

REACTIONS SEROLOGIQUES ATYPIQUES
DANS LE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE BOVINE :
ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE
DANS LES DEPARTEMENTS CONCERNES*

J.J. BENET⁽¹⁾, C. MASSARD⁽¹⁾, B. GARIN-BASTUJI⁽²⁾, F. MOUTOU⁽²⁾,
B. DUFOUR⁽³⁾, M. ZYGMUNT⁽⁴⁾, C. SCHAEFFER⁽⁵⁾, T. COTON⁽⁵⁾.

***RESUME :** Pendant la campagne de prophylaxie 1990-1991 de la brucellose bovine, des bovins ont présenté des réactions sérologiques positives dans une proportion tout à fait anormale de cheptels, en l'absence non seulement de toute manifestation clinique comme l'avortement, mais aussi de tout facteur de risque apparent de brucellose : ces réactions ont été par conséquent qualifiées d'atypiques. Une étude épidémiologique a été menée sur les données recueillies à la date du 15 mars 1991 dans les départements principalement concernés : 03, 12, 18, 19, 21, 23, 36, 42, 58, 63, 64, 71, 87, 89. L'ampleur du phénomène a été confirmée : 2163 cheptels ont été touchés, sur plus de 100 000 cheptels exposés au risque, soit 2,08 % (0,5 % à 6 % selon les départements) ; le taux de bovins atteints était de 3,62 % dans les cheptels affectés (1,7 % à 4,8 %) et de 0,10 % (de 0,02 % à 0,27 %) sur l'ensemble des 3,5 millions de bovins de ces départements.*

L'étude n'a pas permis de mettre en évidence de relation avec l'âge, le sexe, ou le type de production. Dans 65 % des cas, les réactions positives associent l'épreuve à l'antigène tamponné (E.A.T.) et la fixation du complément (F.C.), et dans 35 % elles ne concernent que l'E.A.T. 60 % des réactions sont devenues négatives lors d'un contrôle réalisé environ 1 mois (soit 59 % des cheptels) après le dépistage initial, et 84 % (soit 78 % des cheptels) lors d'un contrôle supplémentaire 1 mois plus tard.

*Les caractéristiques de ces manifestations sont incompatibles avec les données classiques d'une infection par une *Brucella* sauvage. A l'inverse, elles sont consistantes avec l'hypothèse d'une infection croisée. Une surveillance appropriée de la prophylaxie sera mise en oeuvre à l'occasion de la prochaine campagne.*

* Article reçu le 9 septembre 1991, accepté le 7 octobre 1991.

(1) E.N.V.A., Maladies contagieuses, 94704 Maisons-Alfort cedex 04

(2) C.N.E.V.A.-L.C.R.V., 22 rue Pierre Curie, 94703 Maisons-Alfort

(3) F.N.G.D.S.B., 149 rue de Bercy, 75595 Paris cedex 12

(4) I.N.R.A., Centre de recherches de Tours-Nouzilly, Domaine de l'Orfrasière, Nouzilly, 37380 Monnaie

(5) D.G.A.I., Service vétérinaire de la Santé et de la Protection animales, 175 rue du Chevaleret, 75013 Paris

SUMMARY : During winter of 1990-1991, unexpectedly high rates of positive serological results to screening test of bovine brucellosis were observed in the central part of France (14 départements). Since they were not associated with commonly known risks of brucellosis, nor with any clinical signs of brucellosis, they have been called "atypical reactions". A questionnaire-survey has been conducted on the basis of data collected until March 15th 1991 by local Veterinary Services. 2163 herds were affected for 100,000 exposed (0.5 % to 6 % according to départements) and 3.62 % cattle (1.7 % to 4.8 %) in these affected herds, or 0.01 % to 0.3 % cattle over 3.5 millions cattle in these départements.

Results do not show any association with age, sexe, or production. In 65 % of cases of these false positive reactions, both Rose Bengal Plate Test and Complement Fixation Test gave positive results. 60 % of cattle had negative reactions one month later (59 % of herds) and 84 % of cattle two months later (78 % of herds).

These observations are not consistent with the hypothes of true infection by *Brucella*. At the opposite, they are consistent with the hypothesis of cross-infection. A special surveillance will be implemented during next winter.

*
* *

La lutte contre la brucellose bovine en France repose en particulier sur le dépistage des cheptels infectés. L'épreuve à l'antigène tamponné (E.A.T.), et la fixation du complément sont principalement utilisées, en complément, pour les cheptels laitiers, du test de l'anneau (ring-test).

Dans plusieurs départements du Centre de la France, gros berceau de production de viande bovine, et par conséquent fortement investis dans le commerce national et international, dès le début de la campagne de prophylaxie de 1990-1991 des résultats sérologiques positifs au dépistage de la brucellose bovine ont été constatés. Ce phénomène avait une ampleur alarmante par le nombre des cheptels concernés : deux pour cent environ des cheptels étaient touchés, sur un total de plus de 100 000 élevages, regroupant plus de 3,5 millions de bovins.

Un tel phénomène apparaissait inexplicable, dans la mesure où cette région était réputée indemne de brucellose depuis plusieurs années, et que le taux moyen de cheptels détectés avait été inférieur à 0,5 pour cent pour la campagne précédente. De façon quasi constante, ces cheptels semblaient à l'écart de tout facteur de risque de brucellose, tant par l'historique sanitaire de ces élevages, par le contexte sanitaire des élevages voisins, que par les mouvements d'animaux. Aucune interférence vaccinale ne pouvait non plus être retenue, en raison de l'arrêt de la vaccination contre la brucellose depuis de nombreuses années. Le nombre de bovins concernés dans chaque élevage était en général très limité : le plus souvent un seul, quelquefois deux animaux, très rarement davantage. Pour ces différentes raisons, ces réactions qui ne pouvaient être expliquées par la brucellose, tout au moins telle qu'elle était connue, ont été qualifiées d'atypiques.

L'impact de ces manifestations sérologiques est désastreux, tant par les entraves au commerce (national, international), l'atteinte à l'image de qualité des producteurs, que par le discrédit apporté aux méthodes de lutte. On pouvait craindre également que, du fait du trouble jeté dans les esprits, des décisions inadaptées soient prises pour certains élevages réellement infectés, contribuant ainsi à une relance de l'infection brucellique authentique.

Les hypothèses envisagées pour tenter d'expliquer ces manifestations portaient sur la nature de l'antigène responsable, et les circonstances de sa mise en oeuvre. L'antigène pouvait être brucellique : *Brucella* sauvage de caractère atypique (contagion, symptômes, sérologie, etc.) ; fraction d'antigène de *Brucella*, contaminant une substance biologique ou médicamenteuse ; sêquelles vaccinales.

Il pouvait aussi s'agir d'un agent possédant des déterminants antigéniques communs avec *Brucella* [3, 7] ; *Yersinia* 0:9, *Escherichia coli* 0:157 et *Salmonella urbana* N sont les plus fréquemment mis en cause [2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11]. *Yersinia* 0:9 a été isolé chez l'Homme [12] et chez le porc [8], associé à des réactions croisées ; l'inoculation expérimentale provoque chez le porc ces mêmes réactions [4]. Chez les bovins, cette bactérie n'a pas encore fait l'objet d'isolement, mais son inoculation parentérale fait apparaître des anticorps croisant avec *Brucella* [9]. *Escherichia coli* 0:157 a été isolé chez l'Homme dans des cas d'entérite, associés à la consommation de viandes hachées de bovins, dans lesquelles cet agent a pu être identifié [11].

Les circonstances d'action de ces antigènes pouvaient être d'ordre monofactoriel (injection ou utilisation médicamenteuse ; ingestion à dose unique importante, ou faible et répétée) ou plurifactoriel ; dans ce dernier cas, l'infection serait commune, mais non détectée précédemment, et différents facteurs d'action récente auraient eu un rôle déclenchant révélant cette infection latente, ou ce portage sub-clinique.

A la suite d'une réunion à laquelle participaient les représentants des différents départements concernés (23 Janvier 1991, Moulins), une enquête épidémiologique a été entreprise sous la direction de la Direction Générale de l'Alimentation (D.G.A.I.) dans le cadre d'un groupe de travail associant le Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires (C.N.E.V.A.), la Fédération Nationale des Groupements de Défense Sanitaire du Bétail (F.N.G.D.S.B.), l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort et l'Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A.). Le but général était de connaître la situation d'une façon plus précise, pour ultérieurement aviser de l'opportunité d'aménagements éventuels, voire pour déterminer la nature des décisions à prendre pour la poursuite de la prophylaxie de la brucellose bovine dans cette région, et peut-être en France, d'une façon adaptée.

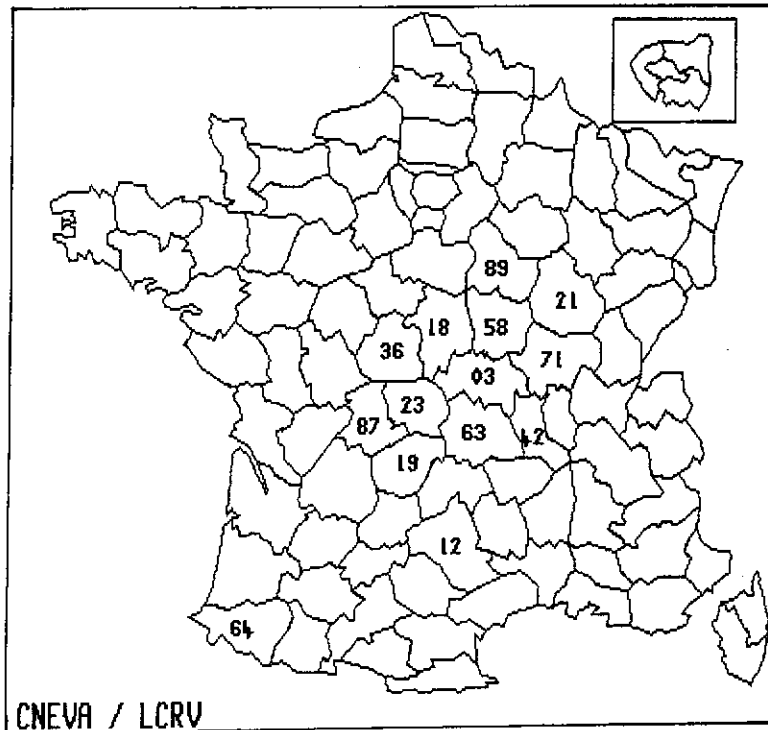
Cette enquête s'articule avec d'autres investigations [Garin-Bastuji et coll., à paraître] soit expérimentales (épreuve cutanée allergique ; immunoempreinte ; recherche par culture fécale d'agents bactériens croisant antigéniquement avec *Brucella*) soit épidémiologiques (enquête cas/témoins).

POPULATION ET METHODE

Une étude descriptive a été réalisée dans les 14 départements où le phénomène avait été identifié (Carte 1) : Allier (03), Aveyron (12), Cher (18), Corrèze (19), Côte-d'Or (21), Creuse (23), Indre (36), Loire (42), Nièvre (58), Puy-de-Dôme (63), Pyrénées-Atlantiques (64), Saône-et-Loire (71), Haute-Vienne (87), et Yonne (89). Ces départements ont été retenus sur la base de la situation sanitaire départementale *a priori* favorable, et d'une augmentation brutale du taux de cheptels comportant au moins un animal à sérologie positive, cette situation les ayant conduit à en référer à la Direction centrale de la D.G.A.I..

L'objectif était de quantifier la situation dans ces départements, en déterminant les différents taux d'atteinte (cheptels, animaux), en les comparant aux taux d'infection brucellique, de caractériser le phénomène par quelques variables d'ordre zootechnique (âge, sexe, type de production) ou sérologique (typologie des réactions dans les élevages, et évolution au cours du temps), dans l'espoir de voir les données suggérer une orientation pour le choix d'une hypothèse explicative.

Carte 1 : Répartition géographique des départements affectés par les sérologies atypiques.



L'étude ne pouvait être conduite que de manière rétrospective, la majeure partie de la campagne de prophylaxie étant déjà entamée au moment du début effectif de l'enquête. Elle était de type exhaustif, en raison du fait que tous les élevages avaient été soumis au dépistage de la brucellose, et en raison du recrutement de tous les élevages concernés par ce phénomène atypique.

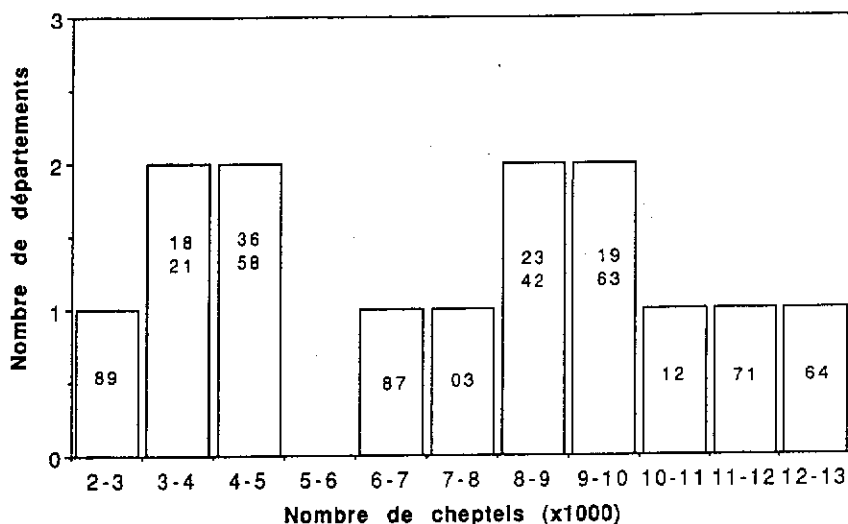
L'information a été collectée auprès de chaque Direction départementale des Services vétérinaires, par l'intermédiaire d'un questionnaire compilant les informations à l'échelle du département. L'information recueillie concernait les résultats de la campagne de prophylaxie 1990-1991, à la date du 15 mars 1991. Sur la base des résultats des premiers dépouillements, et de la facilité d'accès aux informations nécessaires, une enquête complémentaire a été menée dans le département de l'Allier consistant à décrire l'évolution du phénomène pour chaque élevage où il avait été constaté.

RESULTATS

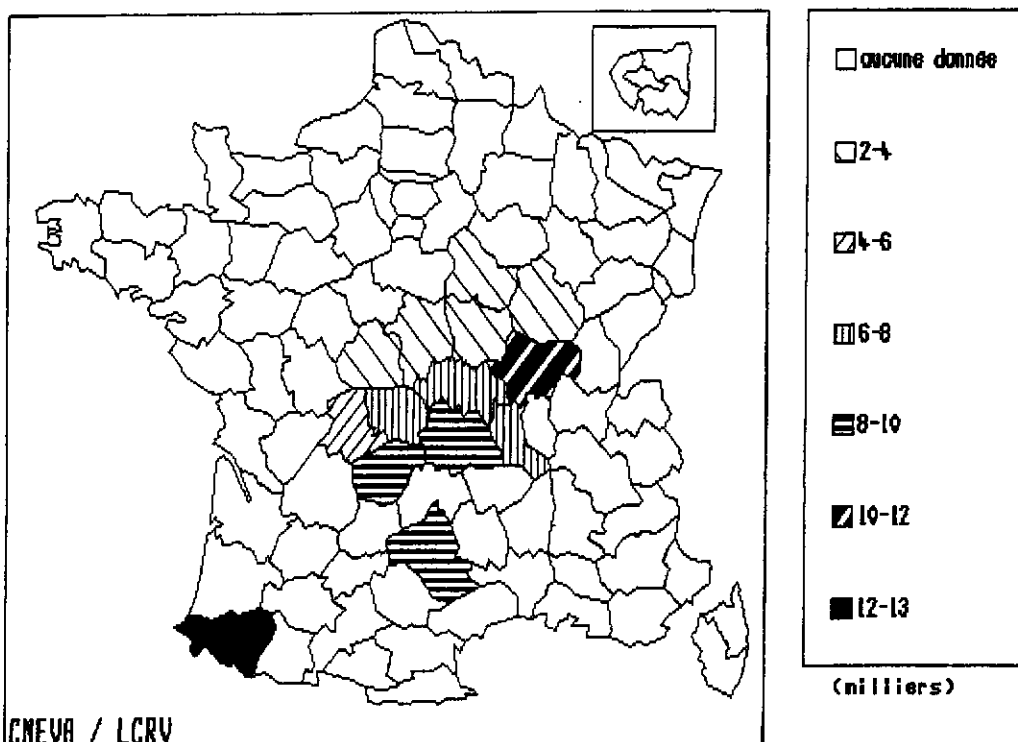
I. DESCRIPTION DES DEPARTEMENTS CONCERNES

Plus de 100.000 cheptels sont exposés au risque (104.212). Ces départements comportent en majorité des cheptels allaitants (64 %), les cheptels laitiers ne constituant qu'une minorité (24 %), de même que les cheptels mixtes (12 %). Le nombre de cheptels par département varie de 2.000 à 13.000 (Figure 1 ; Carte 2).

Figure 1 : Distribution du nombre de cheptels par département.

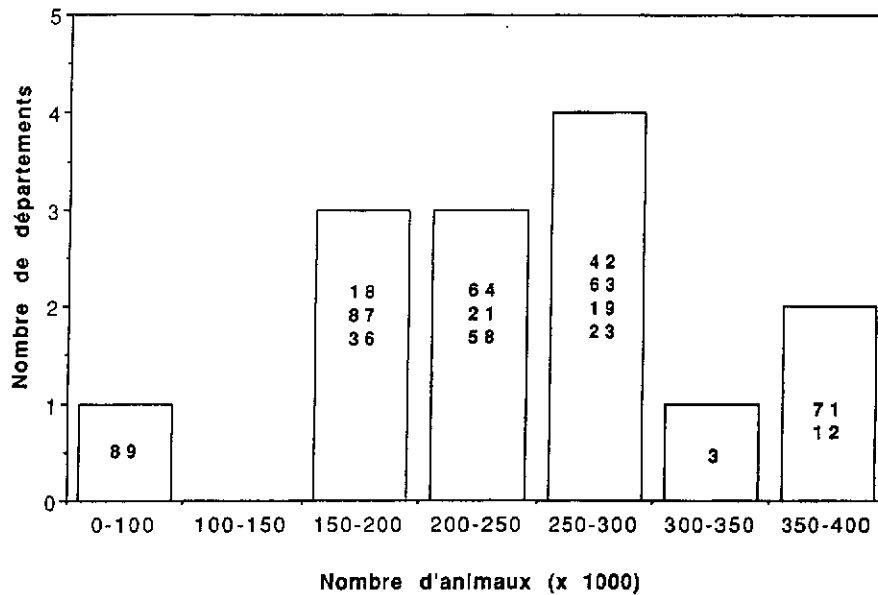


Carte 2 : Nombre de cheptels par département.



Le nombre total de bovins est de 3.514.067 (bovins de plus d'un an effectivement contrôlés) ; le nombre de bovins varie selon les départements de 100.000 à 400.000 (Figure 2 ; Carte 3). Le nombre moyen de bovins par cheptel varie de 15 à 60 (Figure 3 ; Carte 4).

Figure 2 : Distribution du nombre de bovins par département.



Carte 3 : Nombre de bovins de plus d'un an par département.

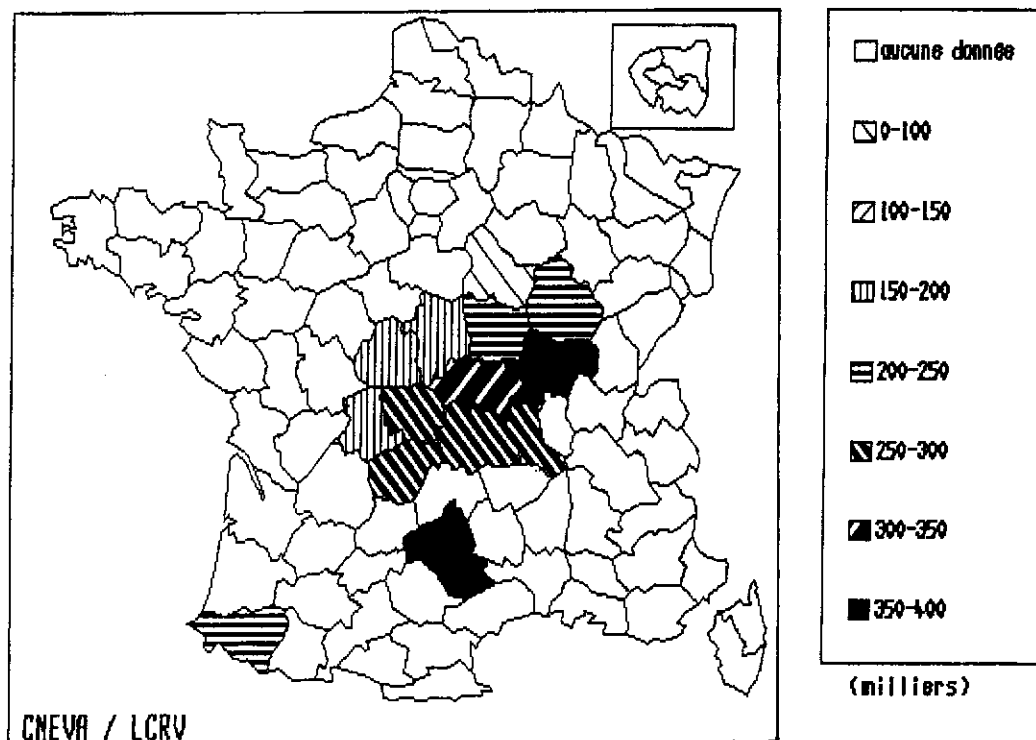
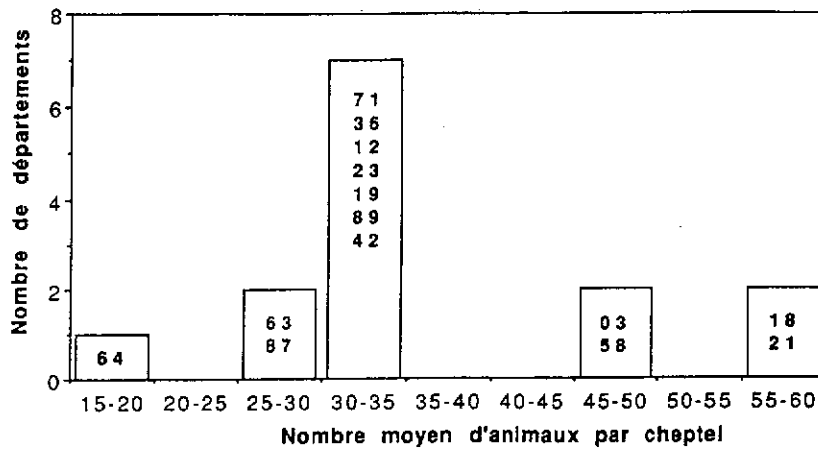
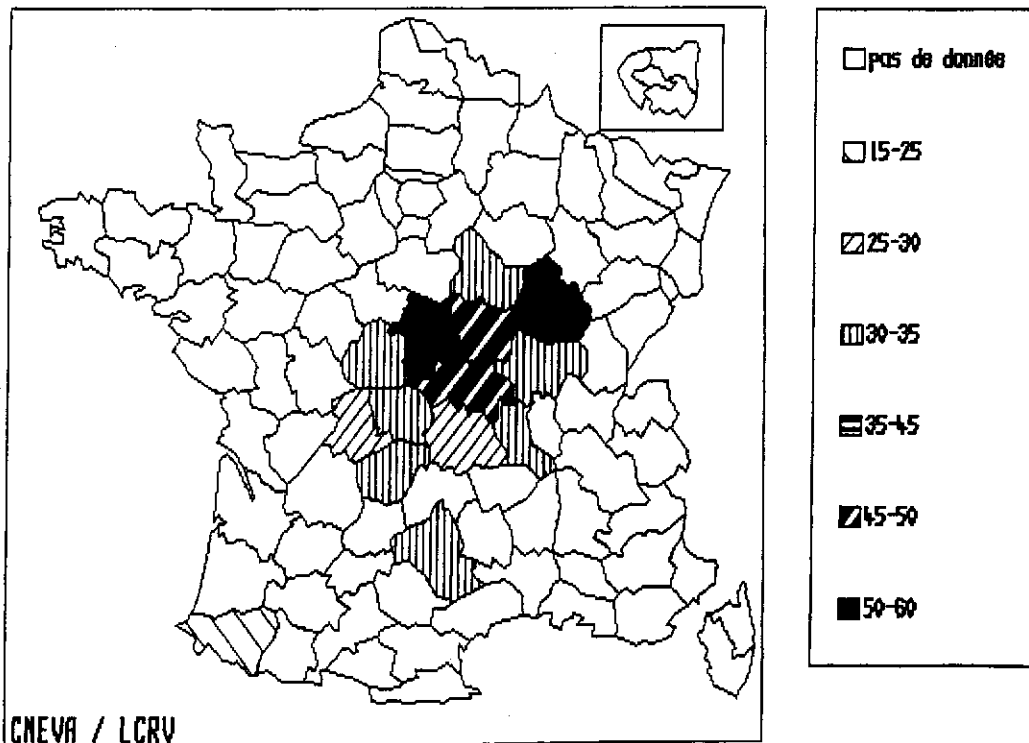


Figure 3 : Distribution des départements selon le nombre moyen de bovins par cheptel.



Carte 4 : Nombre moyen de bovins de plus d'un an par cheptel.

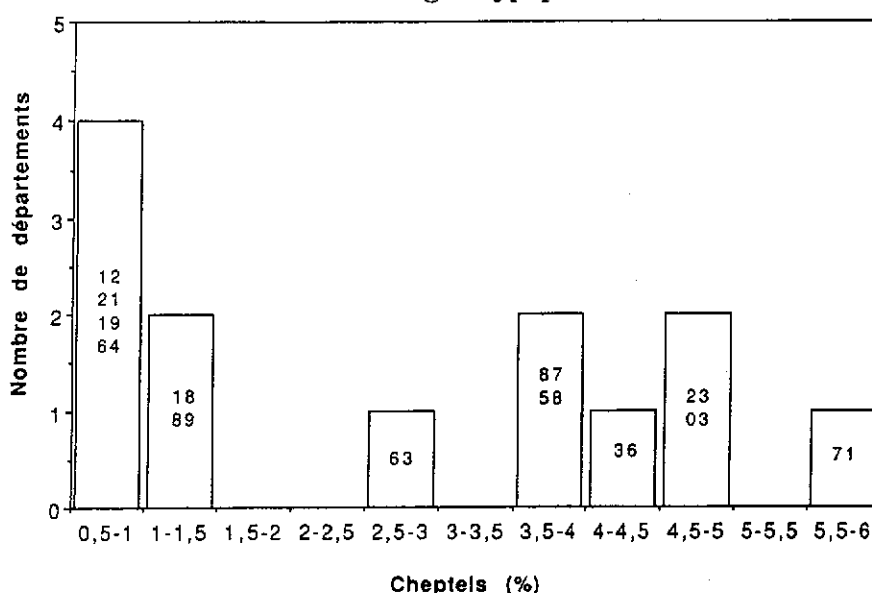


II. IMPORTANCE DU PHENOMENE

Les départements concernés sont regroupés en une zone centrale, à l'exception de deux départements [12, 64] (Carte 1).

Au total, 2.163 cheptels atteints par ce phénomène atypique ont été recensés, ce qui représente un taux moyen de 2,08 %. Ce taux varie selon les départements de 0,5 % à 6 % (Figure 4 ; Carte 5). Les départements les plus touchés (03, 23, 36, 58, 63, 71, 87), sont en plein centre de la zone. Les départements les moins touchés sont situés ou bien en dehors de la zone (64, 12), ou bien en lisière (18, 19, 21, 89). La carte 6 qui porte sur le taux d'animaux à sérologie atypique par département permet d'effectuer les mêmes constatations.

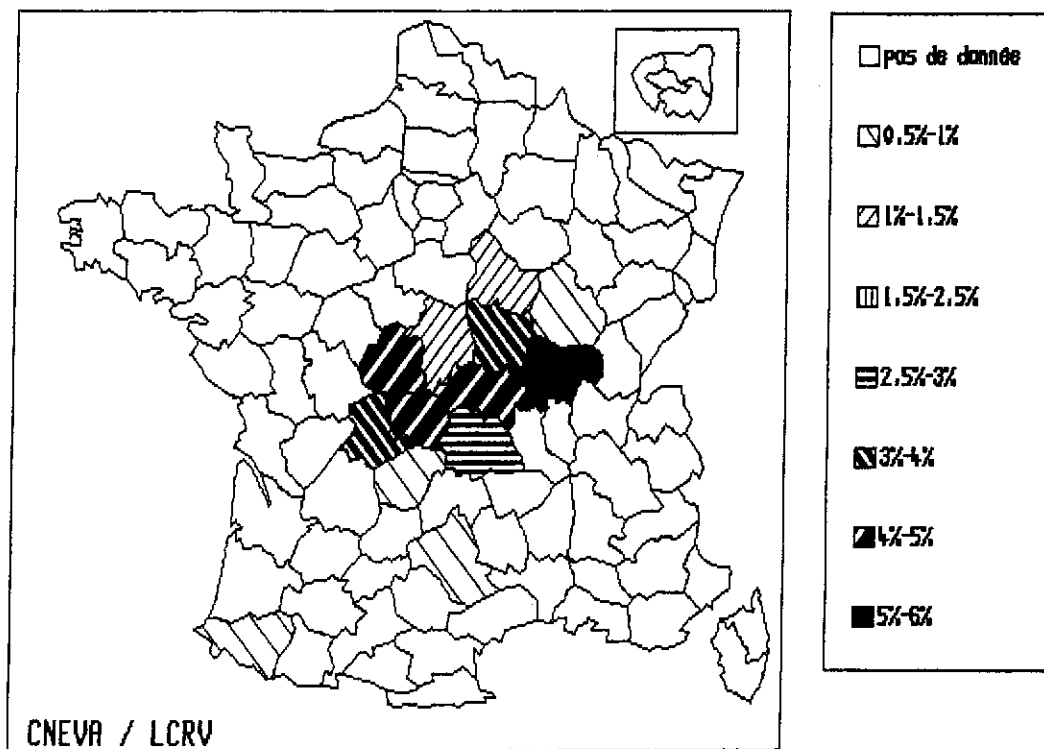
Figure 4 : Distribution des départements selon le taux de cheptels à sérologie atypique.



Dans les élevages atteints, le taux moyen de bovins affectés est de 3,62 % (1,7 % à 4,8 % selon les départements). Le taux d'animaux atteints rapporté à la population des bovins du département varie de 0,01 % à 0,3 % (Figure 5). L'étude de la distribution des départements selon les taux observés fait apparaître deux populations distinctes : pour les cheptels, (Figure 4), un groupe de départements de faible taux (inférieur à 1,5 %), et un deuxième réparti de 2,5 % à 6 % ; pour les animaux, (Figure 5), un premier groupe de départements dont le taux est inférieur à 0,05 % et un deuxième qui s'étend de 0,1 à 0,3 % . La figure 6 montre une relation presque linéaire entre le taux d'animaux à sérologie atypique dans le département, et le taux de cheptels à sérologie atypique.

D'une façon générale, les cheptels touchés ont une taille moyenne (nombre d'animaux) plus élevée que celle du département (Figure 7). La figure 8 représente la répartition du pourcentage de cheptels à sérologie atypique des départements en fonction de la taille moyenne des cheptels à sérologie atypique. Si l'on excepte le cas des départements 12, 19, 64, il semble exister une relation régulièrement décroissante entre ces deux variables. La figure 9 montre la répartition du taux de cheptels à sérologie atypique des départements en fonction du pourcentage de cheptels allaitants du département. Il semble que l'on puisse distinguer deux populations, nettement séparées par le taux seuil de 3 %.

Carte 5 : Pourcentage de cheptels à sérologie atypique par département.



Carte 6 : Pourcentage d'animaux à sérologie atypique par département.

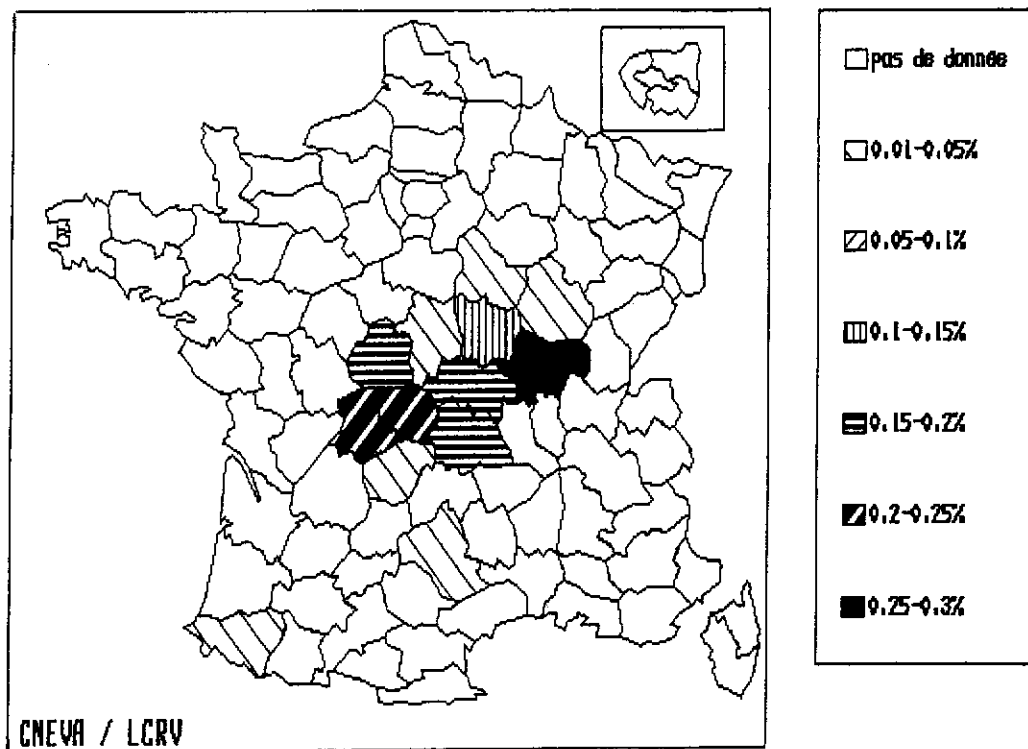


Figure 5 : Distribution des départements selon le taux d'animaux à sérologie atypique (dans le département)

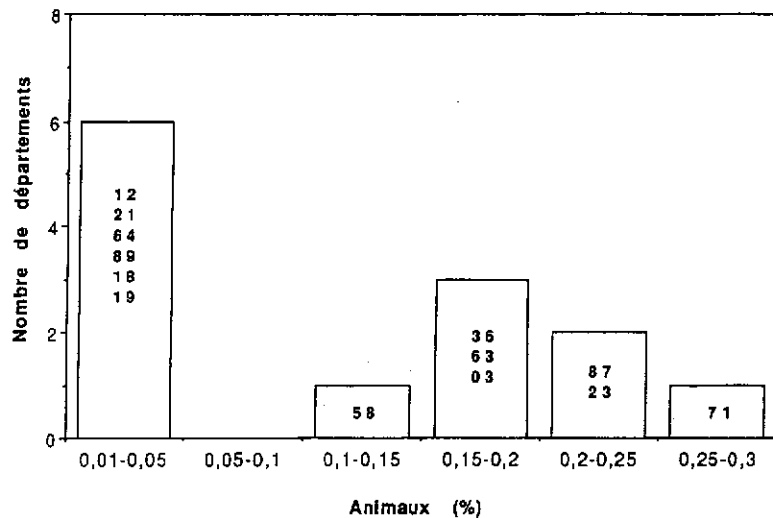


Figure 6 : Dispersion des départements selon les pourcentages d'animaux et de cheptels à sérologie atypique.

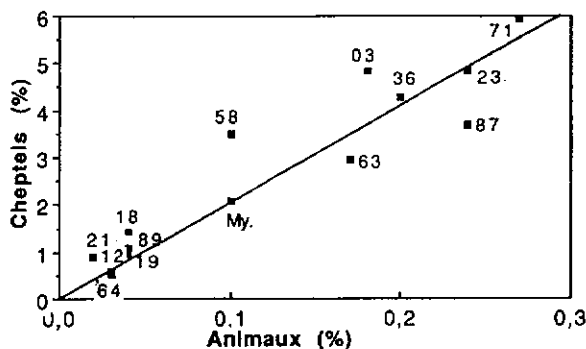


Figure 7 : Dispersion des départements en fonction des nombres moyens d'animaux dans les cheptels à sérologie atypique et dans l'ensemble des cheptels départementaux .

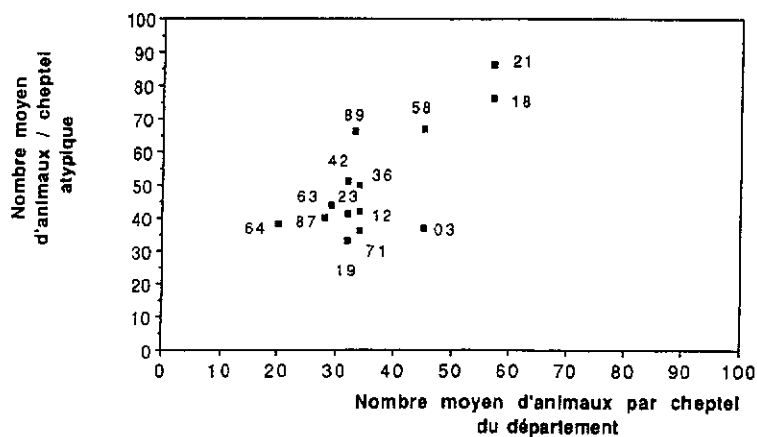


Figure 8 : Dispersion des départements en fonction du pourcentage de cheptels à sérologie atypique et du nombre moyen d'animaux dans les cheptels départementaux.

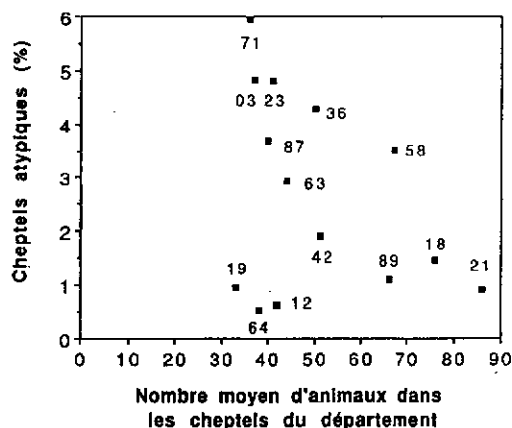
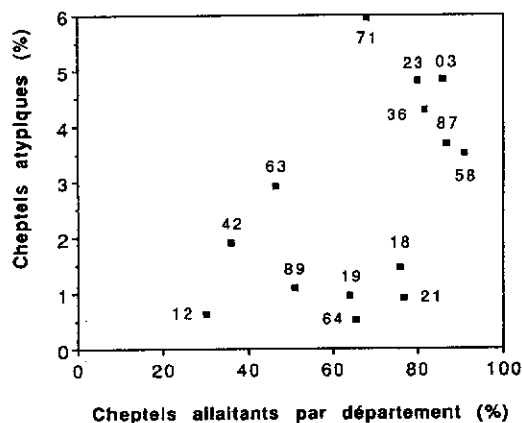


Figure 9 : Dispersion des départements en fonction du pourcentage de cheptels à sérologie atypique et du pourcentage de cheptels allaitants.



III. SITUATION DE LA BRUCELLOSE DANS LA ZONE CONCERNEE

La majeure partie des départements de la zone connaissent une situation sanitaire excellente (prévalence des cheptels infectés en 1990 inférieure à 1 %, sauf pour 64) (cf Carte 7). Tous ces départements ont arrêté la vaccination contre la brucellose depuis plus de cinq ans, sauf les départements 18, 21 et 64.

La figure 10 représente les taux de foyers de brucellose réputée contagieuse (B.R.C.) pendant la période 1988-1990, pour les différents départements, classés par ordre croissant de taux d'infection en 1988. Les taux ont logiquement baissé, sauf pour le département 63. La plupart des départements ont un taux inférieur à 0,1 % en 1990, sauf les départements 21, 63 et 64.

La figure 11 représente pour la même période, les taux de cheptels infectés de brucellose (les cheptels à sérologie atypique ont été exclus de ces données). Les départements sont classés dans le même ordre que celui de la figure 10. Tous les départements ont un taux inférieur à 1 % en 1990, sauf le département 64. En règle générale, les taux ont diminué de 1988 à 1990, sauf pour les départements 18, 03, 23, 21 et 19, pour lesquels on constate une tendance contraire.

Carte 7 : Représentation des taux départementaux de prévalence annuelle d'infection brucellique des cheptels en 1990.

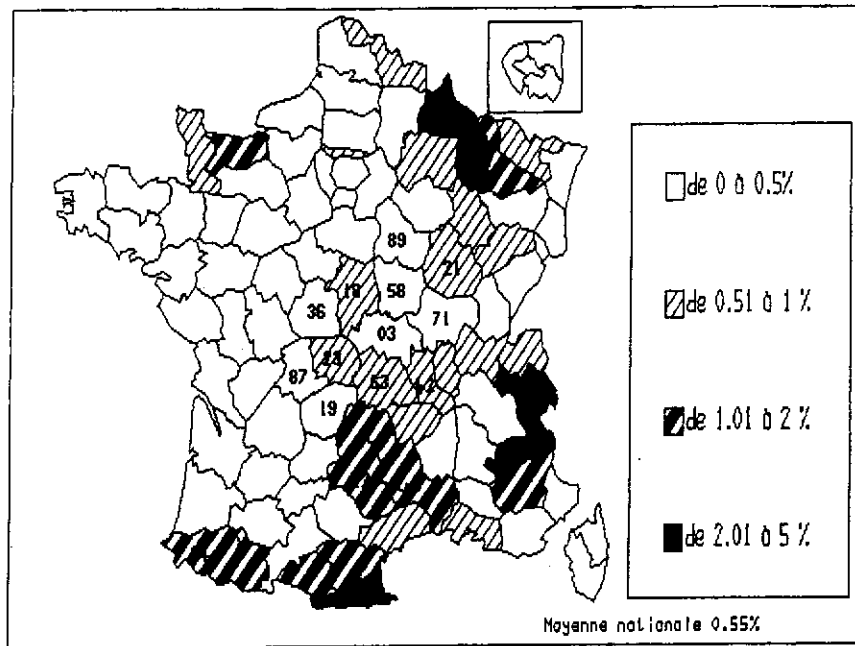


Figure 10 : Taux de foyers de B.R.C. par année (1988-1990) et par département (par ordre croissant du taux moyen annuel de B.R.C.).

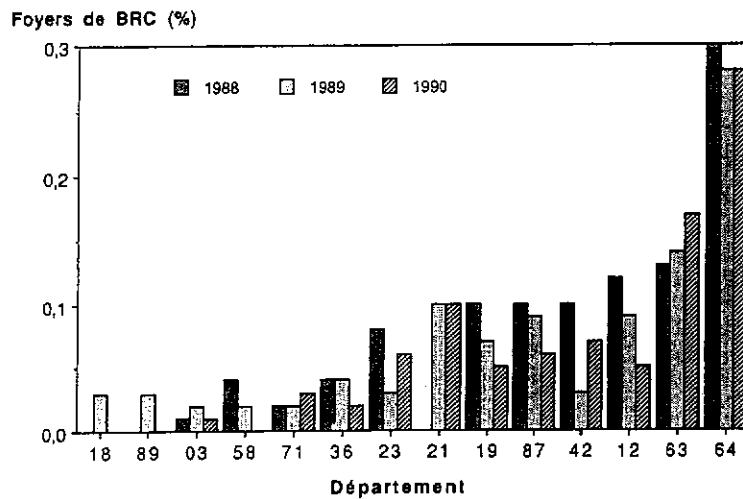
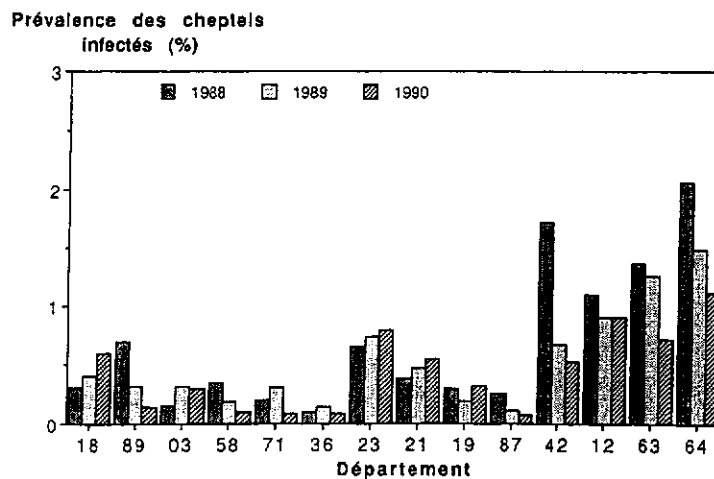


Figure 11 : Taux de prévalence des cheptels infectés par département (1988-1990).



Le rapprochement des figures 10 et 11 permet de constater une relation facilement compréhensible : dans les départements à (relativement) fort taux initial de B.R.C. la diminution du taux de cheptels infectés de brucellose a été la plus forte. Il est en effet plus facile de faire baisser un taux d'infection lorsqu'il est relativement élevé (supérieur à 1 %).

IV. COMPARAISON DE LA BRUCELLOSE INFECTION ET DE LA BRUCELLOSE ATYPIQUE

La figure 12 représente les taux de cheptels à sérologie atypique dans les départements, classés en fonction du taux de cheptels infectés de brucellose. On ne constate aucune relation entre ces deux variables. Les figures 13 et 14 sont bâties sur le même modèle pour les taux de B.R.C. et de brucellose latente : les conclusions sont équivalentes.

Figure 12 : Comparaison du taux moyen annuel de cheptels infectés et du taux de cheptels à sérologie atypique selon les départements.

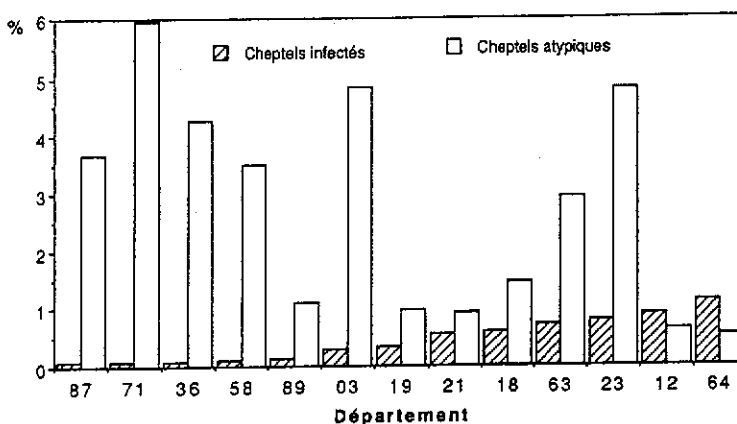


Figure 13 : Comparaison du taux moyen annuel de foyers de B.R.C. et du taux de cheptels à sérologie atypique selon les départements.

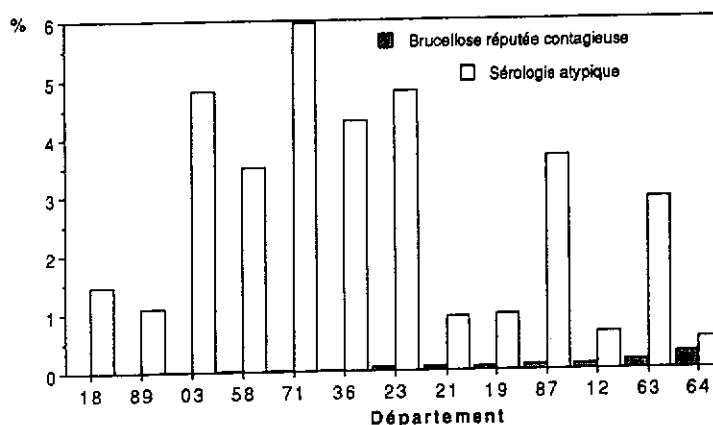
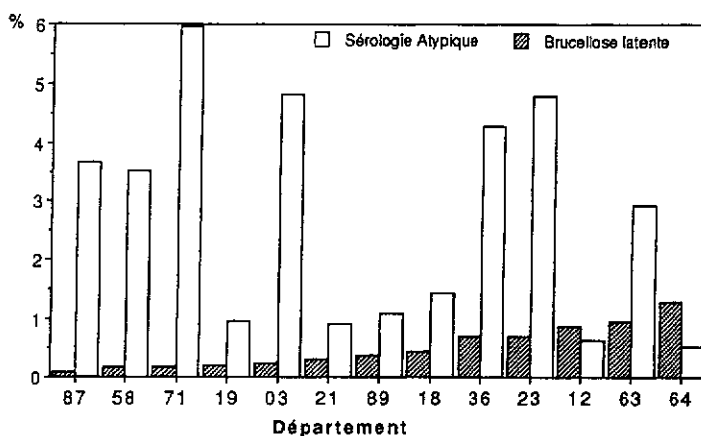


Figure 14 : Comparaison du taux moyen annuel de foyers de brucellose latente et du taux de cheptels à sérologie atypique selon les départements.



V. ETUDE DU NOMBRE DE CAS PAR ELEVAGE

La compilation des données des différents départements (Figure 15) montre que dans 89 % des cas, un ou deux bovins sont touchés : 72 % un seul bovin, 17 % deux bovins. L'étude ultérieure se limite à cette grande majorité du phénomène mise en évidence. La figure 16 permet de rendre compte de la grande dispersion des départements en fonction des pourcentages départementaux de cheptels à sérologie atypique ayant un ou deux bovins atteints. Pour tous les départements, 85 % au moins des cheptels à sérologie atypique comportent un ou deux bovins réagissants.

Figure 15 : Répartition des élevages à sérologie atypique en fonction du nombre de cas par élevage.

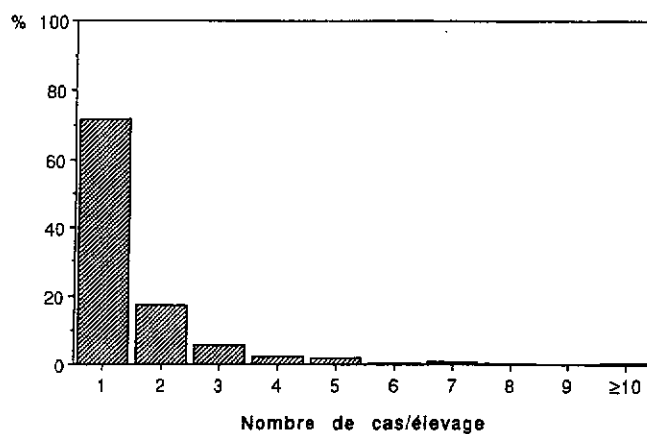
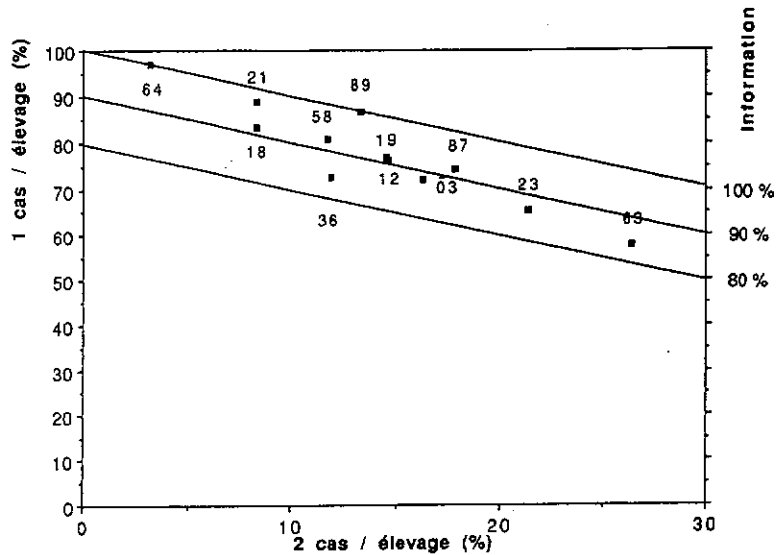


Figure 16 : Distribution des départements selon le nombre de cas atypiques (1 ou 2) par élevage.



Une étude particulière a été menée dans le département de l'Allier. La figure 17 montre la distribution du nombre de cas dans un élevage en cas d'infection brucellique authentique (23 élevages atteints), la figure 18 concerne les cheptels à réactions atypiques (350 élevages). Dans le cas d'une infection brucellique aiguë et évolutive, le nombre de cas détectés lors du premier dépistage sérologique peut être élevé. Il peut en être de même dans le cas d'un cheptel à sérologie atypique, mais la probabilité en est beaucoup plus faible. Lors d'une infection brucellique latente, dans la grande majorité des cas seulement un ou deux animaux sont détectés par le premier dépistage. Il en est de même dans les cheptels à sérologie atypique. De ce fait, il est tout à fait impossible de distinguer brucellose véritable et phénomène atypique en prenant en considération le nombre de réactions dans l'élevage, sur la base des résultats au premier contrôle effectué lors de prophylaxie

Figure 17 : Répartition du nombre de cas par élevage dans les cheptels infectés (23 élevages).

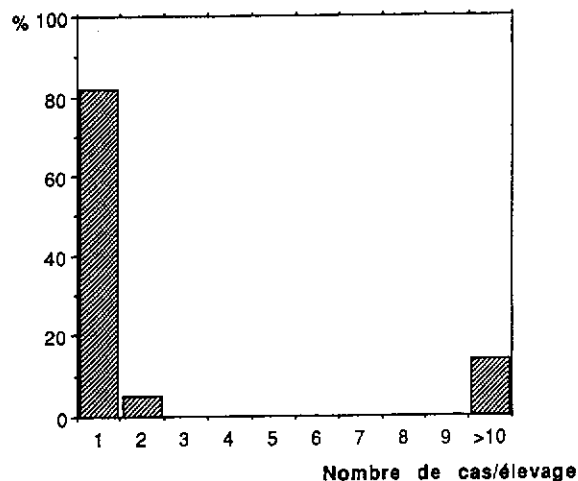
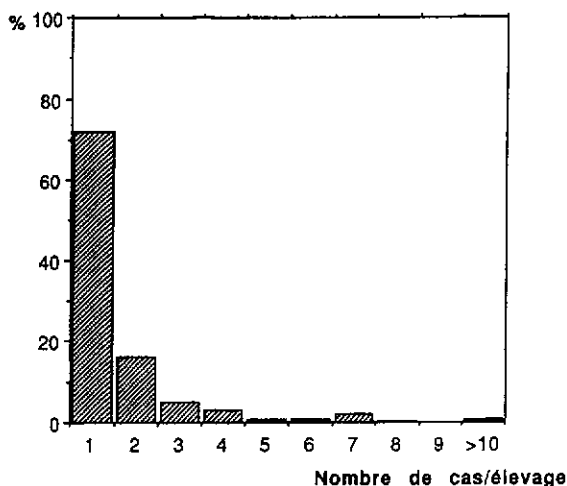


Figure 18 : Répartition du nombre de cas par élevage dans les cheptels à sérologie atypique (350 élevages)

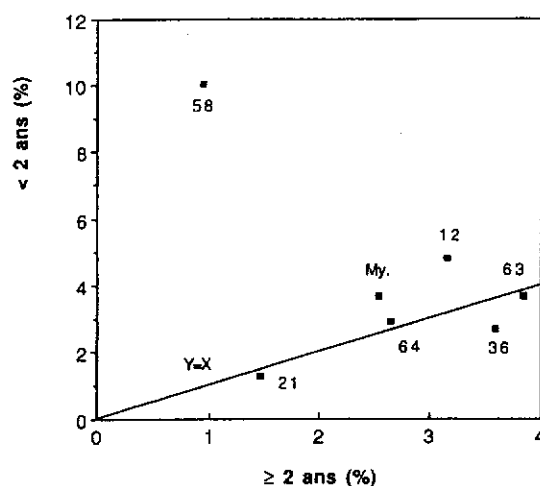


VI. ETUDE DU PHENOMENE EN FONCTION DE DIFFERENTS FACTEURS

1. Facteur âge

La figure 19 permet de comparer, pour chaque département, la distribution du taux d'animaux à sérologie atypique pour les deux classes d'âge, moins de deux ans et au moins deux ans. Les taux ne sont pas différents : les départements sont régulièrement dispersés le long de la bissectrice, sauf le département 58.

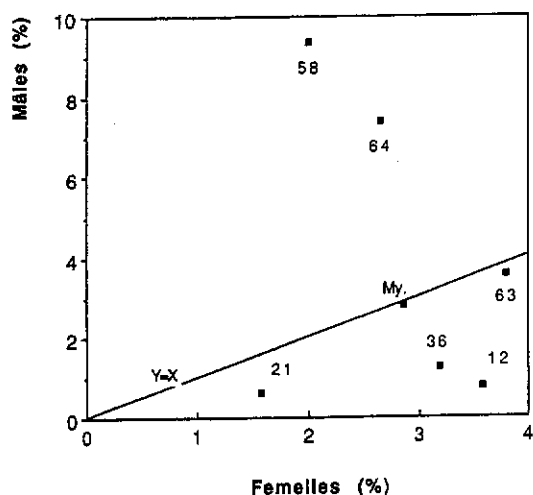
Figure 19 : Distribution des départements selon les taux d'animaux à sérologie atypique dans les classes d'âge (moins de 2 ans et au moins 2 ans).



2. Facteur sexe

La distribution des départements en fonction des taux d'animaux à sérologie atypique par sexe (figure 20) ne permet pas non plus de mettre en évidence une constatation univoque.

Figure 20 : Distribution des départements selon les taux d'animaux à sérologie atypique en fonction du sexe.



3. Facteur type de production

La comparaison des taux d'animaux atteints par le phénomène atypique dans les cheptels laitiers et allaitants (figure 21) suggère un impact plus accusé dans les cheptels allaitants, tout au moins pour les quatre départements pour lesquels les données ont permis l'analyse. Une analyse équivalente sur les taux de cheptels à sérologie atypique (figure 22) conduit au même constat.

Figure 21 : Dispersion des départements en fonction du pourcentage d'animaux à sérologie atypique par type d'élevage (allaitant ou laitier ; 4 départements exploitables).

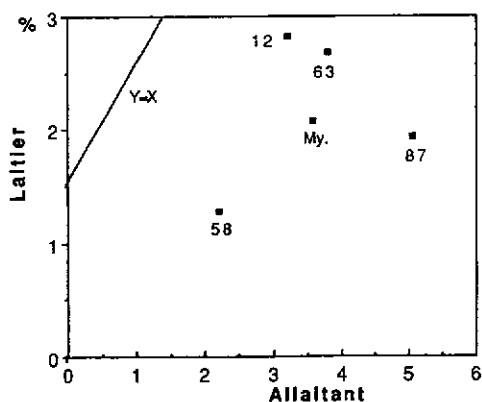
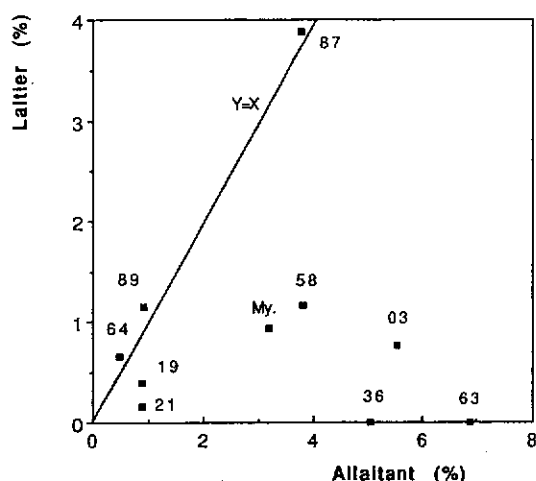


Figure 22 : Distribution des départements en fonction du % de cheptels à sérologie atypique par type d'élevage (allaitant ou laitier).



Toutefois, une analyse plus fine menée à l'échelon des cheptels, dans le département de l'Allier tempère nettement ces premières conclusions. En effet, les effectifs des élevages allaitants sont en général plus nombreux que ceux des élevages laitiers. Si l'on admet l'hypothèse que le phénomène résulte d'un déterminisme aléatoire au moins à l'échelon des individus, on peut en déduire que les élevages d'effectif plus élevé ont une probabilité plus élevée de révéler le phénomène. Il est alors nécessaire de pondérer les taux d'animaux atteints en tenant compte de la taille des cheptels. Dans les cheptels laitiers, le taux d'animaux atypiques est de 1,9 % (effectif moyen = 42). Dans les cheptels allaitants, le taux d'animaux à sérologie atypique est de 2,6 % pour un effectif moyen de 68 bovins ; rapporté à un effectif identique à celui des cheptels laitiers, le taux n'est plus que de 1,6 %... La relation est alors inverse de ce qui avait été précédemment constaté.

Par conséquent, l'étude de ce cas particulier démontre que l'on ne peut pas mettre en évidence de relation claire entre le facteur type de production et le phénomène atypique.

VII. ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES RESULTATS SEROLOGIQUES AUX DIFFERENTS CONTROLES

1. Prophylaxie (= "premier contrôle")

En prophylaxie, le dépistage sérologique, lorsqu'il est effectué sur le sérum, est réalisé par l'épreuve à l'antigène tamponné (E.A.T.). Si un résultat positif est constaté à l'E.A.T., une réaction de fixation du complément (F.C.) est pratiquée.

En moyenne, 58 % des réactions atypiques sont de type E.A.T.+ F.C.+ (Figure 23), les autres étant E.A.T.+ F.C.-. Autour de cette moyenne, les taux propres à chaque département sont très dispersés (figure 24), puisque tout l'éventail possible du rapport entre ces deux pourcentages est couvert.

Figure 23 : Proportions de résultats sérologiques positifs chez les animaux à sérologie atypique (1er contrôle).

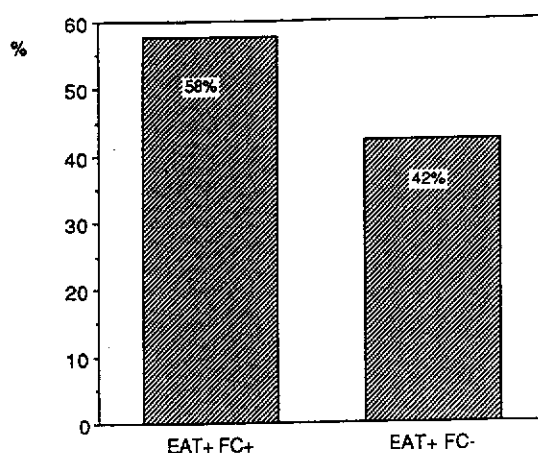
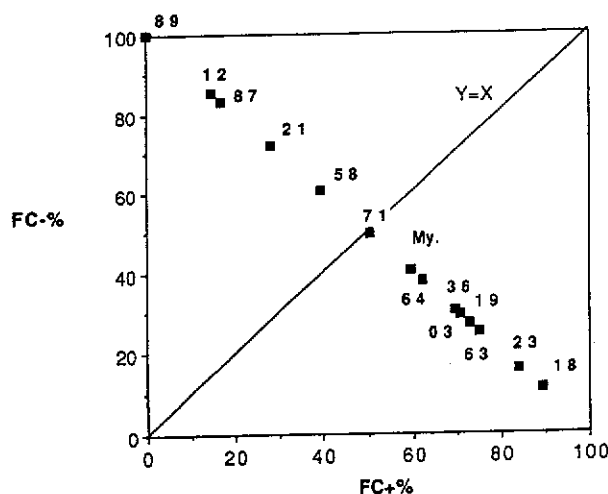


Figure 24 : Dispersion des départements en fonction des résultats sérologiques (1er contrôle).



Les données complémentaires de l'Allier ont permis une étude des résultats à l'échelon de l'élevage (324 élevages étudiés). On n'observe (Figure 25) qu'une seule réaction dans 68 % des élevages, qui se répartissent en 31 % de résultats E.A.T.+ F.C.- et (le complément à 68 %) 37 % d'E.A.T.+ F.C.+ . Deux réactions E.A.T.+ F.C.- sont constatées dans 4 % des élevages, et les autres cas, à savoir diverses combinaisons de réactions positives, dans 28 des élevages. L'étude de ces mêmes données en fonction de la taille des cheptels (Figures 26, 27 et 28) montre une hiérarchie relative entre les différentes catégories de résultats à peu près équivalente selon la taille des cheptels. Toutefois, la prédominance de résultats E.A.T.+ F.C.+ pour les élevages où un seul cas a été observé n'est plus constatée dans les cheptels de moins de 50 bovins. La catégorie "autres cas" est davantage représentée dans les grands effectifs, ce qui est aisément compréhensible.

Figure 25 : Distribution des cheptels selon les résultats sérologiques et leur nombre (Allier).

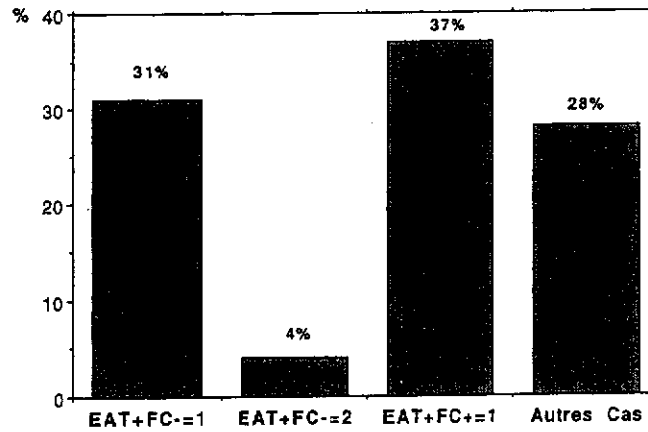


Figure 26 : Distribution des cheptels selon les résultats sérologiques et leur nombre parmi les cheptels de moins de 50 bêtes (Allier).

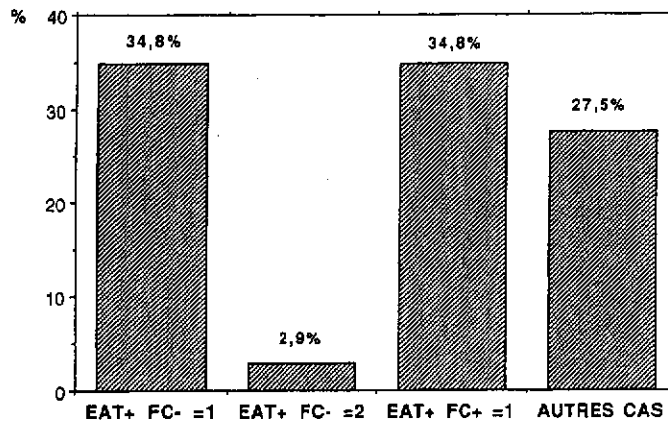


Figure 27 : Distribution des cheptels selon les résultats sérologiques et leur nombre parmi les cheptels ayant de 50 à 100 bêtes (Allier).

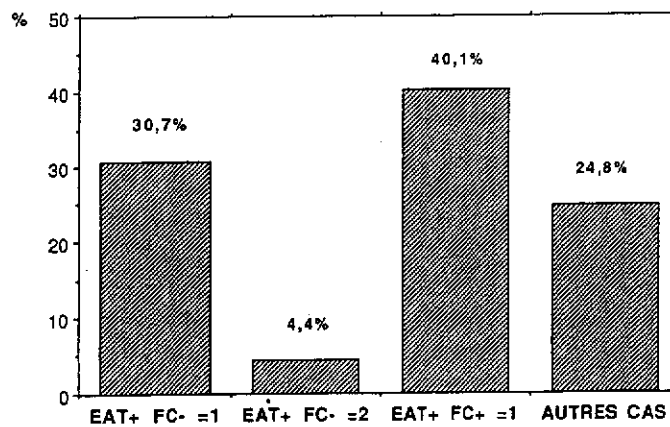
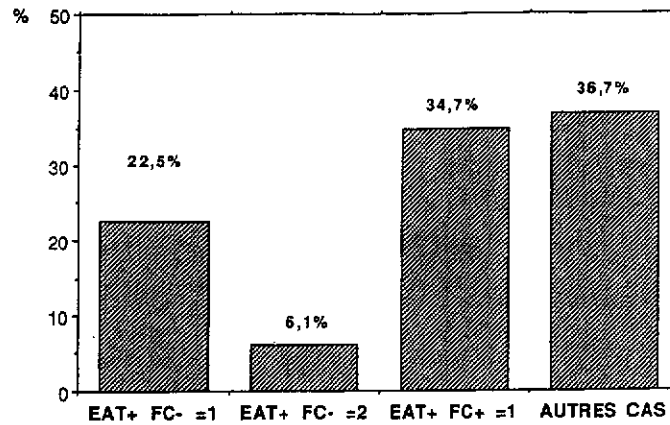


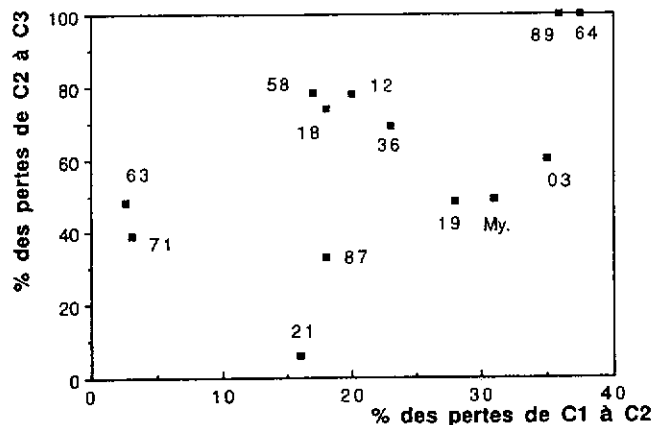
Figure 28 : Distribution des cheptels selon les résultats sérologiques et leur nombre parmi les cheptels de plus de 100 bêtes (Allier).



2. Contrôle n° 2

Au deuxième contrôle, tous les bovins à sérologie positive en prophylaxie (E.A.T.+ et F.C+ ou -) devaient faire l'objet d'un contrôle simultané à l'aide de l'E.A.T. et de la F.C. Tous les sérums positifs du contrôle n° 1 n'ont pas été éprouvés au contrôle n° 2 (Figure 29).

Figure 29 : Distribution des départements en fonction des pertes (tous les sérums positifs du contrôle 1 n'ont pas été testés au contrôle 2).



En moyenne (figure 30) 65 % des E.A.T.+ du contrôle n° 1 se négativent (E.A.T.- F.C.-) lors du 2° contrôle, qui devait être effectué un mois après le premier. Sur les 35 % de sérums restant positifs (notés X+), 89 % sont du type E.A.T.+ (dont environ la moitié sont F.C.+), les 11 autres % sont F.C.+ (E.A.T.-). Le pourcentage de négativation varie de façon importante selon les départements (figure 31), de 35 % à 88 %.

L'évolution des sérologies E.A.T.+ F.C.+ (figure 32) est assez voisine de l'évolution moyenne précédente, à la nuance près que parmi les 37 % qui ne se négativent pas, le taux des sérums qui demeurent avec le même résultat est le plus élevé (56 %). En ce qui concerne les sérologies E.A.T.+ F.C.- (figure 33), la nuance en question est inverse, puisque ce sont les sérologies E.A.T.+ F.C.- qui prédominent (57 %). Autrement dit, un résultat positif donné a environ un peu plus de 50 % de risque de se maintenir au bout d'un délai approximatif d'un mois.

Figure 30 : Contrôle 2 - Evolution des sérologies de résultat E.A.T.+.

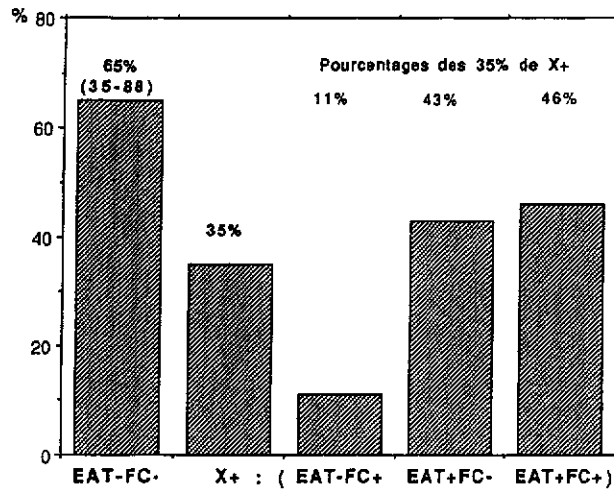


Figure 31 : Dispersion des départements en fonction des taux de résultats sérologiques E.A.T.- F.C.- lors des contrôles 2 et 3.

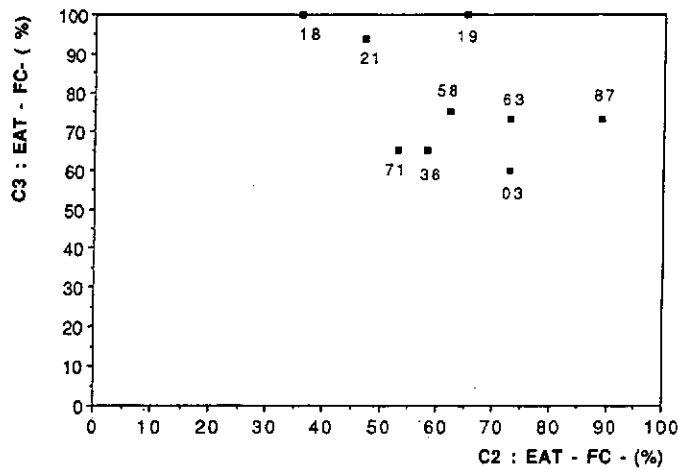


Figure 32 : Contrôle 2 - Evolution des sérologies de résultat E.A.T.+ F.C.+.

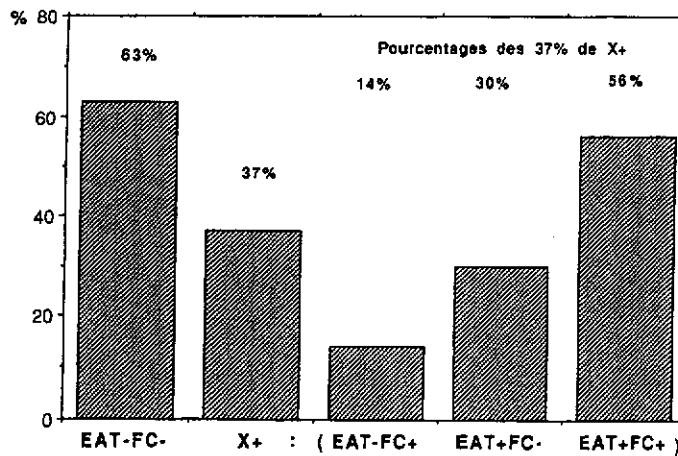
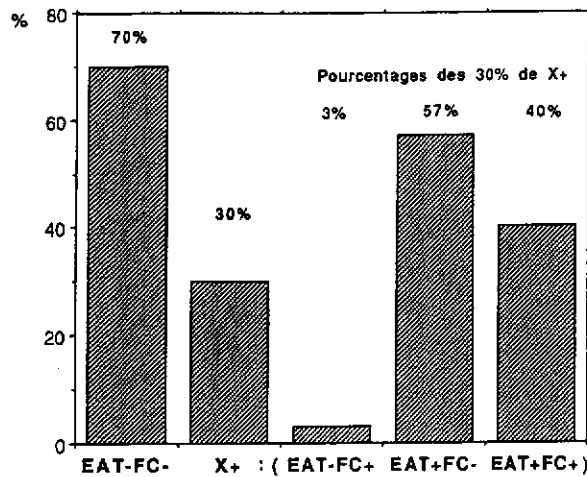
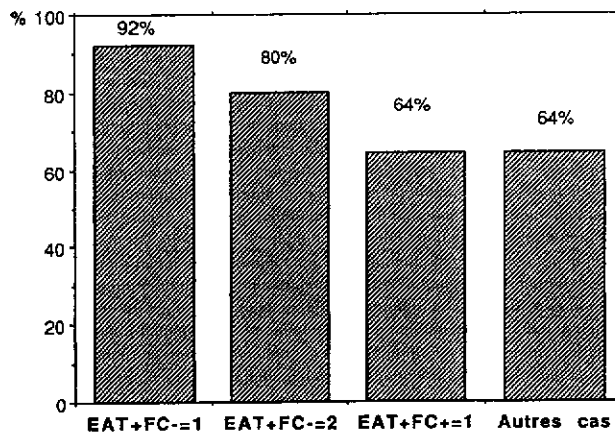


Figure 33 : Contrôle 2 - Evolution des sérologies de résultat E.A.T.+ F.C.-.



Les données de l'Allier ont permis une analyse de l'évolution de ces sérologies à l'échelon de l'élevage. Sur un total de 238 cheptels soumis à un deuxième contrôle, 165 se sont négativés soit 69 %. La figure 34 illustre les pourcentages de négativation des cheptels (et non des sérums individuels comme pour les figures précédentes) en fonction des différents types de résultats observés au premier contrôle (de prophylaxie) : cheptels dans lesquels 1 bovin avait présenté une réaction de type E.A.T.+ F.C.-, cheptels dans lesquels 2 bovins avaient présenté cette même réaction, cheptels dans lesquels 1 bovin avait présenté une réaction de type E.A.T.+ F.C.+, enfin, dans la catégorie "autres cas", les cheptels dans lesquels d'autres types de réaction et/ou un autre nombre de bovins impliqués avaient été constatés. Les taux de négativation sont relativement élevés, surtout pour les réactions E.A.T.+ F.C.-, ce à quoi on pouvait s'attendre.

Figure 34 : Pourcentage de négativation sérologique des cheptels pour chaque type de résultat sérologique.



Dans ce département, le deuxième prélèvement n'a pas été effectué après un même délai pour tous les élevages, ce qui a permis d'étudier l'évolution de cette négativation en fonction du temps écoulé : un mois (figure 35), et deux mois (figure 36). Le délai d'un mois et demi n'est pas étudié en raison du nombre insuffisant d'observations. Globalement, les taux de cheptels dont les résultats sérologiques deviennent négatifs sont plus élevés après deux mois, qu'après un seul mois, pour tous les types de réaction.

Figure 35 : Contrôle à 1 mois : Pourcentage de négativation sérologique des cheptels pour chaque type de résultat sérologique.

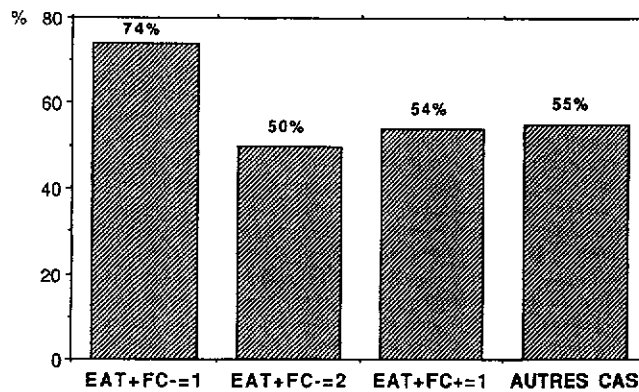
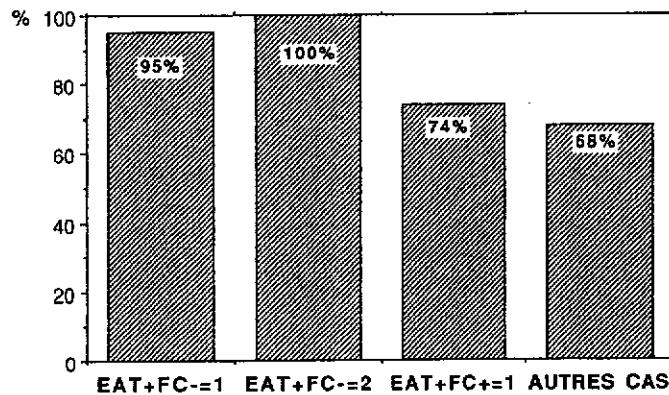


Figure 36 : Contrôle à 2 mois : Pourcentage de négativation sérologique des cheptels pour chaque type de résultat sérologique.



3. Contrôle n° 3

De nombreux sérums positifs au contrôle n° 2 n'ont pas été soumis à ce troisième contrôle (figure 31). 70 % des sérologies E.A.T.+ du second contrôle se sont négativées (figure 37) ; ce taux ne paraît pas notablement différent du taux observé lors du 2^e contrôle (figure 30). En revanche, parmi les sérums restés positifs, les résultats de type E.A.T.+ F.C.- sont plus fréquents (67 %) que lors du second contrôle. Le taux de négativation des résultats de type E.A.T.+ F.C.+ (figure 38) est moins élevé (55 %) que pour les résultats E.A.T.+ F.C.- (82 %) (figure 39) ; mais dans les deux cas, le maintien de la positivité est associé de façon majoritaire à un résultat E.A.T.+ F.C.-. Ces résultats sont à rapprocher de ceux des figures 32 et 33 : on peut ainsi vérifier que si le risque moyen de négativation des sérologies est en moyenne comparable lors du 2^e et du 3^e contrôle, la configuration des résultats restant positifs évolue d'un contrôle à l'autre, d'une manière telle qu'ils confirment la meilleure spécificité de la fixation du complément, et le caractère atypique du phénomène, puisqu'il évolue avec le temps.

Figure 37 : Contrôle 3 - Evolution des sérologies de résultat E.A.T.+.

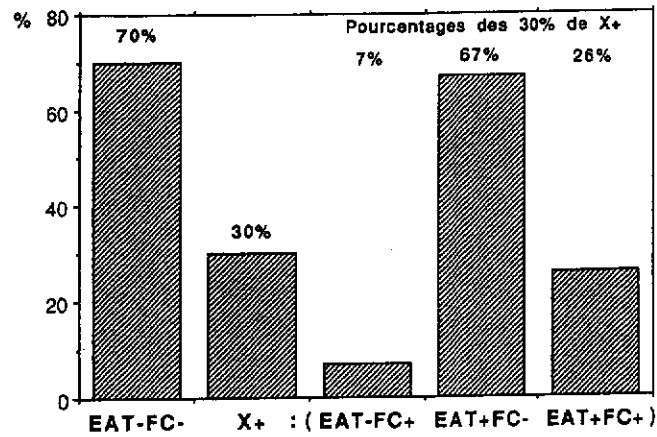


Figure 38 : Contrôle 3 - Evolution des sérologies de résultat E.A.T.+ F.C.+.

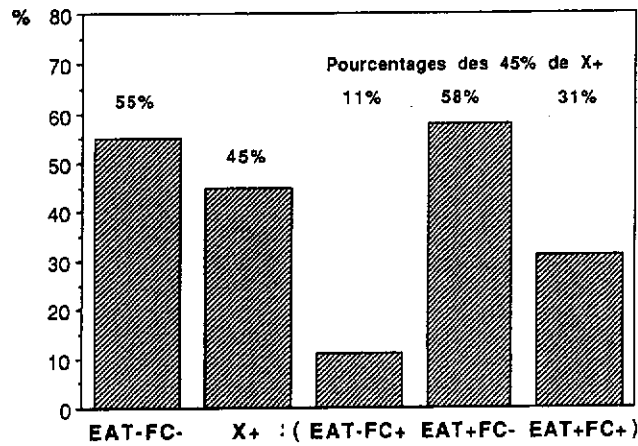
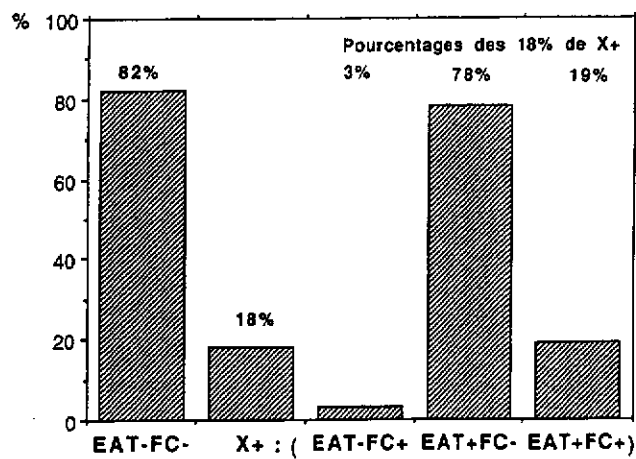


Figure 39 : Contrôle 3 - Evolution des E.A.T.+ F.C.-.



4. Evolution du phénomène

La figure 40 reprend les données individuelles au cours des trois contrôles successifs, de manière à montrer l'évolution de la négativation des réactions sérologiques. Sur la population étudiée, et si l'on fait abstraction du biais potentiel introduit par l'absence d'examen d'un pourcentage important d'individus, on constate que 84 % des sérums sont devenus négatifs à l'issue du 3^e contrôle.

De même, la figure 41 regroupe les données d'observation concernant les cheptels (données de l'Allier) au cours des deux contrôles successifs pour lesquels ces données sont exploitables. Globalement, c'est-à-dire quel que soit le type de résultat positif initial, 66 élevages sur 112, soit 59 % des élevages à sérologies positives, se sont négativés au bout d'un mois, et 99 sur 126, soit 78 %, au bout d'un mois et demi à deux mois. Le gain relatif de négativation des cheptels après environ deux mois par rapport à un examen effectué au bout d'un mois est d'environ 30 % des cheptels ($\chi^2 = 9,8$; $p < 0,05$).

Le contrôle du cheptel dans son ensemble peut faire apparaître de nouvelles sérologies positives, en pourcentage le plus souvent faible, inférieur à un pour cent (figure 42). Les données des départements 18 et 63 ont une portée très limitée, en raison du faible nombre de cheptels concernés. En revanche, les données du département 71 sont beaucoup plus fiables (plus de 14 000 animaux contrôlés) ; dans ce département, le taux d'incidence de sérologies positives au 3^e contrôle est d'environ 1 %.

La comparaison de l'incidence de résultats positifs lors des premier et troisième contrôles (figure 43) montre clairement que l'incidence est plus faible lors du dernier contrôle, y compris pour le département 71 (les données des départements 18 et 63 n'ont pas de signification statistique valable).

DISCUSSION

I. RESULTATS

Cette étude a permis de confirmer la réalité et l'ampleur du phénomène atypique : 2,08 % de cheptels à sérologie atypique en moyenne, contre 0,45 % de cheptels infectés de brucellose authentique. On constate également une grande variabilité de phénomène observée dans les départements concernés, et cela quelle que soit la variable considérée.

L'analyse des différents facteurs envisagés (âge, sexe, type de production) n'a pas permis de mettre en évidence d'association qui aurait pu suggérer une piste pour l'étude d'hypothèses explicatives, ce qui ne veut pas dire pour autant que ces facteurs n'ont aucun rôle. Toutefois, la taille des élevages semble associée au phénomène ; ce constat, tel qu'il apparaît d'après la figure 8, est à nuancer, dans la mesure où la distribution des effectifs par classe de taille d'élevages pourrait suffire à expliquer cette répartition. Pour établir un tel fait, il faudrait procéder à une étude de la fréquence de cheptels à sérologie atypique par classe de taille d'élevages. Le cas échéant, il conviendrait ensuite de vérifier s'il s'agit seulement d'un effet de masse du nombre d'animaux par élevage, ou bien d'un révélateur d'autres facteurs d'ordre zootechnique.

Figure 40 : Evolution des sérologies individuelles au cours des trois contrôles (résultats issus de l'étude des départements 71, 63, 18, 23, 03, 12, 58, 36).

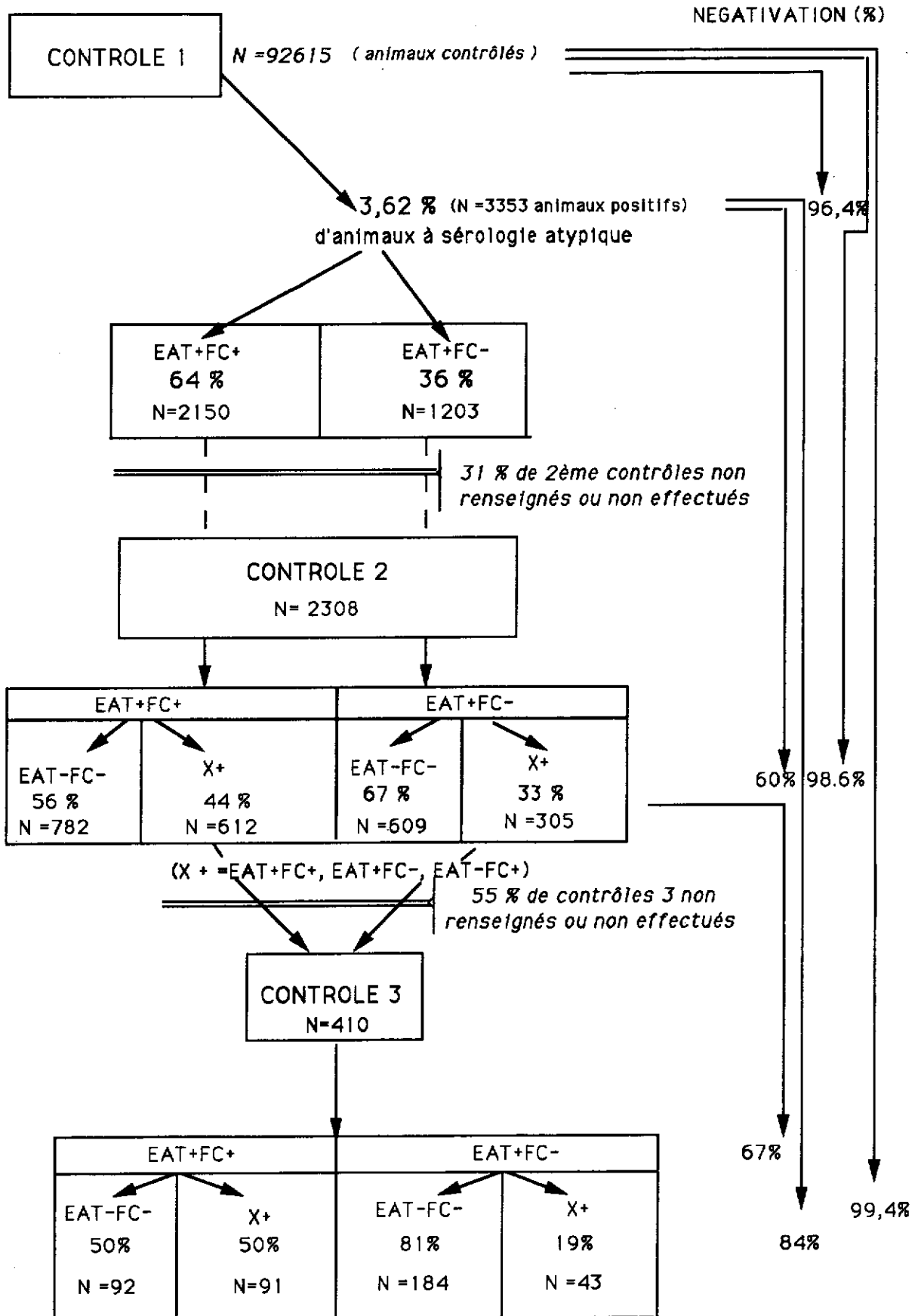


Figure 41 : Evolution de la négativation sérologique des cheptels (Département de l'Allier)

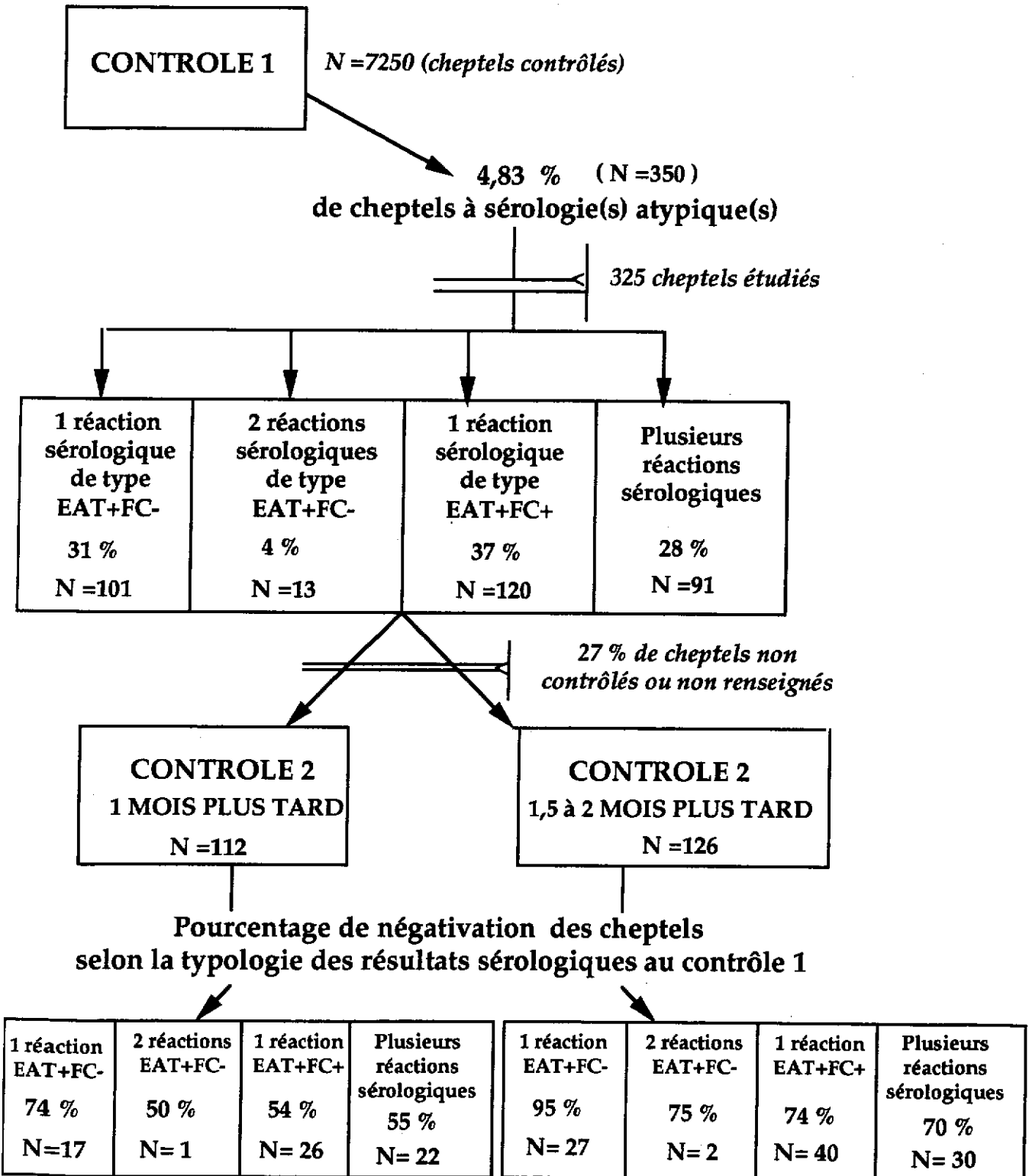


Figure 42 : Incidence de bovins à sérologie positive dans les cheptels à sérologie atypique au 3ème contrôle.

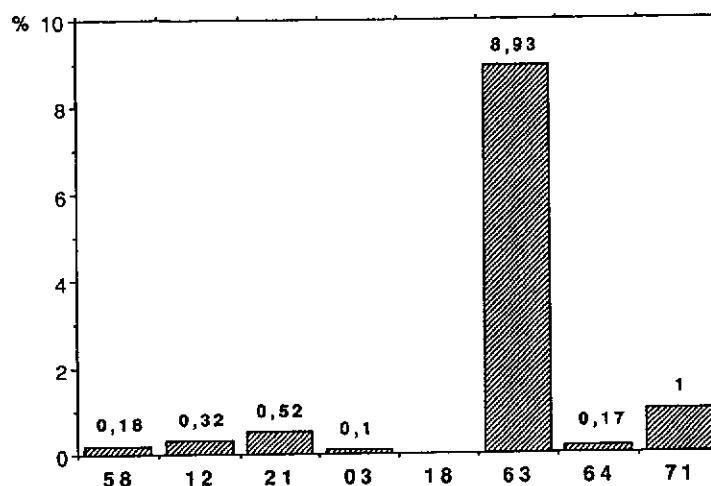
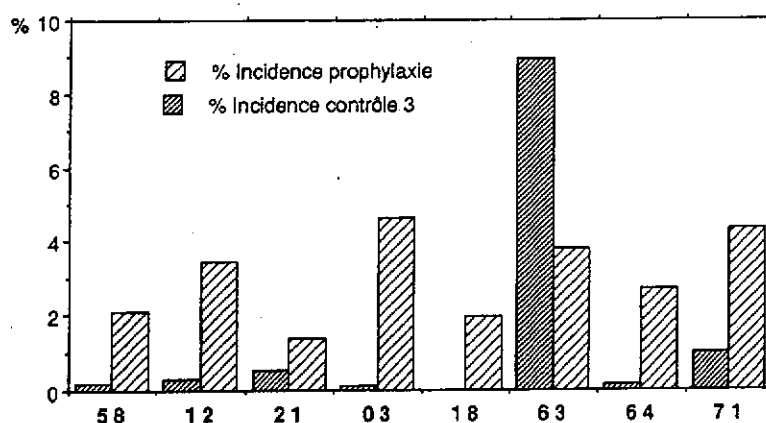


Figure 43 : Comparaison des incidences de bovins à sérologie positive à la prophylaxie et au contrôle.



La comparaison du phénomène à la brucellose classique a conduit aux constats suivants :

- les réactions sérologiques atypiques ont montré un fort taux de négativation dans un délai de 1 à 2 mois, de l'ordre de 60 % (1 mois), à 80 % (2 mois), contrairement à la brucellose, pour laquelle les réactions positives ont une forte tendance à la persistance au moins sur cette durée ;

- le nombre de cas par élevage est faible : 1 seul cas dans 72 % des élevages, 1 ou 2 cas dans 90 % des élevages. Toutefois, cette distribution peut être rencontrée dans les cas d'infection brucellique latente, même si elle est peu probable dans ces départements indemnes de brucellose. Il faut souligner que dans le cas de brucellose authentique l'incidence faible qui peut être observée (un ou deux cas) résulte en grande partie des mesures d'élimination de ces animaux, qui limitent donc le risque de contagion dans l'élevage ; en l'absence de ces mesures, l'évolution du taux d'infection est toujours en augmentation, soit lente, d'allure enzootique (pas de cas clinique, risque d'excrétion plus réduit), soit exponentielle, d'allure épizootique, lors de l'apparition de manifestations cliniques, dont l'avortement, responsable de la haute contagiosité de l'infection.

Pour ces différentes raisons (ampleur du phénomène, négativation des sérologies, faible incidence dans les élevages) le phénomène étudié ne présente aucune caractéristique classique de la brucellose, et peut difficilement être considéré comme provoqué par *Brucella*.

Cette étude a permis d'évaluer l'évolution globale des sérologies positives, à l'issue de trois contrôles successifs. Dans 65 % des cas (E.A.T.+), ces résultats positifs à la prophylaxie se négativent au 2^e contrôle, et dans 90 % des cas (E.A.T.+ initiaux) au 3^e contrôle. D'autre part, une réaction positive donnée en prophylaxie (E.A.T.+ F.C.+) avait environ 50 % de risque de rester positive au 2^e contrôle sous la forme E.A.T.+ F.C.+, et dans 50 % des cas sous une autre forme (E.A.T.- F.C.+ ou E.A.T.+ F.C.-).

Le phénomène étudié continue certes d'évoluer, mais avec une incidence beaucoup plus faible qu'initialement lors de la prophylaxie (cf figure 43). Le cas du département 71 attire l'attention, en raison du taux élevé d'incidence secondaire qui y a été constaté (1 %). Ce taux plus élevé par rapport aux autres départements est-il lié à un phénomène saisonnier ou à une meilleure qualité d'observation ? La suite des observations permettra peut-être de répondre.

L'étude du compte-rendu des examens sérologiques de l'Allier a apporté des conclusions supplémentaires, à l'échelon des élevages (et non plus seulement globalement, à l'échelle du département).

- Dans 35 % des élevages "atypiques" (figure 25) les réactions positives en E.A.T. sont associées à une F.C. négative (une ou deux réactions par cheptel) ce qui permet au moins de laisser planer un doute sur la réalité de l'infection brucellique, et donc conduit à procéder à une expertise pouvant éviter de déclarer infecté un élevage qui ne l'est pas. Cependant, il faut bien voir, à l'inverse, que dans les 65 % des cas restants, la positivité de la F.C. emporterait la conviction, si une procédure spéciale au phénomène atypique n'était mise en oeuvre.

- La taille des élevages est associée à la distribution du nombre d'animaux à sérologie atypique par élevage : la proportion d'élevages comportant une réaction E.A.T.+ F.C.- est supérieure parmi les élevages de moins de 50 bêtes (figures 26, 27 et 28).

- Le temps permet de voir augmenter la proportion d'élevages dont les résultats deviennent négatifs. Cette augmentation de négativation est plus importante pour les résultats E.A.T.+ F.C.- que pour tout autre résultat : pour les élevages ne comportant qu'une seule réaction (E.A.T.+ F.C.-), la proportion passe de 74 % au bout d'un mois à 95 %, et pour les élevages comportant soit une réaction (E.A.T.+ F.C.+), soit plusieurs diversement combinées, de 55 % environ à 72 % (figure 41).

II. METHODE

* Le questionnaire comporte des biais :

- Biais de recrutement : seuls ont été étudiés les départements qui ont spontanément déclaré l'existence du phénomène. On pense toutefois que si d'autres départements étaient concernés par un phénomène d'une ampleur équivalente, ils se seraient manifestés.

- Biais de conception : l'unité statistique retenue initialement était le département, empêchant toute conclusion à l'échelon de l'élevage. C'est pourquoi une étude complémentaire a été menée dans l'Allier permettant la gestion de l'information par élevage.

- Biais d'exécution : le recoupement des données dans un même questionnaire permet de constater des incohérences, signalant des erreurs. C'est ainsi que les données de certains départements ont dû être écartées pour l'étude de certaines variables. Les délais entre les différents contrôles étaient variables, ce qui n'a pas permis une étude précise de l'évolution dans le temps des sérologies (sauf pour le cas particulier de l'Allier). Il faut toutefois préciser que le protocole n'était pas suffisamment explicite puisque le deuxième contrôle devait être effectué au moins 4 semaines après le 1^{er} contrôle. Tous les animaux positifs lors de la prophylaxie n'ont pas subi de 2^e contrôle, et dans le cas de l'abattage du ou des animaux à sérologie positive, tous les élevages n'ont pas subi de contrôle des animaux à sérologie négative comme prévu. Le protocole initial fut rarement respecté en ce qui concerne le 3^e contrôle (contrôle du cheptel dans son ensemble avec abattage ou non du ou des animaux positifs).

* La mesure de ce phénomène atypique peut en elle-même comporter un biais initial résultant de la modification récente de la réglementation. Jusqu'à avril 1990, le dépistage sérologique des cheptels infectés de brucellose nécessitait l'association de la F.C. pour toute réaction positive en E.A.T. A partir de la publication de l'Arrêté Ministériel du 20 mars 1990, une réaction positive en E.A.T. suffisait à considérer un cheptel comme infecté de brucellose. On pourrait donc penser que, de ce fait, des élevages qui autrefois auraient été dépistés par l'E.A.T., mais non classés infectés, grâce à une F.C. négative, seraient maintenant reconnus infectés par le jeu de cette nouvelle disposition réglementaire. Sous cette hypothèse, l'émergence de ce phénomène serait alors le produit de la compilation de données nouvelles (résultats E.A.T.+ F.C.-), en l'absence de référence antérieure, puisque ces mêmes résultats n'étaient pas enregistrés, donnant l'illusion qu'ils n'existaient pas.

Il faut toutefois souligner la forte proportion de résultats qui de toute façon auraient été détectés avant la prise d'effet de cet arrêté : 64 % des sérologies positives sont en effet de type E.A.T.+ F.C.+ (figure 40). Dans ces conditions, il nous faut bien conclure à la réalité de ce phénomène atypique, et écarter une explication tenant à un artefact de recensement des données.

* L'analyse des données sérologiques concernant l'évolution des résultats comporte un biais de sélection, par le fait que tous les animaux n'ont pas fait l'objet des contrôles successifs, sans que l'on sache pour quelle raison ils ont été soustraits à l'examen. Il en est de même pour l'étude de l'incidence, puisque tous les animaux, tous les troupeaux n'ont pas fait l'objet de la même rigueur.

Il faut souligner aussi que l'analyse rencontre une difficulté majeure, bien que courante en épidémiologie animale. Tous les élevages ne sont pas exposés au risque avec la même intensité. Par conséquent, l'étude des facteurs individuels, tels que l'âge ou le sexe devrait en tenir compte, ce qui pose un problème statistique particulièrement complexe. En effet, les résultats sont présentés en procédant à la compilation des données, sans tenir compte des effets de grappe : les données ne sont pas indépendantes, elles sont au moins liées par le département (les procédures de récolte de l'information ne sont pas partout de la même qualité) ou l'élevage.

Pour toutes ces raisons, les tentatives d'extrapolation doivent demeurer très prudentes.

III. DISCUSSION DES HYPOTHESES EXPLICATIVES

Cette étude, bien que descriptive, permet d'écarter un certain nombre d'hypothèses initialement formulées.

L'ampleur du phénomène est incompatible avec une infection brucellique classique, y compris latente, de même qu'avec l'interférence d'une fraction antigénique qui aurait été injectée à l'occasion d'une injection médicamenteuse ou vaccinale. Le statut des départements concernés permet également d'éliminer l'hypothèse d'une explication impliquant des séquelles vaccinales.

Parmi les hypothèses relatives à des agents bactériens ayant des caractères antigéniques croisant avec *Brucella*, celle concernant *Yersinia* 0:9 a acquis une consistance toute nouvelle à l'issue de travaux conduits au C.N.E.V.A. [GARIN-BASTUJI, Communication personnelle] qui ont permis l'isolement de deux souches à partir des fèces de bovins à sérologie positive.

Si cette dernière hypothèse est vraie, on devrait alors considérer cette infection comme sans doute relativement ordinaire jusqu'à une période récente, à l'issue de laquelle une importante modification écologique aurait affecté globalement un grand nombre d'élevages, mais en ne provoquant de manifestations que dans une très faible proportion des bovins.

IV. PROPOSITIONS

Le questionnaire prévu pour la campagne 91-92 devra prendre en compte le cheptel comme unité statistique, afin de permettre la gestion de l'information concernant le type d'élevage, sa taille, l'âge des animaux, et l'évolution des sérologies d'une façon pertinente.

L'exécution du protocole doit être plus rigoureuse. Il faut pour cela mettre en place un système de détection précoce d'erreurs éventuelles, permettant de récolter *in fine* une information de qualité, et non pas seulement constater après la fin de la campagne les divers défauts. On pourrait, par exemple, concevoir qu'une personne soit tout particulièrement chargée de vérifier sur les premiers dossiers la conformité des procédures.

Sur la base des résultats préliminaires d'autres observations, l'emploi du test cutané allergique pourrait être recommandé, sous certaines conditions, pour effectuer le diagnostic différentiel.

CONCLUSION

Cette étude n'a pas permis de répondre de façon définitive, et positive, aux nombreuses questions que se posaient les différentes personnes réunies à Moulins, en janvier 91. Elle a seulement permis de confirmer l'ampleur du phénomène, et, grâce à l'étude complémentaire menée dans l'Allier, les caractéristiques de la distribution des élevages selon le nombre de réactions, et l'évolution des sérologies. Il en découle le constat que ce phénomène n'a vraisemblablement rien à voir avec la brucellose. Aucun facteur associé n'a pu être mis en évidence de façon claire, qui aurait pu nourrir des hypothèses explicatives. On ne dispose d'aucun élément d'ordre épidémiologique (que ce soit de type descriptif, ou de type facteur de risque potentiel) permettant facilement de faire la distinction entre un élevage atypique et un élevage réellement infecté de brucellose. Les conclusions de cette enquête, associée à celle d'autres travaux de recherche bactériologique, permettent cependant d'orienter les hypothèses explicatives vers la responsabilité possible de *Yersinia enterocolitica* 0:9. La mise en place d'un système d'observation adapté, réunissant les conditions de qualité qui ont été soulignées, est une nécessité impérieuse pour la campagne à venir, afin de permettre une exploitation optimale des informations ainsi produites, et des conclusions des différentes recherches entreprises.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos plus vifs remerciements aux différentes personnes qui ont collaboré à cette enquête, appartenant aux D.S.V., L.V.D., G.D.S. et G.T.V. de la zone concernée, et plus particulièrement des départements de l'Allier et de la Saône-et-Loire, également à P. Alliot, pour la réalisation des cartes, à N. Dupré pour sa participation, et enfin, à C. Mary de Bock, pour la mise au point finale du manuscrit.

REFERENCES

- 1 Arrêté du 20 Mars 1990 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la police sanitaire et à la prophylaxie collective de la brucellose bovine. J.O. du 19 Avril 1990:4778-4782.
- 2 CORBEL M.J.- The serological relationship between *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica* serotype IX and *Salmonella* serotypes of Kauffmann-White group N. J. Hyg., Camb. , 1975, 75, 151-171.
- 3 CORBEL M.J.- Recent Advances in the Study of *Brucella* Antigens and their Serological Cross-Reactions. Vet. Bull., 1985, 55 (12), 928-942.
- 4 CORBEL M.J., STUART F. A. and BREWER R.A.- Observations on serological cross-reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. 3rd International Symposium on Brucellosis, Algiers, Algeria, 1983, Develop. Biol. Stand., 56, pp. 341-348.

- 5 HURVEL B.- Differentiation of cross-reacting antibodies against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* by electroimmuno assay. Acta vet. scand., 1975, 16, 318-320.
 - 6 LINDBERG A.A., HAEGGMAN S., KARLSON K. and CARLSSON H.E.- Enzyme immunoassay of the antibody response to *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* 09 infections in humans. J. Hyg. Camb., 1982, 88, 295-306.
 - 7 MITTAL K.R. and TIZARD I.- Serological cross-reactions between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serotype 09. The Veterinary Bulletin, 1981, 51 (7), 501-505.
 - 8 MITTAL K.R. and TIZARD I.R.- Serological cross-reactions between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* type 0:9. Develop. Biol. Stand. 1984, 56, 657.
 - 9 MITTAL K.R., TIZARD I.R. and BARNUM D.A.- Serological cross-reactions between, *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9. Int. J. Zoon., 1985, 12, 219-227.
 - 10 NIELSEN K.- The serological Response of Cattle Immunized with *Yersinia enterocolitica* 0:9 or 0:16 to *Yersinia* and *Brucella abortus* Antigens in Enzyme Immunoassays. Vet. Immunology and Immunopathology, 1990, 24, 373-382.
 - 11 PERRY M. B. and BUNDLE D. R.- Antigenic Relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* Strains with those of *Escherichia coli* O17:H7, *Brucella melitensis*, and *Brucella abortus*. Infection and Immunity, 1990, 1391-1395.
 - 12 SCHOERNER C., WARTENBERG K. and RÖLLINGHOFF M.- Differentiation of Serological responses to *Yersinia enterocolitica* serotype 09 and *Brucella* species by immunoblot or enzyme-linked Immunosorbent Assay using whole bacteria and *Yersinia* outer membrane proteins. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 1570-1574.
-