

Effet des modalités d'utilisation des antibiotiques sur la résistance dans la flore fécale des porcs

Catherine BELLOC (1), Nam Lam DINH (1), Virginie LEZÉ (1), François BEAUDEAU (2) et Arlette LAVAL (1)

(1) Unité de Médecine des Animaux d'Élevage,

(2) UMR-ENVN-INRA Gestion de la Santé Animale,

Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, BP 40706, 44307 Nantes cedex 3

Effet des modalités d'utilisation des antibiotiques sur la résistance dans la flore fécale des porcs

Cette étude a pour objectif de décrire la survenue de résistances en élevage porcin en relation avec les pratiques d'utilisation des antibiotiques. Seize élevages naisseurs-engraisseurs situés dans l'Ouest de la France ont été sélectionnés et classés, selon l'importance de l'utilisation des antibiotiques en hautement (HU), moyennement (MU) ou peu (PU) utilisateurs. Dans ces élevages, des matières fécales de truies et de porcelets ont été prélevées à différents moments du cycle de production et des *Escherichia coli* de la flore fécale ont été isolées pour tester leur sensibilité aux antibiotiques. Les pourcentages de souches résistantes à la tétracycline et à l'association triméthoprime-sulfamides sont élevés (respectivement > à 72 % et de 28 à 84 % selon le moment de prélèvement et la catégorie d'animaux). A l'inverse, la résistance à la gentamicine est peu fréquente (0 à 25 %) et les résultats de résistance à l'amoxicilline sont intermédiaires (7 à 70 %). Les élevages utilisant peu d'antibiotiques présentent les plus faibles pourcentages de résistance. D'autres facteurs intervenant sur la résistance (stress, nature des molécules utilisées) contribuent sans doute à expliquer le fait que la relation entre niveau d'utilisation et résistance ne soit pas toujours linéaire.

Relationship between antimicrobial use and resistance in fecal flora of pigs

The purpose of this investigation was to determine the level of resistance in fecal *Escherichia coli* from pigs housed in commercial herds with different antimicrobial use schemes. Sixteen farrow-to-finish herds from west of France were selected for the study and classified as "high users" (HU), "medium users" (MU) or "poor users" (PU) depending on the importance of antimicrobial consumption. Feces from sows and piglets were collected at several times during animal life and *Escherichia coli* strains isolated from them tested for antimicrobial resistance. Most of *E coli* strains were resistant to tetracycline and trimethoprim-sulfamides (respectively >72% and 28 to 84% depending on sampling time and animal type). Resistance to gentamicin was low (0 to 25%) and variable for amoxicillin (7 to 70%). Other factors, such as stress or use of specific antimicrobials, may influence the inconstant linear aspect of the relation between the amount of antimicrobial used and the resistance of bacteria.

INTRODUCTION

La recherche d'une relation entre l'usage des antibiotiques et l'apparition de bactéries résistantes est un élément intéressant dans la perspective d'une éventuelle identification de modalités d'administration des antibiotiques susceptibles d'induire moins de résistance. En élevage porcin, les pratiques d'utilisation des antibiotiques sont assez similaires entre élevages, notamment en ce qui concerne l'administration collective systématisée d'antibiotiques. Ainsi, les séjours en maternité pour les truies et en maternité et post-sevrage pour les porcelets constituent les phases d'élevage au cours desquelles les animaux reçoivent le plus souvent des traitements. En médecine humaine, des méthodes de quantification de l'utilisation des antibiotiques existent mais elles n'ont pas été extrapolées à la médecine vétérinaire (CHAUVIN et al, 2001).

Dans le cadre de cette étude, nous avons sélectionné des élevages naisseurs-engraisseurs conventionnels dans lesquels les pratiques d'antibiothérapie nous semblaient représentatives de l'ensemble des modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage porcin en France. L'apparition de résistance dans ces élevages a été évaluée par des prélèvements de matières fécales à différents moments de la vie des animaux (truies et porcelets) et la mise en évidence de souches résistantes d'une bactérie sentinelle de la flore fécale : *Escherichia coli*.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Elevages

Seize élevages naisseurs-engraisseurs (identifiés A à P) situés dans l'ouest de la France (régions Bretagne et Pays de la Loire) ont été sélectionnés pour l'étude par l'intermédiaire des vétérinaires de ces élevages sur la base des administrations d'antibiotiques effectuées de façon systématique et collective. Nous avons cherché à obtenir un échantillon diversifié sur le plan de l'utilisation des antibiotiques : utilisation quantitative (« gros utilisateurs » à « non utilisateurs ») et

qualitative (les molécules administrées aux animaux dans ces élevages étaient les plus couramment utilisées en pathologie porcine).

Un questionnaire a permis de recueillir les données concernant les pratiques d'utilisation des antibiotiques dans les élevages ; un récapitulatif en est présenté dans le tableau 1.

1.2. Prélèvements de matières fécales et évaluation de la résistance aux antibiotiques

Dans chaque élevage, 5 truies et 3 porcelets par truie ont été sélectionnés aléatoirement avec, pour les truies, une stratification sur le rang de portée afin d'obtenir un échantillon représentatif de la démographie du troupeau de reproducteurs.

Des prélèvements de matières fécales ont été réalisés sur les truies avant mise bas (J 0) puis 7, 30 et 60 jours après mise bas (respectivement J 7, J 30, et J 60). Sur les porcelets, des matières fécales ont été prélevées en maternité (J 7), en début et fin de post-sevrage (J 30 et J 60) et en fin d'engraissement (J 150). Après ensemencement sur milieu de culture sélectif, 4 colonies bactériennes dont la morphologie était évocatrice de celle d'*Escherichia coli* ont été sélectionnées et leur sensibilité aux antibiotiques testée par la technique de l'antibiogramme standard. Les souches classées « intermédiaires » ont été regroupées avec les souches classées « résistantes ». Ces résultats ont par la suite été exploités pour les antibiotiques suivants : l'amoxicilline, la gentamicine, l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole et la tétracycline. Au total, l'étude a porté sur 1200 souches d'*E coli* isolées de matières fécales de truies et 3099 souches de porcelets.

1.3. Stratégie d'analyse de l'effet de l'utilisation des antibiotiques sur la résistance

Pour le classement des élevages en fonction des modalités d'utilisation des antibiotiques, il n'a pas été tenu compte des utilisations ponctuelles pour des traitements individuels.

Tableau 1 - Fréquences d'utilisation des antibiotiques dans les élevages de l'étude

Molécule	Nombre d'élevages utilisateurs	Nombre total d'utilisations dans les 16 élevages
COLISTINE	13	20
FLUMEQUINE	9	9
ACIDE OXOLINIQUE	1	1
NEOMYCINE	3	3
AVILAMYCINE	1	1
SPECTINOMYCINE	2	2
STREPTOMYCINE	1	1
AMOXICILLINE	4	4
BENZYL PENICILLINE	2	2
TETRACYCLINES	9	10
TMP-SULFADIMERAZINE	4	4

Afin de quantifier le niveau d'utilisation des antibiotiques dans les élevages de l'étude, un score a été établi pour chaque élevage tenant compte du nombre de molécules (x_i) ainsi que de leur nombre d'utilisations (n_i) au cours d'un cycle de production ($\text{score} = \sum n_i x_i$). Les élevages ont ensuite été classés peu ou pas utilisateurs (PU : $\text{score} \leq 2$), moyennement utilisateurs (MU : scores de 3 et 4) ou hautement utilisateurs (HU : $\text{score} \geq 5$). L'association triméthoprim-sulfamides, compte tenu du mode d'action très proche entre les diaminopyrimidines et les sulfamides, est comptabilisé comme une seule molécule. De plus, les molécules du groupe des macrolides-lincosamides-streptogramines, auxquelles *E coli* est constitutivement résistante, n'ont pas été prises en compte lors de l'établissement du score.

Pour l'analyse statistique des résultats, les pourcentages de résistance dans les 3 groupes PU, MU et HU ont été comparés en utilisant un modèle de régression logistique (macro GLIMMIX, SAS Institute Inc, 1999), avec prise en compte de l'effet élevage (en tant qu'effet aléatoire). Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative. Lorsque cette première analyse mettait en évidence un effet du niveau global de l'utilisation des antibiotiques, des comparaisons deux à deux (MU versus PU et HU versus PU) ont été réalisées à l'aide de la même méthode statistique conduisant à l'estimation d'Odds ratios afin de quantifier le risque associé à une augmentation de l'utilisation des antibiotiques.

2. RÉSULTATS

Le classement des élevages selon le score d'utilisation des antibiotiques est présenté dans le tableau 2. Les résultats illustrant l'évolution cinétique des pourcentages de résistance à l'amoxicilline, la tétracycline, l'association triméthoprim-sulfamides et la gentamicine sont illustrés dans le tableau 3.

Concernant l'amoxicilline, le pourcentage de souches d'*E coli* résistantes varie de 15,5 % (PU à J0) à 58,9 % (MU à J7) chez les truies. Dans les trois groupes, les pourcentages de résistance augmentent au cours du séjour des truies en maternité et diminuent ensuite (à J60). Chez les porcelets, ils sont compris entre 7 % (PU à J150) et 70,3 % (MU à J60). Les valeurs maximales sont observées en post-sevrage et les valeurs à J150 sont plus faibles que celles à J0. Quel que soit le stade de production, le niveau global d'utilisation des antibiotiques a un effet significatif sur le pourcentage de souches résistantes à l'amoxicilline chez les truies ($p < 0,01$) comme chez les porcelets ($p < 0,0001$) avec, lorsque la différence est significative, un risque accru quand l'utilisation des antibiotiques augmente.

Les pourcentages de résistance à la tétracycline sont très élevés chez les truies et chez les porcelets, et ce à toutes les

dates de prélèvement : de 63 % (MU à J60) à 93,2 % (MU à J7) chez les truies et de 65,8 (PU à J7) à 99 % (MU à J60) chez les porcelets. Si l'effet du niveau est significatif à l'exception du prélèvement réalisé à J30 sur les truies, les valeurs des odds ratios indiquent que la relation entre niveau d'utilisation et résistance n'est pas linéaire (par exemple pour les truies à J0).

Le niveau de résistance à l'association triméthoprim-sulfamides est élevé chez les truies : de 37,4 % (PU à J30) à 74 % (MU à J30) ainsi que chez les porcelets : de 32,7 % (PU à J7) à 84,6 % (MU à J60). L'effet du niveau d'utilisation d'antibiotiques est globalement significatif à l'exception des prélèvements réalisés sur les truies à J0 et J7 et les pourcentages sont alors significativement plus faibles pour les élevages du groupe PU, sauf dans le cas des truies à J60 (non significatif). Tout comme pour les deux antibiotiques précédemment envisagés, la relation entre niveau d'utilisation et pourcentage de résistance n'est pas toujours linéaire.

En ce qui concerne la gentamicine, les pourcentages de résistance observés sont plus faibles que dans le cas des autres antibiotiques puisque les valeurs maximales observées sont de 19,3 % pour les truies à J30 dans le groupe HU et de 25,3 % à J60 pour les porcelets de ce même groupe. L'effet du niveau d'utilisation de antibiotiques est significatif pour les truies de J0 à J30 et pour les porcelets de J7 à J60. Les valeurs des odds ratios indiquent que le risque de résistance est le plus élevé pour les élevages du groupe HU.

3. DISCUSSION

Les élevages inclus dans cette étude l'ont été sur la base de leur historique d'utilisation des médicaments vétérinaires et en particulier des antibiotiques, avec en préalable une condition de stabilité de ces pratiques depuis au moins 6 mois. Nous avons volontairement recruté des élevages peu utilisateurs (parmi lesquels l'élevage expérimental de la SPP de l'AFSSA Ploufragan) dans lesquels la colistine est la molécule la plus fréquemment utilisée. Ces élevages nous ont permis de documenter un niveau de base et une évolution au cours d'un cycle de production de la résistance aux antibiotiques dans un contexte de faible utilisation d'antibiotiques. A l'opposé, les élevages dont les scores de traitement sont les plus élevés sont ceux dans lesquels l'aliment 1^{er} âge est supplémenté, les truies sont soumises à des traitements réguliers et de plus des traitements collectifs sont administrés aux porcelets en maternité et/ou post-sevrage et/ou engraissement. En ce qui concerne les molécules utilisées, nous avons tenté d'obtenir un échantillon d'élevages représentatifs des pratiques les plus courantes en médecine porcine. Les molécules les plus fréquemment rapportées ont donc été les quinolones chez les truies, les bêta-lactamines, la colistine ainsi

Tableau 2 - Classement des élevages en fonction de leur niveau global d'utilisation des antibiotiques

groupes	Peu ou pas utilisateurs (PU)	Moyennement utilisateurs (MU)	Hautement utilisateurs (HU)
Élevage (score)	I(0), K(1), L(2), M(0), N(1), O(2)	B(4), C(3), D(4), F(3)	A(7), E(6), G(7), H(5), J(6), P(6)

Tableau 3 - Effet du niveau d'utilisation des antibiotiques sur la résistance à l'amoxicilline, la tétracycline, l'association triméthoprime-sulfamides et la gentamicine

Amoxicilline		Niveau d'utilisation en antibiotiques						Analyse statistique		
Animal	Temps	PU		MU		HU		p	ODDs Ratios	
		N	%R	N	%R	N	%R		HU vs PU	MU vs PU
TRUIES	J0	116	15,5	76	34,2	123	26,0	0,0103	1.915 [1.005-3.646]	2.831 [1.419-5.649]
	J7	111	24,3	73	58,9	124	33,9	<0,0001	1.593 [0.900-2.821]	4.459 [2.359-8.429]
	J30	115	26,1	73	50,7	119	46,2	0,0006	2.435 [1.404-4.223]	2.912 [1.567-5.411]
	J60	112	18,8	46	28,3	112	36,6	0,0116	2.502 [1.359-4.609]	1.707 [0.768-3.792]
PORCS	J7	327	19,9	209	54,1	334	49,1	<0,0001	3.935 [2.062-6.069]	4.745 [3.230-6.968]
	J30	316	19,3	204	48,5	289	67,8	<0,0001	8.810 [6.069-15.831]	3.941 [2.664-5.831]
	J60	311	31,8	195	70,3	304	57,2	<0,0001	2.866 [2.062-3.985]	5.058 [3.429-7.462]
	J150	257	7,0	94	26,6	259	42,9	<0,0001	9.958 [5.812-17.064]	4.811 [2.480-9.330]
Tétracycline		PU		MU		HU		p	ODDs Ratios	
Animal	Temps	N	%R	N	%R	N	%R		HU vs PU	MU vs PU
TRUIES	J0	116	79,3	76	73,7	123	87,8	0,0366	1.878 [0.930-3.792]	0.730 [0.370-1.442]
	J7	111	82,0	73	93,2	124	79,8	0,0409	0.870 [0.453-1.673]	2.988 [1.068-8.361]
	J30	115	72,2	73	74,0	119	83,2	0,1082	***	***
	J60	112	88,4	46	63,0	112	87,5	<0,0001	∞	∞
PORCS	J7	327	65,8	209	76,1	334	86,2	<0,0001	3.261 [2.217-4.798]	1.657 [1.120-2.450]
	J30	316	80,1	204	88,7	289	92,7	<0,0001	3.283 [1.928-5.591]	1.921 [1.148-3.215]
	J60	311	84,9	195	99,0	304	95,1	<0,0001	3.596 [1,932-6,691]	16.751 [4.017-69.843]
	J150	257	80,5	94	91,5	259	90,0	0,0023	2.205 [1.315-3.697]	2.532 [1.151-5.572]
TMP-sulfamides		PU		MU		HU		p	ODDs Ratios	
Animal	Temps	N	%R	N	%R	N	%R		HU vs PU	MU vs PU
TRUIES	J0	116	45,7	76	55,3	123	60,2	0,0768	***	***
	J7	111	49,6	73	65,8	124	60,5	0,0687	***	***
	J30	115	37,4	73	74,0	119	60,1	<0,0001	2.472 [1.461-4.182]	4.586 [2.409-8.732]
	J60	112	39,3	46	39,1	112	67,9	<0,0001	3.262 [1.885-5.646]	0.994 [0.492-2.007]
PORCS	J7	327	32,7	209	58,4	334	62,9	<0,0001	3.481 [2.527-4.796]	2.883 [2.013-4.129]
	J30	316	38,3	204	58,8	289	74,7	<0,0001	4.768 [3.363-6.761]	2.302 [1.607-3.298]
	J60	311	40,5	195	84,6	304	79,6	<0,0001	5.731 [4.001-8.208]	8.075 [5.148-12.665]
	J150	257	28,8	94	46,8	259	66,4	<0,0001	4.889 [3.366-7.102]	2.176 [1.337-3.541]
Gentamicine		PU		MU		HU		p	ODDs Ratios	
Animal	Temps	N	%R	N	%R	N	%R		HU vs PU	MU vs PU
TRUIES	J0	116	0,0	76	1,3	123	6,5	0,0069	∞	∞
	J7	111	0,9	73	4,1	124	15,3	<0,0001	19.904 [2.618-51.338]	4.714 [0.481-46.224]
	J30	115	0,0	73	1,4	119	19,3	<0,0001	∞	∞
	J60	112	3,6	46	0,0	112	7,1	0,1188	**	***
PORCS	J7	327	0,0	208	1,4	334	17,7	<0,0001	∞	∞
	J30	316	5,1	204	0,5	289	23,2	<0,0001	5.769 [3.257-10.218]	0.092 [0.012-0.702]
	J60	311	6,1	195	21,5	304	25,3	<0,0001	5.022 [2.982-8.456]	3.994 [2.265-7.044]
	J150	257	0,8	94	0,0	259	0,4	0,6205	***	***

*** différence non significative ; en gras : valeur estimée de l'odds ratio ; entre crochets : [intervalle de confiance de l'odds ratio à 95 %]

que les tétracyclines chez les porcs. Les molécules du groupe des macrolides-lincosamides-streptogramines ont également plusieurs fois été utilisées dans les élevages.

Le choix d'une méthode d'évaluation de la consommation médicamenteuse en médecine vétérinaire est complexe puisqu'elle doit idéalement concilier la prise en compte d'un maximum d'informations à l'introduction d'un minimum de biais. CHAUVIN et al (2001) ont ainsi comparé différentes approches, mettant en évidence la difficulté de considérer l'ensemble des paramètres : chacune des méthodes de mesure privilégie et/ou néglige certaines composantes des traitements. Ainsi, la méthode consistant en l'attribution d'un score à chaque élevage ne tient compte ni de la posologie, ni du moment de l'administration du traitement dans la vie de l'animal, ni de la voie d'administration. De plus, comme les autres méthodes quantitatives, elle compile des molécules et des schémas thérapeutiques dont les effets sont probablement très variables en ce qui concerne l'apparition de résistances. Ainsi, puisqu'elle est active sur *E coli*, nous avons comptabilisé les administrations de colistine lors de l'établissement des scores. Toutefois, la mise en évidence de souches résistantes dans les matières fécales de porcs reste exceptionnelle malgré la fréquente utilisation de cette molécule en médecine vétérinaire (BAYON-AUBOYER et al, 2002). En revanche, la méthode utilisée dans cette étude présente l'avantage d'une grande facilité de mise en œuvre, ne nécessitant pas de calcul : c'est pourquoi nous avons choisi de l'adopter comme première approche de la quantification de l'utilisation des antibiotiques en élevage porcin.

En ce qui concerne la cinétique de l'évolution des pourcentages de résistance au cours d'un cycle de production, il apparaît que celle-ci est le plus souvent similaire dans les trois groupes d'élevages. Chez les truies, les pourcentages les plus élevés sont observés en maternité (entre J7 et J30) avec une tendance à la diminution ensuite. Chez les porcelets, les valeurs maximales correspondent à la période de post-sevrage (entre J30 et J60) puis diminuent au cours de la phase d'engraissement. Ces évolutions sont plus marquées pour les antibiotiques pour lesquels les taux de résistance sont les moins élevés (amoxicilline et gentamicine). Ces périodes d'élevage (maternité pour les truies et post sevrage pour les porcelets) correspondent aux stades de production au cours desquels l'administration d'antibiotiques est la plus fréquente. Cependant, les traitements ne sont probablement pas les seuls éléments explicatifs de ce phénomène puisque une telle évolution des résistances dans le temps a été rapportée en dehors de toute administration d'antibiotiques (BELLOC et al, 2003). De plus, des phénomènes de stress, fréquents pour les animaux à ces périodes (mise bas d'une part et sevrage d'autre part), ont été identifiés comme facteurs favorisant l'apparition des résistances dans plusieurs études (MOLITORIS et al, 1987 ; MORO et al, 1998 ; MORO et al, 2000 ; MATHEW et al, 2003).

Nos résultats montrent que le niveau global d'utilisation des antibiotiques, évalué par un score, est associé à la prévalence des souches d'*E coli* résistantes dans les matières fécales.

En effet, les élevages du groupe PU présentent, dans la quasi totalité des cas, les taux de résistance les plus faibles. Toutefois, cet effet est variable et nécessite donc une étude en fonction des moments de prélèvements ainsi que des molécules considérées.

Ainsi, dans le cas de l'amoxicilline, l'effet global du niveau d'utilisation des antibiotiques est significatif pour tous les couples animal/date de prélèvement à l'exception de deux cas. De plus, à J7 et J60 chez les porcelets, le groupe MU présente le plus fort taux de résistance. Cette observation peut être expliquée par le fait que la méthode de regroupement que nous avons adoptée entraîne une répartition des élevages utilisateurs de bêta-lactamines dans les différents groupes de niveau. Par conséquent, si ce facteur est important pour l'apparition des résistances à l'amoxicilline, l'analyse des résultats devra être conduite avec prudence.

Les pourcentages de résistance observés à la tétracycline sont très élevés dans tous les élevages de l'étude à tous les moments du cycle de production et ce quel que soit le niveau d'utilisation de antibiotiques. Ceci est en accord avec des publications précédentes rapportant des pourcentages de résistance supérieurs à 90 % en l'absence d'utilisation de cette famille d'antibiotiques (DUNLOP et al, 1998). Des déterminants génétiques de cette résistance ont par ailleurs été fréquemment mis en évidence dans la flore fécale des porcs avec ou sans exposition préalable aux antibiotiques (LEE et al, 1993). Concernant l'effet du niveau d'utilisation des antibiotiques sur la résistance, bien que l'effet global soit significatif dans tous les cas à l'exception des truies à J 30, il apparaît que la linéarité de la relation n'est pas toujours vérifiée puisque les valeurs des odds ratios sont dans certains cas plus élevés pour le groupe MU que HU. Les mêmes observations peuvent être faites pour la résistance à l'association triméthoprim-sulfamides.

Enfin, dans le cas de la gentamicine, les pourcentages de résistance observés sont beaucoup plus faibles, à l'exception des élevages du groupe HU. La cinétique d'évolution est comparable à celle de l'amoxicilline avec une absence d'effet du niveau d'utilisation des antibiotiques lors des derniers prélèvements, lorsque les taux de résistance diminuent (J60 pour les truies et J150 pour les porcelets). Parmi les six élevages du groupe HU, cinq administrent des aminosides aux porcs (en maternité par voie injectable ou en supplémentation dans l'aliment 1^{er} âge). Ceci pourrait expliquer la linéarité de la relation antibiotiques/résistance dans ce cas.

CONCLUSION

Cette étude a permis de mettre en évidence qu'un faible niveau d'utilisation des antibiotiques est associé à un taux de résistance statistiquement moins important des souches d'*E coli* de la flore fécale des porcs en ce qui concerne l'amoxicilline et la gentamicine. Toutefois, il apparaît que cette appréciation globale, ne prenant pas en compte l'effet spécifique des différentes molécules sur des antibiotiques de leur famille, doit être complétée par une approche qualitative dans laquelle des schémas thérapeutiques précis sont évalués.

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements à E. Blandin, T. Guyot,

F. Leray et V. Creignou-Peron pour leur excellente collaboration technique à ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAYON-AUBOYER M.H., MOISAN J.C., MORVAN H., 2002. 2^{ème} colloque international francophone de bactériologie vétérinaire, 5 et 6 septembre, Zoopole Saint-Brieuc-Ploufragan, France, 75-76.
- BELLOC C., DINH N.L., PERON V., CARIOLET R., LAVAL A ; 2003. Journées Rech. Porcine, 35, 415-418.
- CHAUVIN C., MADEC F., GUILLEMOT D., SANDERS P., 2001. Vet. Res., 32, 533-543.
- DUNLOP R.H., McEWEN S.A., MEEK A.H., BLACK W.D., FRIENDSHIP R.M., CLARKE R.C., 1998. Prev. Vet. Med., 34, 265-282.
- LEE C., LANGLOIS B.E., DAWSON K.A., 1993. Applied Environment. Microbiol., 59, 1467-1472.
- MATHEW A.G., 2003. American Associ. Swine Vet. March 8-11, Florida, 419-425.
- MOLITORIS E.D., FAGERBERG L., QUARLES C.L., KRICHEVSKY M.I., 1987. Appl. Environ. Microbiol., 53, 1307-1310.
- MORO M.H., BERAN G.W., HOFFMAN L.J., GRIFFITH R.W., 1998. Lett. Appl. Microbiol., 27, 251-254.
- MORO M.H., BERAN G.W., GRIFFITH R.W., HOFFMAN L.J., 2000. J. Appl. Microbiol., 88, 836-844.
- SAS / STAT " User's Version b 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999. 3884 p.