

Brucella abortus d'origine bovine au Sénégal : identification et typage

par J. M. VERGER (*), M. GRAYON (*), M. P. DOUTRE (**) et F. SAGNA (**)

RÉSUMÉ

Cent quatre-vingt une souches de *Brucella* d'origine bovine, isolées au Sénégal, de 1976 à 1978, ont été identifiées par l'ensemble des épreuves recommandées par le sous-Comité de la Taxonomie de ce genre bactérien. Leurs caractères sont, pour l'essentiel, conformes à la définition de l'espèce *Brucella abortus* au sein de laquelle 180 souches appartiennent au biotype 3 et une au biotype 1.

Deux caractères inhabituels pour cette espèce distinguent toutefois les souches sénégalaises : leur réponse négative — à une exception près — à l'épreuve de l'oxydase et leur profil moyen d'oxydation métabolique modifié au niveau de 4 des substrats conventionnels (L-asparagine, L-arabinose, D-galactose et D-xylose). Ces deux caractères originaux sont discutés d'un double point de vue, épidémiologique et taxonomique.

Le genre *Brucella* est subdivisé en 6 espèces (10). Cinq sont présentes en Afrique : *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis* (18) et *B. canis* (21). La rareté des articles consacrés au typage limite malheureusement la connaissance de la nature et de la fréquence des biotypes correspondants.

En ce qui concerne le Sénégal, les données publiées par CHAMBRON, en 1965 (3), portent sur un nombre trop restreint de souches et n'intègrent pas les propositions du Sous-Comité de la Taxonomie des *Brucella*, alors récemment créé, sur la différenciation au sein des espèces de ce genre bactérien (15).

L'application de ces propositions à l'étude de 181 souches de *B. abortus* d'origine bovine isolées dans ce pays, de 1976 à 1978, fait l'objet du présent travail.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches bactériennes

Les 181 souches isolées à la suite de différentes tournées accomplies dans le sud du Séné-

gal (Sine-Saloum, Sénégal-Oriental, Haute, Moyenne et Basse-Casamance), de 1976 à 1978, sont toutes d'origine bovine et proviennent chacune d'un animal différent (carte). Tous les troupeaux visités appartiennent à la race Ndama. Les isollements ont été obtenus à partir de liquides de ponction d'hygromas mis en culture sur milieu « *Brucella* agar modifié », additionné de polymyxine, bacitracine et cycloheximide (mélange P. B. C. lyophilisé) (*).

Après 4 jours d'incubation à 37 °C, sous atmosphère convenable de CO₂ (GASPAC Anaerobic System (*)), l'examen morphologique et microscopique permet de reconnaître, sur les boîtes de milieu sélectif, les colonies de *Brucella*. Celles-ci sont repiquées sur des pentes de « gélose trypticase soja » (*) supplémentée à 1 p. 1 000 d'extrait de levure et, après incubation, les tubes de culture sont envoyés à Nouzilly pour identification et typage.

2. Méthodes d'identification

— La détermination du genre *Brucella* repose sur les méthodes bactériologiques simples (tabl. I) recommandées pour le diagnostic différentiel avec les groupes de bactéries à Gram négatif pouvant prêter à confusion (1, 10).

(*) Station de Pathologie de la Reproduction, Centre de Recherches de Tours, I. N. R. A., Nouzilly, 37380 Monnaie, France.

(**) Laboratoire national de l'Elevage et de Recherches vétérinaires, I. S. R. A., B. P. 2057, Dakar-Hann, République du Sénégal.

(*) BIOMERIEUX : Marcy l'Etoile, 69260 Charbonnières-les-Bains, France.

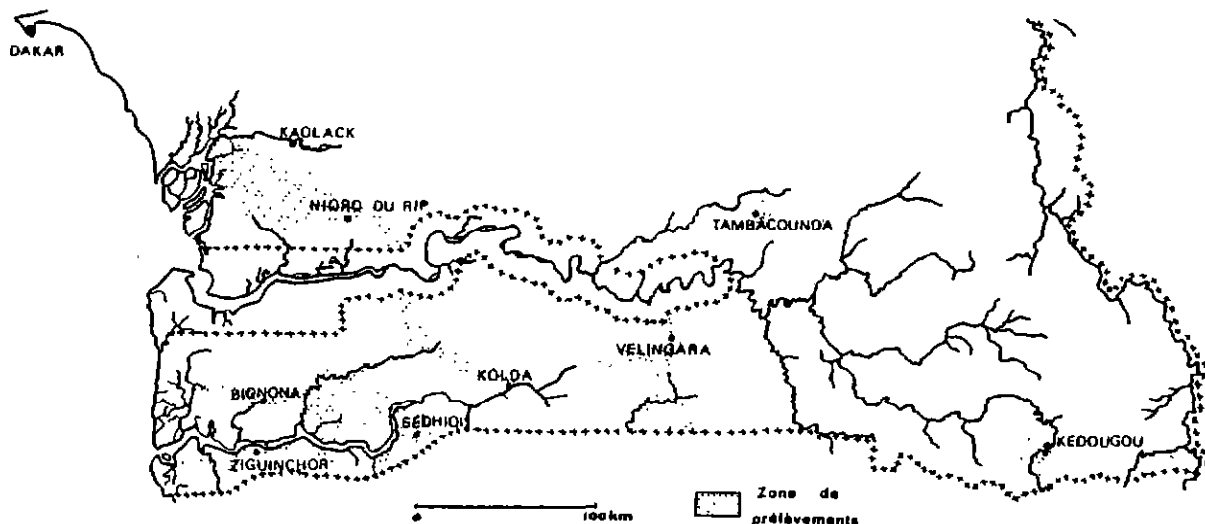


Fig. 1. — Origine géographique des 181 souches de *Brucella abortus* d'origine bovine isolées au Sénégal.

Tableau I. — Caractérisation de 181 souches de *Brucella* d'origine bovine isolées au Sénégal, par les épreuves courantes d'identification des bactéries à Gram négatif.

Caractères	Résultats
Morphologie cellulaire	Coccobaciles non sporulés, non encapsulés
Coloration de Gram	—
Mobilité	—
Fermentation du lactose sur Mac Conkey agar	—
Hémolyse sur gélose sang	—
Acidification du glucose en eau peptonée, rouge de phénol	—
Catalase	+
Oxydase	180 —, 1 +
Uréase	+
Indole	—
Réduction des nitrates	+
Citrate (Simmons)	—
Rouge de méthyle (R. M.)	—
Voges-Proskauer (V. P.)	—

L'épreuve de l'oxydase est pratiquée, pour chaque souche, suivant deux techniques : la première est celle classique de KOVACS ; la seconde utilisant, comme réactif, l'hydrochlorure de N-diméthyl-paraphénylène-diamine, permet, en versant celui-ci à la surface du milieu solide de culture, de tester rapidement l'homogénéité de la réaction de l'oxydase au sein d'une population de colonies bactériennes. Ces deux techniques sont décrites par LENNETTE, SPAULDING et TRUANT (6).

— Les épreuves courantes d'identification des espèces de *Brucella* et de leurs biotypes sont présentées dans le tableau II. Ce sont celles recommandées par le Sous-Comité de la Taxo-

nomie des *Brucella* (5, 15) et décrites par ALTON, JONES et PIETZ (1).

— L'activité respiratoire vis-à-vis des 11 substrats indiqués sur le tableau III (métabolisme oxydatif) est déterminée pour 65 souches de l'échantillon. La méthode employée est décrite antérieurement (11, 19, 20) et l'expression graphique des résultats (fig. 2) est conforme à celle proposée dans un précédent travail (22).

RÉSULTATS

Les souches sénégalaises sont caractérisées par de nombreuses réponses négatives aux épreuves bactériologiques courantes d'identification

des bactéries à Gram négatif (tabl. I). Ceci est conforme au comportement habituel des *Brucella*. Le test de l'oxydase, négatif pour toutes les souches sauf une, mérite attention. Il sera discuté plus loin.

Les résultats des épreuves courantes de différenciation au sein du genre *Brucella* sont présentés dans le tableau II. Toutes les souches, de type morphologique smooth, sont lysées, aux

deux dilutions d'épreuve (DCE et $10^4 \times$ DCE), par le bactériophage Tb spécifique de *Brucella abortus*. Les autres caractères différencient les biotypes :

— Cent quatre-vingt souches exigent l'addition de CO_2 pour leur croissance, produisent de l' H_2S , sont uniquement agglutinées par le sérum monospécifique anti-*abortus-suis* (A) et poussent en présence de thionine aux 3 concen-

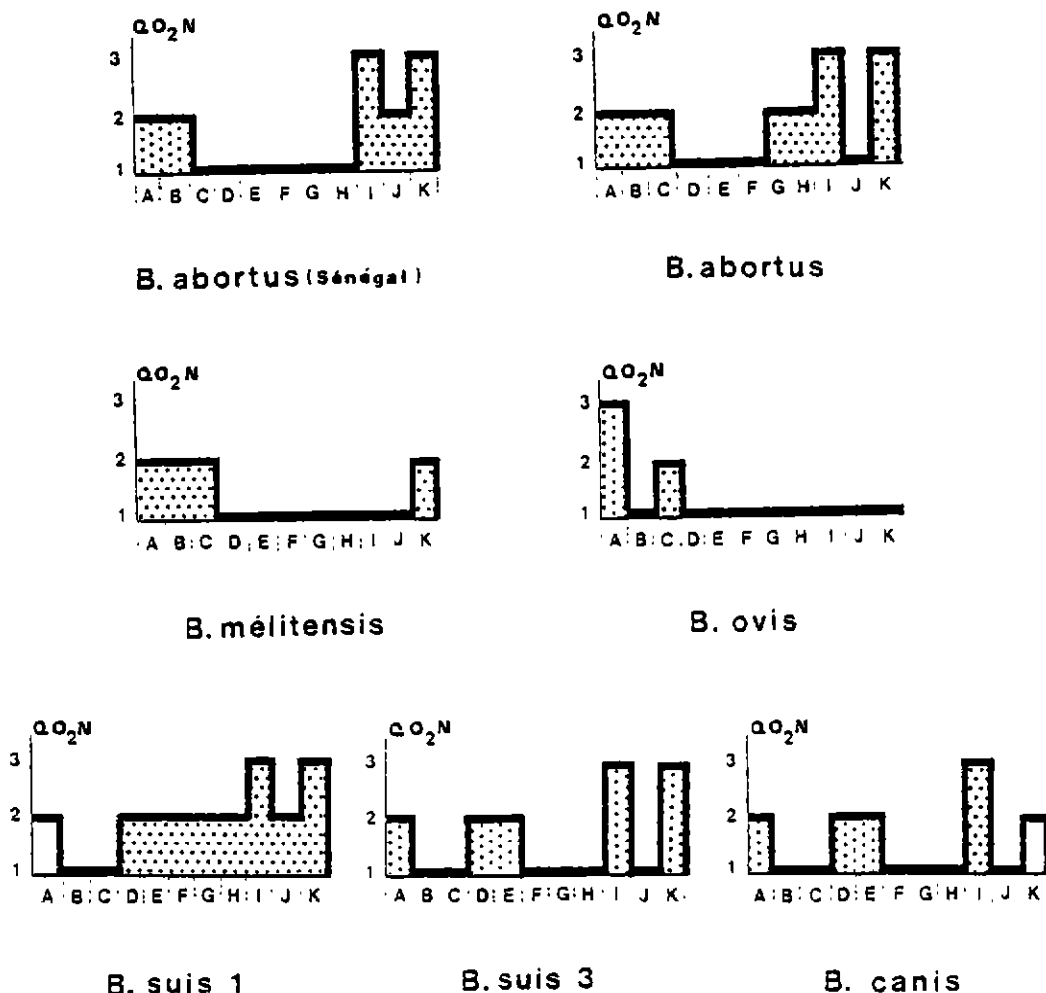


Fig. 2. — Représentation graphique des résultats du métabolisme oxydatif : Profil métabolique moyen des souches de *Brucella abortus* d'origine bovine isolées au Sénégal.

Comparaison avec les profils métaboliques les plus probables pour les espèces et types de *Brucella* dont la présence a été signalée en Afrique.

Niveau QO_2N :

1. QO_2N moyen inférieur à 100
2. QO_2N moyen compris entre 100 et 300
3. QO_2N moyen supérieur à 300.

Substrats :

A = Acide L-glutamique	E = DL-ornithine	I = D-ribose
B = L-alanine	F = L-lysine	J = D-xylose
C = L-asparagine	G = L-arabinose	K = Méso-érythritol
D = L-arginine	H = D-galactose	

Surface pointillée : profil le plus probable quelle que soit la souche.

Surface claire : profil moyen de l'échantillon mais, en raison du grand intervalle entre les valeurs extrêmes observées, le substrat peut être oxydé à l'un ou l'autre des 3 niveaux.

TABL. N°II—Caractérisation de 181 souches de *Brucella abortus* d'origine bovine isolées au Sénégal, par les épreuves conventionnelles d'identification.

Nombre de souches	oxydase	Lyse par le phage Tb		Exigence en CO ₂	Production de H ₂ S	Agglutination par les sérums monospécifiques		Croissance en présence de colorants			Biotype	Espèce		
		DCE 10 ⁴ x DCE (1)	A (2)			M (2)	Thionine			Fuschine basique			Safranine (3)	
							10	20	40	10			20	100
1	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	1		
1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	3	<i>B. abortus</i>	
179	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+			

(1) DCE = Dilution courante d'épreuve ; (2) A = anti-*brucellus-abortus* ; M = anti-*melitensis*.

(3) Concentrations exprimées en µg de colorant par ml de milieu gélosé (sérum dextrose agar).

trations indiquées. Ces caractères définissent *B. abortus* biotype 3.

— Une souche identique par ailleurs aux précédentes s'en distingue par sa sensibilité aux mêmes concentrations de thionine. Elle est, de ce fait, classée dans le biotype 1 de l'espèce.

Les résultats de l'épreuve de l'oxydase figurent aussi dans le tableau II. Une seule souche, appar-

tenant au biotype 3, est positive. Toutes les autres, y compris la seule classée dans le biotype 1, sont oxydase négatives : ce comportement est inhabituel pour l'espèce *B. abortus*.

Les résultats de l'étude du métabolisme oxydatif de l'unique souche du biotype 1 et de 64 parmi celles du biotype 3 — dont la seule oxydase positive — sont présentés dans le tableau III. Il apparaît que, pour les 65 souches,

TABL. N°III—Consommations d'oxygène (QO₂N), après 24 heures de culture sur milieu "Trypticase Soy agar", de 65 souches de *Brucella abortus* d'origine bovine isolées au Sénégal, en présence de différents substrats

Biotype		1	3			
Oxydase		-	+	-		
Dimension de l'échantillon		1	1	63		
Paramètres statistiques ou valeurs individuelles		X1	X1	W	\bar{X}	S
S U B S T R A T S	O ₂	97	87	65-147	97	18
	Acide L-glutamique	266	222	208-409	279	39
	L-alanine	135	171	148-298	225	31
	L-asparagine	0	0	0- 18	2	4
	L-arginine	37	53	39-132	80	18
	DL-ornithine	0	28	12-116	47	23
	L-lysine	0	14	0- 35	15	9
	L-arabinose	14	33	5- 87	45	17
	D-galactose	13	15	2-102	39	18
	D-ribose	382	397	257-506	391	54
	D-xylose	165	173	102-275	180	38
Mésoerythritol	430	370	182-504	370	60	

* La respiration endogène (colonne O) est soustraite et les valeurs sont exprimées en microlitres d'oxygène consommé par milligramme d'azote bactérien et par heure (µlO₂/mg N/h).

Symboles utilisés : W, amplitude ou intervalle entre les valeurs extrêmes observées ;

\bar{X} , moyenne de l'échantillon ; S, écart type de l'échantillon ; X1, valeurs individuelles

les valeurs d'oxygène consommé vis-à-vis des substrats indiqués sont homogènes et indépendantes du biotype et du caractère oxydase. L'expression graphique de ces résultats (fig. 2) montre que le profil métabolique moyen des souches sénégalaises ressemble au « profil le plus probable » défini pour l'espèce *B. abortus*. Ce profil spécifique est cependant altéré, chez les souches sénégalaises, au niveau de 4 substrats :

— la L-asparagine, le L-arabinose et le D-galactose qui sont métabolisés au 1^{er} niveau (QO₂N moyen inférieur à 100) au lieu du deuxième ;

— le D-xylose qui est oxydé au niveau 2 (QO₂N moyen entre 100 et 300) au lieu du premier.

En dépit de ces variations, le profil d'oxydation métabolique des souches sénégalaises ne peut être confondu avec celui des espèces de *Brucella* autres qu'*abortus*.

DISCUSSION

L'identification et le typage des 181 souches sénégalaises n'ont pas soulevé de difficulté. Les caractères morphologiques, culturels et biochimiques, présentés dans les résultats, sont conformes à ceux décrits pour le genre *Brucella* (1, 10) et le classement dans les biotypes 1 et 3 de *B. abortus* (tabl. II) ne souffre aucune ambiguïté. Deux caractères inhabituels pour cette espèce méritent cependant discussion : la réponse négative à l'épreuve de l'oxydase et l'aspect original du profil d'oxydation métabolique (*).

Caractère oxydase

Le genre *Brucella* comprend 6 espèces. Quatre sont réputées oxydase positives : *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* et *B. canis* ; *B. ovis* et *B. neotomae* sont caractérisées, au contraire, par des réactions négatives (1, 10). Toutes les souches de *B. abortus*, d'origines géographiques très diverses, que nous avons typées jusqu'à présent ont effectivement toutes répondu positivement à l'épreuve de l'oxydase. Le comportement négatif des souches sénégalaises —

sauf une (**)— est donc très inhabituel. STEEL, cependant, a observé que des souches de *B. abortus* (1 sur 12), *B. melitensis* (1 sur 6) et *B. suis* (4 sur 7) étaient oxydase négatives (17). Il n'est donc pas impossible que, pour ces trois espèces, la réponse à l'épreuve de l'oxydase soit négative plus souvent que ne le laissent supposer les articles d'identification et de typage de ces bactéries, où souvent d'ailleurs les résultats de ce test ne sont pas mentionnés.

Ces faits soulignent donc l'intérêt taxonomique et épidémiologique de la mise en œuvre systématique de l'épreuve de l'oxydase pour l'étude bactériologique des *Brucella*.

Le support biochimique de la différence de réponse des espèces ou souches de *Brucella* à l'épreuve de l'oxydase n'est pas connu. Cette méthode, basée sur l'aptitude de la chaîne respiratoire à oxyder un certain nombre de colorants, ou systèmes redox, n'est pas spécifique et ne permet pas, à elle seule, de définir les bases biochimiques de la réaction de l'oxydase (14). Une corrélation entre la présence d'un cytochrome c dans la partie terminale de la chaîne respiratoire et une réponse positive à l'épreuve de l'oxydase a pu être avancée pour certains groupes bactériens (*Pseudomonas*, *Moraxella*) (16). Ce n'est pas le cas pour le genre *Brucella* dont toutes les espèces, y compris *B. ovis* et *B. neotomae* oxydase négatives, contiennent du cytochrome c (12, 13, 23).

Profil d'oxydation métabolique

MEYER et CAMERON, sur une gamme définie de substrats (acides aminés et glucides), ont établi que chaque espèce de *Brucella* est caractérisée par un schéma d'oxydation métabolique particulier (8, 9). Nous avons montré (22) que les consommations d'oxygène (QO₂N), vis-à-vis des substrats choisis, peuvent être schématiquement ramenées à 3 niveaux :

— Le niveau 1 réunit les substrats vis-à-vis desquels la consommation d'oxygène est régulièrement faible : QO₂N moyen inférieur à 100 ;

— Le niveau 2 correspond à une consommation modérée d'oxygène : QO₂N moyen compris entre 100 et 300 ;

— Le niveau 3, enfin, groupe les substrats pour lesquels la consommation d'oxygène est

(*) Une inhabituelle lenteur de croissance est également manifestée par toutes les souches sur milieu Trypticase Soy Agar. Cette autre particularité, plus subtile mais régulièrement observée, vaut d'être notée.

(**) Isolée au village de Ndoumbouthie, près de Sokone (Sine-Saloum). Onze autres souches oxydase négatives ont été isolées dans le même village.

constamment élevée : QO_2N moyen supérieur à 300.

La représentation graphique de cette distribution des substrats matérialise un profil métabolique caractéristique de chaque espèce de *Brucella* (fig. 2). Le choix des valeurs limites (100 et 300) tient compte à la fois des consommations moyennes (\bar{X}) et de la dispersion des valeurs individuelles (W), de telle sorte que le profil métabolique moyen, ainsi défini, est le plus probable pour n'importe quelle souche de l'espèce considérée.

L'espèce *B. abortus* est donc caractérisée (fig. 2) par l'oxydation probable des substrats :

- L-arginine, DL-ornithine, L-lysine et D-xylose au niveau 1 ;
- acide L-glutamique, L-alanine, L-asparagine, L-arabinose et D-galactose au niveau 2 ;
- D-ribose et méso-érythritol au niveau 3.

Les souches sénégalaises diffèrent donc de ce profil type au niveau de 4 substrats : la L-asparagine, le L-arabinose, le D-galactose et le D-xylose qui sont oxydés à un niveau inhabituel. Leur profil métabolique ressemble cependant à celui de *B. abortus* plus qu'à aucun des autres espèces du genre (fig. 2).

Les souches sénégalaises ne sont pas les seules, au sein de l'espèce *B. abortus*, à présenter une fluctuation de QO_2N habituel, au niveau d'un ou même de plusieurs substrats.

— La souche vaccinale B 19 oxyde de façon caractéristique l'acide L-glutamique et le méso-érythritol, respectivement aux niveaux 3 et 1 (2, 22).

— Nous avons également rapporté l'isolement de 4 souches de *B. abortus* biotype 1 — isolées chez une vache et 3 mulots (*Apodemus sylvaticus*) originaires d'une exploitation agricole massivement infectée de brucellose bovine — qui, comme les souches du Sénégal, manifestaient une consommation d'oxygène inhabituellement faible (niveau 1) vis-à-vis de la L-asparagine (20). Ce caractère original avait permis en l'occurrence de mettre en évidence un lien épidémiologique certain entre les souches isolées des mulots et celle d'origine bovine.

L'intérêt du marquage épidémiologique de souches de *B. abortus* biotype 1 par un caractère métabolique inhabituel a été également rapporté, dans l'Etat du Minnesota (U. S. A.), par LUCHSINGER et collab. (7).

Des variations du profil métabolique type ont également été observées chez les autres espèces de *Brucella*. C'est le cas, en particulier, de sou-

ches de *B. suis* biotype 3 isolées par COOK et collab. chez des rongeurs dans le North Queensland (Australie) (4).

Ces exemples, parmi d'autres, ont le mérite de souligner le double intérêt du métabolisme oxydatif chez les *Brucella*.

1) Les variations rapportées jusqu'à présent, au niveau d'un ou plusieurs substrats, n'altèrent pas fondamentalement l'aspect général du profil métabolique spécifique. Celui-ci est donc un bon critère de détermination de l'espèce au sein du genre *Brucella*.

2) Ces variations représentent des marqueurs épidémiologiques d'autant plus précieux que l'absence d'outils de marquage suffisamment fins (lysotypes, facteurs de résistance...) caractérise les *Brucella*.

CONCLUSION

L'analyse épidémiologique repose essentiellement sur des observations liées à des méthodes d'investigation propres au Laboratoire. Pour être efficace, elle doit faire appel à toutes les méthodes disponibles, y compris celles qui relèvent de l'identification et du typage bactériologiques. Vaine, en effet, serait la prétention de maîtriser une maladie infectieuse en ignorant l'agent responsable, en tant que tel, sous ses différents aspects que sont les espèces et leurs divers types.

C'est dans cet esprit que nous avons entrepris l'étude bactériologique des souches de *Brucella* isolées au Sénégal. La mise en évidence, sur celles-ci, de deux caractères inhabituels ayant valeur de marqueurs, illustre bien l'intérêt épidémiologique et taxonomique de l'identification et du typage des *Brucella* pour lesquelles, tant en Afrique que dans le reste du monde, la connaissance de la nature et la fréquence des différents types responsables de l'infection est encore trop fragmentaire.

Pour se limiter au continent africain, il serait souhaitable que l'ensemble des souches isolées par les chercheurs des différents laboratoires soient centralisées afin de parvenir à une connaissance taxonomique plus complète.

REMERCIEMENTS

Qu'il nous soit permis ici de remercier MM. Mamadou DIALLO (Directeur du Service de la Santé et des Productions Animales),

Moustapha DIA, Serigne Mbaye DIALLO et Sidy NIANG, respectivement Inspecteurs régionaux à Kaolack, Tambacounda et Ziguinchor, les Chefs de secteurs départementaux : Alioune TOURE (Nioro du Rip), Boubacar NGOM (Foundiougne), Mamadou NDAO (Kédougou), Gnele KANOUTE (Vélingara), Lassana NDIA-YE (Kolda), Amadou GUINDO (Sédhiou),

Mbacké FAYE (Ziguinchor), Bécaye DIALLO (Bignona), Moussa SANGARE (Oussouye) et les agents techniques Issakha DIOP (Vélingara) et Mamadou DIATTA (Kolda) dont l'action conjointe a permis de recueillir sur le terrain, dans d'excellentes conditions, le matériel biologique nécessaire à l'exécution du présent travail.

SUMMARY

Brucella abortus isolated from cattle in Senegal : identification and typing.

One hundred and eighty one strains of *Brucella* isolated from cattle in various areas of Senegal, during a two-year period from 1976 to 1978, were examined by all methods recommended by the subcommittee on Taxonomy of the genus *Brucella*. All were found to have the same main characteristics that identify and define the species *Brucella abortus*. Of the 181 strains, all but one were biotype 3 ; the single different strain was biotype 1.

However two unusual characters distinguish the senegalese strains from the main group of *Brucella abortus* : the oxidase test negative for all but one strains and the specific oxidative profile altered on four of the conventional substrates (L-asparagine, L-arabinose, D-galactose and D-xylose). These two original characters are discussed from an epidemiological and taxonomical point of view.

RESUMEN

Brucella abortus de origen bovina en Senegal : identificación

Se identificaron 181 cepas de *Brucella* de origen bovino, aisladas en Senegal de 1976 a 1978, mediante el conjunto de las pruebas recomendadas por la subcomisión de la taxonomía de dicho género bacteriano. Sus características son, en lo esencial, formadas con la definición de la especie *Brucella abortus* en el seno de las cuales 180 cepas pertenecen al biotipo 3 y 1 al biotipo 1.

Sin embargo, las cepas senegalesas tienen dos características inhabituales : su reacción negativa, con excepción de una, a la prueba de la oxidasa y su perfil medio de oxidación metabólica modificado al nivel de 4 de los substratos convencionales (L-asparagina, L-arabinosa, D-galactosa y D-xylosa). Se discuten estas dos características desde los dos puntos de vista : epidemiológico y taxonómico.

BIBLIOGRAPHIE

- ALTON (G. G.), JONES (L. M.), PIETZ (D. E.). La brucellose. Techniques de laboratoire, 2^e éd. Genève, O. M. S., 1977.
- BROWN (G. M.), LOVE (E. L.), PIETZ (D. E.), RANGER (C. R.). Characterization of *Brucella abortus* strain 19. *Am. J. vet. Res.*, 1972, **33** : 759-764.
- CHAMBRON (J.). La brucellose bovine au Sénégal. *Rev. Elev. vét. Pays trop.*, 1965, **18** (1) : 19-38.
- COOK (I.), CAMPBELL (R. W.), BARROW (G.). Brucellosis in North Queensland rodents. *Aust. vet. J.*, 1966, **42** : 5-8.
- JONES (L. M.). Report of the International Committee on Nomenclature of Bacteria by the Subcommittee on Taxonomy of *Brucella*. Minutes of meeting, July 1966. *Int. J. System. Bacteriol.*, 1967, **17** : 371-375.
- LENNETTE (E. H.), SPAULDING (E. H.), TRUANT (J. P.). Manual of clinical microbiology. Washington, American Society for Microbiology, 1974.
- LUCHSINGER (D. W.), ANGUS (R. D.), GUE (C. S.), ANDERSON (R. K.). The utilization of *Brucella abortus* culturing and biotyping results in the epizootologic investigation of bovine brucellosis. *Proc. U. S. animal Hlth Ass.*, 1973 : 85-99.
- MEYER (M. E.), CAMERON (H. S.). Metabolic characterization of the genus *Brucella*. I. Statistical evaluation of the oxidative rates by which type 1 of each species can be identified. *J. Bacteriol.*, 1961, **82** : 387-395.
- MEYER (M. E.), CAMERON (H. S.). Metabolic characterization of the genus *Brucella*. II. Oxidative patterns of the described biotypes. *J. Bacteriol.*, 1961, **82** : 396-400.
- MORGAN (W. J. B.), CORBEL (M. J.). Recommendations for description of species and biotypes of the genus *Brucella*. *Develop. biol. Standard*, **31** : 27-37. Basel, S. Karger, 1976.
- PHILIPPON (A.). Métabolisme oxydatif et lysotypie des *Brucella*. *Symp. Ser. Immunobiol. Stand.*, 1970, **12** : 181-190.
- REST (R. F.), ROBERTSON (D. C.). Characterization of the electron transport system in *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.*, 1975, **122** : 139-144.
- RICHARDSON (M.). Cytochrome oxidase in cells of the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.*, 1975, **74** : 699-706.

14. SMITH (L.). Cytochrome systems in aerobic electron transport. In : GUNSALUS (I. C.), STANIER (R. Y.). The bacteria. Vol. II : 365-396. New York and London, Academic Press, 1961.
15. STABLEFORTH (A. W.), JONES (L. M.). Report of the Subcommittee on Taxonomy of the genus *Brucella*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon.*, 1963, **13** : 145-158.
16. STANIER (R. Y.), PALLERONI (N. J.), DOUDOROFF (M.). The aerobic Pseudomonads : a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.*, 1966, **43** : 159-271.
17. STEEL (K. J.). The oxidase reaction as a taxonomic stool. *J. gen. Microbiol.*, 1961, **25** : 297-306.
18. THIMM (B.), WUNDT (W.). The epidemiological situation of brucellosis in Africa. *Develop. Biol. Standard.*, **31** : 201-217. Basel, S. Karger, 1976.
19. UMBREIT (W. W.), BURRIS (R. H.), STAUFFER (J. F.). Manometric techniques. A manual describing methods applicable to the study of tissue metabolism. Minneapolis, Burgess Publ. Co., 1964.
20. VERGER (J. M.). Un marqueur épidémiologique : la perte de l'activité oxydative d'une souche de *B. abortus* biotype 1 sur la L-asparagine par conservation à -4°C des suspensions cellulaires. *Annls Rech. vét.*, 1973, **4** : 241-252.
21. VERGER (J. M.), GATE (M.), PIECHAUD (M.), CHATELAIN (R.), RAMISSE (J.), BLANCOU (J.). Isolement de *Brucella suis* biotype 5 à Madagascar, chez une chienne. Validité du nom d'espèce *Brucella canis*. *Annls Microbiol., Inst. Pasteur*, 1975, **126A** : 57-74.
22. VERGER (J. M.), GRAYON (M.). Oxidative profiles of *Brucella* species. *Ann. Sclavo.*, 1977, **19** : 45-60.
23. VERSHILOVA (P. A.), DRANOVSKAYA (E. A.), KUSHNAREV (V. M.). Dopolnityel'nyy sposob opryedelyeniya prinadlyezhnosti bakteriy k rodu *Brucella*. (An additional method of determining the relationship of bacteria to the genus *Brucella*.) *Zh. Microbiol., Mosk.*, 1972, **49** : 98-101.