

**ENQUETE NATIONALE SUR L'EPREUVE
DE L'ANNEAU SUR LAIT DE MELANGE
DESTINEE AU DEPISTAGE
DE LA BRUCELLOSE BOVINE
JUIN 1991 - NOVEMBRE 1991 ***

B. DURAND^[1], B. GARIN-BASTUJI^[1], B. DUFOUR^[2], F. MOUTOU^[1],
TH. COTON^[3], M. BROARDELLE^[4] et M. DAMOUR^[4].

RESUME : A la suite de remontées d'informations de terrain, signalant un excès de réactions positives à l'épreuve de l'anneau sur lait de mélange, une enquête rétrospective a été effectuée afin d'objectiver les résultats du dépistage de la brucellose bovine en troupeaux laitiers, sur l'ensemble du territoire français et pour une période de 6 mois.

Elle a permis de mettre en évidence un nombre important de réactions faussement positives. A l'analyse, le caractère excessif de ces réactions (au moins en partie prévisibles, vu la faible prévalence de l'infection) est apparu essentiellement lié au critère de positivité : en n'attribuant de signification qu'à deux résultats mensuels positifs consécutifs, les performances de l'épreuve de l'anneau pour le dépistage de la brucellose apparaissent tout à fait correctes.

SUMMARY : From informations from the field describing positive reactions in excess issued from ring tests performed on pooled milk, a retrospective study was undertaken in order to test the value of the results obtained during the screening for bovine brucellosis in dairy herds over the whole French territory and during a 6 month period.

The survey led to an important number of false positive reactions. When observed in detail, this number (for a part predictable when looking at the very low prevalence of the disease) is linked for most of it to the positiveness criteria. When keeping as significative only those positive twice in a row, the performances of the ring test to screen for brucellosis are correct.

*
* *

* Article reçu le 23 octobre 1992, accepté le 25 novembre 1992.

[1] Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires (C.N.E.V.A.-L.C.R.V.), 22 rue Pierre Curie, B.P. 67, 94703 Maisons-Alfort cedex.

[2] Fédération Nationale des Groupements de Défense Sanitaire du Bétail (F.N.G.D.S.B.), 149 rue de Bercy, 75595 Paris.

[3] Ministère de l'Agriculture, Direction Générale de l'Alimentation (D.G.Al.), 175 rue du Chevaleret, 75013 Paris.

[4] Centre National d'Information et d'Economie Laitières (C.N.I.E.L.), 27 rue de la Procession, 75015 Paris.

I - INTRODUCTION

L'épreuve de l'anneau ou Ring-test (R.T.) est utilisée depuis longtemps pour le dépistage de la brucellose bovine; mais cette méthode analytique n'est réglementairement imposée pour le dépistage primaire de la brucellose de l'ensemble des cheptels laitiers que depuis 1990 : les laits de mélange de chaque cheptel sont testés régulièrement par R.T.. En cas de résultat positif à un de ces contrôles, la qualification du cheptel est suspendue et un nouveau R.T. est pratiqué sous 15 jours. S'il s'avère à nouveau positif, les animaux sont contrôlés individuellement par des épreuves sur sérum (épreuve à l'antigène tamponné (E.A.T.), fixation du complément (F.C.)) ; sinon le cheptel recouvre sa qualification.

Au début de l'année 1991, des doutes ont été émis sur la validité de cette méthode de dépistage, par les laboratoires chargés de ces analyses ainsi que par les directions départementales des services vétérinaires (D.S.V.) : dans plusieurs départements, le nombre de cheptels dépistés grâce au R.T. apparaissait excessif, eu égard à la situation épidémiologique de la brucellose.

Deux études complémentaires ont été menées :

- Un essai inter-laboratoires sur les procédures techniques de réalisation de l'épreuve de l'anneau, mené en collaboration avec cinq laboratoires interprofessionnels d'analyse laitières (L.I.A.L.).
- Une enquête menée auprès des L.I.A.L., des laboratoires vétérinaires départementaux (L.V.D.) et des D.S.V., afin de cerner l'importance et la nature du problème observé.

C'est cette dernière étude que nous présentons ici. Elle confirme l'existence du problème soulevé par les acteurs de terrain et suggère quelques explications possibles au phénomène constaté.

II - MATERIEL ET METHODE

1. OBJECTIFS

L'étude avait pour objectif de chiffrer les résultats du dépistage de la brucellose bovine par l'épreuve de l'anneau, sur l'ensemble du territoire français et pour une période de 6 mois.

Un questionnaire, élaboré par un groupe de travail animé par la D.G.A.I. a été adressé aux laboratoires d'analyse concernés au début de l'année 1992. Les questionnaires renseignés ont été reçus au cours du premier trimestre de 1992.

2. PROTOCOLE

2.1. Organisation de l'enquête

Les informations relatives au dépistage de la brucellose par R.T. sont partagées sur le terrain par deux types d'organismes :

- Le laboratoire d'analyse détient les données relatives au protocole technique d'analyse, ainsi que les résultats des R.T.. La zone d'activité d'un laboratoire recouvre dans la majorité des cas plusieurs départements.
- La D.S.V. stocke, pour son département, les informations relatives aux contrôles sérologiques des animaux. Le suivi par R.T. des cheptels laitiers d'un département donné peut naturellement concerner plusieurs laboratoires d'analyse.

Pour obtenir une image complète de la situation du dépistage de la brucellose par R.T., il était donc nécessaire de faire collaborer D.S.V. et laboratoires d'analyse.

Les problèmes rencontrés sur le terrain focalisaient les suspicions sur la méthode analytique (le R.T.) et sur sa pertinence pour le dépistage de la brucellose. C'est pourquoi ce sont les laboratoires d'analyse qui ont été choisis pour centraliser les informations.

En pratique : les questionnaires ont été adressés à l'ensemble des laboratoires d'analyse agréés pour le dépistage de la brucellose bovine sur le lait (L.I.A.L. et certains L.V.D.) ; soit en tout 33 laboratoires. Chacun d'eux devait remplir une partie du questionnaire et se chargeait ensuite de dupliquer le reste pour le faire parvenir aux D.S.V. concernées. Il devait enfin rassembler les réponses des D.S.V. et les totaliser pour ne retourner qu'un seul questionnaire complètement renseigné.

2.2. Informations recueillies

On s'est intéressé dans cette étude aux données de dépistage de la période allant du 1er juin 1991 au 30 novembre 1991, soit une durée de 6 mois. Il s'agit donc d'une étude d'observation rétrospective.

Les informations recueillies étaient regroupées en cinq grandes sections détaillées ci-dessous :

SECTION I. DESCRIPTIF DU LABORATOIRE *

Les questions portaient sur l'identification du laboratoire et sur son activité en matière de R.T. (départements d'origine des cheptels contrôlés et, pour chaque département, nombre de cheptels correspondant).

SECTION II. LA METHODE ANALYTIQUE *

Les questions posées concernaient le protocole analytique (volume de lait, d'antigène, modalités d'incubation et de lecture). La date depuis laquelle le laboratoire utilisait le protocole décrit était également demandée.

SECTION III. LES RESULTATS OBSERVES AU COURS DE LA PERIODE ETUDIEE :

On a cherché à décrire, grâce au questionnaire, l'ensemble du processus de dépistage, des R.T. aux contrôles sérologiques.

* Informations fournies par les laboratoires d'analyses.

- Résultats des R.T. * :

Deux types de R.T. sont pratiqués dans les laboratoires d'analyse : des R.T. "de routine" à intervalles réguliers (il était demandé aux laboratoires d'analyse de ne prendre en compte qu'un seul R.T. par cheptel et par mois) ; et des R.T. de contrôle pratiqués dans les 15 jours suivant la survenue d'un R.T. positif sur le lait du cheptel concerné.

R.T. de routine

Chaque cheptel devait avoir subi 6 R.T. pendant la période d'étude (un par mois). On s'est intéressé :

- au nombre total de R.T. pratiqués
- au nombre de R.T. régulièrement négatifs sur les 6 mois
- aux R.T. positifs :

afin d'étudier la répétition de résultats de R.T. de routine positifs pour un même cheptel, ces résultats positifs étaient divisés en 5 catégories :

- . nombre de R.T. positifs pour 1 seul mois
- . nombre de R.T. positifs 2 mois non consécutifs
- . nombre de R.T. positifs 2 mois consécutifs
- . nombre de R.T. positifs 3 mois ou plus, non consécutifs
- . nombre de R.T. positifs 3 mois ou plus, consécutifs.

R.T. de contrôle

Etaient demandés le nombre total de R.T. de contrôle pratiqués et, parmi eux, le nombre de résultats négatifs (négativisation du R.T. de routine positif).

- Résultats des contrôles sérologiques **

On s'est intéressé à deux types de contrôles sérologiques : les contrôles sérologiques motivés par des R.T. positifs, et les contrôles sérologiques effectués sur des cheptels négatifs en R.T..

- Les contrôles sérologiques des cheptels positifs en R.T. :
Toujours dans l'optique d'étudier la répétition de R.T. positifs pour un même cheptel, les informations relatives à ces contrôles étaient recueillies pour chacune des catégories ci-dessus.

Etaient demandés, par catégorie, le nombre total de contrôles effectués, et le nombre de contrôles positifs (on appellera "cheptel positif en sérologie" un cheptel dont un animal au moins a été trouvé positif en sérologie en E.A.T. ou en F.C.).

- Les contrôles sérologiques effectués sur des cheptels négatifs en R.T. :
On s'est intéressé aux contrôles effectués sur des cheptels régulièrement négatifs en R.T. pendant la période d'étude. Etaient demandés le nombre de tels contrôles et, parmi eux, le nombre de contrôles positifs. Le fait que ces contrôles avaient porté sur tout ou partie des cheptels concernés n'était pas demandé.

* Informations fournies par les laboratoires d'analyses

** Informations fournies par les D.S.V.

SECTION IV. RELATION ENTRE R.T. POSITIF ET TAILLE DE L'ELEVAGE*

On a regroupé les cheptels en quatre classes de quotas laitiers annuels (< 60 000 l/an ; de 60 000 l/an à 100 000 l/an ; de 100 000 l/an à 200 000 l/an et > 200 000 l/an). Pour chacune d'elles, étaient demandés le nombre de cheptels contrôlés correspondant et, parmi eux, le nombre de cheptels ayant présenté au moins un R.T. positif pendant la période d'étude.

SECTION V. DEGRE DE SATISFACTION DU LABORATOIRE VIS-A-VIS DE LA METHODE ANALYTIQUE ET COMMENTAIRES*

2.3. Analyse des données

Elle a été réalisée grâce au logiciel EPI-INFO version 5⁽¹⁾, sur un micro-ordinateur compatible PC.

- *Contrôles de cohérence et pré-traitements des informations reçues*

Les questionnaires reçus ont été contrôlés un à un pour détecter des incohérences. Celles-ci concernaient principalement la section III et 11 laboratoires ont dû être exclus du dépouillement pour cette partie du questionnaire.

Les 22 laboratoires restants avaient interprété de façons variées les questions relatives aux résultats des R.T. de routine. Aussi, nous avons dû recalculer la plupart des réponses à ces questions, afin d'obtenir un corpus de questionnaires cohérent.

Pour ces mêmes questions, enfin, il avait été demandé aux laboratoires, de répondre par des nombres de résultats d'examen. Or, pour faire le lien avec les contrôles sérologiques, l'unité statistique pertinente était le cheptel. Aussi, à partir de chacune de ces réponses exprimées en R.T., nous avons calculé le nombre de cheptels correspondant : par exemple, le nombre fourni par un laboratoire en réponse à la question "Nombre total de R.T. mensuels pratiqués (pendant les 6 derniers mois)" correspondait à un nombre de résultats d'examen. Chaque cheptel ayant en principe fait l'objet de 6 R.T. pendant la période d'étude, cette réponse a été divisée par 6 pour obtenir le nombre de cheptels correspondant.

- *Etude descriptive*

Elle a porté sur la méthode analytique, les résultats observés au cours de la période d'étude, la relation entre R.T. positif et taille de l'élevage, et le degré de satisfaction des laboratoires vis à vis de la méthode analytique.

- *Comparaison de deux groupes de laboratoires distingués par le pourcentage global de R.T. de routine positifs obtenus pendant la période étudiée*

L'étude descriptive a rapidement fait apparaître l'existence de deux groupes de laboratoires : ceux qui ont obtenu "peu" de résultats positifs au R.T. pendant la période d'étude et ceux qui en ont obtenu "beaucoup" (le seuil a été fixé arbitrairement à 3 % de R.T. positifs).

Afin d'objectiver cette dichotomie et pour comparer ces deux groupes, nous avons refait une partie de l'étude descriptive (résultats des R.T. et résultats des contrôles sérologiques) pour chacun d'entre eux.

* Informations fournies par les laboratoires d'analyses.

III - RESULTATS

1. ETUDE DESCRIPTIVE

1.1. La méthode analytique

- *les protocoles analytiques utilisés (tableau I)*

31 laboratoires sur 33 ont répondu à cette partie du questionnaire. Près des deux tiers d'entre eux (20 sur 31) utilisaient l'un des deux protocoles suivants :

- Le protocole préconisé par le laboratoire de référence, le plus largement utilisé (13 laboratoires sur 31 réponses) : 2 ml de lait, 50 µl d'antigène, lecture après 1 heure à 37° C puis 18-20 heures à 4° C. Il sera noté par la suite "2-50-A".
- Une miniaturisation de ce protocole (7 laboratoires sur 31 réponses) : 1 ml de lait, 25 µl d'antigène, modalités de lecture identiques. Il sera noté par la suite "1-25-A".

Les 11 réponses restantes se partageaient entre 8 protocoles différents.

Tableau I : Les protocoles analytiques utilisés

Volume (1) de lait	Volume (2) d'antigène	Modalités d'incubation et de lecture (3)	Nombre de laboratoires	Pourcentage de laboratoires
2	50	A	13	39 %
1	25	A	7	21 %
2	50	C	4	12 %
2	50	B	1	3 %
2	1	A	1	3 %
1	25	B	1	3 %
1	25	C	1	3 %
1	50	B	1	3 %
1	50	D	1	3 %
1	0,25	B	1	3 %
NR(4)	NR(4)	NR(4)	2	6 %
			33	100 %

(1) Exprimé en ml

(2) Exprimé en µl

(3) A : 1 h à 37° C puis 18-20 h à 4° C

B : 1 h à 37° C

C : 18-20 h à 4° C

D : 18-20 h à température ambiante

(4) NR : Non Réponse

- *l'expérience qu'a le laboratoire du protocole qu'il utilise*

27 laboratoires sur 33 ont répondu à cette question. Pour les deux tiers d'entre eux (18 sur 27), le protocole utilisé ne l'était que depuis moins d'un an.

1.2. Les résultats des R.T. pendant la période d'étude

11 laboratoires ont été exclus du dépouillement de cette partie du questionnaire. Les principaux motifs d'exclusion étaient les suivants : les R.T. de routine n'étaient pas mensuels ; le laboratoire ne faisait pas de R.T. ; ou les questions n'étaient renseignées que partiellement ou pas du tout.

Seules les réponses de 22 laboratoires sont donc prises en compte ici.

1.2.1. Les R.T. mensuels de routine (tableau II)

Globalement 1.9 % (15 547 sur 806 317) des R.T. de routine pratiqués pendant la période étudiée ont été trouvés positifs. Ils correspondent à 6,5 % (8 516 sur 130 800) des cheptels soumis au contrôle (on appellera "cheptels positifs en R.T." les cheptels qui ont présenté au moins un R.T. de routine positif pendant la période étudiée).

Tableau II : Résultats des R.T. de routine pendant la période étudiée (1)

Pourcentage de R.T. positifs	15.547 sur 806.317 (1,9 %)	
Pourcentage de cheptels positifs (2)	8.516 sur 130.800 (6,5 %)	
Répétition de R.T. positifs : parmi les cheptels positifs, pourcentage de cheptels ayant présenté :		
1 R.T. positif isolé	4.762	(55,9 %)
2 R.T. positifs non successifs	882	(10,4 %)
2 R.T. positifs successifs	1.176	(13,8 %)
3 (ou plus) R.T. positifs non successifs	635	(7,5 %)
3 (ou plus) R.T. positifs successifs	1.061	(12,4 %)
TOTAL	8.516	(100 %)

(1) On ne comptabilise qu'un seul examen par cheptel et par mois.

(2) Par cheptel positif on entend : cheptel ayant présenté au moins un R.T. mensuel positif pendant la période d'étude.

La majorité de ces cheptels positifs en R.T. n'ont présenté qu'un seul examen positif isolé pendant la période d'étude (4 762 sur 8 516, soit 55,9 % des cheptels positifs en R.T.).

Le pourcentage de R.T. de routine positifs est cependant apparu très variable selon les laboratoires : si on s'intéresse à la distribution des laboratoires selon la pourcentage de R.T. de routine positifs (voir tableau III et figure 1), on constate qu'un seuil arbitraire de 3 % d'examen positifs permet de séparer deux groupes de laboratoires :

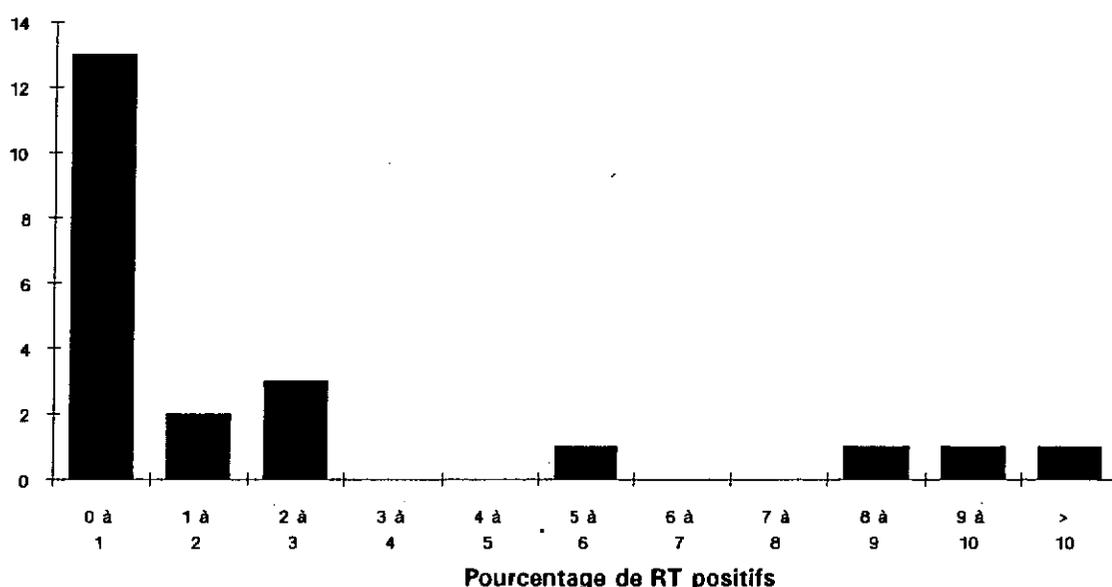
- La majorité d'entre eux (18 sur 22) qui ont obtenu "peu" de résultats positifs (moins de 3 % des R.T. de routine)
- Une minorité (4 laboratoires sur 22) qui ont obtenu plus de 3 % de résultats positifs (entre 6 % et 30 %). Ces 4 laboratoires ont réalisé 5 % des R.T. de routine qui ont été pratiqués, mais ont totalisé à eux seuls plus de la moitié (54,6 %) des résultats positifs.

Enfin, il est à noter que la majorité des laboratoires (13 sur 22) ont obtenu moins de 1 % de résultats d'analyse positifs.

Tableau III : Distribution des laboratoires selon le pourcentage de R.T. de routine trouvés positifs pendant la période d'étude

Pourcentage de R.T. positifs	Nombre de laboratoires	Pourcentage de laboratoires
0 à 1 %	13	59 %
1 à 2 %	2	9 %
2 à 3 %	3	14 %
3 à 4 %	0	
4 à 5 %	0	
5 à 6 %	1	5 %
6 à 7 %	0	
7 à 8 %	0	
8 à 9 %	1	5 %
9 à 10 %	1	5 %
Plus de 10 %	1	5 %
	22	100 %

Figure 1 : Distribution des laboratoires selon le pourcentage de R.T. positifs.



1.2.2. Les R.T. de contrôle (tableau IV)

Seuls 11 laboratoires sur 33 ont répondu à cette partie du questionnaire. Pour ces laboratoires, la majorité du R.T. de contrôle ont contredit le résultat positif du R.T. de routine (négativation dans 54,3 % des cas).

1.3. Les contrôles sérologiques

Les 22 réponses retenues pour l'analyse des résultats des R.T. de routine ont été utilisées pour le dépouillement de cette partie du questionnaire.

Tableau IV : Les R.T. de contrôle, pratiqués dans les 15 jours suivant la survenue d'un résultat positif

Concordance entre le premier et le second R.T.	408 sur 1.046 (45,7 %)
Discordance entre le premier et le second R.T.	568 sur 1.046 (54,3 %)

1.3.1. Les contrôles sérologiques des cheptels positifs en R.T.

- Existence d'un contrôle sérologique : celui-ci a été effectué pour 20,4 % (1.737 sur 8 516) des cheptels trouvés positifs en R.T.. Ce pourcentage est variable selon le nombre de R.T. de routine positifs qu'ont pu présenter les cheptels : le maximum de contrôles est atteint pour les cheptels qui ont présenté 2 R.T. de routine positifs successivement (49,7 % de ces cheptels ont été contrôlés) (tableau Va).

Tableau Va : Les contrôles sérologiques des cheptels positifs en R.T. : Existence d'un contrôle sérologique

Pourcentage de cheptels contrôlés parmi les cheptels positifs en R.T.	1.737 sur 8.516 (20,4 %)
Pourcentage de cheptels contrôlés parmi les cheptels ayant présenté :	
1 R.T. positif isolé	758 sur 4.762 (16,8 %)
2 R.T. positifs non successifs	86 sur 882 (9,8 %)
2 R.T. positifs successifs	585 sur 1.176 (49,7 %)
3 (ou plus) R.T. positifs non successifs	69 sur 635 (10,9 %)
3 (ou plus) R.T. positifs successifs	199 sur 1.061 (18,8 %)

- Résultats de contrôles : 10,5 % (183 sur 1.737) des cheptels contrôlés (qui sont des cheptels positifs en R.T.) ont été trouvés positifs en sérologie. Ce pourcentage varie peu avec le nombre de R.T. de routine positif qu'ont pu présenter ces cheptels. L'optimum est atteint pour les cheptels qui ont présenté 2 R.T. de routine positifs successivement : 12,5 % (73 sur 585) d'entre eux sont trouvés positifs en sérologie, (tableau Vb).

Tableau Vb : Les contrôles sérologiques des cheptels positif en R.T. : Résultats des contrôles

Pourcentage de cheptels positifs en sérologie parmi les cheptels recontrôlés	183 sur 1.737 (10,5 %)
Pourcentage de cheptels positifs en sérologie parmi les cheptels recontrôlés ayant présenté :	
1 R.T. positif isolé	79 sur 798 (9,9 %)
2 R.T. positifs non successifs	5 sur 86 (5,8 %)
2 R.T. positifs successifs	73 sur 585 (12,5 %)
3 (ou plus) R.T. positifs non successifs	6 sur 69 (8,7 %)
3 (ou plus) R.T. positifs successifs	20 sur 199 (10,1 %)

1.3.2. Les contrôles sérologiques des cheptels négatifs en R.T.

16 % des cheptels négatifs en R.T. ont été également contrôlés en sérologie (19.577 sur 122.284) ; 0,5 % (91 sur 19.577) d'entre eux ont été trouvés positifs (tableau VI).

Tableau VI : Les contrôles sérologiques effectués sur les cheptels trouvés négatifs en R.T. pendant la période d'étude

Pourcentage de cheptels négatifs en R.T. qui ont été contrôlés en sérologie	19.577 sur 122.284 (16 %)
Pourcentage de cheptels trouvés positifs en sérologie parmi les cheptels contrôlés	91 sur 19.577 (0,5 %)

1.4. Relation entre R.T. positifs et taille de l'élevage

Seuls 7 laboratoires sur 33 ont renseigné complètement cette partie du questionnaire. Pour ceux-ci, le pourcentage de cheptels positifs en R.T. est apparu d'autant plus élevé que le quota laitier annuel était bas (tableau VII).

Tableau VII : Relation entre R.T. positif et taille de l'élevage

Quota laitier	Nombre de cheptels	Nombre de cheptels positifs en R.T.	Pourcentage de cheptels positifs en R.T.
Moins de 60.000 l/an	7.565	549	7,3 %
de 60.000 à 100.000 l/an	3.552	129	3,6 %
de 100.000 à 200.000 l/an	5.452	86	1,6 %
plus de 200.000 l/an	11.174	58	0,5 %
TOTAL	27.743	822	3,0 %

Par ailleurs, la majorité des cheptels positifs en R.T. avait un quota laitier annuel inférieur à 60.000 l, alors que cette tranche de quotas ne correspondait qu'au quart de l'ensemble des cheptels (figures 2a et 2b).

1.5. Degré de satisfaction des laboratoires vis-à-vis de la méthode analytique et commentaires

La majorité des laboratoires qui ont répondu à la question correspondante du questionnaire se sont déclarés mécontents de la méthode analytique qu'ils utilisent (14 laboratoires sur 23). Seuls 7 laboratoires sur 23 s'en sont déclarés satisfaits. 2 laboratoires avaient enfin une opinion mitigée (réponses : "oui et non"). Cette majorité d'insatisfaits se retrouve quelle que soit la méthode analytique utilisée.

Figure 2a : Relation entre R.T. positifs et taille de l'élevage : Répartition des cheptels selon le quota laitier (exprimé en l/an).

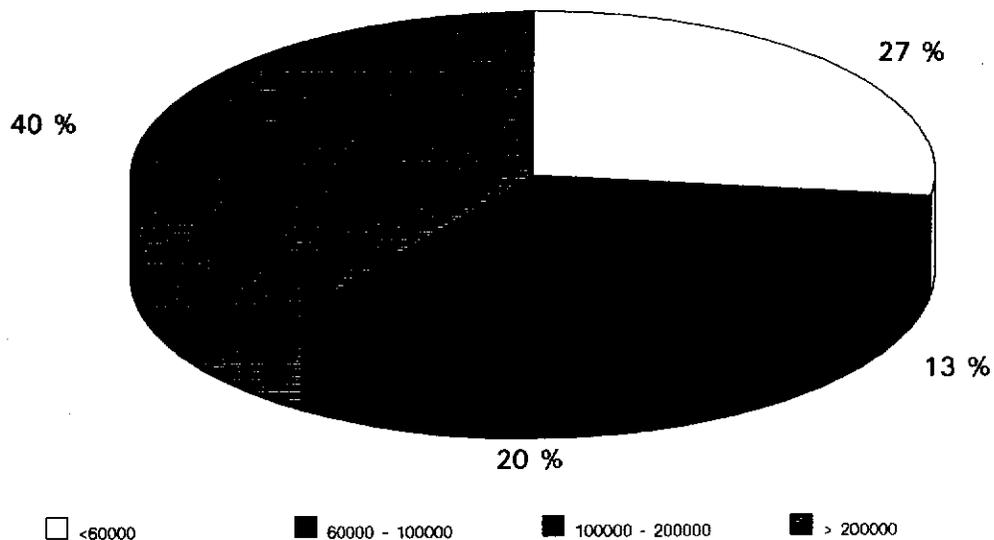
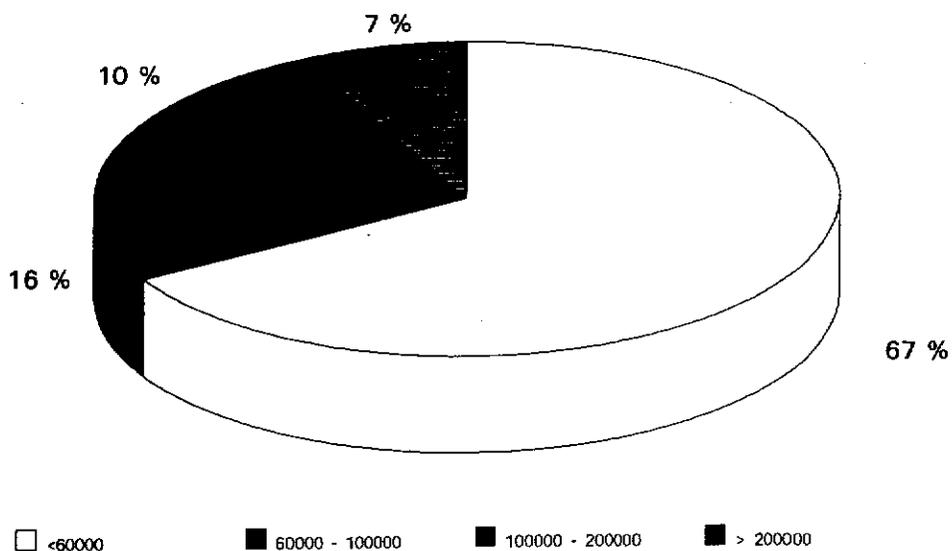


Figure 2b : Relation entre R.T. positifs et taille de l'élevage : Répartition des cheptels positifs en R.T. selon le quota laitier (exprimé en l/an).



Les reproches formulés par les laboratoires portaient sur :

- la valeur prédictive positive, jugée trop faible (16 réponses) : "trop sensible", "mauvaise spécificité au seuil de sensibilité demandé", trop de faux positifs".

Etaient incriminés :

- les modalités d'incubation et de lecture des R.T. (6 réponses) : "trop de douteux", "trop de positifs-limite", "images troublantes", "la lecture des différences de couleur n'est pas évidente (...) il y a en réalité 4 ou 5 zones (...)".
- le passage à + 4° C, lors de l'incubation (4 réponses).

QUELQUES COMMENTAIRES ONT ETE FORMULES :

- insuffisance de formation : "les laits vus pendant le stage sont différents de ceux qui sont traités sur le terrain (2 réponses)". Les stages dont il est question sont les stages organisés par le laboratoire de référence.
- discrédite le laboratoire, la méthode de dépistage, surcharge la D.S.V. (2 réponses).
- un point positif : "facile à réaliser, peu onéreux" (1 réponse).
- une suggestion : "mettre au point une technique de confirmation sur lait des résultats douteux" (1 réponse).

2. COMPARAISON DE DEUX GROUPES DE LABORATOIRES DISTINGUES PAR LE POURCENTAGE DE R.T. DE ROUTINE POSITIFS OBTENUS PENDANT LA PERIODE D'ETUDE

Parmi les 22 laboratoires retenus pour le dépouillement des résultats des R.T. de routine, nous avons formé deux groupes de laboratoires : ceux qui ont obtenu moins de 3 % des R.T. de routine positifs pendant la période d'étude (groupe 1 : 18 laboratoires), et ceux qui en ont obtenu plus de 3 % (groupe 2 : 4 laboratoires).

Nous avons ainsi pu comparer ces deux groupes selon deux ensembles d'indicateurs :

- les résultats des R.T. mensuels de routine
- les contrôles sérologiques.

2.1. Les résultats des R.T. mensuels de routine (tableau VIII)

Le pourcentage de R.T. mensuels de routine trouvés positifs, ainsi que le pourcentage de cheptels trouvés positifs en R.T. ont été beaucoup plus élevés pour le groupe 2 que pour le groupe 1 (52,2 % vs 4,1 %).

Pour le groupe 1, près des trois-quarts des cheptels trouvés positifs en R.T. n'ont présenté qu'un seul examen positif pendant la durée de l'étude. La répartition des cheptels positifs en R.T. en fonction de la répétition des résultats positifs est beaucoup plus uniforme pour le groupe 2.

Tableau VIII : Comparaison de deux groupes de laboratoires :
ceux qui ont obtenu moins de 3 % de R.T. positifs et ceux
qui ont obtenu plus de 3 % de R.T. positifs
Résultats des R.T. de routine pendant la période étudiée

	Laboratoires ayant obtenu < 3 % pos.	Laboratoires ayant obtenu > 3 % R.T. pos.
Pourcentage de R.T. de routine positifs	7.068 sur 767.716 (0,9 %)	8.479 sur 38.533 (22,0 %)
Pourcentage de cheptels positifs	5.043 sur 124.179 (4,1 %)	3 473 sur 6.621 (52,5 %)
Répétition de R.T. positifs : parmi les cheptels positifs, pourcentage de cheptels ayant présenté :		
1 R.T. positif isolé	3.643 (72,2 %)	1.119 (32,2 %)
2 R.T. positifs non successifs	342 (6,8 %)	540 (15,5 %)
2 R.T. positifs successifs	679 (13,5 %)	497 (14,3 %)
3 R.T. (ou plus) positifs non successifs	152 (3,0 %)	483 (13,9 %)
3 R.T. (ou plus) positifs successifs	227 (4,5 %)	834 (24,0 %)
TOTAL	5.043 (100 %)	3.473 (100 %)

2.2. Les contrôles sérologiques

2.2.1. Les contrôles sérologiques des cheptels positifs en R.T.

- Existence d'un contrôle sérologique : le taux de contrôle sérologique des cheptels positifs en R.T. a été plus de deux fois plus élevé pour le groupe 1 que pour le groupe 2 (26,2 % contre 12,0 %). Pour le groupe 1, ces contrôles ont concerné principalement les cheptels ayant présenté 2, 3 ou plus de 3 R.T. positifs consécutifs. Pour le groupe 2, ils concernaient surtout les cheptels ayant présenté 2 R.T. positifs consécutifs (tableau IXa).

Tableau IXa : Comparaison de deux groupes de laboratoires.
Les contrôles sérologiques des cheptels positifs en R.T. :
existence d'un contrôle sérologique

	Laboratoires ayant obtenu < 3 % R.T. pos	Laboratoires ayant obtenu > 3 % pos
Pourcentage de cheptels contrôlés parmi les cheptels positifs en R.T.	1.321 sur 5.043 (26,2 %)	416 sur 3.473 (12,0 %)
Pourcentage de cheptels contrôlés parmi les cheptels ayant présenté :		
1 R.T. positif isolé	720 sur 3.643 (19,8 %)	78 sur 1.119 (7 %)
2 R.T. positifs non successifs	80 sur 342 (23,4 %)	6 sur 540 (1,1 %)
2 R.T. positifs successifs	344 sur 679 (50,7 %)	241 sur 497 (48,5 %)
3 R.T. (ou plus) positifs non successifs	61 sur 152 (40,1 %)	8 sur 483 (1,7 %)
3 R.T. (ou plus) positifs successifs	116 sur 227 (51,1 %)	83 sur 834 (10,0 %)

- Résultats des contrôles : le pourcentage de cheptels trouvés positifs en sérologie parmi les cheptels contrôlés est beaucoup plus élevé dans le groupe 1 que dans le groupe 2 (13,2 % contre 1,9 %). Plus précisément, près de 20 % des cheptels qui avaient présenté 2, 3 ou plus de 3 R.T. positifs successivement, et qui avaient été contrôlés, ont été trouvés positifs en sérologie (tableau IXb).

Tableau IXb : Comparaison de deux groupes de laboratoires.
Les contrôles sérologiques des cheptels positifs en R.T. :
résultats des contrôles

	Laboratoires ayant obtenu < 3 % R.T. pos.	Laboratoires ayant obtenu > 3 % pos.
Pourcentage de cheptels positifs en sérologie parmi les cheptels recontrôlés.	175 sur 1.321 (13,2 %)	8 sur 416 (1,9 %)
Pourcentage de cheptels positifs en sérologie parmi les cheptels ayant présenté :		
1 R.T. positif isolé	76 sur 720 (10,6 %)	3 sur 78 (4 %)
2 R.T. positifs non successifs	5 sur 80 (6,3 %)	0 sur 6 (0 %)
2 R.T. positifs successifs	68 sur 344 (19,8 %)	5 sur 241 (2 %)
3 R.T. (ou plus) positifs non successifs	6 sur 61 (9,8%)	0 sur 8 (0 %)
3 R.T. (ou plus) positifs successifs	20 sur 116 (17,2 %)	0 sur 83 (0 %)

2.2.2. Les contrôles sérologiques des cheptels négatifs en R.T. (tableau X)

Tableau X : Comparaison de deux groupes de laboratoires :
les contrôles sérologiques effectués sur les cheptels
trouvés négatifs en R.T. pendant la période d'étude

	Laboratoires ayant obtenu < 3 % R.T. pos.	Laboratoires ayant obtenu > 3 % R.T. pos.
Pourcentage de cheptels négatifs en R.T. qui ont été contrôlés en sérologie	18.901 sur 119.136 (15,9 %)	676 sur 3.148 (21,5 %)
Pourcentage de cheptels trouvés positifs en sérologie parmi les cheptels contrôlés	77 sur 18.901 (0,4 %)	14 sur 676 (2,1 %)

Le pourcentage de cheptels négatifs en R.T. qui ont également été trouvés négatifs en sérologie est un peu plus élevé pour le groupe 1 que pour le groupe 2 (99,6 % contre 97,9 %).

IV - DISCUSSION

1. MATERIEL ET METHODE

1.1. Organisation de l'enquête

D'après le protocole, chaque laboratoire devait collaborer avec plusieurs D.S.V. afin de collecter les données relatives aux contrôles sérologiques effectués sur les cheptels qu'il suivait en R.T.. Le laboratoire devait ensuite totaliser les réponses des D.S.V. et ne renvoyer qu'un questionnaire totalement renseigné.

Dans la pratique, ce schéma n'a fonctionné correctement que pour 14 laboratoires sur 33. Pour 16 laboratoires, certaines D.S.V. n'ont pas pris part à l'étude ; la D.S.V. du département où est implanté le laboratoire a cependant toujours collaboré avec ce dernier. Les 3 laboratoires restants ont rendu un questionnaire incomplet et il a été impossible de savoir quelles D.S.V. avaient ou n'avaient pas collaboré.

Enfin, il est à noter que certaines D.S.V., jugeant les informations demandées confidentielles, ont préféré renvoyer leur questionnaire directement.

La collaboration entre laboratoires et D.S.V. a donc été difficile (hormis à l'intérieur d'un même département). L'enquête avait pour objet le suivi de cheptels ; il aurait donc peut-être été plus logique de centrer, localement, le circuit d'information sur les D.S.V..

1.2. Le questionnaire

Les questions relatives aux résultats des R.T. de routine pendant la période d'étude se sont révélées (malheureusement a posteriori) ambiguës, et une lecture rapide des réponses reçues a montré que les laboratoires les avaient interprétées de façons variées.

L'ambiguïté principale portait sur l'unité statistique à décompter : les questions pouvaient être interprétées comme portant sur un nombre de R.T. (c'était leur objectif) ou comme portant sur un nombre de cheptels (c'est-à-dire un nombre de séries de 6 examens de routine mensuels).

Pour pouvoir exploiter les réponses des laboratoires, nous avons défini un ensemble de critères permettant de classer ces réponses selon l'interprétation des questions. Nous avons ensuite recalculé ces réponses pour obtenir un ensemble de données cohérent sur le plan des unités statistiques décomptées.

En ce qui concerne les résultats des R.T. de routine, la validité des résultats présentés ici dépend donc directement de la validité de ces pré-traitements que nous avons effectués. Il importe donc d'interpréter ces chiffres avec précaution.

2. RESULTATS

2.1. La méthode analytique

Près des deux tiers des laboratoires utilisaient soit le protocole préconisé par le laboratoire de référence, (2-50-A), soit une miniaturisation de ce protocole (1-25-A) permettant d'automatiser les analyses. Ce pourcentage reste faible, compte tenu du fait que ce protocole est préconisé depuis 1987 par le laboratoire de référence. Cependant, ce dernier organise depuis 1990 des stages d'agrément des laboratoires utilisateurs de la

technique et on peut espérer que celle-ci va progressivement s'imposer par ce biais. Le fait que ces stages ne soient organisés que depuis peu, peut également expliquer que la majorité des laboratoires n'avaient que peu d'expérience du protocole utilisé.

2.2. Les résultats des R.T.

Le chiffre global de 6,5 % de cheptels trouvés positifs en R.T. sur les 6 mois étudiés apparaît nettement trop élevé, comparativement à la prévalence de la brucellose (que l'on peut majorer par le chiffre de l'année 1991, tous cheptels bovins confondus : 0,52 % [5]). Le problème soulevé par les acteurs de terrain et qui motive cette étude est donc bien réel.

Deux groupes de laboratoires apparaissent clairement : le groupe 1 (moins de 3 % de R.T. de routine positifs) et le groupe 2 (plus de 3 % de R.T. de routine positifs). Le groupe 1 a trouvé 4,1 % des cheptels qu'il contrôle positifs en R.T. : bien qu'inférieur au chiffre global, ce résultat demeure excessif. Le groupe 2 en a trouvé 52,5 % : c'est énorme.

Les cheptels trouvés positifs n'ont présenté, dans la plupart des cas qu'un seul R.T. de routine positif durant les 6 mois étudiés. C'est particulièrement net pour le groupe 1 ; beaucoup moins pour le groupe 2. Pour ce dernier, la répartition des cheptels en fonction de la répétition des R.T. de routine positifs est assez uniforme.

Cette uniformité peut être expliquée, en termes probabilistes, par une augmentation de la probabilité, pour un R.T. isolé, d'être positif. Une cause possible de cette augmentation sera avancée plus loin.

Par "cheptel positif en R.T." on entend ici : cheptel ayant présenté au moins un R.T. positif pendant l'étude. L'intérêt de plutôt prendre en compte la répétition de résultats positifs a été soulignée par plusieurs auteurs [2, 6]. De fait, si on change ce critère de positivité en ne considérant plus comme positifs que les cheptels ayant présenté 2 R.T. ou plus positifs successivement pendant la période d'étude, on obtient un pourcentage de "cheptels positifs en R.T." plus en accord avec la situation épidémiologique de la brucellose : 1,70 % pour l'ensemble des laboratoires et 0,74 % pour le groupe 1 (ce dernier chiffre est proche de notre estimation de la prévalence de la brucellose : 0,52 %).

Ce nouveau critère de positivité (2 R.T. mensuels de routine ou plus positifs successivement) est en fait assez proche du critère de positivité officiel puisque, réglementairement, seuls les cheptels ayant présenté 2 R.T. positifs à 15 jours d'affilée devraient être contrôlés en sérologie (quoique leur qualification soit suspendue dès le premier R.T. positif). Le faible nombre de réponses que nous avons reçues au sujet de ces R.T. de contrôle laisse à penser que leur utilisation ne s'est pas encore généralisée sur le terrain. Ils apparaissent pourtant tout à fait pertinents puisqu'on observe une négativation du résultat dans plus de la moitié des cas.

2.3. Les contrôles sérologiques

2.3.1. Les contrôles sérologiques des cheptels positifs en R.T.

- Existence des contrôles :

Le pourcentage global de cheptels positifs en R.T. qui sont contrôlés (1 cheptel sur 5) apparaît faible. On peut l'expliquer en partie par le fait que comme on l'a vu, certaines données issues de D.S.V. (relatives à des contrôles sérologiques) manquent, alors que les résultats en R.T. des cheptels correspondants ont été pris en compte. Si ces "trous" dans les données biaisent certainement ce chiffre (qui est donc sous-estimé), ils ne le font que peu. En effet, nous avons pu calculer que l'information relative au contrôle sérologique des cheptels positifs en R.T. ne manquait que pour 6,8 % d'entre eux. Ce

biais lié à l'étude n'explique donc pas à lui seul le faible taux de contrôles sérologiques : d'autres facteurs interviennent sous doute, parmi lesquels le manque de moyens des D.S.V. pour faire face à un nombre important de contrôles sérologiques, qui les amène probablement à sélectionner les cheptels à contrôler.

On constate en effet, en comparant les groupes 1 et 2, que plus il y a de cheptels à contrôler, plus le taux de contrôles est faible. On peut par ailleurs trouver une manifestation de la sélection, par les D.S.V., des cheptels à contrôler dans le fait que ces contrôles sont prioritairement ciblés sur les cheptels ayant présenté 2 R.T. positifs ou plus successivement.

- Résultats des contrôles :

Le pourcentage global de cheptels positifs en sérologie parmi les cheptels positifs en R.T. (10,5 %) apparaît bien faible. Il faut cependant noter d'emblée qu'il est classique [2] d'observer des animaux brucelliques positifs en R.T. et négatifs en sérologie : dans de rares cas, l'infection mammaire ne se traduit que par une synthèse locale d'anticorps : on a alors des animaux brucelliques dépistables par R.T., mais qui sont dépourvus d'anticorps circulants et sont donc négatifs aux épreuves sur sérum. Si l'on excepte ces cas, on peut considérer que ce chiffre est analogue à une valeur prédictive positive (V.P.P.) : un cheptel positif en R.T. a environ une chance sur dix d'être également positif en sérologie.

Cette valeur n'est que peu améliorée dans le groupe 1.

Là encore, ce résultat doit être relativisé par le critère de positivité choisi dans l'étude : si on ne considère plus comme positifs en R.T. que les cheptels ayant présenté au moins 2 R.T. de routine positifs d'affilée, le pourcentage de cheptels positifs au contrôle sérologique est presque doublé, et passe à près de 20 % pour le groupe 1.

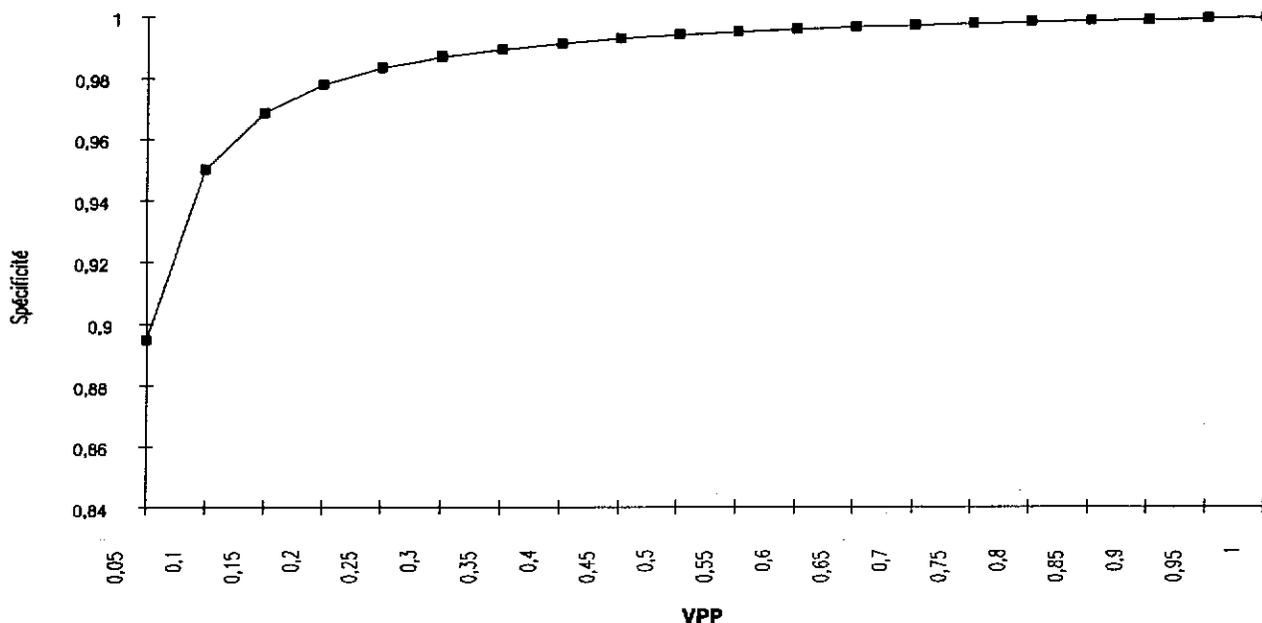
Par ailleurs, cette faible V.P.P. est étroitement liée à la faible prévalence de la brucellose : lorsque le taux d'infection d'une maladie devient très bas, les qualités diagnostiques d'un test de dépistage (et particulièrement sa spécificité) doivent être excellentes pour que sa V.P.P. reste correcte. Dans le cas qui nous intéresse, avec une prévalence de 0,52 %, la spécificité du test devrait être au moins égale à 99,48 % pour pouvoir obtenir une V.P.P. supérieure à 50 % (figure 3). En clair, pour qu'un cheptel positif en R.T. ait plus d'une chance sur deux d'être également positif en sérologie (et si l'on néglige les rares cas de brucellose mammaire sans anticorps circulants), il faut que ce test de dépistage ait une spécificité extrêmement élevée et de beaucoup supérieure aux valeurs obtenues par d'autres auteurs [3].

Enfin, ces résultats doivent être replacés dans le cadre plus général de la stratégie de lutte contre la brucellose : en l'état actuel de la réglementation, le R.T. appliqué aux laits de mélange a pour rôle de concentrer en cheptels brucelliques la population des cheptels recontrôlés en sérologie ; et ce en temps réel, mois après mois. Il remplit effectivement cette mission, puisque pour le groupe 1, le pourcentage de cheptels brucelliques au sein de ceux qui sont positifs en R.T. est 25 fois plus élevé que dans la population générale (on passe de 0,52 % à 13,2 %). Toujours pour le groupe 1, mais en changeant le critère de positivité des cheptels (2 R.T. successifs positifs au moins), le facteur multiplicatif est de 37 (on passe de 0,52 % à 19,5 %).

2.3.2. Les contrôles sérologiques des cheptels négatifs en R.T.

99,5 % des cheptels négatifs en R.T. sont trouvés également négatifs en sérologie. Ce chiffre est analogue à une valeur prédictive négative : un cheptel négatif en R.T. a 99,5 chances sur 100 d'être également négatif en sérologie.

Figure 3 : Spécificité minimale d'un test de dépistage permettant d'obtenir une V.P.P. donnée (prévalence : 0,55 %)



2.4. La relation entre R.T. positifs et taille de l'élevage

Le peu de réponses que nous avons reçues sur ce sujet impose d'interpréter les résultats avec précautions, cependant une relation apparaît : le pourcentage de cheptels trouvés positifs au R.T. est d'autant plus élevé que la taille des cheptels est faible. Outre le simple effet de dilution des laits positifs dans le mélange [4], cette relation peut être expliquée de la façon suivante : les réactions faussement positives en R.T. sont souvent imputées à la présence de colostrum ou de lait de mammite dans le mélange. Pour les petits mélanges, ces laits "pèsent plus lourd" parce qu'ils sont moins dilués. Il est alors logique d'observer plus de réactions faussement positives.

Ce phénomène pourrait également expliquer en partie le très fort pourcentage de cheptels positifs en R.T. dans le groupe 2 : pour l'un des laboratoires (nous ne disposons pas de l'information pour les autres), les laits contrôlés proviennent à 80 % de cheptels dont le quota laitier est inférieur à 60 000 l/an (ce chiffre est de 27 % pour l'ensemble des laboratoires) ; ils proviennent à 92 % de cheptels dont le quota laitier est inférieur à 100 000 l/an (ce chiffre est de 40 % pour l'ensemble des laboratoires). Enfin, la relation entre R.T. positifs et taille de l'élevage subsiste lorsqu'on supprime ce laboratoire de l'analyse. On peut donc expliquer les résultats de ce laboratoire du groupe 2 par le fait qu'il analyse des laits qui proviennent majoritairement de petits élevages.

V - CONCLUSION

Cette étude a permis de montrer que le problème soulevé au sujet du dépistage de la brucellose sur le lait est réel : le pourcentage de cheptels trouvés positifs en R.T. pendant les 6 mois de l'étude est très élevé, en regard de la prévalence de la maladie.

La plupart des cheptels trouvés positifs en R.T. semblent être de faux positifs, négatifs en sérologie. Cet état de faits risque, à la longue, comme le signalent certains laboratoires, de discréditer la méthode de dépistage de la brucellose ainsi que les laboratoires de diagnostic. En tout état de cause, il surcharge les D.S.V. en cheptels à contrôler en sérologie et, de fait, seul un faible pourcentage des cheptels positifs en R.T. est soumis à ces contrôles.

Le problème est surtout marqué pour les petits élevages, dont les laits de mélange diluent moins que les autres colostrum et laits de mammite, connus pour provoquer des réactions faussement positives. Il concerne par ailleurs surtout un groupe de 4 laboratoires, dont un au moins contrôle majoritairement des laits issus de petits élevages.

Outre ces facteurs, le problème apparaît surtout lié au critère de positivité des cheptels choisis : dans cette étude, étaient considérés comme positifs les cheptels ayant présenté au moins un R.T. positif. Or, dans la majorité des cas, un premier R.T. positif se négative à l'examen suivant et, de fait, les résultats du dépistage de la brucellose semblent nettement plus en accord avec la situation épidémiologique de la maladie si on ne considère plus comme positifs que les cheptels ayant présenté au moins deux résultats positifs successifs.

Ce critère de positivité est proche de celui qui a été fixé réglementairement (les contrôles sérologiques sont effectués sur les cheptels ayant présenté 2 R.T. positifs à moins de 15 jours d'écart), mais dont on peut penser qu'il n'est pas encore largement appliqué sur le terrain, au vu du peu d'informations que nous avons recueillies sur ce sujet.

En l'état actuel de la réglementation, le R.T. appliqué aux laits de mélange a pour rôle de concentrer en cheptels brucelliques la population des cheptels, avant qu'ils soient contrôlés en sérologie. On peut considérer qu'il remplit cette mission puisque le pourcentage de cheptels brucelliques parmi ceux qui sont positifs au R.T. (selon le second critère de positivité) est 37 fois plus élevé que dans la population générale.

Pour améliorer l'efficacité du dépistage de la brucellose sur laits de mélange, en plus d'un changement du critère de positivité au R.T. des cheptels, il faudrait, enfin, affiner sur le plan technique la méthode d'analyse pour en améliorer les qualités diagnostiques. Cependant, la faible prévalence de la maladie rend nécessaire un test à la sensibilité et à la spécificité extrêmement élevées, qui peut s'avérer lourd à développer, valider et standardiser.

VI - BIBLIOGRAPHIE

1. DEAN A.D., DEAN J.A., BURTON J.H., DICKER R.C. - Epi-Info version 5 : a word processing database and statistic program for epidemiology on micro-computers. CDC Atlanta, Atlanta, Georgia, USA, 1990. Trad. Française : ENSP.
2. GARIN-BASTUJI B. - Qualité des analyses sérologiques et adaptation de leur emploi à la situation épidémiologique de la brucellose bovine. *Epidémiol. Santé anim.*, 1990, 17, 78-84.
3. HUBER J.D., NICOLETTI P. - Comparison of the results of card, Rivanol, complement-fixation, and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, 47, 1529-1531.

4. ROEPKE M.H., STILES F.C. - Potential efficiency of mik ring test for detection of brucellosis. Am. J. Vet. Res., 1970, 31, 2145-2149.
5. ROGY C. - Brucellose bovine en France : Bilan de l'année 1991. Bulletin Epidémiologique Vétérinaire, Mai 1992, 2065.
6. SUTRA L., DUBRAY G. - Interprétation des discordances entre le ring-test et les épreuves sérologiques utilisés dans le dépistage de la brucellose bovine. Bull. Soc. Vét. Prat. de France, 1987, 71 (10), 565-577.

VII - REMERCIEMENTS

Nous remercions l'ensemble des personnes qui, dans les laboratoires d'analyses et dans les DSV, ont collaboré à cette étude.

*
* *