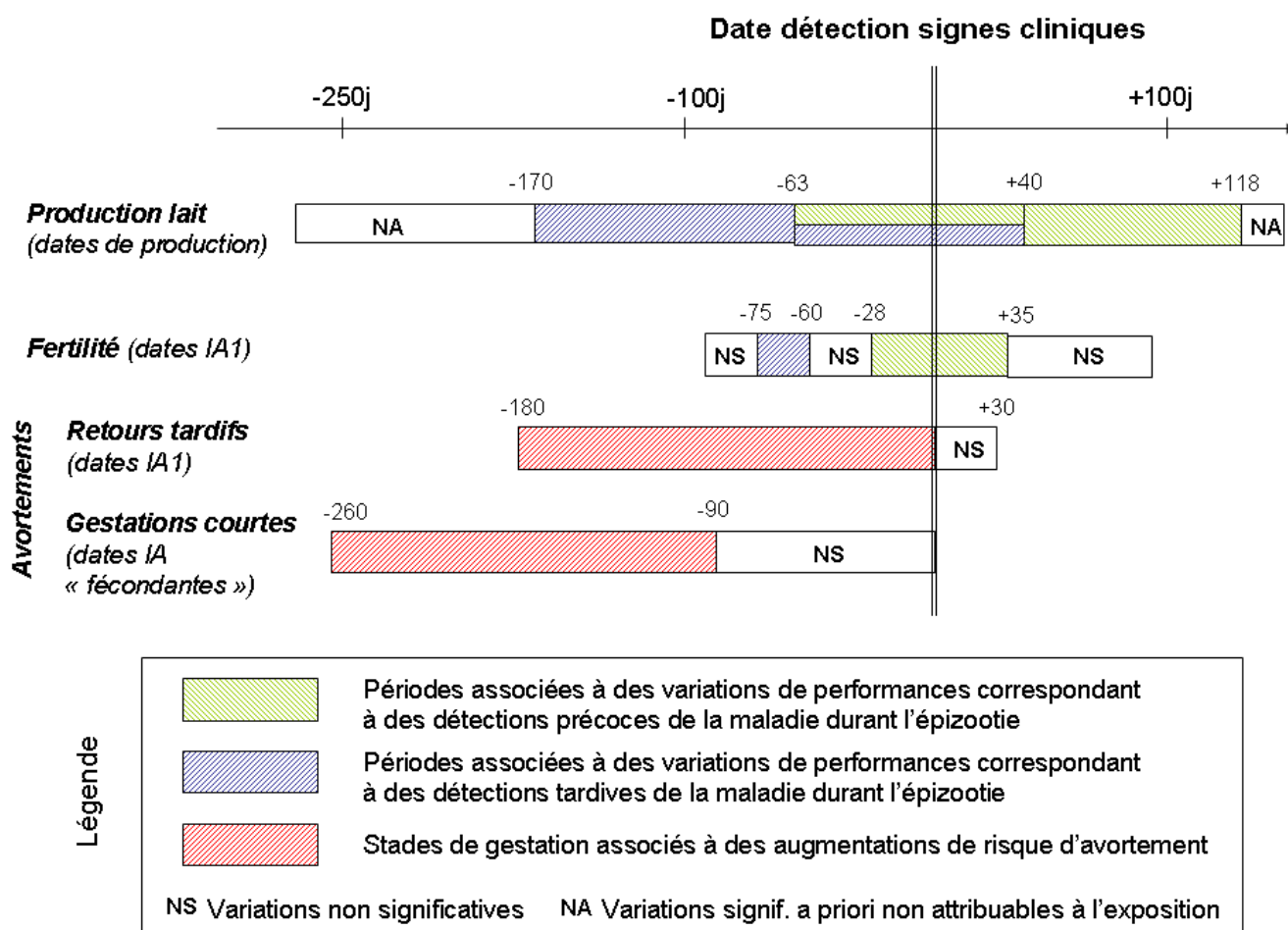


Figure 1 : Périodes autour de la date de détection des signes cliniques du virus de la Bluetongue sérotype 8 associées à des baisses de performances

1.1.2.1. Effet du virus selon le moment de l'infection

La diminution de fertilité associée à l'exposition au BTV-8 intervient sur un intervalle de temps resserré autour de la date de détection de la maladie dans les troupeaux détectés précocement pendant l'épizootie (9 semaines). La période de baisse de fertilité avant la date de détection de la maladie indique que les effets du BTV-8 sur l'augmentation du taux de retours 90 jours sont sans doute causés soit par des échecs de fécondation (dans le cas d'une infection

de la vache autour de l'IA), soit par de la mortalité embryonnaire (dans le cas d'une infection les semaines suivant l'IA). Les IA pourraient être affectées rapidement après l'infection, mais pourraient l'être également jusqu'à plusieurs semaines après, possiblement en raison de la persistance de l'effet du virus, comme la durée de l'hyperthermie ou la contamination et le développement du virus dans les voies génitales des vaches.

La période de réalisation des IA pour lesquelles il y a une augmentation du risque d'avortement associée à l'exposition est estimée à 6 mois, pour les 2 critères étudiés. Cette période correspond à différents stades de la gestation selon l'intervalle entre la date d'IA de la vache et le date de détection de la maladie du troupeau. Pour les retours tardifs, en supposant que les troupeaux sont exposés au virus pendant un intervalle relativement court autour de la date de détection de la maladie, cette période semble indiquer une augmentation de la mortalité fœtale durant les 6 premiers mois de gestation. Le risque de retours tardifs est plus élevé pour des expositions supposées pendant le premier tiers de gestation que pendant le deuxième tiers. Cependant, les expositions supposées pendant le premier mois de gestation entraînent moins de retours tardifs que pendant le deuxième mois. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces observations. Tout d'abord, il semble que l'effet délétère du virus sur le fœtus soit plus fort quand celui-ci est jeune, ce qui est cohérent avec les résultats d'études expérimentales. De plus, des expositions très précoces pendant la gestation sont associées à une forte augmentation du taux de retours 90 jours (Chapitre 1). Ces expositions pourraient se traduire plus fréquemment par l'augmentation de retours avant 90 jours que par des retours tardifs. L'augmentation des retours tardifs associés à des expositions très précoces pourrait s'expliquer par un effet délétère du virus décalé, peut-être suite à la momification du fœtus. Une partie du décalage peut être attribuable à une non détection des chaleurs après l'interruption de la gestation. Les atteintes sévères du fœtus entraînant sa mort en début de gestation sont vraisemblablement associées à des avortements précoces. Le critère durée de gestation courte ne permet pas d'estimer l'effet de l'exposition sur les avortements précoces. C'est probablement la raison pour laquelle aucune augmentation du taux de gestation courte n'a été mise en évidence pour des expositions supposées durant le premier tiers de gestation. Les effets du virus sont moins sévères en fin de gestation (MacLachlan et al., 2000). L'augmentation du taux de gestation courte pour des expositions supposées pendant le dernier tiers de gestation pourrait être due à une augmentation du taux de naissances prématurées.

1.1.2.2. Diffusion progressive du virus dans le troupeau et hypothèses sur les durées d'effet de l'infection selon les performances

Les baisses de performances après la date de détection de la maladie dans les troupeaux pourraient être dues au temps nécessaire à la circulation du virus dans les troupeaux et à la persistance de l'effet du virus sur les performances. Des effets sur la fertilité sont observés durant 5 semaines après la date de détection de la maladie dans le troupeau, alors que pour la production de lait, des effets sont observés durant 4 mois suivant cette date. Pour expliquer cette différence de durée d'effet, une hypothèse pourrait être que le temps nécessaire à la propagation du virus dans un troupeau exposé est relativement courte, de l'ordre de quelques semaines, et que l'effet de l'infection au niveau individuel est plutôt de courte durée sur la fertilité et persistant sur la production de lait. Les performances de reproduction sont notamment affectées par l'hyperthermie (Bridges et al., 2005, Hansen et al., 2001, Putney et al., 1988, Wolfenson et al., 2000). L'hyperthermie est modérée chez les bovins, elle commence rapidement après l'infection (dès le lendemain), peut persister jusqu'à une dizaine de jours et dépasse rarement les 40°C (Dal Pozzo et al., 2009, Darpel, 2007). La durée de la période de baisse de fertilité est cohérente avec la durée d'hyperthermie. La production de lait est influencée par des signes cliniques affectant directement les trayons ou les mamelles ou entraînant une diminution de l'ingestion d'aliments (lésions buccales et podales). Ces signes cliniques sont associés à un temps de guérison relativement long qui pourrait expliquer les baisses de production de lait plusieurs mois après la date de détection de la maladie. La durée de baisse de la production de lait est cohérente avec la durée d'effet associée à l'exposition au virus de la maladie hémorragique épizootique (du même genre *Orbivirus* que le BTV). En effet, les vaches exposées au début de l'épizootie ont montré une baisse significative de leur production de lait durant les 4 mois suivants l'apparition du virus (Kedmi et al., 2010).

1.1.3. Périodes de variations des performances et hypothèses sur la détection des signes cliniques selon le moment d'exposition

La figure 2 présente les variations de fertilité (mesurée par le taux de retours 90 jours) avant et après la date de détection de signes cliniques dans le troupeau, selon le mois de détection de ces signes cliniques, indépendamment du niveau d'exposition local. La figure 4 (page 117) du chapitre 1 concernant la diminution de la production laitière associée à l'exposition au virus BTV-8 présente les mêmes résultats pour l'effet de l'exposition au BTV-8 sur la production de lait autour de la date de détection de signes cliniques, pour les vaches des troupeaux

appartenant aux cantons modérément exposés. Les baisses de fertilité et de production de lait sont d'autant plus précoces que le troupeau est détecté tardivement durant l'épizootie. De plus, dans les troupeaux détectés tardivement, les IA pour lesquelles une augmentation du taux de retour 90 jours a été observée ont été réalisées pendant le pic de détection de la maladie dans le canton où est situé le troupeau. Ce résultat suggère que la détection de la maladie a été retardée pour les troupeaux détectés tardivement pendant l'épizootie.

Ceci souligne d'une part l'intérêt de quantifier les variations de performances sur un intervalle de temps large autour de la date de détection de la maladie, et d'autre part, l'intérêt de distinguer les foyers selon le moment de détection par rapport à la progression de l'épizootie.

1.1.4. Influence du niveau d'exposition local et du mois de détection et hypothèses sur la circulation du virus dans une population bovine

Les tables 2 et 3 présentent une synthèse de l'influence du niveau d'exposition local et du mois de détection sur l'effet sur les performances. Des variations de l'effet de l'exposition sur les performances sont observées selon ces deux facteurs. Ces variations pourraient être expliquées soit par la variation de l'incidence intra-troupeau, soit par la quantité de virus inoculée aux vaches par les *Culicoides*. En effet, la prévalence intra-troupeau augmente quand la prévalence inter-troupeau locale est plus élevée (Durand et al., 2010). Comme les niveaux d'exposition ont été classés selon la proportion de troupeaux nouvellement infectés, il se pourrait que l'incidence intra-troupeau soit plus élevée dans les troupeaux situés dans les cantons les plus fortement exposés au virus. Ceci expliquerait que globalement, les baisses de performance sont plus fortes dans ces cantons. De plus, l'abondance des vecteurs diminue entre août et décembre. Or, la quantité de vecteurs est un facteur qui détermine la proportion de troupeaux infectés dans une région, le nombre de vaches infectées par troupeau et la quantité de virus inoculées aux vaches. La diminution de l'abondance en vecteurs pourrait donc être responsable de la diminution de l'incidence intra-troupeau ou de la quantité de virus inoculée aux vaches (ou une combinaison des deux).

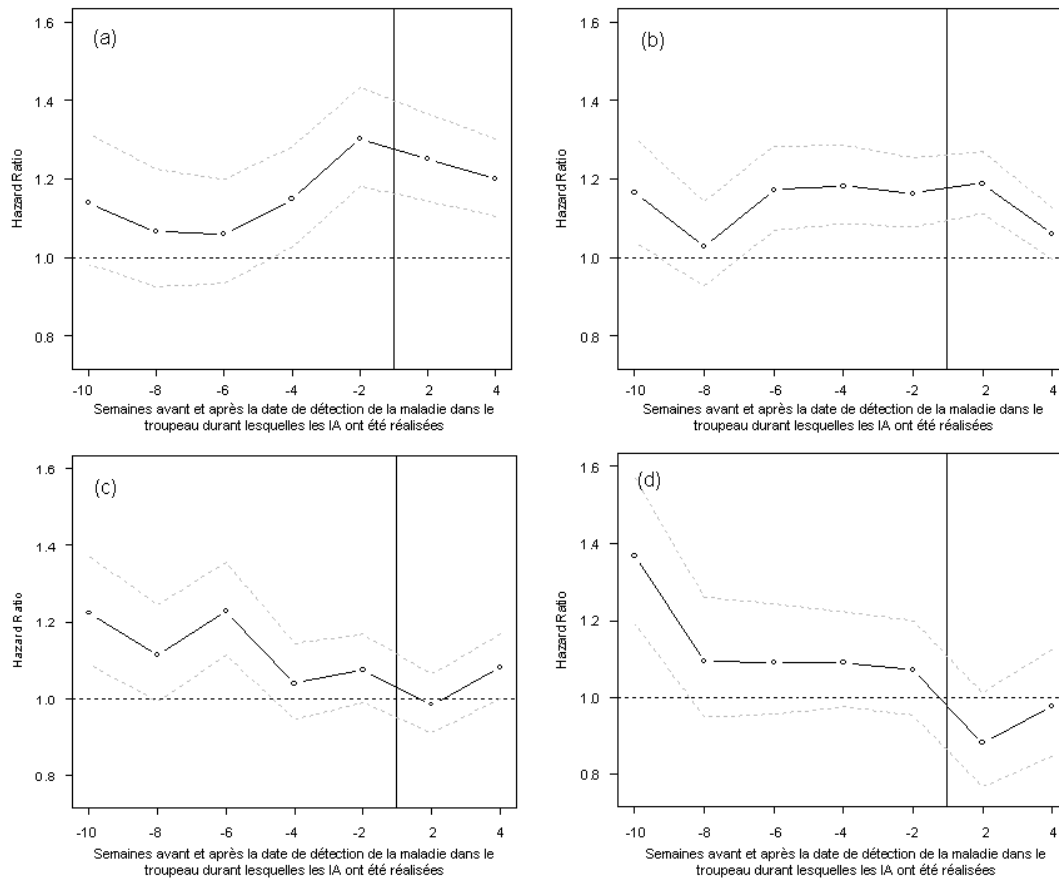


Figure 2 : Variations de la fertilité (mesurée par le taux de retours 90 jours) avant et après la date de détection des signes cliniques du virus de la Bluetongue sérotype 8 dans le troupeau selon le mois de détection de ces signes cliniques ; (a) foyers détectés en septembre, (b) foyers détectés en octobre, (c) foyers détectés en novembre, (d) foyers détectés en décembre

Dans la comparaison des pertes par niveau d'exposition ou par mois de détection, il y a un biais de sélection potentiel du fait de la distribution des dates de détection des signes cliniques selon la catégorie d'exposition. En effet, ces dates de détection des troupeaux situés dans les cantons les plus exposés sont majoritairement en septembre et octobre, alors qu'elles sont réparties entre septembre et décembre et entre août et décembre pour les troupeaux situés dans les cantons modérément et faiblement exposés, respectivement (cf figure 1 page 114 chapitre 1). Pour limiter ce possible biais de sélection, il est donc nécessaire d'estimer les variations des performances selon le niveau d'exposition au niveau canton pour chaque mois de détection des signes cliniques. La figure 4 présente les effets moyens de l'exposition au BTV-8 sur les performances pendant les périodes de variations mises en évidence selon ces deux facteurs. Indépendamment du niveau d'exposition, l'effet sur les performances diminue globalement

quand le mois de détection de la maladie est plus tardif. Pour un mois donné, l'effet de l'exposition diminue quand le niveau d'exposition est plus faible pour la production de lait des vaches de troupeaux détectés entre août et octobre et pour le taux de retours tardifs des vaches de troupeaux détectés en septembre. Aucun effet du niveau d'exposition n'est mis en évidence pour l'effet de l'exposition sur la fertilité et sur le taux de gestation de courte durée. L'incidence intra-troupeau pourrait diminuer quand la proportion de troupeaux voisins infectés diminue. Le mois de détection semble entraîner plus de variations de l'effet de l'exposition sur les performances que le niveau d'exposition des cantons. Ceci suggère que l'incidence intra-troupeau (et/ou la quantité de virus inoculée aux vaches) pourrait être plus influencée par le mois de détection que par le niveau d'exposition au niveau canton.

Deux hypothèses pourraient être envisagées pour expliquer que l'effet de l'exposition sur la fertilité ne varie pas selon le niveau d'exposition locale. La première hypothèse est liée à la durée des périodes d'exposition à risque de variation de fertilité et à l'incidence de l'infection dans les troupeaux exposés. La durée de la période d'exposition associée à des variations de la fertilité est courte par rapport aux autres performances (Figure 3). Il est possible que l'incidence intra-troupeaux du BTV-8 pendant cette période varie peu selon le niveau d'exposition du canton mais que globalement l'incidence intra-troupeau soit plus élevée dans les troupeaux des cantons fortement exposés. Il se pourrait que la période de variation de la fertilité soit trop courte pour refléter les variations globales de l'incidence intra-troupeau. Cependant, il n'y a pas non plus de relation entre l'effet de l'exposition sur le taux de gestation de courte durée et le niveau d'exposition alors que la période de variations est de 6 mois. Ceci ne permet donc pas de valider l'hypothèse énoncée.

La deuxième hypothèse fait intervenir la notion de quantité de virus inoculée aux vaches dans ces troupeaux. Les effets de l'infection sur la fertilité interviennent à des étapes précoces du cycle de reproduction (fécondation, développement embryonnaire). Ces étapes sont probablement plus sensibles aux effets de l'infection que ne l'est le développement fœtal. L'effet biologique de l'infection sur la fertilité serait alors peu dépendant de la quantité de virus inoculé aux vaches, et une faible quantité de virus pourrait suffire à entraîner un échec de fécondation ou la mort de l'embryon (réponse « binaire » plutôt qu'un effet dose).

Table 2 : Influence du niveau d'exposition local sur l'effet de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) sur les performances. L'effet de l'exposition a été estimé pour des expositions pendant la période à risque de variations des performances. Pour les critères de reproduction, la population de référence est composée des vaches appartenant à des troupeaux non exposés en 2007. Pour la production de lait, la population de référence est composée des vaches en lactation entre 2004 et 2006 appartenant à des troupeaux exposés en 2007.

Performance	Critère étudié	Période associée à des variations de performance (par rapport à la date de détection du BTV-8 dans le troupeau)	Vaches de troupeaux situés dans les cantons fortement exposés	Vaches de troupeaux situés dans les cantons modérément exposés	Vaches de troupeaux situés dans les cantons faiblement exposés
Fertilité	Retours 90 jours (HR, IC95%)	IA de 10 semaines avant à 4 semaines après	1,11 [1,06 ;1,17]	1,13 [1,09 ;1,16]	1,12 [1,07 ;1,17]
Avortements	Retours 90-200 jours (HR, IC95%)	IA de 260 jours avant à la date de détection	1,60 [1,44 ;1,77]	1,40 [1,30 ;1,51]	1,45 [1,31 ;1,60]
	Gestations courtes (HR, IC95%)	IA de 260 jours à 90 jours avant	1,41 [1,28 ;1,55]	1,36 [1,25 ;1,47]	1,38 [1,22 ;1,55]
Production lait	Pertes par lactation (kg/lactation, IC95%)	CL de 63 jours avant à 118 jours après*	235 [40 ;394]	211 [117 ;306]	186 [80 ;293]

Table 3 : Influence du mois de détection des signes cliniques sur l'effet de l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) sur les performances. L'effet de l'exposition a été estimé pour des expositions pendant la période à risque de variations des performances. Pour les critères de reproduction, la population de référence est composée des vaches appartenant à des troupeaux non exposés en 2007. Pour la production de lait, la population de référence est composée des vaches en lactation entre 2004 et 2006 appartenant à des troupeaux exposés en 2007.

Performance	Critère étudié	Période associée à des variations de performance (par rapport à la date de détection du BTV-8 dans le troupeau)	Vaches de troupeaux déclarés en septembre	Vaches de troupeaux déclarés en octobre	Vaches de troupeaux déclarés en novembre	Vaches de troupeaux déclarés en décembre
Fertilité	Retours 90 jours (HR IC95%)	IA de 10 semaines avant à 4 semaines après	1,19 [1,10 ;1,29]	1,12 [1,04 ;1,19]	1,09 [1,03 ;1,17]	1,05 [0,96 ;1,16]
Avortements	Retours 90-200 jours (HR IC95%)	IA de 260 jours avant à la date de détection	1,72 [1,47 ;2,01]	1,42 [1,20 ;1,68]	1,39 [1,16 ;1,66]	1,16 [0,90 ;1,50]
	Gestations courtes (HR IC95%)	IA de 260 jours à 90 jours avant	1,44 [1,23 ;1,68]	1,36 [1,08 ;1,71]	1,25 [0,89 ;1,76]	1,33 [0,89 ;1,99]
Production lait	Pertes par lactation (kg/lactation, IC95%)	CL de 63 jours avant à 118 jours après*	249 [180 ;318]	218 [159 ;278]	159 [69 ;250]	128 [-30 ;287]

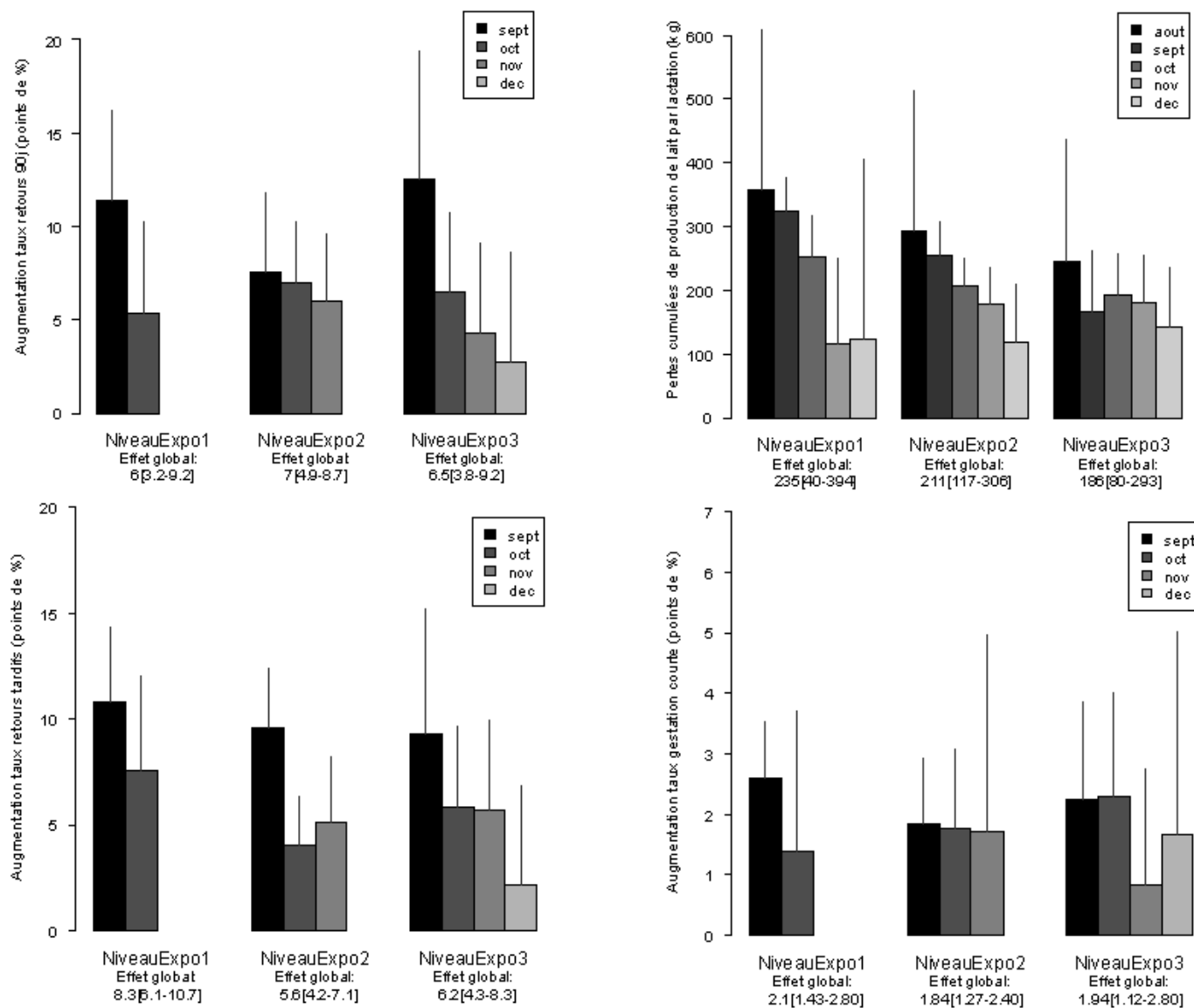


Figure 4 : Variations des performances associées à l'exposition au BTV-8 selon le niveau d'exposition du canton et du mois de détection de la maladie

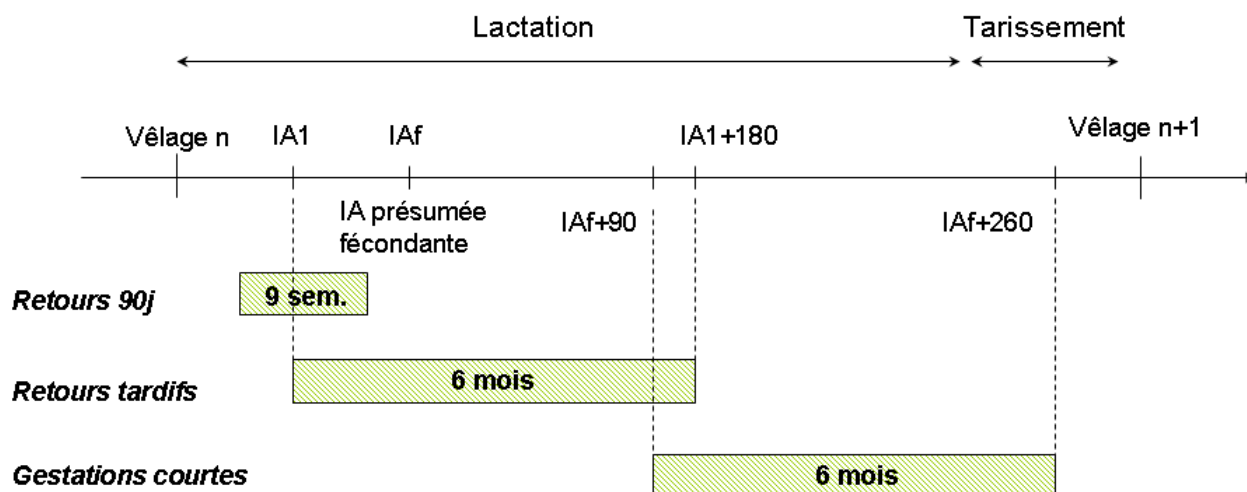


Figure 3 : Périodes supposées de la gestation (intervalles date IA des vaches – date de détection de la maladie dans le troupeau) pour lesquelles des baisses de performances de reproduction associées à l'exposition au virus de la Bluetongue sérotype 8 sont observées

1.2. Quantification d'un potentiel effet secondaire de la vaccination contre le BTV-8 sur la fertilité

1.2.1. Impact de la vaccination contre le BTV-8 sur la fertilité

La vaccination contre le BTV-8 avec un vaccin inactivé est associée à une légère augmentation des retours précoces uniquement pour les vaches ayant reçu une deuxième injection de vaccin la semaine suivant l'IA. Cet effet secondaire correspond à une augmentation de 4 points de pourcent des retours précoces. L'occurrence d'un retour précoce ne permet pas de distinguer un échec de fécondation d'une mortalité embryonnaire précoce. Cependant, comme les injections de vaccin autour de la date d'IA (entre -3 et 1 jours) ne sont pas associées à une augmentation de retours, l'effet secondaire mis en évidence est probablement dû à une augmentation de la mortalité embryonnaire précoce. Aucun effet de la vaccination sur la mortalité embryonnaire tardive n'a été montré.

1.2.2. Comparaison des impacts de la vaccination contre le BTV-8 et de l'exposition au BTV-8 sur la fertilité au niveau troupeau

La comparaison des pertes de fertilité attribuables à la vaccination et à l'exposition au niveau troupeau indique que l'impact de la vaccination sur la fertilité est très limité par rapport à celui de l'exposition. En considérant l'effet de l'exposition dans la population la plus touchée (effet moyen

estimé de 4 semaines avant à 5 semaines après la date d'exposition pour les foyers détectés en septembre dans les cantons les plus exposés), l'impact de l'exposition au niveau d'un troupeau sur la fertilité a été estimé 22 fois supérieur à celui de la vaccination. Étant donné la faible proportion de vaches inséminées pendant la semaine à risque de vaccination par rapport à la proportion de vaches inséminées pendant la période à risque d'exposition, les situations pour lesquelles les pertes de fertilité associées à la vaccination seraient supérieures aux pertes associées à l'exposition sont très peu vraisemblables. Ce résultat semble indiquer que les bénéfices de la vaccination sont très supérieurs aux risques.

Une autre méthode de comparaison des effets de la vaccination et de l'exposition sur la fertilité aurait été de calculer les fractions de risque attribuables à la vaccination et à l'exposition. La notion de fraction de risque attribuable fait intervenir le taux de vaccination et d'exposition dans les populations d'étude. Or, en raison de l'existence de sous-déclaration des foyers de BTV-8, qui a été vérifiée dans le chapitre 3, la population de référence a été sélectionnée dans une autre région. Dans cette population qui a permis d'estimer les effets de l'exposition (étude cas-témoin), le taux d'exposition n'est donc pas défini, ce qui ne permet pas de calculer la fraction de risque attribuable à l'exposition.

1.3. Variations de fertilité des vaches laitières dans les troupeaux sans notification de signe clinique de BTV-8 situés en zone d'épizootie

Les baisses de performances permettent de compléter l'information issue de la surveillance concernant l'étendue de la maladie (nombre de troupeaux infectés) et la date probable d'introduction du virus dans le troupeau. Dans les troupeaux non déclarés comme foyers situés en zone d'épizootie, des baisses de fertilité ont été mises en évidence. Ce résultat confirme qu'une partie des troupeaux non déclarés en zone d'épizootie ont été infectés durant l'épizootie de 2007 (Durand et al., 2010). L'amplitude de ces baisses est plus faible que celles dans les troupeaux ayant connu un épisode clinique. En supposant un effet équivalent de l'infection dans les troupeaux déclarés et non déclarés, environ 60% des troupeaux non déclarés en zone d'exposition auraient été infectés (si l'effet est plus faible dans les troupeaux non déclarés, ce pourcentage augmente). Il a été vérifié qu'aucune variation du même ordre de grandeur n'était observée en absence d'exposition, ce qui indique que les variations observées sont attribuables à l'exposition au BTV-8. Ceci suggère que le suivi des baisses de fertilité peut être utilisé pour montrer de manière spécifique l'existence de sous-déclaration des foyers pendant une épizootie.

Dans les troupeaux sans notification de signe clinique, où la maladie a été détectée tardivement, des baisses de performances sont détectées très précocement par rapport à la date de détection des signes cliniques. Cela suggère que la circulation du virus dans ces troupeaux est généralement antérieure (parfois très) à la détection de l'infection par les éleveurs. Ces résultats suggèrent que l'étude des profils temporels de variations de fertilité peut contribuer à évaluer le potentiel du dispositif de surveillance à détecter ou non précocement la circulation du virus.

2. Originalités et limites des approches méthodologiques retenues

2.1. Choix du niveau d'estimation des effets moyens de l'infection

Les effets moyens de l'infection par le BTV-8 ont été estimés dans les troupeaux ayant connu un épisode clinique pour lesquels la proportion de vaches infectées est inconnue. Malgré que la quantification de l'effet du BTV-8 au niveau d'une population sous-estime l'effet biologique, ce niveau a été choisi car il permet d'estimer un effet moyen de l'exposition dans un troupeau infecté (Table 4). Ces effets moyens sont utiles pour l'évaluation économique de la vaccination.

Table 4 : Avantages et inconvénients de la quantification des variations de performance au niveau individuel et au niveau d'une population

	Effet de l'infection au niveau individuel	Effet de l'exposition au niveau populationnel
Avantages	Information utile pour la connaissance de l'effet biologique de l'infection	Puissance statistique élevée Information utile pour l'aide à la décision car correspond à l'effet moyen dans un troupeau dans les conditions naturelles d'exposition
Inconvénients	Dispositif d'étude coûteux (suivi individuel du statut d'infection)	Effet moyen qui sous-estime probablement l'effet individuel si la prévalence intra-troupeau de l'infection est inférieure à 1

2.2. Originalités des approches méthodologiques

2.2.1. Larges effectifs des populations comparées

Les différentes analyses dans ce travail ont été réalisées dans de larges populations de bovins. Les grands effectifs permettent l'identification de variations de performances de faibles amplitudes et la quantification précise des effets étudiés. L'association entre l'exposition au BTV-8 et le risque d'avortement n'a pas été mise en évidence dans la seule étude analytique ayant investigué cette association du fait des faibles effectifs (Santman-Berends et al., 2010). De plus, la sélection des

troupeaux et des vaches sur des grandes zones permet de limiter les biais de sélection et de permettre une meilleure représentativité des échantillons sélectionnés.

2.2.2. Quantification des variations de performances sur un large intervalle autour de la date de détection de la maladie dans le troupeau

La quantification des variations de performances sur un large intervalle autour de la date de détection de la maladie permet de déterminer le début et la fin des périodes de variation de ces performances. La détermination de cette période permet d'estimer l'impact moyen de l'exposition dans les troupeaux atteints. De plus, ceci a permis de mettre en évidence des variations de performances très précoces par rapport à la date de détection de la maladie dans les foyers détectés tardivement durant l'épizootie et dans certains troupeaux sans notification de signe clinique situés en zone d'épizootie. Ces variations peuvent être le résultat d'une détection retardée des signes cliniques ou d'une détection suivie d'une déclaration retardée. Des variations postérieures à la date de détection de la maladie ont également été montrées (allant jusqu'à 4 mois après pour la production de lait). Ces variations sont probablement le résultat d'une combinaison de la persistance des effets de l'exposition sur les performances d'une vache infectée et du temps nécessaire à la diffusion du virus dans les troupeaux infectés.

Pour l'effet de l'exposition sur les performances de reproduction, cet intervalle permet de prendre en compte le stade de gestation. Ceci a permis de montrer que certains stades de gestation sont probablement plus affectés que d'autres par l'exposition au BTV-8.

2.2.3. Prise en compte du niveau d'exposition local et du mois de détection

La proportion de vaches infectées par troupeau est inconnue. Cette proportion est notamment influencée par le niveau d'exposition et le mois de détection de la maladie, ce qui a justifié leur prise en compte dans les analyses. Les résultats montrent que ces facteurs influencent fortement l'effet de l'exposition sur les performances. C'est leur prise en compte qui a permis d'éviter un biais de confusion entre ces facteurs et d'autre part, d'évaluer leurs influences relatives.

Une façon d'interpréter les résultats obtenus serait de comparer les niveaux de pertes dans les troupeaux atteints avec ceux des vaches infectées. Cette comparaison suppose que l'effet biologique de l'infection soit comparable dans ces deux populations. Au niveau individuel, l'effet de l'infection par le BTV-8 sur la fertilité a été estimé à une augmentation de 35,7 points de pourcent de retours (Santman-Berends et al., 2010). L'effet moyen au niveau troupeau correspond à une augmentation de 6,6 points de pourcent de retours dans l'ensemble des troupeaux ayant

connu un épisode clinique et de 15,7 dans les troupeaux détectés en septembre et les plus fortement exposés. La comparaison de ces effets permet une estimation (large) de la proportion de vaches infectées par troupeau. En suivant ce raisonnement, cette proportion pourrait être de l'ordre de 20% dans l'ensemble des troupeaux ayant connu un épisode clinique en 2007 et de l'ordre de 45% dans les troupeaux foyers détectés en septembre dans les cantons les plus fortement exposés. Concernant la production de lait, l'effet étant plus élevé dans les troupeaux atteints que pour les vaches infectées, l'application du même raisonnement conduirait à estimer une proportion de vaches infectées par troupeau de 100%. Il est très difficile d'estimer ce paramètre épidémiologique à l'aide des connaissances des effets de l'infection sur les performances. On peut cependant spéculer que la proportion de vaches infectées par troupeau est probablement supérieur à 20%.

2.3. Limites des données d'exposition disponibles

La détection des signes cliniques ne correspond pas à l'entrée du virus dans le troupeau (Figure 5). Après l'entrée du virus dans un troupeau, il y a un délai d'expression des signes cliniques de la maladie (sous l'hypothèse que l'animal infecté présente des signes), ainsi qu'un délai nécessaire à leur détection et déclaration. Ceci entraîne un possible biais puisque le troupeau est alors considéré à tort comme non infecté pendant la période entre l'entrée du virus et la détection des signes cliniques.

Le statut et les dates d'infection des vaches appartenant aux troupeaux exposés sont inconnus. De plus, certaines vaches pourraient être infectées rapidement avant ou après la détection des premiers signes cliniques alors que d'autres pourraient être infectées plus tardivement étant donné le temps nécessaire au virus pour se propager dans le troupeau (Figure 6). Les caractéristiques des données d'exposition soulignent l'intérêt de quantifier les variations des performances sur un large intervalle autour de la date de détection de la maladie dans le troupeau.

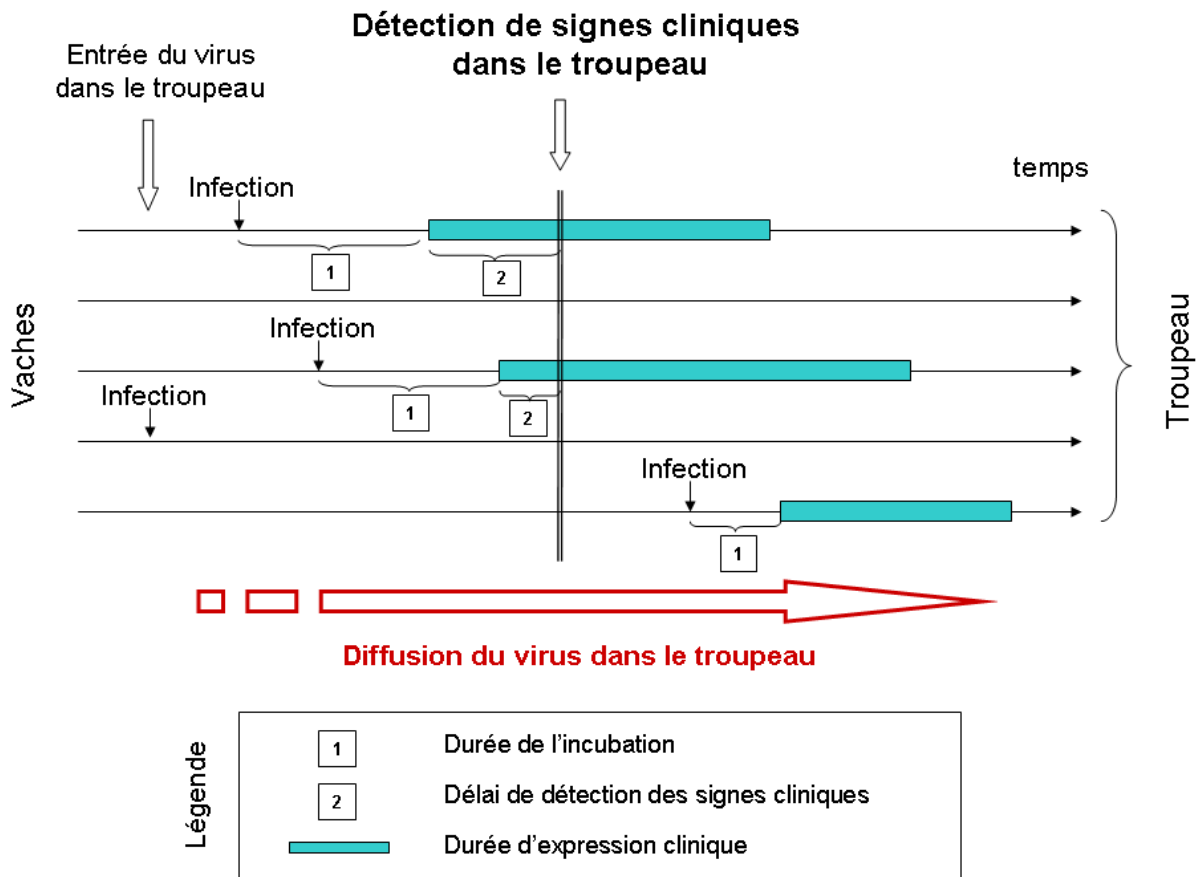


Figure 5 : Durée d'incubation du virus de la Bluetongue sérotype 8, délai de détection des signes cliniques et diffusion du virus dans un troupeau

2.4. Stratégies d'analyses statistiques

2.4.1. Prise en compte des facteurs de variations des performances

Les performances ont de nombreux facteurs de variation. Afin de ne pas attribuer à tort des variations qui ne seraient pas attribuables à l'exposition, il est nécessaire de prendre en compte ces facteurs pour quantifier l'effet de l'exposition sur les performances. Par exemple, les mois d'exposition correspondent globalement aux mois où la fertilité est meilleure (de septembre à janvier) et les mois de pic d'exposition (septembre et octobre) correspondent à la période où la production de lait est la plus faible, indépendamment de l'exposition. Par conséquent, ne pas prendre en compte les mois d'IA et les mois des contrôles laitiers aurait entraîné une sous-estimation de l'effet de l'exposition sur la fertilité et une surestimation de l'effet de l'exposition sur la production de lait. De plus, les variations associées à ces facteurs peuvent avoir des amplitudes importantes par rapport à celles associées à l'exposition.

2.4.2. Plusieurs populations de référence

Le fait de considérer plusieurs populations de référence permet de limiter de possibles biais de sélection. La concordance des résultats issus des comparaisons avec les deux populations de référence, et ce pour toutes les performances étudiées, est un critère important de robustesse des résultats, ce qui permet d'être confiant par rapport aux résultats obtenus. Afin de montrer la comparabilité de chaque population de référence avec la population exposée, il est nécessaire de vérifier qu'il n'y a pas de variation significative des performances d'une part entre les années considérées, et d'autre part, entre les régions sélectionnées. Deux modèles ont été considérés pour vérifier l'absence de variation significatives, indépendamment de l'exposition. L'effet année a été testé en comparant les performances des vaches des troupeaux non exposés entre les années 2005 et 2007. L'effet région a été testé en comparant les performances des vaches en 2005/2006 entre la région exposée et la région non exposée. Les effets année et région dans ces deux modèles sont non significatifs, ce qui confirme la comparabilité de chaque population de référence avec la population exposée.

2.4.3. Utilisation de modèles statistiques pour prendre en compte les structures de corrélation

Il existe trois sources de corrélation dans les données de performances et d'exposition au BTV-8 : le regroupement des vaches en élevages, la répétition dans le temps des données de performances et la structure spatiale des données d'exposition. Les vaches appartenant à un même troupeau ne sont pas indépendantes (effet conduite d'élevage). Les modèles statistiques classiques de type logistiques ou linéaires ne permettent pas de prendre en compte la non indépendance des données intra-troupeau. Or, ne pas tenir compte de cette dépendance peut conduire à des inférences statistiques erronées. La prise en compte de la corrélation entre les animaux d'un même troupeau peut se faire par l'utilisation de modèles « à effets aléatoires ». Pour l'analyse d'évènements binaires, des modèles logistiques mixtes ont été utilisés. Pour l'analyse de temps de survie, des modèles de survie de type conditionnels ont été utilisés (variable aléatoire = variable de fragilité). Cette approche permet de modéliser les distributions de temps de survie conditionnellement à un effet aléatoire non observé et propre à chaque troupeau. Les temps de survie observés sont supposés indépendants conditionnellement aux effets aléatoires.

Les données de production de lait d'une même lactation sont répétées dans le temps, et constituent une source d'autocorrélation temporelle. Ne pas prendre en compte ces corrélations entraîne un risque de surestimation des effets de l'exposition. Des modèles statistiques spécifiques, modèles à

effets mixtes, ont permis de prendre en compte ces phénomènes de dépendances temporelles, et donc de limiter les risques de surestimation de l'effet de l'exposition. De même, les données d'IA pour une lactation sont répétées dans le temps, ce qui implique de prendre en compte la variabilité individuelle de la fertilité (effet vache emboîté dans effet troupeau). Or, deux variables à effets aléatoires dans un modèle rendent très difficile sa convergence avec des effectifs aussi importants. Pour la quantification des effets secondaires de la vaccination sur la fertilité, les IA de rang 1 et 2 ont été considérées sans ajustement sur l'effet vache et la robustesse des résultats a été testée dans un modèle avec seulement les IA de rang 1. Pour la quantification des effets de l'exposition sur l'occurrence des retours en IA, seules les IA de rang 1 ont été sélectionnées.

Enfin, le dernier chapitre a nécessité l'estimation des dates d'exposition présumées des troupeaux n'ayant pas été déclarés durant l'épizootie. Comme les dates d'exposition sont fortement corrélées spatialement (virus à transmission vectorielle), il est nécessaire de prendre en compte cette structure spatiale afin d'estimer correctement les dates d'exposition présumées. L'utilisation d'un type de modèle statistique original d'interpolation spatiale (krigeage) a permis de prédire des dates d'exposition présumées en prenant en compte la structure de corrélation spatiale des données d'exposition. Plusieurs étapes de validation ont été réalisées afin de vérifier la précision des interpolations. Le principe consiste à n'utiliser qu'une partie des données observées pour prédire les dates d'exposition de l'autre partie de l'échantillon et de comparer les dates prédites avec les dates observées. Ces validations ont permis de montrer que le krigeage estime correctement les dates d'exposition.

2.5. Arguments en faveur de la causalité

Un des objectifs de ce travail est de quantifier les écarts de performances associés à l'exposition au BTV-8. Les relations statistiques mises en évidence ne permettent pas de démontrer la causalité de ces relations. La question qui nous intéresse est de montrer que les variations de performances sont bien attribuables à l'exposition. Cette question est liée à la notion de causalité puisqu'une relation causale implique nécessairement que les variations mises en évidence soient attribuables à l'exposition. La notion de causalité repose sur un faisceau d'arguments (Hill, 1965). Parmi ces arguments, on peut en citer quatre qui sont en faveur de la causalité concernant l'association entre l'exposition au BTV-8 et les variations de performances. Le premier argument concerne la plausibilité, en terme d'hypothèses biologiques, des associations entre l'exposition au BTV-8 et les performances étudiées. Ces hypothèses sont discutées dans le chapitre 1. Le deuxième argument

est la relation dose-effet mise en évidence entre les pertes moyennes au niveau troupeau et la proportion de troupeaux voisins infectés. Nous avons vu que l'augmentation de la proportion de troupeaux voisins infectés pourrait être associée soit à une augmentation de l'incidence intra-troupeau, soit une augmentation de la quantité de virus inoculée aux vaches (ou une combinaison de ces deux hypothèses). Dans les deux cas, cela suggère que plus la pression d'infection est forte, plus l'effet de l'exposition sur les pertes est important. Le troisième argument est la temporalité entre le moment d'exposition et les variations des performances de reproduction. Les périodes en pointillés bleu dans la Figure 6 correspondent aux périodes de réalisation des IA pour lesquelles les possibles retours sont postérieurs à la date de détection de la maladie, et donc a priori attribuable à l'exposition au BTV-8. On observe une augmentation des retours précoces quand les IA sont réalisées autour de la date de détection de la maladie. Quand les IA sont réalisées plusieurs semaines avant la date de détection (ce qui correspond probablement à des expositions tardives), on observe des retours plus tardifs. Si les variations de taux de retours étaient dues à un/des facteur(s) autre(s) que l'exposition (climat, alimentation...), les périodes d'augmentation des retours seraient réparties de manière plus homogène. Le dernier argument est la spécificité des associations entre l'infection par le BTV-8 et les variations de fertilité et de production de lait. En effet, pour ces deux performances, il a été vérifié qu'aucune variation du même ordre de grandeur n'était observée en absence d'exposition.

3. Généralisation des résultats

Les effets de l'infection au BTV-8 et de la vaccination ont été quantifiés dans de larges populations de bovins, ce qui permet de généraliser les résultats à d'autres populations de bovins, à conditions d'élevage proches et à conditions d'exposition ou de vaccination équivalentes. Les effets de l'infection sur les performances ont été quantifiés pour des vaches Holstein non vaccinées jamais exposées à un virus BTV. Les effets d'une primo-infection sont probablement plus importants que ceux dans une population non naïve. A priori, il n'y a pas de raison pour que les effets de l'infection diffèrent dans les autres races, à conditions d'élevage proches et à conditions d'exposition équivalentes. Concernant le sérotype du BTV, on ne peut pas généraliser les résultats car les souches peuvent être plus ou moins virulentes.

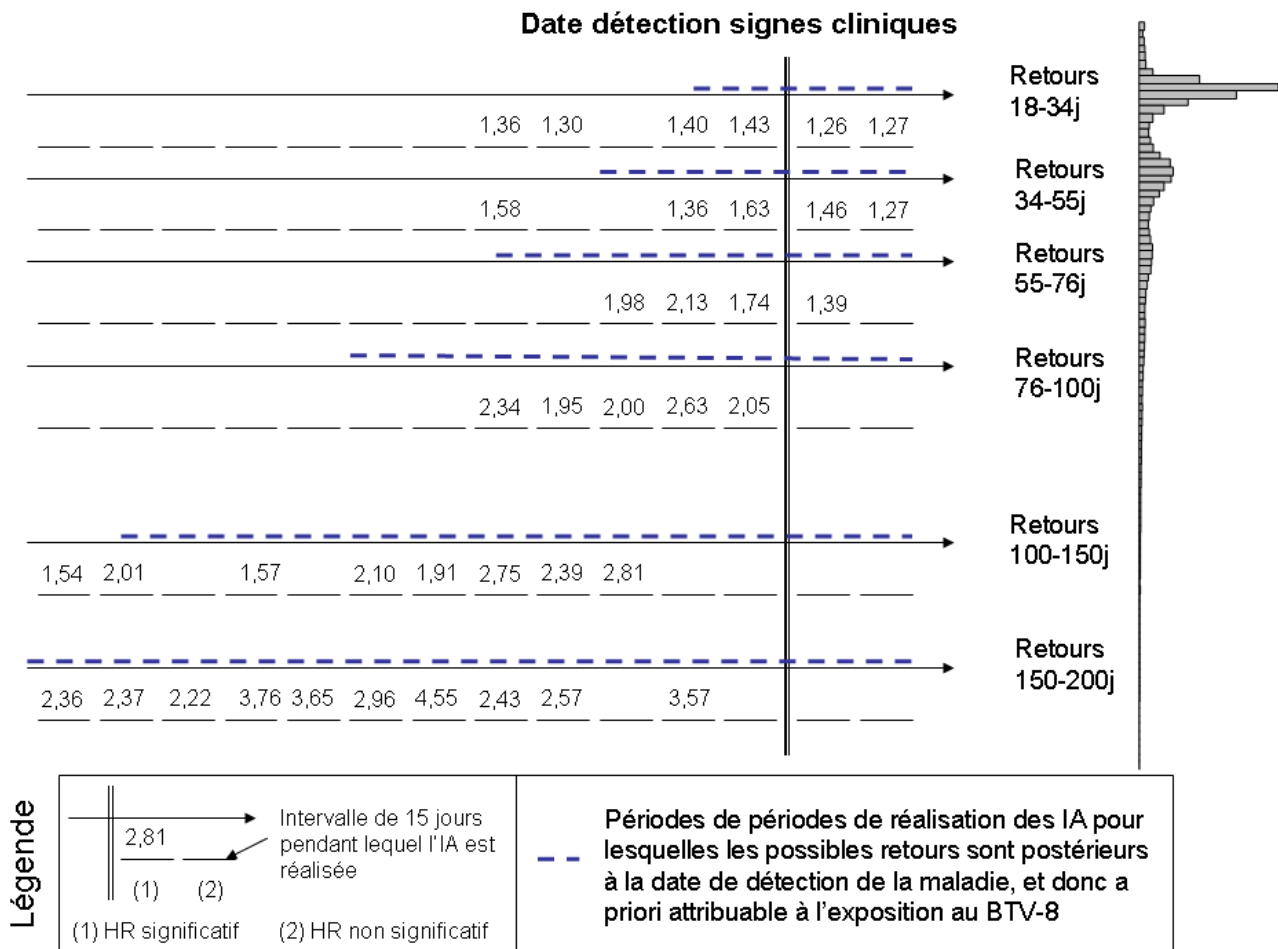


Figure 6 : Hazard ratio des taux de retours en IA selon l'intervalle entre la date d'IA et la date de détection du virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) dans le troupeau et selon le type de retour (rang IA 1 et 2 ; population de référence : vaches appartenant à des troupeaux non exposés en 2007)

Les effets secondaires de la vaccination ont été quantifiés chez des vaches Holstein dans des troupeaux non exposés au virus situés en Bretagne. Des conséquences similaires peuvent être attendues en cas de primo-immunisation avec un vaccin inactivé comportant les mêmes adjuvants. Cependant, il n'est pas possible de généraliser ces résultats dans le cas d'une vaccination annuelle de rappel car les effets peuvent être différents.

4. Implications

4.1. Connaissances mobilisables pour l'évaluation des stratégies de maîtrise

Les connaissances des effets moyens de l'exposition au BTV-8 sur les performances sont utiles pour l'évaluation des stratégies de maîtrise contre le BTV-8. Les pertes majeures de performances associées à l'exposition au BTV-8 semblent justifier les stratégies qui ont été implantées sur le terrain. L'évaluation des stratégies de maîtrise peut servir en cas de ré émergence du virus, afin de justifier ou non le recours à ces stratégies de maîtrise. L'estimation des pertes associées à l'effet secondaire de la vaccination sur la fertilité constitue un élément de l'évaluation du ratio bénéfice/risque de la vaccination. Les résultats de la comparaison des impacts de l'exposition et de la vaccination sur la fertilité ne semblent pas remettre en question le bénéfice de la vaccination, les effets secondaires de la vaccination sur la fertilité étant très inférieurs aux effets de l'exposition.

4.2. Connaissances mobilisables pour l'évaluation de la capacité de détection du système de surveillance

Les profils de variation des performances autour de la date de détection de la maladie apportent des éléments d'évaluation sur la capacité du système de surveillance à détecter précocement ou non la maladie. Un probable retard de détection de la maladie a été mis en évidence dans les troupeaux foyers cliniques détectés tardivement durant l'épizootie. Il n'est pas possible de distinguer la part du retard attribuable à la détection et à la déclaration. De manière plus générale, la mise en évidence de variations significatives de fertilité dans les troupeaux non déclarés, vraisemblablement attribuables à l'exposition au BTV-8, permet de confirmer l'existence de sous-déclaration (ou sous-détection) des foyers pendant l'épizootie. Etant donné les effets observés dans ces troupeaux, l'ampleur de la sous-déclaration des foyers est sans doute très importante. Ces résultats montrent que le suivi des variations de fertilité pourrait être utilisé dans un contexte plus large de détection de l'émergence d'agents pathogènes (pour les agents qui affectent la fertilité des vaches).

5. Perspectives

5.1. Évaluation économique de l'épizootie de BTV-8 et de la vaccination contre le BTV-8

La quantification des pertes associées à l'exposition à un agent pathogène constitue une étape de l'évaluation économique de la propagation de cet agent dans une population. En effet, en plus des pertes de performances, l'évaluation économique prend en compte le coût des traitements, des tests diagnostiques et des mesures de contrôles. Plusieurs études ont cherché à estimer les impacts économiques associés à l'épizootie de BTV-8 chez les bovins (Fofana, 2009, Hasler et al., 2011, Velthuis et al., 2009). Pour les effets de l'exposition sur les performances, ces études se sont principalement basées sur des dires d'expert en l'absence de quantification objective. Un prolongement de cette thèse serait de réaliser une nouvelle évaluation économique en se basant sur les pertes moyennes estimées dans les troupeaux déclarés et non déclarés en zone d'exposition.

Nous avons considéré que les bénéfices potentiels de la vaccination correspondent aux pertes causées par la maladie. L'estimation précise des bénéfices de la vaccination nécessite de quantifier la réduction des pertes obtenue grâce à la vaccination. Cette quantification implique la comparaison des performances des bovins infectés et vaccinés et des bovins infectés et non vaccinés. Cet objectif n'est pas réalisable en conditions réelles. Un dispositif expérimental pourrait permettre de quantifier cette réduction, mais ces études sont longues et coûteuses.

Les estimations des pertes causées par la maladie pourraient être utilisées pour évaluer l'efficacité de la vaccination. Une approche par modélisation pourrait être envisagée afin de comparer différents scénarios de vaccination (par exemple selon le taux de vaccination).

5.2. Système de surveillance syndromique

Étant donné le niveau d'impact de l'exposition au BTV-8 sur les critères de reproduction et de production de lait, il pourrait être intéressant d'évaluer si le suivi des variations de performances pourrait être utilisé comme système d'alerte dans le cadre d'une surveillance syndromique. Dans les troupeaux non déclarés comme foyers situés en zone d'épizootie où des baisses de fertilité ont été observées, il serait intéressant de voir si il y a également des pertes de production de lait. La comparaison des variations de fertilité et de production de lait, en terme de précocité et d'amplitude, serait intéressante pour évaluer laquelle de ces performances serait la plus pertinente en terme de qualité de signal. Étant donné les nombreux facteurs faisant varier les performances, la prise en compte de ces facteurs dans le système de surveillance paraît indispensable. L'utilisation

des données de performance dans le cadre d'une surveillance syndromique nécessiterait d'étudier la capacité d'un tel système à détecter rapidement des écarts par rapport aux performances attendues sans information a priori sur la survenue et le moment d'une exposition des troupeaux dans une région.

REFERENCES

- Argaez-Rodriguez, F. J., D. W. Hird, J. Hernandez de Anda, D. H. Read, and A. Rodriguez-Lainz. 1997. Papillomatous digital dermatitis on a commercial dairy farm in Mexicali, Mexico: incidence and effect on reproduction and milk production. *Prev. Vet. Med.* 32(3-4):275-286.
- Bareille N., Beaudeau F., Billon S., Robert A., Faverdin P. 2003. Effects of health disorders on feed intake and milk production in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 83: 53-62.
- Beaudeau, F., C. Fourichon, A. Robert, A. Joly, and H. Seegers. 2004. Milk yield of cows and Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) infection in 7,252 dairy herds in Bretagne (western France). *Proceedings Annual Meeting of the European Association for Animal Production.*
- Bridges, P. J., M. A. Brusie, and J. E. Fortune. 2005. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29(3):508-522.
- Coulon, J. B., F. Lescourret, and A. Fonty. 1996. Effect of foot lesions on milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79(1):44-49.
- Dal Pozzo, F., K. De Clercq, H. Guyot, E. Vandemeulebroucke, P. Sarradin, F. Vandebussche, E. Thiry, C. Saegerman. 2009. Experimental reproduction of bluetongue virus serotype 8 clinical disease in calves. *Vet. Microbiol.* 136 : 352-358.
- Darpel, K. E., C.A. Batten, E. Veronesi, A.E. Shaw, S. Anthony, K. Bachanek-Bankowska, L. Kgosana, A. Bin-Tarif, S. Carpenter, U.U. Müller-Doblies, H.H. Takamatsu, P.S. Mellor, P.P.C. Mertens, C.A.L. Oura. 2007. Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *Vet. Rec.* 161:253-261.
- Deluyker, H. A., J. M. Gay, L. D. Weaver, and A. S. Azari. 1991. Change of milk yield with clinical diseases for a high producing dairy herd. *J. Dairy Sci.* 74(2):436-445.

- Durand, B., G. Zanella, F. Biteau-Coroller, C. Locatelli, F. Baurier, C. Simon, E. Le Drean, J. Delaval, E. Prengere, V. Beaute, and H. Guis. 2010. Anatomy of Bluetongue Virus Serotype 8 Epizootic Wave, France, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 16(12):1861-1868.
- Fofana, A., L. Toma, D. Moran, G.J. Gunn and A.W. Stott. 2009. Measuring the economic benefits and costs of Bluetongue virus outbreak and control strategies in Scotland. *Proceedings of the Annual Conference of the Agricultural Economics Society.*
- Fourichon, C., H. Seegers, N. Bareille, and F. Beaudeau. 1999. Effects of disease on milk production in the dairy cow: a review. *Prev. Vet. Med.* 41(1):1-35.
- Hansen, P. J., M. Drost, R. M. Rivera, F. F. Paula-Lopes, Y. M. al-Katanani, C. E. Krininger, 3rd, and C. C. Chase, Jr. 2001. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 55(1):91-103.
- Hasler, B., K. S. Howe, E. Di Labio, H. Schwermer, and K. D. Stark. 2011. Economic evaluation of the surveillance and intervention programme for bluetongue virus serotype 8 in Switzerland. *Prev. Vet. Med.*
- Hill, A. B. 1965. The Environment and Disease: Association or Causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 58:295-300.
- Kedmi, M., M. Van Straten, E. Ezra, N. Galon, and E. Klement. 2010. Assessment of the productivity effects associated with epizootic hemorrhagic disease in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 93(6):2486-2495.
- Lucey, S., G. J. Rowlands, and A. M. Russell. 1986. Short-term associations between disease and milk yield of dairy cows. *J. Dairy Res.* 53(1):7-15.
- MacLachlan, N. J., A. J. Conley, and P. C. Kennedy. 2000. Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:643-651.
- Putney, D. J., M. Drost, and W. W. Thatcher. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 30(2):195-209.
- Robert, A., F. Beaudeau, H. Seegers, A. Joly, and J. M. Philipot. 2004. Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). *Theriogenology* 61(1):117-127.
- Santman-Berends, I. M., J. J. Hage, P. A. Rijn, J. A. Stegeman, and G. V. Schaik. 2010. Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) infection reduces fertility of Dutch dairy cattle and is vertically transmitted to offspring. *Theriogenology.*

- Tranter, W. P. and R. S. Morris. 1991. A case study of lameness in three dairy herds. *New Zealand Vet. J.* 39(3):88-96.
- Velthuis, A. G., H. W. Saatkamp, M. C. Mourits, A. A. de Koeijer, and A. R. Elbers. 2009. Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. *Prev. Vet. Med.* 93(4):294-304.
- Wolfenson, D., Z. Roth, and R. Meidan. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:535-547.

CONCLUSION GENERALE

L'exposition au BTV-8 dans une population de bovins antérieurement naïfs est associée à des baisses importantes de performances, sur la fertilité, le risque d'avortement et la production de lait. L'appréciation de ces impacts tient compte du fait que les pertes moyennes ont été estimées pour l'ensemble des vaches des troupeaux retenus pour l'estimation. Or, dans ces troupeaux, appelés ici foyers cliniques, au moins un animal a présenté des signes cliniques de la maladie pendant l'épizootie de 2007, mais il est possible que toutes les vaches n'aient pas été infectées. Dans les foyers cliniques, l'exposition au BTV-8 a été associée à une augmentation de 7 points de pourcent de retours 90 jours, de 6 points de pourcent de retours tardifs (entre 90 et 200 jours après insémination), de 2 points de pourcent de gestations courtes (dues à des avortements tardifs ou des naissances prématurées), et à une diminution de 200 à 300 kg de lait par vache (soit environ 3% de la production annuelle). Par ailleurs, la fertilité a également été altérée dans les autres troupeaux pendant l'épizootie (les autres performances n'ont pas été étudiées). Dans les troupeaux où seule une séroconversion a été détectée, l'effet de l'exposition sur la fertilité était du même ordre de grandeur que dans les foyers cliniques. De plus, dans les troupeaux non notifiés comme infectés par le dispositif de surveillance et situés dans les départements où au moins un troupeau infecté a été enregistré, une baisse de fertilité a été mise en évidence. Elle représentait en moyenne environ 60% de l'effet estimé dans les foyers cliniques.

La durée de baisse de performances a été de 9 semaines pour la fertilité et de 6 mois pour la production de lait (dans les troupeaux détectés précocement pendant l'épizootie). Pour ce qui est des avortements, les gestations affectées étaient associées à des inséminations réparties sur plus de 6 mois. Les performances étaient affectées avant la détection des signes cliniques de la maladie dans le troupeau. Dans les troupeaux pour lesquels la détection de signes cliniques a été tardive pendant l'épizootie, des baisses de performances ont été observées très tôt (plusieurs semaines à plusieurs mois) avant la détection de la maladie, suggérant un possible retard de détection de l'infection de ces troupeaux.

Les pertes moyennes varient selon la proportion de troupeaux voisins infectés et selon le mois où l'infection a été détectée. Elles étaient plus élevées quand la proportion de troupeaux voisins infectés augmentait et plus faibles dans les troupeaux détectés tardivement. L'augmentation de l'effet avec la proportion de troupeaux voisins infectés pourrait être due à l'augmentation de la proportion de vaches infectées par troupeau ou à la quantité de virus inoculée aux vaches. La diminution de l'effet moyen selon le mois de détection pourrait être due soit au fait qu'une partie

des troupeaux détectés tardivement ont en fait été infectés plus tôt durant l'épizootie, ce qui dilue l'effet moyen décelable sur une période donnée, soit au fait que l'effet de l'infection était moins marqué dans ces troupeaux ce qui aurait pu retarder le moment où des signes ont été détectés par l'éleveur, soit à une exposition moindre lors d'une infection en fin d'épizootie, l'activité vectorielle étant réduite en début d'hiver.

La vaccination contre le BTV-8 avec un vaccin inactivé est associée à une très légère baisse de fertilité. Cette diminution a été observée seulement pour les vaches vaccinées la semaine suivant l'IA et uniquement après la deuxième injection de vaccin. L'impact de la vaccination sur la fertilité est très limité par rapport à celui de l'exposition.

Les baisses de performances permettent de compléter l'information issue de la surveillance de la maladie concernant l'étendue de l'épizootie (nombre de troupeaux infectés) et la date probable d'introduction du virus dans les troupeaux. La mise en évidence d'une baisse de fertilité notable dans les troupeaux non déclarés comme foyers mais situés en zone d'exposition indique qu'une partie non négligeable de ces troupeaux ont été infectés durant l'épizootie. Le nombre de troupeaux infectés est donc probablement très supérieur au nombre de troupeaux détectés par le système de surveillance. De plus, les baisses de performances sont décelables en moyenne quelques semaines avant que des signes ne soient détectés. Et elles sont très précoces dans les troupeaux où la maladie a été détectée tardivement. Cela indique que la circulation du virus dans les troupeaux est généralement antérieure (parfois très) à la détection de l'infection par les éleveurs.

Si l'on considère les effets à l'échelle d'une région, les pertes cumulées de l'infection sont donc importantes. L'estimation des pertes économiques causées par la maladie pendant l'épizootie doit tenir compte des baisses de performances dans les foyers, mais aussi dans les troupeaux non notifiés comme foyers, dont certains ont été infectés. Une évaluation économique de l'impact du BTV-8 basée sur les pertes de production estimées ici pourrait être réalisée pour compléter celles déjà disponibles qui avaient utilisé des estimations à dire d'expert ou manquant de précision par rapport aux résultats obtenus.

La quantification des pertes induites par l'infection et des effets secondaires de la vaccination apporte des informations utiles pour l'évaluation coût/bénéfice ou bénéfice/risque de la vaccination contre le BTV.

Au vu des écarts de performances mis en évidence dans les troupeaux infectés, il serait intéressant d'évaluer si le suivi des variations de performances peut être intégré comme système d'alerte dans le cadre d'une surveillance syndromique de l'émergence d'une épizootie de FCO dans une population naïve. Ceci nécessiterait d'étudier au préalable la capacité d'un tel système à détecter rapidement des écarts par rapport aux performances attendues, sans disposer d'information a priori sur la survenue et le moment d'une exposition des troupeaux dans une région.

LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

Article accepté

Nusinovici, S., H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau and C. Fourichon. 2011. “A side effect of decreased fertility associated with vaccination against Bluetongue virus serotype 8 in Holstein dairy cows”. *Preventive Veterinary Medicine* 101: 42-50.

Article en revision

Nusinovici, S., H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau and C. Fourichon. “Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds”. *Journal of Dairy Science*.

Article soumis

Nusinovici, S., H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau and C. Fourichon. “Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds”. *Theriogenology*.

Communications congrès internationaux

Nusinovici, S., H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau and C. Fourichon. 2011. “A slight side effect on fertility associated with vaccination against Bluetongue virus serotype 8 in dairy cows”. *Society of Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine*, Leipzig (communication orale).

Nusinovici, S., H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau and **C. Fourichon**. 2011. “Impact of infection or vaccination for Bluetongue virus serotype 8 on reproduction in dairy cows”. *Annual Meeting of the European Federation of Animal Science*, Stavanger (communication orale).

Nusinovici, S., H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau, **P. Ezanno** and C. Fourichon. 2011. « Using the reproductive performance data to evaluate the under-reporting of Bluetongue virus serotype 8 case herds during the 2007 epizootic in France ». *Epidemics*, Boston (poster).

Communications symposium internationaux

Nusinovici, S., H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau and C. Fourichon. 2010. « Production effects associated with exposure to the Bluetongue virus serotype 8 in dairy herds ». *International workshop on animal health economic*, Nantes (communication orale).

Communications orales dans congrès nationaux

Nusinovici, S., H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau et C. Fourichon. 2010. “Fertilité des vaches laitières et vaccination contre le virus de la Bluetongue serotype 8 en 2008 dans les zones de Bretagne non touchées par l'épizootie de BTV-1/BTV-8 ». *Journée bovine nantaise*, Nantes (communication orale).

Groupe de travail avec des acteurs de la gestion sanitaire

Participation à un groupe de travail du comité technique régional FCO de Bretagne. Restitutions finales des résultats de l'effet de la vaccination contre le BTV-8 sur la fertilité le 30/04/2010 et le 20/10/2011.

REMERCIEMENTS

Financement :

La thèse a bénéficié d'un financement d'allocation doctorale dans le cadre du contrat de progrès Etat Région entre :

- Le ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire et
- Le conseil régional des Pays-de-la-Loire.

Ce travail a bénéficié d'un financement de l'INRA, du Cemagref et des Conseils Régionaux de Basse-Normandie, Bretagne, Pays de la Loire et Poitou-Charentes, au titre du projet SANCRE, dans le cadre des programmes « Pour et Sur le Développement Régional »

Mise à disposition de données :

- Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) du ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire,
- Centre de Traitement de l'Informatique Génétique (CTIG),
- Union Bretonne des Groupements de Défense Sanitaire (UBGDS).

RESUMÉ et MOTS CLÉS

Infection par le virus de la Bluetongue sérotype 8 et performances dans les troupeaux bovins laitiers

L'émergence du virus de la Bluetongue sérotype 8 (BTV-8) en Europe de nord en 2006 a causé des pertes économiques en élevages bovins. Une vaccination a été mise en place en France sans évaluation ex ante du ratio bénéfice/risque. Les pertes causées par la maladie et les potentiels effets secondaires de la vaccination n'ont pas été estimés. Les objectifs de cette thèse sont (1) de quantifier les effets moyens de l'exposition des troupeaux au BTV-8 en conditions naturelles sur les performances de production et de reproduction des vaches laitières, (2) de quantifier l'effet de la vaccination sur la fertilité et (3) d'évaluer si les variations de fertilité peuvent contribuer à décrire l'étendue d'une épizootie. Les effets de l'exposition et de la vaccination sur les performances ont été quantifiés à l'aide de modèles statistiques multivariés permettant de prendre en compte les facteurs connus influençant les performances. L'exposition des troupeaux au BTV-8 est associée à une forte diminution de la fertilité et de la production de lait, et à une forte augmentation du risque d'avortement. Les pertes augmentent avec la proportion de troupeaux voisins infectés et diminuent quand la détection de la maladie est tardive pendant l'épizootie. La vaccination contre le BTV-8 avec un vaccin inactivé est associée à une légère diminution de la fertilité dont l'impact est très limité par rapport à celui de l'exposition. Une baisse de fertilité dans les troupeaux non foyers situés en zone exposée indique qu'une partie de ces troupeaux a été infectée durant l'épizootie. Ces résultats peuvent contribuer à l'évaluation de stratégies de maîtrise et de surveillance du BTV.

Mots clé : Bluetongue ; vaches laitières ; performances ; épidémiologie ; modèles statistiques ; vaccination

Infection with the Bluetongue virus serotype 8 and performance in dairy cattle herds

The Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) emerged in northern Europe in 2006 causing economic losses in cattle herds. Vaccination has been implemented in France without ex ante evaluation of the risk-benefit ratio. No estimation of losses due to the disease and possible vaccination adverse effects has been performed. The objectives of this thesis were (1) to quantify the average effects of exposure to BTV-8 in dairy herds on milk production and reproductive performance of dairy cows, (2) to quantify the effect of vaccination on fertility and (3) to evaluate whether variation in fertility could contribute to the description of the epizootic spread. The effects of exposure and vaccination were quantified using multivariable statistical models which allowed to take into account known factors that influence performance. Exposure to BTV-8 in dairy herds was associated with an important decrease in fertility and milk production, and with an important increase in abortion risk. Losses increased with the proportion of infected neighbouring herds and decreased when the disease detection was late during the epizootic. The vaccination against BTV-8 using inactivated vaccines was associated with a slight decrease in fertility which had a very limited impact compared to the impact of exposure. A decrease in fertility in non case herds located in the exposed area indicated that some of these herds were infected during the 2007 epizootic. These results could contribute to the evaluation of BTV control measures and surveillance.

Key words: Bluetongue ; dairy cows ; performance ; epidemiology ; statistical models ; vaccination