

UTILISATION COMPAREE DU SERUM, DU POUMON ET DU MUSCLE POUR LE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE CHEZ LES SANGLIERS*

Bruno Garin-Bastuji¹, Christiane Cau¹, Franck Boué²,
Marie-Eve Terrier² et Jean Hars³

RESUME : Les sérums récoltés sur des animaux tués à la chasse dans le cadre du programme national de surveillance sérologique du sanglier sauvage (peste porcine classique, maladie d'Aujeszky, brucellose, trichinellose) sont fréquemment de mauvaise qualité, et souvent inexploitable. L'objectif de cette étude était d'évaluer le remplacement du sérum par des exsudats de muscle ou de poumons, plus pratiques à réaliser et moins fragiles. Cet article présente les résultats obtenus en brucellose⁴. Dans l'épreuve à l'antigène tamponné et en fixation du complément, les résultats étaient soit ininterprétables soit très inférieurs à ceux du sérum. L'utilisation de l'ELISA indirect apparaît possible, en revanche, sur extraits pulmonaires et, surtout, musculaires. Ainsi, sur les 383 triples prélèvements testés, une sensibilité relative de 50% environ a été obtenue pour les muscles et de 40% environ pour les poumons. La spécificité relative était, dans tous les cas, satisfaisante ($\geq 98\%$).

Mots-clés : Brucellose, sangliers, sérologie, sérum, extraits musculaires, extraits pulmonaires.

SUMMARY : Sera sampled from hunted animals in the frame of the national programme of serological surveillance in wild boars (classical swine fever, Aujeszky's disease, brucellosis, trichinellosis) are generally of low quality giving frequently unexploitable results. The aim of this study was to assess the replacement of blood serum by muscle or lung extracts, more practical to sample and less fragile. This paper presents the results obtained in brucellosis⁵. In the Rose Bengal and complement fixation tests, results were either not interpretable or very low compared to serum. However, the use of indirect ELISA appears possible on lung extracts, and more, on muscle extracts. Hence, on 383 triple samples tested, the sensitivity (relative to the sera) was around 50% for muscles extracts and around 40% for lung extracts. The relative specificity was high in all cases ($\geq 98\%$).

Keywords : Brucellosis, wild boars, serology, serum, muscle extracts, lung extracts.



* Texte de la conférence présentée au cours de la journée AEEMA, 14 mai 2004

¹ AFSSA Alfort, Lerpaz, Unité Zoonoses Bactériennes, Laboratoire OIE/FAO de référence pour la brucellose, 23 avenue du Général-de-Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France

² AFSSA Nancy, Lerrpas, Unité Santé & Gestion de la Faune Sauvage, Domaine de Pixérécourt, BP 9, 54220 Malzéville, France

³ ONCFS. Unité Sanitaire de la Faune, ZI de Mayencin, 5 Allée de Bethléem, 38610 Gieres, France

⁴ Les résultats obtenus pour la maladie d'Aujeszky sont présentés dans l'article qui suit [B. Toma *et al.*]

⁵ Results obtained for Aujeszky's disease are presented in the next article [B. Toma *et al.*]

I - INTRODUCTION

Le Ministère de l'agriculture (Direction Générale de l'Alimentation) et l'Office national de la chasse et de la faune sauvage (ONCFS) se préoccupent de plus en plus du risque sanitaire que peut représenter la faune sauvage pour les animaux domestiques et l'homme [Chmitelin, 2004]. A ce titre, le sanglier fait l'objet d'une attention particulière, depuis quelques années, car ses effectifs sont en constante augmentation et il est porteur - ou susceptible de l'être - de nombreuses infections ou parasitoses, transmissibles au porc, à d'autres espèces domestiques ou à l'homme, telles que la peste porcine classique (PPC), la maladie d'Aujeszky (MA), la brucellose, la tuberculose et la trichinellose [Hars *et al.*, 2004a, b, et c].

La plupart du temps, ces maladies sont difficilement détectables dans la nature car le sanglier est infecté (infesté) de façon inapparente (c'est le cas de la trichinellose ou de la brucellose qui est enzootique dans de nombreuses populations européennes) ou parce que les signes cliniques et les cas de mortalité passent totalement inaperçus dans l'écosystème forestier fréquenté par cette espèce. De ce fait, l'épidémiologie-surveillance de ces maladies est en partie fondée sur des enquêtes sérologiques menées sur des animaux tués à la chasse. C'est le cas de la surveillance de la PPC du sanglier dans le nord-est de la France, du programme national de surveillance sérologique qui concerne la PPC et la MA depuis 1991, la brucellose depuis 1997 et la trichinellose depuis 2000 [Boué *et al.*, 2003], ainsi que des enquêtes de séroprévalence mises en œuvre dans les départements où des foyers de brucellose sont apparus dans des élevages de porcs en plein air [Hars *et al.*, 2004a].

Les prélèvements sanguins sont réalisés par des acteurs bénévoles et non professionnels, en général des chasseurs, et ne sont pas collectés, conservés et acheminés jusqu'au laboratoire dans des conditions optimales. Le problème est particulièrement aigu pour le sanglier qui est le plus souvent chassé en battue. L'animal est alors éviscéré en fin d'action de chasse, parfois plusieurs heures après la mort. Il est de ce fait très difficile de prélever du sang, qui est en partie coagulé ou hémolysé, y compris dans le cœur, d'où une absence de prélèvement ou une récolte de liquide plus ou moins souillé au fond des cavités abdominale ou thoracique.

La conséquence en est une mauvaise qualité globale des sangs et des sérums dont une proportion importante est inexploitable alors que les objectifs d'échantillonnage sont déjà difficiles à atteindre sur le terrain. On peut citer comme exemples, parmi de nombreux autres, le suivi de la PPC du sanglier dans le département du Bas-Rhin où le rendement moyen entre 1993 et 2000 était de 50% de sangs exploitables [Hars *et al.*, 2001], le programme national de surveillance sérologique du sanglier sauvage, où, entre 1991 et 1999 les rendements variaient de 20 à 60% suivant les départements [Albina *et al.*, 2000], l'enquête sérologique menée en 1999 dans le département de l'Allier autour d'un foyer de brucellose porcine où le rendement était de 60% [Hars *et al.*, 2000]. Ferroglio *et al.* [2000] signalent quant à eux de 28,5 à 48,8% d'échantillons inexploitables chez le chamois pour la recherche sérologique de brucellose.

Chez le chamois et d'autres espèces sauvages, des extraits pulmonaires, en lieu et place de sérum, ont été utilisés avec succès pour ce type d'enquêtes, même si globalement le taux d'anticorps identifiés était toujours inférieur à celui du sérum [Mörner *et al.*, 1988 ; Ferroglio *et al.*, 2000]. Devant les difficultés à utiliser le sérum pour la surveillance à l'abattoir de la maladie d'Aujeszky chez le porc, Le Potier *et al.* [1998], reprenant des études danoises préalables sur la salmonellose [Nielsen *et al.*, 1998], ont également utilisé avec succès les extraits réalisés à partir de muscle avec des résultats semblables en termes de taux d'anticorps décelé.

Ces supports étant plus faciles à prélever et moins fragiles que le sang, une étude destinée à évaluer des tests sérologiques MA, PPC, brucellose et trichinellose sur extraits musculaires et/ou pulmonaires chez le sanglier sauvage a ainsi été mise en place sous l'égide de la DGAI et de l'ONCFS. L'étude a été menée dans trois départements, choisis sur des critères de prévalence ou de risque de l'une de ces quatre infections, sur une durée de trois ans (2000-2003), l'objectif étant de recueillir environ 1000 « trios » de prélèvements (sang, poumon, muscle). Les résultats concernant la brucellose sont rapportés dans cet article.

En France, la brucellose porcine a longtemps été cantonnée aux élevages familiaux et a disparu dans les années 70 avec l'industrialisation de l'élevage porcin. Depuis

1993, des foyers sont réapparus en élevage de plein air. Ainsi, de 1993 à fin 2003, 41 foyers (dont 35 confirmés par l'isolement de *Brucella suis* biovar 2) ont été répertoriés dans 23 départements (figure 1). Le sanglier semble être le principal réservoir et la voie vénérienne est probablement la voie de transmission principale. En effet, les intrusions de sangliers mâles dans les élevages de porcs en plein air sont courantes (avec saillie fréquemment confirmée par la naissance de produits croisés). Si, chez le sanglier, un seul cas clinique de brucellose (orchite aiguë) a été rapporté jusqu'à présent, un taux important de réactions sérologiques anti-*Brucella* a

régulièrement été observé lors des enquêtes départementales et nationales menées depuis 1993, le pourcentage d'animaux séropositifs variant le plus souvent entre 20% et 35% (figure 2). Les quelques études bactériologiques avec recherche de *Brucella* par culture sur la rate de sangliers chassés, menées lors d'enquêtes ponctuelles, ont, quant à elles, confirmé la présence de *B. suis* biovar 2 chez environ 10% des animaux, sans lésion apparente. L'infection brucellique semble donc très largement répandue et de manière quasi-inapparente dans les populations de sangliers françaises [Hars et al., 2004a].

Figure 1

Foyers de brucellose porcine en France (1993-2003)

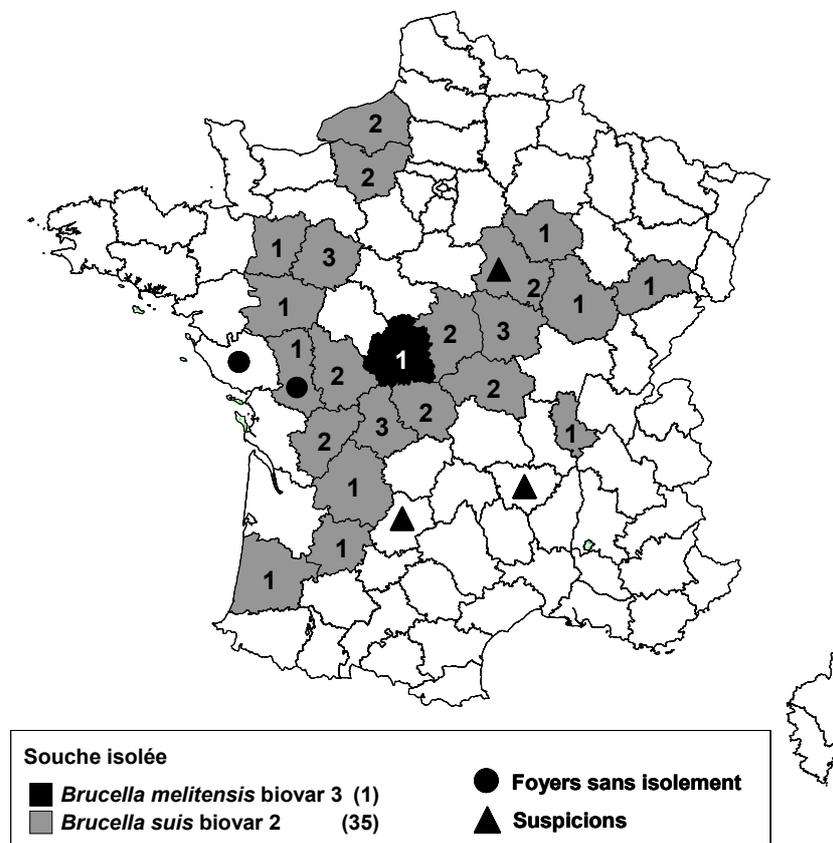
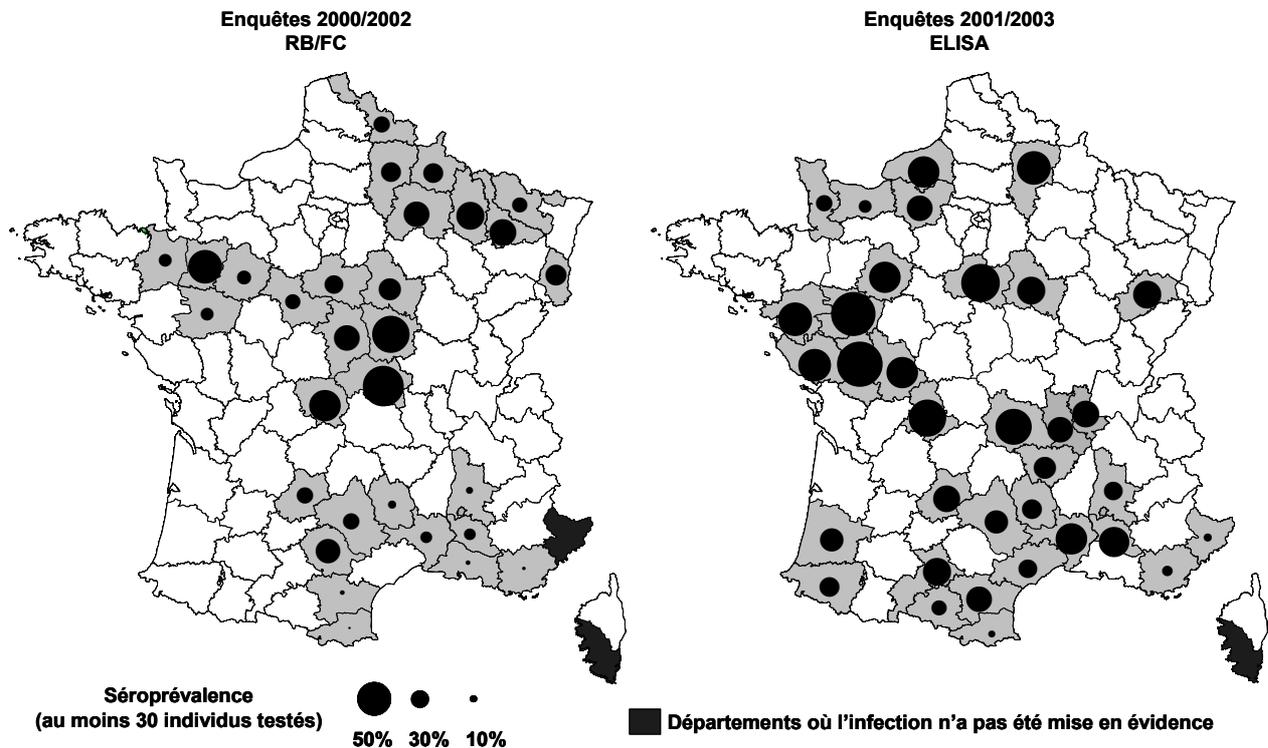


Figure 2

Résultats des enquêtes nationales de séro-prévalence de la brucellose chez le sanglier chassé en France (2000-2003)



II – MATERIEL ET METHODES

1. PRELEVEMENTS

Trois lieux d'étude avaient été identifiés :

- Le département des Bouches-du-Rhône, dans lequel, en Camargue, *Trichinella spiralis* a été identifiée en 1998 (et où le centre de recherche de la Tour du Valat a participé activement) et qui devait, de ce fait, fournir des animaux séropositifs pour la trichinellose ;
- Le département des Ardennes où plusieurs lots de chasse ont été échantillonnés, qui devait fournir des animaux séropositifs pour la maladie d'Aujeszky ;
- Le département de la Moselle dans lequel le principal site de prélèvements était le camp militaire de Bitche et sa périphérie, qui se situait encore en zone infectée de PPC et devait fournir des animaux séropositifs.

Au vu des résultats obtenus dans le dépistage sérologique de la brucellose du sanglier en

France (figure 2), il était probable qu'un certain pourcentage d'animaux de ces trois sites serait également porteur d'anticorps anti-brucelliques.

Les directeurs départementaux des services vétérinaires (DDSV) des trois départements concernés étaient maîtres d'ouvrage du programme dans leur département et ont organisé la campagne de prélèvements en collaboration avec la Fédération départementale des chasseurs et le service de garderie de l'ONCFS. Chaque année, l'objectif était de prélever 100 à 150 animaux par site.

Chaque animal faisait l'objet d'un prélèvement de sang (10 ml), de pilier du diaphragme ou de diaphragme (20 à 30 g) et d'un fragment de poumon (20 à 30 g).

Un dossier d'appui technique était fourni par l'ONCFS à la DDSV pour la mise en place du protocole. Il comportait une fiche générale de présentation du programme à distribuer aux partenaires locaux, une fiche technique de directives pour l'échantillonnage et pour la

logistique (matériel de prélèvements, collecte, circuit des prélèvements entre le terrain et les laboratoires), un modèle de fiche individuelle de commémoratifs et une fiche de recommandations techniques destinée aux chasseurs (ou autres préleveurs).

Tous les prélèvements ont été conditionnés dans les LVD des Bouches-du-Rhône, des Ardennes et de la Moselle, qui ont assuré la centrifugation des sangs et l'extraction des sérums, l'extraction à partir du tissu pulmonaire ou musculaire, suivant le protocole décrit plus loin et la congélation d'un fragment de muscle destiné à un contrôle trichoscopique ultérieur. Les échantillons étaient transmis à l'AFSSA Nancy qui les redistribuait aux différents laboratoires concernés (AFSSA pour la brucellose, la PPC et la trichinellose, ENVA pour la maladie d'Aujeszky).

2. PREPARATION DES EXTRAITS MUSCULAIRES ET PULMONAIRES

2.1. EXTRAITS MUSCULAIRES

Le protocole suivant, mis au point par P. Boireau *et al.* [comm. personnelle] et dérivé de protocoles publiés [Le Potier *et al.*, 1998] a été suivi. Un fragment de viande de 20 g environ était placé dans un tube et congelé à -20°C le plus rapidement possible après prélèvement. Le fragment était ensuite laissé à température du laboratoire et l'exsudat récolté par inclinaison du tube. L'extrait était congelé immédiatement après collecte pour limiter l'action des protéases.

2.2. EXTRAITS PULMONAIRES

Le protocole suivant, préconisé par Ferroglio *et al.* [2000] a été suivi. Un fragment de poumon de 2,5 g environ était placé dans un tube et, soit conservé 24-48 h à 4°C, soit congelé à -20°C. Le fragment était ensuite incubé 30 min à température ambiante dans 2 ml de tampon phosphate. Après agitation au vortex pendant 5 min et centrifugation à environ 500 g pendant 15 min, l'exsudat était récolté et congelé immédiatement à -20°C.

3. PREMIERE PHASE : EVALUATION DES TECHNIQUES DE REFERENCE (EAT ET FC)

La première phase de cette étude (prélèvements de la saison 2000-2001) a consisté à évaluer le comportement des deux techniques sérologiques de référence en

brucellose porcine (épreuve à l'antigène tamponné et épreuve de fixation du complément) sur des extraits musculaires et pulmonaires de sanglier. Les techniques utilisées étaient celles préconisées par l'AFNOR et ont été réalisées au moyen d'antigènes conformes aux exigences européennes.

3.1. EPREUVE A L'ANTIGENE TAMPONNE (EAT)

Vingt-deux trios (sérum, extrait pulmonaire, extrait musculaire) et deux duos (absence de sérum) ont fait l'objet d'études préliminaires en EAT.

3.2. EPREUVE DE FIXATION DU COMPLEMENT (FC)

Vingt et un trios ont fait l'objet d'études préliminaires en FC.

4. SECONDE PHASE : EVALUATION DE LA METHODE ELISA

Le kit ELISA indirect utilisé a été le même tout au long de la période de travail (kit Chekit-Brucella suis, Intervet-Bommeli [lot n°BRS111-754]). Ce kit ELISA est identique (même référence, même lot) à celui testé en 2001 et adopté par notre équipe depuis 2002 pour l'enquête sérologique nationale annuelle sur les populations de sangliers, du fait de sa plus grande sensibilité et de sa meilleure applicabilité aux sérums issus d'animaux sauvages [Boué *et al.*, 2002 ; 2003]. C'est le seul kit ELISA indirect adapté à l'espèce porcine, et donc au sanglier, disponible actuellement sur le marché. Il existe plusieurs kits ELISA de compétition utilisables dans l'espèce porcine, mais leurs niveaux de performance (sensibilité, spécificité), ne sont pas encore établis tant chez le porc domestique que chez le sanglier. Ils n'ont donc pas été utilisés dans la présente étude.

L'étude a porté sur deux années de prélèvements (2001-2002 et 2002-2003), soit 383 trios (sérum/muscle/poumon) et un total de 401 duos sérum/muscle et 462 duos sérum/poumon. Tous les résultats ont été obtenus dans les mêmes conditions (même lot de réactif ELISA, même laboratoire, même manipulateur).

Les prélèvements d'un même sanglier ont été analysés sur la même plaque et selon le protocole du fabricant. La dilution (1/100) et le seuil préconisés par le fabricant pour les

sérums ont été utilisés pour l'ensemble des prélèvements ($\text{index}^6 \leq 60\%$: négatif ; $60\% < \text{index} < 70\%$: douteux ; $\text{index} \geq 70\%$: résultat positif). Ce seuil avait été validé au préalable

pour les sérums par plusieurs de nos études tant chez le porc domestique que chez le sanglier sauvage [Boué *et al.*, 2002 ; 2003 ; Garin-Bastuji, résultats non publiés] :

III - RESULTATS

1. PREMIERE PHASE : EVALUATION DES TECHNIQUES DE REFERENCE (EAT ET FC)

1.1. EPREUVE A L'ANTIGENE TAMPONNE (EAT)

Parmi les 22 sérums, 9 ont donné des résultats ininterprétables du fait d'une hémolyse ou de faux agglutinats, les 13 autres étaient négatifs en EAT. Deux extraits pulmonaires se sont révélés négatifs, les 20 autres ont donné un résultat ininterprétable (illisible). Les 22 extraits musculaires étaient ininterprétables.

1.2. EPREUVE DE FIXATION DU COMPLEMENT (FC)

Tous les extraits pulmonaires et musculaires testés ont présenté une coagulation lors du chauffage nécessaire à la décomplémentation. Lorsque la décomplémentation à 60°C était appliquée sur le surnageant de centrifugation de l'extrait et suivie d'une nouvelle centrifugation, la coagulation était de nouveau obtenue sur l'ensemble des extraits musculaires (21 extraits testés). Sur les extraits pulmonaires, cette modification a permis d'obtenir les résultats indiqués au tableau I.

Ainsi, pour tous les animaux dont le sérum a donné un résultat positif, l'extrait pulmonaire donne un résultat négatif. En revanche, on obtient des résultats à 20 UIFC/ml, donc

positifs, pour des animaux dont les sérums étaient hémolysés et donc inutilisables en FC.

2. SECONDE PHASE : METHODE ELISA

Tous les résultats ayant été obtenus systématiquement dans les mêmes conditions de prélèvement, de préparation des extraits et de réalisation de l'épreuve, le cumul des résultats obtenus à chaque saison est possible, ce qui a pour intérêt de réduire les intervalles de confiance.

Les figures 3 et 4 montrent la distribution des index obtenus avec chacun des prélèvements de chaque trio, d'une part pour les sangliers dont le sérum a fourni une réponse positive ou douteuse, et d'autre part, pour les sangliers dont le sérum a fourni une réponse négative ou douteuse.

Sur la figure 3 on constate que pour la quasi-totalité des sangliers, c'est le sérum qui donne le niveau de réaction le plus élevé. Pour certains sangliers, le niveau de réaction de l'extrait pulmonaire et celui de l'extrait musculaire sont très voisins. Pour les autres, c'est tantôt le poumon, tantôt le muscle, qui donne le résultat le plus élevé, avec une tendance marquée à un plus haut niveau de réaction pour le muscle. De plus, dans de nombreux cas de résultats discordants, le muscle et/ou le sérum sont négatifs mais présentent un index nettement supérieur à 0.

⁶ index : (DO échantillon - DO contrôle négatif) / (DO contrôle positif - DO contrôle négatif) (%)

Tableau I
Résultats comparés sérum/extrait pulmonaire en fixation du complément

Sérum		Extrait pulmonaire ²	
EAT ¹	FC ²	FC	Nombre
4	266	16	1
1	160	0	1
4	133	0	1
4	80	0	1
1	66	0	1
0	16	0	1
0	10	0	1
1	0	0	1
0	0	0	8
<i>hémolysé</i>	<i>hémolysé</i>	0	1
<i>hémolysé</i>	<i>hémolysé</i>	20	4

¹ intensité d'agglutination (0,1, 2, 3, 4)

² unités UIFC/ml (seuil de positivité ≥ 20 UIFC /ml)

Figure 3
Distribution des index obtenus pour chaque trio de prélèvements de chaque sanglier dont le sérum a fourni une réponse positive ou douteuse (n = 154)
 (sérums classés par ordre croissant de résultats)

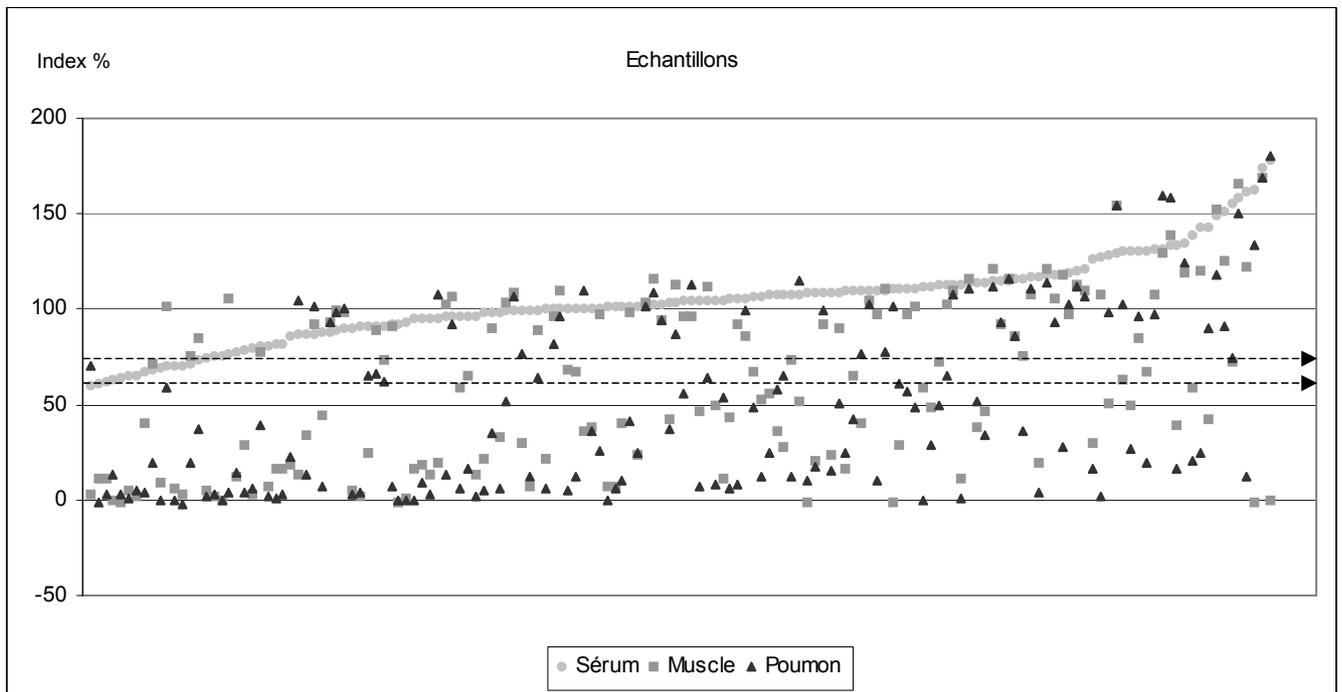
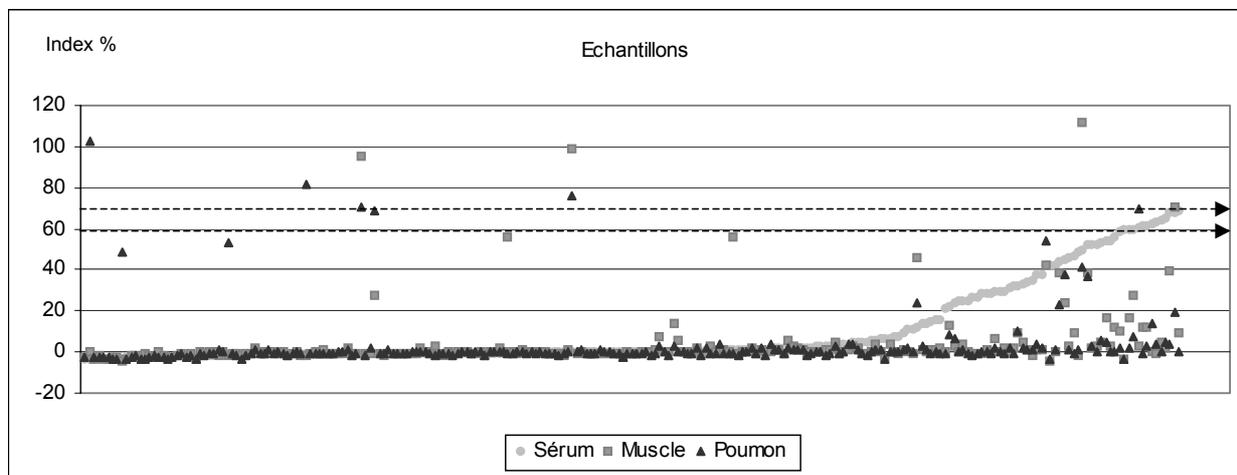


Figure 4

Distribution des index obtenus pour chaque trio de prélèvements de chaque sanglier dont le sérum a fourni une réponse négative ou douteuse (n = 239)
(sérums classés par ordre croissant de résultats)



Sur la figure 4, on constate que :

- Deux couples muscle positif/poumon douteux sont associés à un sérum dont l'index est nul ;
- Deux extraits pulmonaires à résultat positif correspondent à des sérums et muscles dont l'index est nul ;
- Le taux d'extraits pulmonaires ou musculaires à index supérieur à 0 augmente nettement dès que l'index du

sérum correspondant est également supérieur à 0.

Les tableaux II et III récapitulent les résultats obtenus au cours des deux années pour, respectivement, la comparaison sérum-muscle et la comparaison sérum-poumon. La sensibilité et la spécificité sont des valeurs relatives établies en prenant les résultats des sérums pour référence (positifs et négatifs respectivement).

Tableau II

Comparaison des résultats obtenus sur sérums et sur muscles de sangliers

Résultats douteux	Performances	2001-2003		2001-2002	2002-2003
		Trios (N = 383)	Duos (N = 401)	Duos (N = 200)	Duos (N = 201)
Considérés comme positifs	Concordance*	79,1	79,3	81,5%	77,1
	Kappa*	52,9 [41,6-64,1]	53,0 [42,0-64,1]	57,5 [41,8-73,3]	48,8 [33,4-64,2]
	Sensibilité*	50,0 [41,9-58,1]	50,0 [42,0-58,0]	54,6 [42,8-65,9]	45,8 [35,1-56,5]
	Spécificité*	98,7 [96,2-99,7]	98,8 [96,4-99,7]	98,4 [94,3-99,8]	99,1 [97,5-100,0]
Considérés comme négatifs	Concordance*	79,4	79,3	81,5	77,1
	Kappa*	51,3 [39,6-63,0]	50,9 [39,4-62,3]	55,9 [39,5-72,2]	46,0 [29,9-62,1]
	Sensibilité*	47,9 [39,6-56,4]	47,3 [39,2-55,7]	52,1 [40,0-63,9]	42,8 [31,8-53,9]
	Spécificité*	98,3 [95,8-99,5]	98,4 [96,0-99,6]	98,4 [94,4-99,8]	98,4 [96,2-100,0]

* en %

Tableau III
Comparaison des résultats obtenus sur sérums et sur poumons de sangliers

Résultats douteux	Performances	2001-2003		2001-2002	2002-2003
		Trios (N = 383)	Duos (N= 462)	Duos (N = 250)	Duos (N = 212)
Considérés comme positifs	Concordance*	74,4	74,9	78,8%	70,3
	Kappa*	41,3 [29,9-52,7]	40,3 [29,7-51,1]	49,4 [34,8-64,0]	28,2 [18,7-37,8]
	Sensibilité*	39,6 [31,9-47,8]	37,6 [30,5-45,2]	46,2[35,8-56,8]	30,1 [14,5-45,8]
	Spécificité*	97,8 [95,0-99,3]	98,2 [96,0-99,4]	98,1 [94,5-99,6]	98,4 [96,2-100,0]
Considérés comme négatifs	Concordance*	74,9	75,5	80,0	70,3
	Kappa*	39,2 [27,2-51,2]	38,7 [27,4-49,8]	50,2 [35,1-65,3]	25,1 [8,5-41,7]
	Sensibilité*	36,1 [28,3-44,6]	34,7 [27,6-42,5]	45,5 [34,8-56,5]	22,8 [13,5-32,0]
	Spécificité*	98,3 [95,8-99,5]	98,6 [96,6-99,6]	98,8 [95,6-99,9]	98,5 [96,4-100,0]

* en %

IV - DISCUSSION ET CONCLUSION

1. EAT et FC

Les extraits musculaires ou pulmonaires ont donné de manière systématique des résultats ininterprétables en EAT, du fait de faux agglutinats ou parce qu'illisibles.

En FC, les extraits musculaires sont inutilisables car ils coagulent systématiquement lors de la décomplémentation. Pour les extraits pulmonaires, l'épreuve donne des résultats, mais le titre obtenu est très souvent bien inférieur à celui observé pour les sérums et il est souvent nul, y compris lorsque le sérum montre un titre élevé.

Ce résultat avait déjà été mis en évidence dans les études menées en brucellose chez les chamois et les bovins [Ferroglio *et al.*, 2000], mais les auteurs ne rapportaient qu'une diminution moyenne de titre de 1 à 3. Cependant pour certains animaux, dont le titre du sérum était élevé, le titre observé sur l'extrait pulmonaire pouvait également être très faible à nul, ce qui était également observé par Mörner *et al.* [1988] en sérologie de la tularémie sur le lièvre.

Si nos résultats ne remettent pas en cause ceux obtenus par ces auteurs, ils montrent que la FC sur extraits pulmonaires est peu adaptée à une enquête de séroprévalence en brucellose chez le sanglier lorsqu'une grande partie des animaux infectés présentent des titres en FC faibles à moyens. A titre d'exemple, lors de l'enquête nationale 2001-

2002, 31 sérums sur 110 positifs en FC présentaient un titre inférieur à 60 UIFC/ml. Une grande partie d'entre eux risque ainsi de ne pas être détectée en réalisant la FC sur extrait pulmonaire.

EAT et FC ne semblent donc pas bien adaptées à la sérologie sur extraits musculaires ou pulmonaires pour les enquêtes de séroprévalence de la brucellose chez le sanglier chassé.

2. ELISA

Quelle que soit la population d'échantillons envisagée (trios ou duos de prélèvements), les résultats obtenus tant en sensibilité, que spécificité et concordance (Kappa) sont très voisins tant pour le couple sérum / muscle que pour le couple sérum / poumon :

- Une concordance d'environ 80% (Kappa : ~51-53) est observée pour le couple sérum/muscle et d'environ 75% (Kappa : ~39-41) pour le couple sérum /poumon. Elle est égale ou supérieure dans tous les cas lorsque les résultats douteux sont considérés comme négatifs.
- La meilleure sensibilité (lorsque les résultats des sérums sont pris pour référence) est obtenue pour les muscles et lorsque les résultats douteux sont considérés comme positifs. Elle ne dépasse jamais 50%, néanmoins.

- Pour les poumons la sensibilité avoisine les 40% et est, là encore, supérieure lorsque les résultats douteux sont considérés comme positifs. La spécificité est identique ou inférieure à celle observée quand ces résultats douteux sont considérés comme négatifs.
- La spécificité est dans tous les cas particulièrement satisfaisante et avoisine ou dépasse les 98%. Pour les muscles, elle est, comme la sensibilité, toujours meilleure lorsque les résultats douteux sont considérés comme positifs.

Ces tendances ont été retrouvées pour chacune des saisons de prélèvements, mais avec des différences notables de sensibilité pour les muscles, et surtout pour les poumons, entre les campagnes 2001-2002 et 2002-2003, avec un plus faible chiffre pour cette dernière campagne, sans explication évidente.

Enfin, il est très vraisemblable que la sensibilité faible observée pour les muscles et les poumons par rapport aux sérums correspond à une quantité effective d'anticorps plus faible dans les deux premiers, surtout le poumon. L'utilisation d'une dilution moins poussée pour les muscles et les poumons que pour les sérums ou l'abaissement du seuil de positivité pour ces prélèvements permettraient certainement, au vu de la figure 3 -de nombreux résultats se situent juste en dessous du seuil, pour les muscles notamment- d'améliorer la sensibilité. Le Potier *et al.* [1998] ont en effet montré, pour la maladie d'Aujeszky, que l'extrait musculaire renfermait en moyenne 20 fois moins d'anticorps que le sérum du même animal. Nielsen *et al.* [1998] préconisaient quant à eux pour la recherche des anticorps anti-Salmonella, une dilution des extraits musculaires au 1/30 pour une dilution du sérum au 1/400. Les volumes d'échantillons disponibles n'ont pas permis d'étudier l'intérêt de ces modifications de protocole. Celles-ci pourraient néanmoins produire un effet inverse sur la spécificité, déjà imparfaite. De plus, la figure 4 semble indiquer qu'un tel effet pourrait être de faible ampleur, très peu d'extraits présentant un index proche du seuil de positivité lorsque les sérums correspondants présentent un résultat négatif. Seules des études réalisées d'une part dans une population de sangliers certainement indemne

de brucellose (en Corse, par exemple) et sur un effectif de porcs ou de sangliers certainement infectés, permettraient d'établir avec plus de précision la dilution et/ou le seuil de positivité optimaux.

L'utilisation du test ELISA indirect sur extraits musculaires ou pulmonaires devrait néanmoins permettre d'établir la présence ou l'absence de l'infection brucellique dans une population de sangliers avec une certaine fiabilité. L'utilisation du muscle semble préférable au travers des résultats de cette étude et dans ce cas, l'interprétation comme positifs des résultats douteux assure un niveau optimal de sensibilité et de spécificité. Compte tenu des valeurs estimées de la sensibilité et de la spécificité individuelles et de l'incertitude corollaire, il n'est pas possible de proposer une règle rigide assurant un résultat exact. On peut néanmoins proposer des orientations pour l'interprétation de résultats positifs en ELISA indirect sur muscle de sanglier, avec le coffret Bommeli :

Compte tenu de la spécificité du test sur muscle par rapport au sérum (env. 98%) :

- Si le nombre d'échantillons de muscle étudiés est inférieur ou égal à 50, alors l'absence de résultat positif signe l'absence vraisemblable ou la très faible prévalence de l'infection, l'obtention de deux ou trois résultats positifs démontre que l'infection est probablement présente et plus de quatre résultats positifs démontre la présence de l'infection.
- Si le nombre d'échantillons de muscle étudiés est supérieur à 50, moins de 2% de réponses signe l'absence vraisemblable ou la très faible prévalence de l'infection, l'obtention de 2 à 8% de résultats positifs démontre que l'infection est probablement présente et plus de 8% de résultats positifs démontre la présence de l'infection.

Enfin, compte tenu de la sensibilité du test sur muscle par rapport au sérum (env. 50%), la prévalence moyenne apparente obtenue devrait être augmentée de 50% pour estimer la prévalence vraisemblable (ex. : 20% + (20 x 0,5)% = 30%).

BIBLIOGRAPHIE

- Albina E., Mesplède A., Chenut G., Le Potier M.F., Bourbao G., Le Gal S., Leforban Y. - A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's Disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Vet. Microbiol.*, 2000, **1-2**, 43-57.
- Boué F., Hars J., Le Potier M.F., Mesplède A., Garin-Bastuji B., Boireau P., Toma B., Pacholek X. - Bilan du Programme National 2001/2002 de Surveillance Sérologique des Sangliers Sauvages - Peste Porcine Classique, Maladie d'Aujeszky, Brucellose, Trichinellose. Rapport DGAI-AFSSA-ONCFS, 2002, 40 pp.
- Boué F., Hars J., Le Potier M.F., Mesplède A., Garin-Bastuji B., Boireau P., Toma B., Pacholek X. - Bilan du Programme National 2002/2003 de Surveillance Sérologique des Sangliers Sauvages - Peste Porcine Classique, Maladie d'Aujeszky, Brucellose, Trichinellose. Rapport DGAI-AFSSA-ONCFS, 2003, 40 pp.
- Chmitelin I. - Risques sanitaires et faune sauvage : le point de vue de la Chef des Services Vétérinaires français. *Faune Sauvage*, 2004, **261**, 1.
- Ferroglio E., Rossi L., Gennero S. - Lung-tissue extract as an alternative to serum for surveillance for brucellosis in chamois. *Prev. Vet. Med.*, 2000, **43**, 117-22.
- Hars J., Valéry M., Chaduc F., Garin-Bastuji B., Pinguet O., Rossi S. - Surveillance de la Brucellose du Sanglier et du Lièvre dans le département de l'Allier, *Bull. Inf. Pathol. Anim. Sauv.*, 2000, **23**, 121-138.
- Hars J., Rossi S., Pacholek X. - Peste porcine classique du sanglier. Bilan du suivi épidémiologique du foyer des Vosges du Nord 1992-2001. Rapport ONCFS/DGAI 2001. 23 p.
- Hars J., Thiébaud M., Cau C., Rossi S., Baubet E., Boué F., Garin-Bastuji B. - La brucellose du Sanglier et du Lièvre, due à *Brucella suis* 2 en France. *Faune Sauvage*, 2004a, **261**, 18-23.
- Hars J., Rossi S., Mesplède A., Pacholek X., Boué F., Le Potier M.F. - Epidémiologie et surveillance de la peste porcine classique du Sanglier en France. *Faune Sauvage*, 2004b, **261**, 24-28.
- Hars J., Boschioli M.L., Belli P., Vardon J., Garin-Bastuji B., Thorel M.F. - Découverte du premier foyer de tuberculose sur les ongulés sauvages en France. *Faune Sauvage*, 2004c, **261**, 29-34.
- Le Potier M.F., Fournier A., Houdayer C., Hutet E., Auvigne V., Hery D., Sanaa M., Toma B. - Use of muscle exudates for the detection of anti-IgE antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.*, 1998, **143**, 385-387.
- Morner T., Sandstrom G., Mattsson R. - Comparison of serum and lung extracts for surveys of wild animals for antibodies to *Francisella tularensis* biovar *palaeartica*. *J. Wildl. Dis.*, 1988, **24**, 10-4.
- Nielsen B., Ekeröth L., Bager F., Lind P. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1998, **10**, 158-63.



Remerciements

Cette étude a été réalisée grâce à un financement spécifique du Ministère de l'agriculture (Direction Générale de l'Alimentation).

Claudine Sarton (Afssa Alfort), Chantal Patron et Nathalie Stroucken (Afssa Nancy) sont particulièrement remerciées pour leur excellente collaboration technique.

Les auteurs souhaitent également remercier vivement les personnels des DDSV et LVD des départements des Ardennes, des Bouches-du-Rhône et de Moselle ainsi que les agents de l'ONCFS, sans qui cette étude n'aurait pas été possible.