

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET  
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES  
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE**

**PROJET DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU  
DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE**

**SOUS LE THEME**

**Etude de la réponse et de la durée immunitaire après  
vaccination contre la brucellose par le vaccin Rev1 chez  
les petits Ruminants  
Région de Laghouat**

**PRESENTE PAR :**

- El Kalah Hayat
- Bensayeh Zemzem

**ENCADRE PAR :**

Dr Akermi Amar

**Année universitaire**

**2011 - 2012**

# Remerciement

*Nous remercions Allah de nous avoir aidés à préparer ce modeste travail et nous le remercions pour ses biens faits.*

*Comme un tel travail ne s'effectue jamais seul, nous aimerions remercier par quelques phrases tous ceux qui de près ou de loin nous ont aidés à le réaliser.*

*Nous tenons à remercier notre encadreur Mr Akermi Amar pour sa gentillesse, sa patience et de nous avoir fait bénéficier de ses compétences et ses conseils précieux et ses encouragements qui ont été pour nous un atout certain et nous ont permis de beaucoup apprendre, tout en menant à bien ce travail.*

*Nous aimerions adresser un remerciement particulier à Mr le directeur de laboratoire régional de Lahgouat : Maktouf Lakhdar, et à tous le personnel : l'expère technicien Abdelkader et Dr Matach Zakaria.*

*Nos chaleureux remerciements à Dr Lakhdari Khadidja , le technicien Mohamed, et Dr Karima qui nous ont prodigués tant d'encouragements.*

*Nous remercions aussi tous les professeurs et les employés de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret, et surtout à Mr Ouared Toufik*

# *Dédicaces*

*A mes parents*

*L'offre ce travail, résultats de mes efforts et fruits de votre éducation.*

*A toi ma chère mère, source du plus précieux soutien, pour ta douceur, ta bonté et ta précieuse tendresse, je te témoigne respectueusement ma reconnaissance et ma gratitude pour tout ce que tu as fait pour moi depuis ma naissance.*

*A toi papa, mon diadème pour le respect de mon choix.*

*A mes chers frères : Obida, Hodaifa, et Okba.*

*A ma chère sœur Allaa.*

*A ma deuxième famille à Tiaret : Daoued, pour le soutien et la tendresse.*

*Clin d' œil: Assia, Hayat, Gaga, Souad, Rim, et Zouzou.*

*A mon miel: Hayat.*

*A mes meilleurs amies: Ghzala, Kawtar, Nejla, Amina, Zola.*

*A mes amis Hicham et Zina qui ma aider dans mon travail.*

*A toute la famille : Abdelali, et Bensayeh.*

*A tous ceux que j'aime.*

***Zemzem***

# *Dédicaces*

*Louanges à Allah, maître de l'univers.*

*Paix et Salut sur notre Prophète Mohamed.*

*A mes parents qui ont consenti d'énormes sacrifices pour me voir réussir, pour l'enseignement de la vie, pour l'éducation qu'ils m'ont donnés et tous les conseils et encouragements qu'ils n'ont cessé de me prodiguer durant mes études.*

*Je leur dois reconnaissance et gratitude.*

*Ma sœur Sarah et mon frère Bouziyan.*

*A mon binôme Zemzem.*

*A mes chers amis Kadirou, Abdelkarim et Sidahmad.*

*A ma chère cousine Meriem.*

*A mes meilleurs amies Ghezala, Amina, kaoutar, Zola, Zina et surtout Amina véto qui ma encouragé durant mes années d'études.*

*A tous mes amis de la promotion 2011 /2012.*

*Et enfin à toute la famille : Elkalah et Bouhalloufa.*

***Hayat***

## *Liste des abréviations*

**BPA:** Buffered plate agglutination

**CP :** Caprin

**EAT :** Epreuve à l'antigène tamponné

**ELISA:** Enzyme –Linked ImmunoSorbent Assay

**ICFTU:** International complément fixation test units

**INRA:** Institut national des recherches agronomique

**LPS –S:** Lipopolysaccharides-Smooth

**OV :** Ovin

**RB:** Rose Bengale

## *Liste des figures*

**Figure N°01 :** Présentation de la zone d'étude LAGHOUAT

**Graphe N°02 :** La séropositivité et la séronégativité chez les deux espèces (ovines et caprines).

**Figure N°03 :** Résultat reliant les espèces vaccinées avec les temps après vaccination

## *Liste des tableaux*

**Tableau N°1-**Proposition thérapeutique

**Tableau N°2-**Stratégie de contrôle de la brucellose en fonction de la situation épidémiologique

**Tableau N°3-** Prélèvement effectués au niveau de Laghouat

**Tableau N°4-**Tableau croisée reliant les espèces vaccinées avec les deux années d'après vaccination

**Tableau N °5-** table croisé reliant les espèces vaccinées avec les temps après vaccination

## *Liste des photos*

**Photo 1** -Prélèvement

**Photo 2**- Dépôt du sérum

**Photo 3**-Mélange de l'antigène avec le sérum

**Photo 4**-Agitation de l'antigène avec le sérum

**Photo 5**-Interprétation des résultats

**Photo 6**-Réactif (Rose Bengale)

**Photo 7**-Matériel

**Photo 8**- Agitateur et centrifugeuse

**Photo 9**-Sérum

**Photo 10**-Méthode de prélèvement

**Photo 11**-Espèces ovine

**Photo 12**-Espèces caprine

**Photo 13**-Ferme d'étude

**Photo 14**-Le binôme



# *Table De Matières*

**La liste des abréviations**

**La liste des figures**

**La liste des tableaux**

**Introduction**

## **Partie bibliographique**

### **Chapitre I : Généralités sur la Brucellose**

I. Définition .....	1
A- La brucellose zoose majeur .....	1
B- La brucellose animale.....	1
* La brucellose ovine et caprine.....	1
II. Etiologie.....	2
A. Agent pathogène.....	2
B. Culture .....	2
C. Pathogénie .....	2
1. Chez l'animale.....	3
2. chez l'homme .....	3
D. Morphologie .....	3
E. Caractères cultureux .....	3
F. Caractères biochimiques .....	3
G. Caractères biologiques .....	4

### **Chapitre II : Épidémiologie**

I. Epidémiologie .....	5
A- Situation mondiale de la brucellose humaine .....	5
B- Situation mondiale de la brucellose ovine et caprine .....	5
C- La prévalence de la brucellose des petits ruminants en Algérie .....	6

D- Risques professionnels .....	6
E- La situation mondiale de la brucellose .....	7
F- Résistance aux agents physico-chimiques .....	7
G- Source de contagion .....	8
H- Mode de transmission .....	8
1- Transmission verticale .....	8
2- Transmission horizontale directe et indirecte .....	8
* Directe .....	8
* Indirecte.....	8

### **Chapitre III : Etude clinique**

A- Etude clinique .....	9
B- Lésions .....	9
C- Importance économique .....	10
D- Importance hygiénique.....	10
E- Symptômes .....	11
1- Symptômes majeurs .....	11
2- Symptômes mineurs.....	11

### **Chapitre IV : Diagnostic**

I- Les techniques de diagnostic .....	12
A- Diagnostic épidémioclinique .....	12
* Les prélèvements.....	12
B. Diagnostic bactériologique .....	12
C. Diagnostic sérologique .....	14
1- Epreuve à l'antigène tamponné(EAT) : test Rose Bengale .....	14
2- Epreuve de l'anneau sur le lait : Ring test .....	16
3- Séro-agglutination de Wright.....	17

4- Fixation de complément.....	18
5- Epreuve de l'antigène BPA (Buffered plate agglutination).....	19
6- Elisa (Enzyme Like Immuno Sorbent Assay ).....	19
7- Fluorescence Polarization Assay .....	20
D- Diagnostic allergique .....	21

## **Chapitre V: Prophylaxies**

I. Traitement .....	22
A. Traitement curatif .....	22
1. Chez l'animal .....	22
2. Chez l'homme .....	22
B. Les principaux antibiotiques.....	22
II .Prophylaxie .....	23
A. Prophylaxie de la brucellose chez les petits ruminants .....	24
1. Prophylaxie sanitaire .....	25
* Eradication par diagnostic/abattage .....	25
a. Dépistage sérologique .....	25
b. Assainissement des troupeaux infectés .....	26
c. Protection des troupeaux indemnes .....	26
2. Prophylaxie médicale .....	26
- La vaccinothérapie .....	27
* Vaccin Rev1 .....	27
* Le vaccin B19.....	28
* Le vaccin 45 /20 .....	28
* Le vaccin H38 .....	28
3. Prophylaxie mixte .....	28
4. Mesures générales .....	28
* Prophylaxie chez l'homme.....	29

* Education sanitaire et formation .....	29
B. Prophylaxie de la brucellose chez les petits ruminants en Algérie.....	31
1. Définition et réglementation.....	31
2. Prophylaxie médicale .....	31
* Prophylaxie de vaccination 2006 .....	31
* Contraintes rencontrées .....	32
C. Mesure de lutte contre la brucellose humaine et animale.....	32
1- Rôle de la santé .....	32
2- Rôle de l'inspection vétérinaire .....	32
3- Rôle de la commune .....	33

## **Partie II**

### **Etude Expérimentale**

#### **CHAPITRE 1:**

#### **Matériel & Méthodes**

I. Conditions expérimental .....	34
A- Lieu et durée d'étude .....	34
B- Objectif de l'étude.....	34
C- Localisation et caractéristiques de la zone d'étude .....	34
D- Echantillonnage .....	35
II. Matériel et méthodes .....	36
A- Matériel .....	36
B- Méthode.....	36
1- Prélèvements sanguins .....	36
2- Mode opératoire .....	37
a- Dépôt des sérums et d'antigène.....	38
b- Lecture .....	40
c- Interprétation de résultats .....	40

**CHAPITRE 2**  
**Résultats et discussions**

Etude de la relation entre séropositivité des tests sérologique et le temps après la vaccination .....	42
Conclusion .....	46
Références Bibliographiques.....	47
Annexe .....	49

# *Introduction*

# Introduction

Si la brucellose des bovins est aujourd'hui en bonne voie d'éradication en Europe, celle des petits ruminants demeure par contre un problème préoccupant dans tous les pays méditerranéens. Caprins et ovins sont responsables de 80% des brucelloses. Essentiellement à *Brucella mélitensis* et plus rarement à *Brucella abortus bovis*. C'est une zoonose comportant un risque important pour la santé des consommateurs (Cleon, 1988). Le Manuel de sécurité biologique en laboratoire de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) classe les *Brucella* (particulièrement *Brucella mélitensis*) en groupe III de risque qui serait responsable de 500 000 nouveaux cas humains par an dans le monde (Gorvel, 2004). C'est une infection systémique avec des symptômes initialement non spécifiques pouvant évoluer vers des complications touchant tous les organes et nécessitant souvent une hospitalisation et un traitement long et astreignant. Certains patients développent une forme chronique qui peut durer plusieurs années. L'infection se contracte par la consommation de produits laitiers ou par contact des animaux atteints : moutons et chèvres, qui sont infectés par la variété *Brucella mélitensis*, une des plus dangereuses pour l'homme (INVS, 2007).

Au niveau des élevages, la brucellose entraîne des pertes sévères, en provoquant notamment l'avortement des femelles gravides et parfois leur stérilité.

Diverses stratégies ont été adoptées, séparément ou conjointement pour le contrôle puis l'éradication des brucelloses animales. Il est évident que le choix d'une stratégie dépendra de la prévalence de la maladie, du contexte socio-économique et de la volonté politique avec un objectif bien défini, qui peut viser soit l'éradication définitive de la maladie dans un pays ou une zone donnée soit, tout simplement, son contrôle à un niveau de prévalence « acceptable ».

La lutte proposée repose essentiellement sur des méthodes de prophylaxie sanitaire (dépistage et abattage des individus infectés) et médicale (vaccination) (Acha et Szyfres, 1989). Le choix de la stratégie de lutte dépend de la prévalence de l'infection et de l'incidence des avortements brucelliques et des moyens dont disposent les autorités sanitaires pour mener à bien ces programmes (Garin-Bastuji, 1993).

Les vaccins utilisables chez l'animal sont des vaccins vivants atténués développés à partir de souches (*B. mélitensis* Rev.1) pour les petits ruminants. Cette souche représente

actuellement le seul vaccin disponible pour la prophylaxie de la brucellose chez ces espèces (Young, 1995).

Il arrive, par conséquent, à garantir une protection dans plus de 85% des cas. Malgré ce bon score, cette vaccination s'accompagne de deux redoutables inconvénients. D'une part, la souche Rev.1 conserve une certaine pathogénicité résiduelle pour l'animal et pour l'homme (Gorvel, 2004) ce qui la rend impropre à la vaccination des animaux gravides et présente un risque potentiel pour l'homme.

D'autre part, la protection acquise entraîne la synthèse d'anticorps qui sont précisément ceux que détectent les tests de diagnostic sérologiques qui se heurtent à l'existence de résultats faux positifs. Il est donc impossible de distinguer un animal vacciné d'un animal infecté (Pouillot et al., 1998).



# *Partie I*

## *Etude Bibliographique*

# CHAPITRE 1

## Généralités sur la Brucellose

## **I- Définitions**

### **A- La brucellose zoonose majeur :**

Egalement appelée Fièvre de Malte, Fièvre Ondulante, ou Fièvre Méditerranéenne, la brucellose est une des zoonoses majeures à travers le monde, avec la tuberculose bovine et la rage. Cette maladie peut avoir un impact important sur la santé animale et humaine, ainsi que socio économiquement, spécialement dans les pays où le revenu agricole repose largement sur l'élevage et les produits laitiers.

La maladie est due à une exposition au bétail ou à ses productions. La bactérie la plus souvent incriminée est *Brucella melitensis*, puis *Brucella abortus*, *Brucella suis*, et *Brucella canis*. L'infection peut résulter d'un contact direct avec des animaux infectés, ou de la consommation de lait ou de viande crus issus d'animaux infectés. Les voies d'infection sont donc digestive, cutanée (peau lésée), conjonctivale ou respiratoire. Le plus souvent, la contamination se fait par manipulation d'avortons ou d'annexes, ou lors de contacts avec des animaux malades. Elle est donc le plus souvent une maladie professionnelle, touchant éleveurs, vétérinaires, employés d'abattoir et laborantins. L'Homme étant un hôte secondaire ou accidentel, il n'y a pas de transmission interhumaine. (ENVF, 2004).

### **B- La brucellose animale :**

- **Brucellose ovine et caprine :**

Due le plus souvent à *Brucella melitensis*, elle affecte les organes de la reproduction. Il faut bien distinguer la brucellose ovine due à *Brucella melitensis* de l'« épididymite contagieuse du bélier », qui est causée par *Brucella ovis*. Elle est moins répandue dans le monde que l'infection à *Brucella abortus*. Elle suit la répartition de l'élevage ovin, avec une forte présence sur le pourtour de la Méditerranée.

Les pays d'élevage intensif comme l'Australie, la Nouvelle-Zélande, et l'Afrique du sud en sont Indemnes. (ENVF, 2004).

## II- ETIOLOGIE :

### A- Agent pathogène :

Les bactéries du genre *Brucella* sont des parasites intracellulaires qui se présentent sous forme de petits bacilles à Gram négatif du groupe alpha-2 des protéobactéries (ENVF, 2004). Elles sont l'agent de la brucellose, une maladie zoonotique qui affecte une grande variété de mammifères, y compris l'homme.

### B- Culture :

L'agent responsable de la maladie est *Brucella melitensis*, qui a trois biovars, et dont les

Caractéristiques antigéniques sont communes à celles de *Brucella abortus*. Elle se cultive en 48-72h sur gélose et forme alors des colonies lisses, à l'inverse de *Brucella suis* et *Brucella canis* qui donnent des colonies rugueuses. L'infection de petits ruminants par d'autres *Brucella* est possible mais elle reste sans retentissement clinique et ne permet pas de transmission entre les animaux. (ENVF, 2004).

### C- PATHOGENIE :

L'incubation dure 14 à 180 jours chez les petits ruminants, au cours desquels se produit la colonisation locale et régionale par les bactéries. Chez les femelles en gestation, les bactéries se multiplient alors dans le cytoplasme des trophoblastes du chorion (dans le réticulum endoplasmique granuleux).

La libération d'endotoxine dans la circulation sanguine, notamment à la suite d'une septicémie, peut conduire à un choc endotoxinique et à la mort. Les traitements antibiotiques peuvent conduire à une libération importante d'endotoxines. L'importance de cette libération est variable selon les molécules et, d'une manière générale, les antibiotiques peuvent être classés (en allant des molécules faisant libérer les quantités les plus importantes vers les molécules faisant libérer les quantités les plus faibles) de la manière suivante : céphalosporines, pénicillines, aminosides et quinolones. (ENVF, 2004).

**1- Chez l'animal (ovin et caprin) :**

Les ovins ont tendance à se débarrasser spontanément des *Brucella* plus facilement et dans une proportion supérieure aux animaux de l'espèce bovine. Une proportion importante des brebis aurait ainsi tendance à l'auto stérilisation dans un délai de 6 mois à 1an, en période de repos sexuel. Néanmoins, la persistance de l'infection sur un certain nombre d'animaux assure la pérennité de la maladie dans le troupeau. L'avortement ne survient habituellement qu'une fois (Le Minor et Verron, 1989).

**2- Chez l'homme :**

Les *Brucella* sont responsables de septicémie subaiguë (fièvre ondulante sudoro-algique) avec localisations viscérales multiples, articulaires, neuro-méningées ; pulmonaire, hépatique ou testiculaires.... (Alzart, 1986).

**D- Morphologie :**

Ce sont de très petits coccobacilles de 0,6  $\mu\text{m}$  de longueur. Elles sont tantôt isolées, tantôt groupé deux en diplocoques, parfois constituent de courtes chaînettes ou de petits amas (Le Guyon, 1960). Gram négatif, immobiles, non sporulés et aérobies stricts (Flandrois, 1997).

Il y a lieu de signaler l'intérêt de certaines colorations spéciales notamment, la coloration de STAMP et de COSTER (Obre et buttiaux, 1983). Les formes de mutation sont entourées de capsules bien nettes, surtout dans les cultures jeunes. La paroi de *Brucella* contient une endotoxine ou lipopolysaccharides(LPS) dont le pouvoir pathogène n'est pas clairement établi (Flandrois, 1997).

**E- Caractères cultureux :**

La culture des *Brucella* nécessite, au moins au sortir de l'organisme, l'utilisation de milieux enrichis par du sérum ou sang de mouton. Les conditions physiques pour leur croissance est un Ph à 6,8 et une température de 34c° (DE Boeck et Larcier, 1999).

**F- Caractères biochimiques :**

Les *Brucella* possèdent oxydase, catalase et uréase. Elles n'utilisent pas le citrate et ne produisent pas d'indole ni acétyl-méthyl-carbinol (réaction de Voges-Proskauer négative).

L'utilisation des sucres est lente et n'est pas décelée sur les milieux usuels car l'acidification est masquée par la production d'ammoniaque (Cleon. V, 1988 ; DE Boeck et Larcier, 1999).

**G- Caractères biologiques :**

Les brucelles rejetées dans les milieux extérieurs par un animal infecté, peuvent rester vivantes et virulentes très longtemps, si elles sont protégées des rayons ultraviolets du soleil (Oger, 1986).

# CHAPITRE 2

Epidémiologie

**I- Epidémiologie :****A- Situation mondiale de la brucellose humaine :**

L'épidémiologie de la maladie humaine est étroitement liée à l'infection animale.

La fréquence de la maladie humaine est difficile à évaluer en raison de son polymorphisme clinique et de la sous déclaration. Si l'incidence de la maladie est en nette régression dans les pays développés, il n'en est pas de même dans les pays en voie de développement ou elle peut atteindre des taux préoccupants (Frobisher et al, 1975).

L'infection est souvent liée à une exposition professionnelle et est plus particulièrement contractée par les voies orale, conjonctivale ou respiratoire. L'ingestion de produits laitiers constitue, quand à elle, le risque majeur pour la population générale. Le risque est important pour les vétérinaires et les éleveurs qui manipulent les animaux infectés et les avortons ou placentas. La brucellose est l'une des infections acquises au laboratoire les plus fréquentes (INRA, 2007).

Tous foies, à l'échelle mondiale, la brucellose atteint encore plus de 500 000 individus chaque année. L'incidence de la maladie est variable selon les pays et les régions allant de 0,125 à 200 cas / 100 000 habitants (Frobisher et al ; 2007). La situation mondiale de la brucellose humaine peut donc être schématiquement scindée en deux groupes : les infections autochtones fréquentes des pays enzootiques, et les infections rares des voyageurs des pays indemnes de brucellose animale. Ces deux situations se reflètent dans les incidences rapportées : moins de 100 cas par an aux USA depuis de 10 ans, soit une incidence annuelle de 0,036 cas/100 000 habitants et jusqu'à 200 cas / 100 000 habitants aux Moyen-Orient. Dans certains pays enzootiques, l'incidence rapportée est faible en raison de l'absence de système de surveillance ou de leur insuffisance (IVS, 2004).

**B- Situation mondiale de la brucellose ovine et caprine :**

Les échanges commerciaux, le prêt des béliers ou de boucs, et surtout la transhumance jouent un rôle important dans la contamination des cheptels indemnes. Les séjours des animaux dans des pâtures ou des bergeries sont également à incriminer.

L'infection s'étend dans les troupeaux à deux périodes préférentielles : l'époque de la lutte (rôle des béliers et boucs) et la période des mises bas.



Classiquement, en milieu initialement indemne, la maladie se caractérise par des avortements nombreux la première année (jusqu'à 50 à 90 p. cent des femelles dans certains cas) Les avortements deviennent rares l'année suivante (pripares ; femelles nouvellement introduites) et disparaissent ensuite. En réalité, l'infection persiste ; expliquant la réapparition des avortements au bout de quelques années en raison de l'augmentation du nombre des animaux sensibles qui constituent les générations de remplacement et donnant ainsi un aspect cyclique à la maladie.

Dans les régions anciennement infectées (cas des régions méditerranéennes), la brucellose évolutive accompagnée d'avortements est remplacée peu à peu par une brucellose latente, sans symptomatologie perceptible ou révélée par des avortements isolés ou survenant par petites flambées cycliques (Cleon, 1988).

### **C- La prévalence de la brucellose des petits ruminants en Algérie :**

La brucellose animale n'a été recherchée que lorsque l'homme en a été le révélateur.

Cependant, l'initiation au dépistage de cette maladie a été organisée suite à une épidémie qui était déclarée en 1984 à Ghardaïa avec plus de 600 cas cliniques dont 248 cas confirmés par la sérologie à l'institut Pasteur. A la suite de cette épidémie, le ministère de l'agriculture a mené une étude épidémiologique qui avait touché les trois espèces bovine, caprine et ovine à l'échelle nationale avec une collaboration étroite entre les services médicaux et les services vétérinaires. La mélitococcie était implantée en particulier dans les zones de transhumance où le brassage des animaux rendait plus difficile sa maîtrise sanitaire. L'absence de spécificité d'hôte qui caractérise la plupart des espèces du genre *Brucella* explique l'interdépendance qui peut exister entre les brucelloses des diverses espèces animales et les conséquences épidémiologiques qui en découlent (Cleon, 1988).

### **D- Risques professionnels :**

Parmi les infections acquises au laboratoire, la brucellose est la plus fréquemment signalée.

La brucellose est considérée comme une maladie professionnelle chez :

- Les vétérinaires ;
- Les bouchers ;
- Les taxidermistes ;

- Les agriculteurs ;
- Les biologistes ;
- Le personnel de laboratoire. (Salim, 2008).

#### **E- La situation mondiale de la brucellose :**

Elle est d'abord hygiénique, en raison du fort pouvoir pathogène de la bactérie pour l'Homme, qui peut se contaminer par contact direct avec les animaux infectés ou par la consommation de lait et de fromages frais. Quant à son importance économique, elle tient aux pertes engendrées par les avortements et les cas de stérilité, ainsi qu'aux conséquences sur la commercialisation des produits. Elle provoque également une hausse du taux de mortalité périnatale, des morts chez les femelles, et une baisse des productions.

Elle est donc inscrite en France sur la liste des maladies réputées contagieuses et des vices rédhibitoires, et elle appartient à la liste des maladies prioritaires de l'Office International des Epizooties.

Les brucelles rejetées dans les milieux extérieurs par un animal infecté, peuvent rester vivantes et virulentes très longtemps, si elles sont protégées des rayons ultraviolets du soleil (Oger, 1986).

#### **F- Résistance aux agents physico-chimiques :**

Le LPS est très résistant à de nombreux agents physiques ou chimiques. Il ne peut pas être détoxifié par l'action conjointe du formol, du vieillissement et de la chaleur et il n'est donc pas transformable en anatoxine contrairement à ce qui est observé pour certaines toxines protéiques.

L'hydrolyse par les acides ou les bases ou l'oxydation (par le permanganate, les hypochlorites,...) du LPS est possible mais il faut utiliser les agents chimiques dans des conditions telles qu'ils altèrent les autres constituants biologiques et qu'ils modifient l'antigénicité du LPS.

La thermo résistance est très élevée. Pour détruire l'activité endotoxinique il faut un chauffage de 7 heures à 126 °C ou un chauffage de 30 minutes à 145°C en chaleur humide et, dans un four, il est nécessaire de chauffer 7 heures à 170°C ou 30 minutes à 250°C. (Akermi, 2008).

**G- Source de contagion :**

Elles sont représentées par les ovins et caprins malades ou infestés (surtout en période d'agnelage), et éventuellement d'autres espèces animales infectés (bovins, chiens, ruminants sauvages...). Le bélier ou le bouc peuvent jouer un rôle important dans la persistance et la dissémination de l'infection (fréquence des formes inapparentes, persistance du portage). La persistance du germe dans l'environnement joue également un rôle important. (Akermi, 2008).

**H- Mode de transmission :****1- Transmission verticale :**

Elle peut se réaliser in utero (naissance d'un nouveau viable mais infecté) ou lors du passage du nouveau né dans la filière pelvienne. Les jeunes ; plus résistants, se débarrassent généralement de l'infection. L'infection persiste toutefois jusqu'à l'âge adulte chez environ 5 à 10% des produits nés de mère brucellique, sans susciter de réaction sérologique décelable. Les signes cliniques (avortement éventuel) et la réaction sérologique n'apparaîtront, chez les jeunes femelles infectées, qu'à la faveur de la première gestation (Ganière et al. 2008).

**2- Transmission horizontale directe et indirecte :**

- **Directe :** contacts directs entre individus infectés et individus sains lors de la cohabitation (notamment en période de mise bas), ingestion, contamination vénérienne.

**Indirecte :** Par l'intermédiaire des locaux, pâturages, véhicules de transport, aliments, eaux, matérielvivers (matériel de vèlage) contaminés par les matières virulentes.(Garnière et al. 2008).

# CHAPITRE 3

Etude clinique

**A- Etude clinique :**

Il n'y a aucune atteinte de l'état général lors d'infection aiguë. Les formes inapparentes sont plus fréquentes chez les caprins que chez les ovins. Une forme chronique asymptomatique existe chez les femelles, avec une colonisation du système lymphoréticulaire. Après une première réponse immunitaire, les symptômes et les anticorps disparaissent alors et les animaux restent porteurs asymptomatiques.

Les symptômes génitaux sont les plus fréquents, notamment l'avortement, qui a lieu surtout chez les femelles primipares, pendant le dernier tiers de gestation (40 à 90% des femelles). Dans 10-15% des cas, il se produit plusieurs avortements chez la même femelle.

En cas de mise bas à terme, la mortalité périnatale est très forte dans les 24 heures suivant la mise bas. Si le petit survit, il peut devenir porteur chronique. La rétention placentaire est moins fréquente que chez les bovins, mais une stérilité temporaire est couramment observée chez les femelles infectées.

L'infection des mâles est généralement inapparente, avec parfois des orchites ou épididymites. Des mammites se déclarent parfois, et peuvent toucher beaucoup d'animaux, au stade clinique, avec des nodules inflammatoires et du lait grumeleux. Les arthrites et bursites sont rares chez les petits ruminants. (Philippon et al, 2005).

**B- Lésions :**

Les plus courantes sont des rétentions placentaires et des endométrites, plus fréquentes chez les caprins que chez les ovins. Les femelles ayant avorté présentent souvent une métrite suppurative avec des suffusions hémorragiques sur les cotylédons, ainsi qu'une endométrite. Dans le placenta, on peut observer une infiltration gélatineuse jaunâtre, et des fausses membranes fibrineuses, localisées sur une partie ou généralisées.

Les symptômes sont très variés, avec une maladie plus sévère pour *Brucella melitensis* que pour *Brucella abortus*, la première étant la plus pathogène pour l'Homme et provoquant même de nombreux décès.

La brucellose est asymptomatique dans environ un cas sur deux. Son incubation dure cinq à trente jours ou plus, puis il se développe une maladie plus ou moins sévère. Dans la forme aiguë, on observe une grande faiblesse, des douleurs musculaires et articulaires, des maux de tête, une forte fièvre (ondulante pour *Brucella abortus* ou fièvre de Malte pour *Brucella*

*melitensis*), des tremblement, une hépatomégalie, une splénomégalie, des sudations nocturnes d'odeur caractéristique, ainsi que des troubles digestifs parfois (constipation). Les localisations cliniques sont donc aussi nombreuses que diverses : ostéoarticulaire, urogénitale, nerveuse, hépatique, cardiovasculaire, glandulaire... L'évolution est possible sur plusieurs semaines ou mois, et des complications peuvent apparaître, comme des encéphalites, névrites périphériques, arthrites suppurées, endocardites végétantes... La mortalité est négligeable.

La forme chronique dure quant à elle plusieurs années, sans foyer d'infection localisée.

Il existe enfin des réactions d'allergie à *Brucella abortus*, provoquant des lésions cutanées papuleuses ou pustuleuses sur les mains. Les méthodes globales de prévention sont : la pasteurisation du lait, la vaccination du bétail, et l'élimination des animaux infectés. De plus, pour les professionnels, le port de protections est indispensable lors de la manipulation d'avortons, de placentas et de tout produit issu du tractus génital femelle. Plus généralement, tout contact avec des animaux suspects de brucellose doit être évité. Le traitement repose sur une double antibiothérapie avec doxycycline et rifampicine

(Ou streptomycine) pendant six semaines. On observe alors environ 5% de rechutes pour les meilleurs protocoles. (IVS, 2004).

### **C- Importance économique :**

Forte

Avortements, chutes de production Forte ;

Avortements, chutes de production Moyenne ;

Baisse du taux de natalité du troupeau Forte ;

Inaptitude au travail Faible Forte ;

Traitement et prévention coûteux. (Djendel, 2000).

### **D- Importance hygiénique :**

Forte Zoonose. (Djendel, 2000).

**E- Symptômes :****1- Symptômes majeurs**

Avortement, mortalité périnatale, rétention placentaire Avortement, mortalité périnatale, stérilité temporaire Inflammation de la queue de l'épididyme, baisse de la fertilité Souvent asymptomatique

Avortement, mortalité périnatale, stérilité temporaire Lésions suppuratives chroniques Avortement et stérilité avec *B.canis*.

Souvent inapparente avec autres *Bucella* Douleurs musculaires et articulaires, fièvre...

**2- Symptômes mineurs :**

Infécondité temporaire, arthrites, bursites, rétention placentaire, mammites, avortements. (Djendel, 2000).

# CHAPITRE 4

Diagnostic



## **I- Les techniques de diagnostic :**

### **A- Diagnostic épidémiologique :**

Il est difficile à réaliser car les symptômes de la brucellose sont tardifs et peu spécifiques. En effet, après une longue période asymptomatique, la maladie est subclinique chez la plupart des animaux. Cependant, le recueil des commémoratifs du troupeau peut faciliter une suspicion. Le diagnostic de laboratoire est donc toujours nécessaire, par isolement de la bactérie ou mise en évidence d'anticorps dans le sérum.

Une suspicion de brucellose bovine peut être émise lors de : avortement isolé ou en série, mort d'un veau en anoxie dans les 48h après la mise bas, fréquence anormale des rétentions placentaires, hygromas, et orchite/épididymite chez le mâle.

Pour les petits ruminants, un troupeau est suspecté de brucellose lors d'avortements en phase terminale de gestation, de mortalité post natale, ou d'atteinte des organes génitaux mâles.

Enfin, des symptômes chez l'Homme tels que de la fièvre, des boiteries, des douleurs musculaires... doivent également entraîner une suspicion de brucellose. (Frohiher et Fuerst, 1975).

#### **• Les prélèvements :**

Les plus souvent utilisés pour le diagnostic de laboratoire sont : des calottes placentaires, du liquide utérin, l'avorton lors d'un avortement, ou du sang. On utilise aussi parfois du colostrum, du sperme, des sécrétions vaginales, ou du tissu et des nœuds lymphatiques. Le dépistage est possible à partir de sang sur tube sec ou de lait de mélange récolté dans le tank. (Frohiher et Fuerst, 1975).

### **B- DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE :**

Il est réalisé par examen microscopique avec colorations, ou par culture en milieux sélectifs, permettant une identification de genre et espèce. Les échantillons les plus intéressants pour sa réalisation sont : des cotylédons issus du placenta, des excréments vaginales, ou du poumon, foie et contenu abomasal du fœtus.

Ces prélèvements doivent être fixés avec la chaleur ou l'éthanol avant d'être colorés par les méthodes de Stamp, Köster, ou Macchiavello. L'observation d'agrégats intracellulaires

permet alors d'émettre une suspicion de brucellose. Mais la morphologie de la bactérie est la même que celle de *Coxiella Burnetti*, *Chlamydophila abortus* et des confusions peuvent avoir lieu. Ces bactéries sont résistantes à la décoloration par les acides faibles et apparaissent donc colorées en rouge sur fond bleu par la coloration de Stamp.

Cependant, ces méthodes de coloration ont une faible sensibilité lorsqu'elles sont réalisées sur le lait ou les produits laitiers, où les *Brucella* sont souvent présentes en faible nombre et où l'interprétation est rendue difficile par la présence de globules gras. Toute coloration, positive ou non, doit donc être confirmée par une mise en culture.

Un isolement et une mise en culture de *Brucella* peuvent être réalisés sur milieux solides classiques, qui limitent la formation de mutants « rough » et le développement de contaminants. Cependant, il est recommandé d'utiliser des milieux liquides pour les échantillons volumineux ou pour pratiquer un enrichissement. Les milieux les plus utilisés sont le « Trypticase-Soy Agar » ou le « Serum Dextrose Agar ».

La culture sur milieu sélectif permet d'éviter la croissance d'autres espèces de bactéries. Le plus utilisé est le milieu de Farrell, qui est préparé par addition de six antibiotiques à un milieu de culture classique. Un enrichissement peut être pratiqué lorsque la culture est réalisée à partir de prélèvements pauvres en bactéries, comme le lait ou le colostrum.

Au bout de trois ou quatre jours d'incubation, des colonies rondes de 1-2 mm de diamètre apparaîtront, bombées, transparentes, de couleur miel, lisses, luisantes, et à contours réguliers. Ces colonies deviennent avec le temps plus grosses et plus foncées.

L'identification d'espèce et le biotypage peuvent être réalisés grâce à des techniques de phago-lyse et sur culture bactérienne, à partir de critères biochimiques et sérologiques. Une technique de PCR récemment mise au point permet également la détection et l'identification de *Brucella*, et plusieurs techniques moléculaires, comme la PCR, la RFLP, et le Southern Blot permettent de différencier les espèces de *Brucella* et certains de leurs biovars.

Les souches vaccinales sont identifiables par certaines techniques bactériologiques (Milieux sélectifs), ainsi que par PCR (mais son intérêt est limité). (Cleon, 1988).

### C- DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE :

Le diagnostic et le dépistage sérologiques sont très utilisés, sur sérum ou lait. Les anticorps détectés sont ceux dirigés contre les épitopes du LPS, ce qui entraîne des problèmes de parenté entre *Brucella abortus* et d'autres bactéries. En effet, lorsque la prévalence est faible, la valeur prédictive de ces tests diminue car beaucoup de faux positifs apparaissent, notamment à cause d'une réaction croisée avec *Yersinia enterocolitica*. De plus, l'intensité et la durée de la réponse humorale sont très variables en fonction des individus et des doses infectieuses, avec aussi des variations qualitatives. La période la plus efficace pour réaliser ce test chez les petits ruminants est le post-agnelage, puisque les titres en anticorps sont alors très élevés. Mais aucun de ces tests ne détecte tous les animaux infectés.

La réalisation de ces tests doit suivre les standards internationaux définis par l'Office International des Epizooties, et les réactifs utilisés doivent avoir été produits en respectant les standards décrits. Ainsi, pour la production d'antigènes de diagnostic, seules les souches S99 (Weybridge) ou 1119-3 de *Brucella abortus* peuvent être utilisées. Ces souches doivent être complètement « smooth » et ne doivent pas agglutiner en milieu salin. Elles doivent provenir de cultures pures et se montrer conformes aux caractéristiques de *Brucella abortus* biovar 1 d'indépendance vis-à-vis du CO<sub>2</sub>. (Ferron, 1984).

#### 1- Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) = Test Rose Bengale :

L'antigène utilisé est une suspension de *Brucella abortus* (souche 99 de Weybridge) inactivée par la chaleur et le phénol (0,5%), diluée en tampon acide puis colorée par le Rose Bengale. Il doit être conservé entre 2 et 8°C, à l'obscurité, et ne doit surtout pas être congelé.

Selon les normes de l'Office International des Epizooties, l'antigène pour le test au Rose Bengale est préparé en récupérant par centrifugation des souches 99 de *Brucella abortus* tuées, et en les remettant en suspension dans du phénol salin. Pour chaque 35 mL de cette suspension, on rajoute 1 mL de Rose Bengale à 1 % dans de l'eau distillée ; et le mélange est agité pendant deux heures à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré et centrifugé pour recueillir les cellules colorées, remises en suspension au taux de 1g de cellules pour 7 ml de diluant (hydroxyde sodique, phénol, acide lactique). La couleur de cette suspension doit être rose

intense, et le surnageant doit être sans colorant. La suspension est de nouveau filtrée à plusieurs reprises, puis conservée à l'obscurité et au frais.

Ce test permet le diagnostic sérologique des brucelloses (*melitensis*, *suis*, *abortus*) sur lame, en milieu acide tamponné (pH 3,65 ±0,05). Le tampon acide permet d'augmenter la spécificité car l'activité agglutinante des immunoglobulines G augmente en pH acide (le Test d'Agglutination de plaque, présenté page 45, utilise également un antigène brucellique tamponné). C'est une des méthodes les plus faciles à mettre en oeuvre et la plus largement utilisée pour la mise en évidence des anticorps brucelliques dans les sérums.

L'antigène et le sérum à analyser sont mélangés à volumes égaux, et après 4 minutes de contact, la présence d'anticorps se traduit par la formation d'agglutinants visibles à l'œil nu. S'il n'y a pas d'anticorps spécifiques, le mélange reste homogène.

Le mode opératoire est le suivant :

- Placer l'antigène et les sérums à température ambiante (18-23°C), 30 à 60 minutes avant le début du test
- Sur une plaque, déposer 30 µL de chacun des sérums à tester
- Agiter doucement le flacon d'antigène
- Déposer 30 µL d'antigène coloré à côté de chacun des sérums
- Mélanger soigneusement l'antigène et le sérum
- Agiter la plaque pendant quatre minutes exactement et lire immédiatement

Il est préférable d'avoir un témoin positif (sérum infecté) et un témoin négatif.

Pour l'interprétation, une absence d'agglutination signifie qu'il n'y a pas d'anticorps dans le sérum, tandis que l'existence d'une agglutination, aussi minime soit elle, signale la présence d'anticorps anti-*Brucella*.

Ce test est très sensible, en particulier chez les animaux vaccinés. En effet, le vaccin peut provoquer une forte réponse en anticorps, et interférer alors avec les tests sérologiques.

Des faux négatifs peuvent apparaître, et seront détectés en renouvelant le test à au moins trois mois d'intervalle.

Simple et rapide, ce test est donc surtout utilisé en dépistage. Une fixation du complément ou une ELISA sont ensuite nécessaires pour confirmer les positifs ou douteux.

Pour les petits ruminants, c'est le test le plus utilisé en dépistage, avec une sensibilité de 90% et une détection des anticorps plus précoce que pour la fixation du complément.

Cependant, la sensibilité de ce test peut beaucoup varier en fonction de la situation épidémiologique de la maladie. (Cleon, 1988).

## **2- Epreuve de l'anneau sur le lait = Ring Test :**

C'est une réaction d'agglutination qualitative obtenue par interaction des anticorps contenus dans le lait dirigés contre le LPS bactérien avec un antigène coloré par l'hématoxyline. Les agglutinats colorés sont adsorbés sur les globules gras et se regroupent en surface dans l'anneau de crème.

L'antigène utilisé est une suspension de *Brucella abortus* (souche 99 de Weybridge) inactivée par la chaleur et le phénol (0,5%), et colorée à l'hématoxyline. Il doit être conservé entre 2 et 8°C, sans être congelé.

Selon les normes de l'Office International des Epizooties, la production de cet antigène se fait à partir d'une suspension de souches 99 de *Brucella abortus* tuées, centrifugée puis remise en suspension dans une solution d'hématoxyline colorant. Après avoir reposé 30 minutes à température ambiante, le mélange violet est additionné de 940 mL de sulfate d'ammonium aluminium à 10%. La solution doit être gardée à température ambiante pendant 45-90 jours. Avant utilisation, la solution est mélangée et filtrée. La solution finale a une concentration de un gramme de cellules pour 30 mL de colorant et est conservée 48h à température ambiante. Elle est ensuite re-centrifugée et lavée trois fois, pour avoir un pH de 3.0. Les bactéries sont finalement remises en suspension au taux de 1 gramme pour 27 mL de diluant (phénol, acide citrique, hydrogène phosphate disodique), et filtrées une dernière fois.

Permettant la mise en évidence des anticorps brucelliques dans le lait, cette technique est très simple et bien adaptée à la surveillance épidémiologique des cheptels laitiers.

Le mode opératoire est le suivant :

- Placer l'antigène une heure à température ambiante (18-23°C) avant le début des tests
- Agiter avec soin l'antigène au moment de l'emploi

- Homogénéiser les laits à tester par agitation (après les avoir conservés au moins 24h à +4°C), puis les répartir en tubes de 1 mL (il faut du lait non dilué pour analyser du lait de mélange, et du lait dilué de 1/1 à 1/16 dans un lait négatif pour analyser du lait individuel). La taille de la colonne de lait dans le tube doit être d'au moins 25 mm. Les échantillons de lait ne doivent pas avoir été congelés, chauffés ou violemment remués.

- Ajouter 50 µl d'antigène
- Mélanger soigneusement
- Incuber une heure à l'étuve à 37°C, puis 18 à 20h entre +2 et +8°C
- Effectuer la lecture (une incubation de toute une nuit à 4°C augmente la sensibilité du test et permet une lecture plus facile)

Il est préférable d'avoir comme témoins un lait positifs et un lait négatif.

Pour l'interprétation, si l'anneau de crème est moins coloré que le lait sous jacent, cela signifie qu'il n'y a pas d'anticorps, tandis que si l'anneau de crème est plus ou autant coloré que le lait sous jacent, des anticorps doivent être présents. Une réaction fortement positive est indiquée par la formation d'un anneau bleu/violet au dessus d'une colonne de lait, mais tout dépôt bleu à l'interface entre le lait et la crème doit être considéré comme positif car il peut être révélateur, surtout dans les gros troupeaux. Un lait individuel est considéré comme positif à partir de la dilution au 1/8.

Ce test est très sensible, mais des faux positifs peuvent apparaître chez les animaux récemment vaccinés (moins de 4 mois post-vaccin) ou dans des échantillons contenant du lait anormal (colostrum ou lait de mammite). Quand ce test est positif, il est nécessaire de tester individuellement tous les animaux pour détecter et pouvoir éliminer les malades. Il peut être utilisé pour le dépistage de la brucellose bovine, mais il n'est pas utilisable chez les petits ruminants. Dans les grands troupeaux, sa sensibilité diminue. (Le Minor, et Verron, 1989).

### **3- Séro-agglutination de Wright :**

C'est une technique d'agglutination lente en tubes. Des dilutions de sérum à titrer sont mises en présence de quantités constantes d'antigènes brucelliques, puis ces dilutions sont mises à incuber une nuit à 37°C.

Lorsque le sérum est positif, il se forme des complexes antigène/anticorps qui précipitent en formant un culot, tandis que le surnageant devient transparent. Lorsque le sérum est négatif, le mélange réactionnel reste opaque.

Ce test, moyennement sensible et très peu spécifique, n'est pas reconnu comme test de référence par les organismes internationaux. (Flandrois, 1997).

#### **4- Fixation du Complément :**

Cette technique est très utilisée comme test de confirmation mais elle est compliquée à réaliser, demande un équipement de laboratoire sophistiqué et une équipe bien formée. La fixation du complément peut être réalisée à chaud (37°C pendant 30 minutes) ou à froid (4°C pendant 14-18 heures), avec des caractéristiques légèrement différentes, à adapter à la qualité des sérums testés.

Le protocole est le suivant :

- Des dilutions successives du sérum inactivé sont mises en présence de concentrations constantes d'antigène brucellique ainsi que de complément titré, puis le tout est mis à incuber, au chaud ou au froid.
- Les anticorps éventuellement présents dans le sérum analysé forment des complexes

antigène/anticorps, propres à fixer le complément (s'il n'y a pas d'anticorps spécifiques, le complément reste libre).

- La présence de complément libre est mise en évidence par addition d'un complexe hémolytique : globules rouges de mouton + sérum hémolytique correspondant.

Si des anticorps spécifiques de *Brucella abortus* sont présents, il y a absence d'hémolyse, tandis qu'en l'absence de ces anticorps, une hémolyse se produit.

Il est indispensable de mettre en place différents témoins pour pouvoir interpréter les réactions : un témoin sérum, un témoin antigène, un témoin complément et un témoin globules rouges.

L'interprétation des résultats est standardisée : il existe un système d'unité pour la lecture, basé sur le sérum standard de l'Office International des Epizooties, qui contient 1000 ICFTU (International Complement Fixation Test Units) par millilitre. Chaque laboratoire pratiquant ce test doit donc être agréé pour que ses résultats soient interprétables suivant les

normes internationales. Ainsi, les sérums donnant un titre équivalent à 20 ICFTU/mL ou plus sont considérés comme positifs.

Ce test est très spécifique, mais certains faux positifs peuvent apparaître à cause du vaccin S19. Les femelles vaccinées avec le vaccin S19 entre 3 et 6 mois sont considérées comme positives si le sérum donne une fixation positive à un titre de 30 ou plus ICFTU/mL lorsque les animaux sont testés à l'âge de 18 mois ou plus. (cleon, 1988).

#### **5- Epreuve de l'antigène BPA (Buffered Plate Agglutination) :**

C'est une méthode rapide et facile, utilisant un principe d'agglutination rapide sur lame en milieu acide tamponné (pH 3,7), ce qui permet d'éliminer les agglutinations non spécifiques. Les colorants utilisés sont le cristal violet et le vert brillant.

Le sérum est mélangé avec l'antigène, puis la plaque est agitée, avant d'être incubée quatre minutes dans une chambre humide à température ambiante, et ceci deux fois de suite.

Ressortie finalement, elle est agitée encore une fois avant d'effectuer la lecture. Lorsque l'antigène coloré en bleu est mis en présence de sérums contenant des anticorps spécifiques, il se forme alors des agglutinats visibles à l'oeil nu.

Ce test est très sensible, notamment pour la détection d'anticorps vaccinaux, mais les positifs doivent être confirmés par un test plus spécifique.

#### **6- ELISA (Enzyme Like Immuno Sorbent Assay):**

Pour la réalisation de ce test, le LPS de *Brucella* est fourni fixé sur les parois des puits des microplaques en polypropylène. Les sérums ou laits à tester sont dilués et mis à incuber dans les puits. S'il y a des anticorps spécifiques, il se forme alors des complexes

LPS/anticorps fixés sur les parois du puits. Après lavage, une immunoglobuline anti-anticorps couplée à une enzyme est mise à incuber, et ce conjugué se fixe sur l'immun complexe. Après un deuxième lavage, le substrat de l'enzyme (TMB) est ajouté dans les puits.

Si l'immun complexe est présent, l'enzyme assure la transformation du substrat en un composé bleu, devenant jaune après blocage. L'intensité de la coloration mesure le taux d'anticorps présents dans l'échantillon. Le seuil de positivité est fixé à partir d'un échantillon de contrôle positif à introduire sur chaque microplaque.



L'ELISA indirecte est un test très sensible mais il ne permet pas toujours de différencier les animaux infectés des vaccinés et est donc plutôt utilisé en dépistage. Tandis que l'ELISA de compétition est lui très spécifique, et évite la plupart des réactions dues aux anticorps vaccinaux du vaccin S19. On l'utilise donc pour la confirmation sur des animaux vaccinés. (Benkirane, 2004).

#### **7- Fluorescence Polarisation Assay :**

C'est une technique simple et rapide de mesure d'interaction antigène/anticorps, qui peut être pratiquée aussi bien en laboratoire que sur le terrain. Elle est recommandée comme test de référence dans le cadre du commerce international.

Le mécanisme de ce test est basé sur la rotation aléatoire des molécules en solution. La taille des molécules étant le principal facteur influençant le taux de rotation, qui y est inversement proportionnel, une petite molécule tourne plus vite qu'une grosse. Si une molécule est marquée avec un fluorochrome, le temps de rotation pour faire un angle de  $68,5^\circ$  peut être déterminé en mesurant l'intensité de la lumière polarisée dans des plans horizontaux et verticaux. Une grosse molécule émet ainsi plus de lumière dans un plan simple (plus polarisée) qu'une petite molécule, qui tourne plus vite et qui émet plus de lumière dépolarisée.

La sensibilité et la spécificité de ce test sont proches de celles de l'ELISA de compétition. Sa spécificité pour les animaux vaccinés avec le vaccin S19 est proche de 99%.

Cependant, l'interprétation des résultats n'a pas encore été standardisée.

En conclusion, selon les recommandations de l'Office International des Epizooties, le test Rose Bengale, le BPAT (Buffered Plate Agglutination Test), l'ELISA et le test en lumière polarisée sont des bons tests de dépistage. Mais les positifs doivent toujours être confirmés en raison de leur manque de spécificité.

Le test de séro-agglutination est considéré comme non satisfaisant pour des fins de commercialisation. Le test de fixation du complément est plus spécifique et a un système standardisé d'interprétation quantitative. Les performances de l'ELISA et du test en lumière polarisée sont quand à elles comparables ou meilleures que celles du test de fixation du complément, et comme ils sont plus simple techniquement, ils devraient être utilisés en priorité.

Dans les autres espèces animales, comme les buffles, les bisons d'Europe et d'Amérique, les yaks, les wapitis et les chameaux, les mêmes procédures sérologiques peuvent être utilisées (puisque la pathogénie est identique), mais chaque test doit être validé pour l'espèce animale étudiée. (Gorvel, 2004).

#### **D- DIAGNOSTIC ALLERGIQUE**

Le dépistage allergique consiste en la mise en évidence de l'immunité cellulaire.

C'est une intradermo-réaction à la brucelline. La réaction est considérée positive lorsque l'épaississement du pli cutané, constaté 72h après l'injection, est supérieur à deux millimètres.

Cette réaction est spécifique mais peu sensible (beaucoup de faux négatifs).

C'est une réaction d'hypersensibilité retardée suite à l'injection dans le derme de *Brucella*. Elle est peu utilisée en routine, avec une bonne spécificité mais une sensibilité moyenne. C'est donc un bon test complémentaire des approches sérologiques mais il ne permet pas non plus de différencier un infecté d'un vacciné. Il n'est jamais mis en oeuvre en pratique.

Chez les petits ruminants, on pratique une injection par voie sous-cutanée à la paupière inférieure. Une réaction locale nettement positive se produit au bout de 48h chez les infectés: oedème de la paupière et de la région zygomatique. C'est un moyen de dépistage des troupeaux infectés (et non des animaux infectés), car il y a beaucoup de faux négatifs. (Eric et al, 2007).

# CHAPITRE 5

## Prophylaxie

**I- Traitement :****A- Traitement curatif :****1- Chez l'animal :**

Le traitement curatif de la brucellose ne peut envisager, car cette maladie entraîne l'abattage. Toutefois dans un troupeau infecté. On peut utiliser des traitements considérés comme susceptibles d'empêcher l'avortement. Dans ce cas l'antibiothérapie est le seul traitement efficace dans la brucellose aiguë et la brucellose subaiguë focalisée (Cazenav. 1972).

**2- Chez l'homme :**

Le traitement curatif de la brucellose repose essentiellement sur l'antibiothérapie. Le but est de traiter la maladie et d'éviter les complications et les rechutes. (Cazenav. 1972).

**B- Les principaux antibiotiques :**

- Les familles d'antibiotiques :
  - Cyclines : (Oxytétracycline, Doxycycline) activité bactéricide; antibiotiques actifs au Ph acide des phagolysosomes.
  - Aminosides : (Streptomycine, gentamycine) rapidement bactéricide ; antibiotique surtout actif en secteur extracellulaires ; synergique en association avec les cyclines.
  - Rifamycines : (Rifampicine) bonne diffusion tissulaire et intracellulaire ; activité bactéricide en intracellulaire et en Ph acide ; synergique en association avec les cyclines.
  - Sulfamides : (Triméthoprime, Sulfaméthoxazole) bonne diffusion intracellulaire uniquement pour le triméthoprime ; activité variable en fonction des souches testées.
  - Fluoroquinolones : (Ofloxacine, ciprofloxacine) bonne diffusion tissulaire et intracellulaire ; diminution nette de leur activité et faible pouvoir bactéricide en Ph acide.
- La prescription d'une monothérapie et/ou d'un traitement de courte durée s'accompagne d'un taux élevé d'échec thérapeutique et de rechute à l'arrêt de traitement. Afin d'éviter les rechutes, l'antibiothérapie de la brucellose repose

obligatoirement sur une association d'antibiotiques pendant une durée prolongée.

**Tableau N°1 : Propositions thérapeutiques (Chakroun et al.2007)**

<b>Stades de la maladie et terrains</b>	<b>Protocoles thérapeutique</b>	<b>Durée du traitement</b>
Brucellose aigue	Cycline+aminoside ou Cycline+rifampicine	45 jours (14 à 21 jours pour la streptomycine. 7 jour pour la gentamicine. 21 à 45 jours pour la rifampicine)
Brucellose ostéo-articulaire	Cycline+rifampicine+ aminoside	3 à 6 mois (21 jours pour la streptomycine, 8 à 15 jours pour la rifampicine)
Endocardite brucellienne	Cycline+rifampicine+ aminoside	6 à 12 semaines (21 à 30 jours pour la streptomycine, 15 jours pour la gentamicyne). Durée plus longue.
Brucellose neuro-méningée	Rifampicine+ Cotrimoxazole+ aminoside ou rifampicine+ fluoroquinolone+ aminoside	8 à 12 semaines ( 21 jours pour la streptomycine, 8 à 15 jours pour la gentamicine).
Femme enceinte	Rifampicine seule ou rifampicine+ cotrimoxazole	45 jours. Arrêt du cotrimoxazole 8 à 15 jours avant terme.
Enfant < 8 ans	Cotrimoxazole+ rifampicine ou cotrimoxazole+ aminoside	45 jours (21 jours pour la streptomycine, 7 jours pour la gentamycine).
Sujets âgés	Cycline+ rifampicine	45 jours

## **II- Prophylaxie :**

Souvent, la lutte contre les zoonoses a pour objectif la protection de la santé publique. Les modalités d'action et le niveau doivent dépendre d'une part, des éléments d'épidémiologie analytique propres à l'infection et, d'autre part des conséquences de la maladie chez l'homme (gravité et fréquence). (Barbara et Marc, 2007).

Les programmes de surveillance et de lutte mis en œuvre dans les différents pays n'ont enregistré que de succès limités ou se sont révélés vains.

L'objectif prioritaire tel que le programme méditerranéen de lutte contre les zoonoses qui contribuent à la protection de la santé publique et au développement socio-économique dans cette partie du monde reste limités, car de nombreuses maladies émergentes sont des zoonoses.

La brucellose humaine transmise à partir des animaux de la ferme telle que les bovins, les moutons et les chèvres est considérée comme l'une des zoonoses les plus répandues du monde et est rapportée dans au moins 56 pays (Aggad, 2004).

Dans ce contexte, diverses stratégies ont été adoptées, séparément ou conjointement pour le contrôle puis l'éradication des brucelloses animales.

Deux stratégies prophylactiques peuvent permettre de maîtriser les maladies animales réputées contagieuses : les mesures médicales (chimio prévention et surtout vaccination) et les mesures sanitaires qui doivent éviter la contamination des animaux sains (mesures défensives) ou éliminer l'agent pathogène en cause (mesures offensives). Le plus souvent, une lutte efficace combine ces mesures en tentant de contrôler la source de l'agent pathogène, ses modes de transmissions et ses hôtes réceptifs. (Aggad, 2004).

#### A- Prophylaxie de la brucellose chez les petits ruminants

**Tableau N°2 :** Stratégie de contrôle de la brucellose en fonction de la situation épidémiologique (Benkirane.A, 2001)

Situation épidémiologique	Stratégie de contrôle et mesures d'accompagnement	Méthode de surveillance	Résultats recherchés
A.*prévalence élevée chez les animaux. *Incidence clinique élevée chez les humains	*Vaccination de masse *Appui aux services vétérinaires *Utilisation rationnel des ressources *Contrôle des déplacements	Sérologie décevante (tests appropriés) Bactériologie Suivi de l'incidence chez l'homme	Passer à B
B.Prévalence modérée	Prophylaxie mixte	*Recensement et identification des	

		animaux *Contrôle sérologique *Suivi bactériologique *Communication active *Coopération avec le ministère de la santé	Passer à C
C.Prévalence faible <1%	Prophylaxie sanitaire	*Surveillance dans les étables et aux abattoirs *suivi sérologique *Enquête dans les groupes cibles	Attendre D
D.Absence de la maladie	Contrôle les mouvements	Surveillance des indicateurs de risque	Maintenir cet état

### 1- Prophylaxie sanitaire :

#### ❖ Eradication par diagnostic /abattage :

##### a- Dépistage sérologique :

La prophylaxie sanitaire repose sur un dépistage essentiellement immunologique des animaux infectés. Les épreuves sérologiques :le Rose Bengale, la séro-agglutination lente en tubes , fixation du complément, le test immun enzymatique (ELISA) compétitif qui est actuellement disponible pour le diagnostic de la brucellose à B.abortus. Néanmoins son utilisation nécessite encore d'être correctement validée et standardisée. Des tentatives d'adaptation de ce test à l'infection à l'aide de B.melitensis sont actuellement en cours, (Benkirane, 2001).

Ces tests sérologiques sont les plus utilisés, ils détectent les anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide de surface (LPS-S) des souches de brucella de type lisse. L'épreuve cutanée allergique révèle l'état d'hypersensibilité de type retardée induite, tant chez l'homme que chez

l'animale, par la brucellose .L'emploi simultané des épreuves sérologique et allergique améliore le dépistage et permet d'accéder plus rapidement à l'éradication (INRA ,2007).

#### **b- Assainissement des troupeaux infectés :**

L'assainissement passe par deux actions complémentaires, c'est-à-dire, isolement et élimination précoce de tous les ovins reconnus infectés associés à une destruction du germe éventuellement présent dans l'environnement (désinfection des locaux d'élevage, destruction des matières virulentes...). (Merial, 2004).

Toutefois, compte tenu en particulier de la taille parfois importante des troupeaux et des particularités de l'élevage ovin ou caprin, il faut souligner qu'un résultat définitif ne peut être espéré que si les conditions suivantes sont réunies :

- Taux d'infection faible au moment du dépistage (c'est-à-dire infection récente) ;
- Renouvellement fréquent des contrôles (tous les mois par exemple), avec élimination immédiate des positifs ;
- Cheptel à l'abri des contaminations exogènes (par transhumance, pas d'échange de béliers etc.).

Mais, même dans ce cas, l'assainissement peut être un travail de longue haleine. Lorsque ces conditions ne sont pas réunies, notamment lorsque le taux d'infection est élevé au départ, la seule solution efficace consiste à envisager l'élimination en bloc du troupeau. (Merial, 2004).

#### **c- Protection des troupeaux indemnes :**

Elle passe par le contrôle des introductions d'animaux (issus d'élevage indemnes), le contrôle de la transhumance (l'idéal étant de l'interdire aux troupeaux infectés) et le contrôle sérologique et /ou allergique régulier des cheptels. (Merial, 2004).

### **2- Prophylaxie médicale :**

La prophylaxie médicale est justifiée dans les régions fortement infectées car elle représente la seule méthode économiquement utilisable de lutte contre la brucellose. Elle peut aussi compléter efficacement la prophylaxie sanitaire lorsque la prévalence de l'infection des troupeaux s'avère trop importante, et surtout lorsque le brassage important des animaux par



transhumance rend son application difficile. Elle est en revanche à proscrire en région indemne ou peu infectée (Merial, 2004).

#### ❖ **La vaccinothérapie :**

La prophylaxie médicale repose sur l'augmentation de la résistance des animaux à la maladie. Elle est basée sur l'immunité active (vaccination) qui peut diminuer sa prévalence et la maintenir à un niveau bas. Celle-ci ne peut pas prétendre à l'éradication (Blood et Anderson, 1976).

##### • **Vaccin Rev1 :**

Ce vaccin contient une souche atténuée de *Brucella mélitensis*. La souche Rev1 a été très soigneusement essayée et contrôlée sur le terrain (Blood et Anderson, 1976). Employé pour immuniser les ovins et les caprins contre l'infection à *Brucella mélitensis*. Ce vaccin a des caractéristiques analogues à celle du vaccin souche 19 chez les bovins. Par conséquent, il demeure le vaccin de choix, il est le plus efficace et le plus largement utilisé dans le monde chez les petits ruminants. Son utilisation est recommandée à la dose de 10 CFU.

Il induit malheureusement, dans ces conditions, une réponse sérologique d'autant plus durable que la vaccination est pratiquée à un âge avancé, ce qui restreint celle-ci aux jeunes animaux, tout en sachant que chez 1 à 2% d'entre eux, néanmoins, les anticorps persisteront jusqu'à l'âge adulte. Il y a donc incompatibilité entre un usage indiscriminé du vaccin Rev1 par la voie classique sous-cutanée, à la dose standard, et une politique d'éradication par abattage des animaux réagissant aux épreuves du diagnostic sérologique de la brucellose (INRA, 2007).

Par conséquent, pour éviter l'induire de réactions sérologiques qui interfèrent avec le diagnostic ultérieur. On ne vaccine généralement que les agneaux et les jeunes âgés de 3 à 8 mois. Cette limitation fait que la vaccination n'a qu'un faible impacte immédiat sur la prévalence de la maladie. Pour surmonter ce problème, la première année d'un programme de vaccination, il est possible de vacciner l'ovin et le caprin adulte avec une dose réduite (10x10 cellules viables) de Rev1. il est préférable de limiter l'utilisation de vaccin à une saison pendant laquelle il y peu ou pas de femelles gravides. Les agneaux et les jeunes immunisés avec le vaccin Rev1 pourront, à l'état adulte, subir des épreuves sérologiques à de fin d'éradication, à condition d'utiliser la RFC (WHO, 1986).

- **Le vaccin B19 :**

Le vaccin le plus répandu est la souche B19. Ce vaccin provoque une forte immunité qui est durable, mais il présente plusieurs inconvénients, on l'injecte à la cour de deux mois précédant la période de lutte ; la fertilité des béliers est souvent réduite. Un titre d'agglutinine persiste jusqu'à 3 ans ce qui obscurcit le diagnostic et empêche l'éradication ultérieure. D'enzooties d'ostéomyélite peuvent éclater 10 à 20 jours après la vaccination ; les béliers ont faibles et boitent de l'un des membres, et de nombreux sujets restent couchés (Blood et Anderson, 1976).

- **Le vaccin 45/20 :**

C'est une souche rugueuse 45/20 des bactéries *Brucella abortus*, non virulente et non agglutinogène (Hamdi, 2000). Ce vaccin trouve son application dans l'exploitation menacée de contamination. La vaccination sera limitée aux animaux non infectés dont l'identification aura été préalablement établie par les tests sérologiques (Derivaux et Ectors, 1980). Ce vaccin peut être utilisé pour les bovins, ovins et caprins lorsqu'on l'emploie chez des veaux de six mois et davantage l'immunité qu'il provoque est de bonne qualité (El-Bachàane, 2000).

- **Le vaccin H38 :**

Le vaccin H38 confère une immunité efficace et peut être administré quel que soit l'âge et l'état de gestation des animaux. On peut l'utiliser chez les agneaux et les adultes, ce qui permet d'immuniser rapidement un cheptel et donc de réduire le nombre d'avortements et la propagation de l'infection. Ce vaccin a toutefois l'inconvénient de donner lieu à de graves lésions locales et d'induire des réactions sérologiques persistant pendant de longue période ; son utilisation est donc incompatible avec les programmes de lutte par diagnostic/abattage, ce qui le rend inacceptable dans la plus part de pays. (El-Bachàane, 2000).

### **3- Prophylaxie mixte :**

Celle-ci associe successivement ou simultanément avec les deux modes : abattage et vaccination. (Akermi, 2008).

### **4- Mesures générales :**

Que l'on mette ou non de programmes de vaccination et/ou d'éradications, certaines mesures de lutte générale, valables pour toutes les espèces, aident à réduire la propagation de l'infection.

1. On a montré que l'isolement au cours de la parturition est une mesure de lutte efficace. Elles impliquent l'installation de talles de vêlage ou d'agnelage séparées et suppose ainsi que la personne qui s'occupe des animaux soit capable de reconnaître l'imminence d'un avortement.
2. Dans un troupeau infecté toute parturition doit être considérée comme une source potentielle d'infection et les produits non vivants devraient si possible incinérés ou si non enterrés profondément le sac en plastique très épais utilisés en agriculture ont pratique pour transporter des produits potentiellement contaminés devront être désinfectés avant d'être balayés ou lavée au jet.
3. Agir sur les mouvements incontrôlés des troupeaux « la protection sanitaire d'un pays s'exerce aux frontières » les animaux doit être certifiés pour la brucellose, ce qui n'empêche pas de refaire des examens complémentaires sur ces animaux (Anonyme. 1992).
4. Gérer au mieux de les ressources disponibles ; par exemples : en associant la vaccination anti-brucellique à d'autres programmes prophylactiques (Benkirane.2001)

- **Prophylaxie chez l'homme :**

La prophylaxie de la maladie humaine passe nécessairement par celle de la maladie animale. Elle apportera une indication fiable sur le succès obtenu en prophylaxie animale, elle permettra de mesurer l'efficacité de la vaccination de masse chez les animaux (Ferron. 1984). Les mesures reposent sur la déclaration obligatoire de la maladie, l'hygiène des manipulations (port de gants, lavage des mains), l'éducation sanitaire et la consommation de produits laitiers pasteurisés, la vaccination de personnes exposées par fraction PI est actuellement abandonnées (Chakroune et al.2007).

- **Education sanitaire et formation :**

La lutte contre la brucellose devrait présenter un intérêt économique évident pour le fermier et autre personne vivant de production animale malheureusement, en pratique, la perspective de perte immédiate ; par élimination des animaux infectés et les inconvénients engendrés par la vaccination et les contrôles répétés peuvent l'emporter, aux yeux du fermier, sur les avantages à long terme de la lutte. Il est par conséquent nécessaire d'expliquer à toutes les personnes concernées les raisons et les avantages du programme de lutte, en particulier les intérêts

économiques durables et l'élimination du risque grave pour la santé humaine, y compris pour la santé du fermier, de sa famille et des autres employés de la ferme. C'est ce travail qui continue le but principal de l'éducation sanitaire dans le cadre de programme de lutte contre la brucellose. Parmi les autres tâches importantes de l'éducation sanitaire figurent :

1. La diffusion de l'information sur les différentes phases du programme et sur les opérations en cours.
2. La motivation des propriétaires d'animaux, des personnes qui s'occupent d'animaux, des employés de l'industrie alimentaire et du grand public, afin qu'il participe aux parties appropriées du programme.
3. L'information des personnes exposées et de celles qui vivent dans des zones d'endémie sur les mesures à prendre pour se protéger.
4. L'information de pouvoir publics, des hommes politiques et des autres personnalités dirigeantes, afin de s'assurer de leur soutien continu au programme (WHO, 1986).

L'éducation sanitaire est donc étroitement liée aux différentes phases du programme de lutte et ne doit pas être envisagée comme une indépendante.

Les mesures spécifiques décrites ci-dessus, et en particulier lorsque n'y a pas de programmes de lutte nationale, il est possible de prendre certaines mesures visant à motiver les éleveurs à lutter contre la brucellose chez les animaux et se protéger eux-même. En premier lieu certains groupes de personnes sont considérées comme exposées de par leur profession : vétérinaire, agent de santé animale, d'abattoirs et personnes qui occupent des animaux dans les exploitations infectées. Deuxièmement il est nécessaire de diffuser des informations sur les méthodes de propagation de l'infection brucellienne. Le contact avec les animaux infectés et leur produit de parturition et la consommation des produits non traités constituent la principale source de l'infection humaine. Troisièmement, il faut sensibiliser la population au moyen de lutte chez les animaux, c'est-à-dire qu'il faut qu'elle sache que l'on peut éradiquer à l'aide d'un moyen planifier de diagnostic et d'élimination des animaux infectés (Aggad, 2004).

**B- Prophylaxie de la brucellose chez les petits ruminants en Algérie :****1- Définition et réglementation :**

- Zoonose majeure, sévit à l'état enzootique.
- Maladie à déclaration obligatoire (décret 95-66 modifié et complété....)
- Loi 88-08 du 26/01/1988 relative à la médecine vétérinaire.
- Arrêté interministériel du 26/12/1995 fixant les mesures de prévention et de lutte spécifique à la Brucellose ovine et caprine.
- Arrêté n°245 du 13/06/2005 ordonnant la vaccination contre la brucellose des animaux de l'espèce ovine et caprine.
- Instruction ministérielle n°342 du 21/05/2006 relative à la prophylaxie médicale contre la Brucellose chez les petits ruminants.

En Algérie, nous sommes dans une période transitoire ou nous passons du dépistage à la vaccination chez les petits ruminants. La vaccination sera élargie pour couvrir tout le territoire national (Boughalem, 2007).

Néanmoins, il faut noter quelques problèmes qu'on peut rencontrer au cours du déroulement de cette opération :

- Le nombre élevé de l'espèce caprine et ovine, l'élevage à domicile non déclaré, ce qui cause un véritable problème pour les vétérinaires praticiens.
- L'existence de la Brucellose chez les ovins est certaine, mais pas évaluée par absence d'administration favorisant la présence d'un réservoir animal non négligeable et incontrôlables.

**2- Prophylaxie médicale :****• Prophylaxie de vaccination 2006 :**

Une première campagne de vaccination a été réalisée en 2006. L'effectif vacciné « 3.359.259 »ovins et caprins.

La vaccination a été réalisé en (juin – juillet),la deuxième était en (novembre et décembre).Les wilayas consternées sont :

Tébessa, Biskra, M'sila, Laghouat, Khenchela, Djelfa, Batna, Médéa, Oum El Bouaghi, Tiaret et Ghardaïa. L'opération a été pratiquée par les praticiens exerçant à titre privé et mandatés.

Une deuxième campagne de vaccination lancée fin 2007/début 2008.

Le pré-bilan (3.518.895) ovins et caprins. Mêmes wilayas qu'en 2006. (Akermi, 2008).

- **Contraintes rencontrées :**

Parmi les contraintes rencontrées, durant cette campagne, nous citons :

-Démarrage difficile de la campagne.

-Après les grandes campagnes de prophylaxie officielles.

-Peu de praticiens mandatés.

-Retard de réception des boucles d'identification.

-Réticence des éleveurs à adhérer à ce programme compte tenu de sa nouveauté.

(Akermi, 2008).

### **C- Mesure de lutte contre la brucellose humaine et animale :**

#### **1- Rôle de la santé :**

- Dépistage et prise en charge des cas.
- Education sanitaire aussi bien pour les personnes exposées que pour la population générale.
- Déclaration des foyers infectés à l'inspection vétérinaire. (Akermi, 2008).

#### **2- Rôle de l'inspection vétérinaire :**

- Dépistage actif des cas caprins et bovins.
- Déclaration des foyers infectés au service de prévention.
- Suivi de l'abattage des animaux infectés.

- Accélérer les modalités d'administration (car le retard actuel d'administration pose un problème chez les éleveurs les incitant à éviter l'abattage à tout prix). (Akermi, 2008).

### **3- Rôle de la commune :**

- -Suivi de l'abattage des animaux infectés, en responsabilisant les forces de sûreté pour l'application de cette mesure indispensable.
- Contrôle des vendeurs du lait et dérivés, nécessité du certificat confirmant l'absence de contamination des animaux fournisseurs (à renouveler tous les trois mois).

Interdite l'abattage clandestin. (Akermi, 2008).

# *Partie II*

## *Etude Expérimentale*



# CHAPITRE 1

Matériel & Méthodes

## **I. Conditions expérimental :**

### **A- Lieu et durée d'étude :**

Notre étude a été réalisée dans la wilaya de Laghouat ou nous avons touché quatre communes : El Assafia, Sidi Makhlouf, Aflou ainsi que la commune de Laghouat.

Les études s'est déroulé durant la période du 15/12 /2011 au 05/04/2012.

### **B- Objectif de l'étude :**

Compte tenu de la menace que représente la maladie pour la santé des consommateurs l'éradication de la maladie s'opère généralement sur la base d'un programme de vaccination initial destiné à ramener le niveau actuel de la maladie active au sein d'une population à un niveau gérable. Les objectifs visés au cour de cette étude sont :

- La détection de la réponse immunitaire induite chez les animaux vaccinés ;
- L'estimation de la durée de vie des anticorps post vaccinaux ;
- Tracer les grandes lignes de prophylaxie de la brucellose à *Brucella melitensis*.

### **C- Localisation et caractéristiques de la zone d'étude :**

La wilaya de Laghouat est située à plus de 750 mètres d'altitude sur les hauts plateaux, La wilaya est traversée par les chaîne de l'Atlas Saharien avec des sommets qui dépassent les 2000 mètres (Djebel Amour 2200 mètres). Elle est délimitée :

Nord, par la wilaya de Tiaret et, par la wilaya de Djelfa ;

Sud, par la wilaya de Ghardaïa ;

Ouest, par la wilaya d'El-Bayad.

Le climat est continental aride avec des moyennes de  $-5^{\circ}\text{C}$  l'hiver et de plus de  $40^{\circ}\text{C}$  l'été.

Elle est caractérisée par un type d'élevage ovin traditionnel et extensif, dont L'estimation de cheptel est environ 17000000 têtes.



**Figure N°01 :** Présentation de la zone d'étude LAGHOUAT

#### **D- Echantillonnage :**

L'étude a porté sur un nombre total de 131 échantillons de sang qui ont été prélevés de la veine jugulaire des espèces dont 82 têtes ovines d'où 69 sujets ont été vaccinés l'an 2010, et 13 en 2011, et 49 têtes caprines vaccinées en 2011 contre la brucellose par le vaccin REV1.

**Tableau N°03 :** prélèvement effectués au niveau de Laghouat.

Région	Espèce	Sexe		Age	Nombre de prélèvement	Nombre globale
		Male	Femelle			
<b>Sidi makhlouf</b>	Ovins	03	08	+ de 30 mois	11	17
	Caprins	02	04	+ de 30 mois	06	
<b>Aflou</b>	Ovins	00	12	+ de 30 mois	12	20
	Caprins	01	07	+ de 30 mois	08	
<b>Laghouat</b>	Ovins	03	30	+ de 18 mois	33	58
	Caprins	00	25	+ de 18 mois	25	
<b>El-Assafia</b>	Ovins	00	26	+ de 30 mois	26	36
	Caprins	00	10	+ de 30 mois	10	

## **II. Matériel et méthodes :**

### **A- Matériel :**

- Gants, lunettes ;
- Tubes de prélèvement sous vide ;
- Glacière ;
- Centrifugeuse ;
- Agitateur.
- Support de plaque ;
- Notice d'emploi ;
- Schéma de distribution et d'identification ;
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits ;
- Pipettes réglables, ou fixes, pour mesurer et délivrer de 0 à 1000 $\mu$ L ;
- Chronomètre ;
- Embouts de pipettes à usage unique ;
- Eau distillée : l'eau utilisée pour la préparation de la solution de lavage peut être produite par un système de distillation conventionnel ou par tout un système performant de purification d'eau.
- Réactifs (Antigène rose Bengale).

### **B- Méthode :**

La méthode utilisée dans notre travail est basé sur l'épreuve sérologique (Rose Bengale), pour le dépistage de la brucellose chez les animaux qui ont subit la vaccination contre la brucellose par le vaccin Rev 1.

#### **1- Prélèvements sanguins :**

Les sérums récupérés ont subit un test sérologique de Rose Bengale qui a été pratiqué dans le laboratoire régional vétérinaire de Laghouat.

Les prélèvements de sang sont réalisés dans des tubes secs stériles de type « Vacutainer » sans anticoagulant dont chaque prélèvement est identifié par le code du sujet correspondant et un numéro d'ordre .Les prélèvements sont ensuite gardés hermétiquement fermés à la verticale et transportés sous froid (dans une glacière) au laboratoire régionale de Laghouat. les sérums sont

centrifugés chaque fin de journée de collecte des échantillons à l'aide d'une centrifugeuse à 5000 tours par minute pendant 10 minutes. Après la centrifugation, les sérums sont transvasés dans des flacons bouchés et identifiés et conservés au froid sous une température de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Les échantillons congelés ne doivent être décongelés qu'une fois ; une détérioration de la substance à analyser dans les échantillons peut survenir si les échantillons sont congelés et décongelés plusieurs fois ; (Elie, 2007).



**Photo N°01 : Prélèvements.**

## **2. Mode opératoire :**

### **NB : Précaution d'emploi :**

- Ne pas pipeter les réactifs à la bouche ;
- Éviter le contact du substrat avec la peau, les muqueuses, et les yeux ;
- Le matériel livré ne contient aucun élément contaminant, et que les sérums des ruminants soient théoriquement non infectieux, il est conseillé de désinfecter l'ensemble des éléments à usage unique utilisés au cours des manipulations. Cette désinfection peut se faire soit par immersion pendant 1 heure minimum dans l'hypochlorite de sodium à 5 % fraîchement préparé, avant de les éliminer 1 heure minimum ou par toute autre méthode conforme à la réglementation en vigueur.

**a- Dépôt des sérums et d'antigène :**

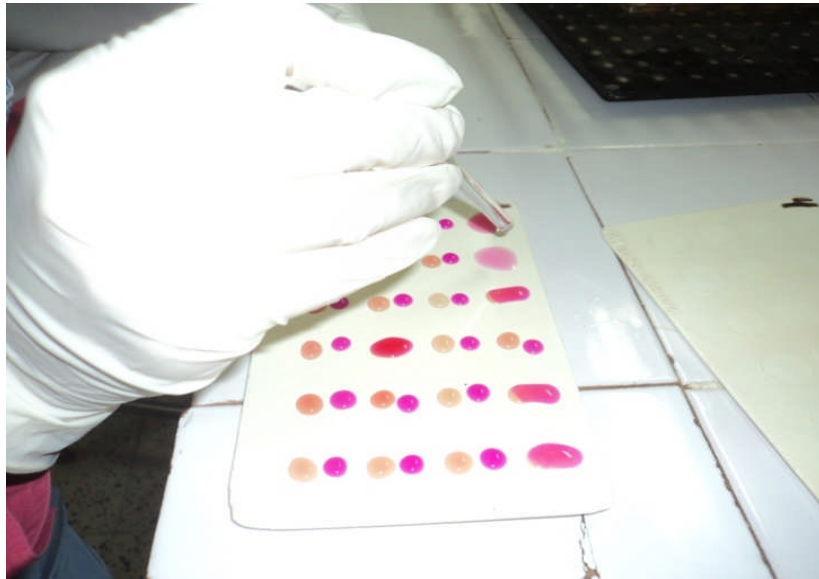
Le test au Rose Bengale a été réalisé dans le laboratoire régional de Laghouat.

- Nous avons mis l'antigène et les sérums obtenus à une température ambiante, sur une plaque de 24 puits, puis on a déposé 30 $\mu$ L de chaque sérum à tester, après l'agitation de flacon d'antigène en déposant 30 $\mu$ L à côté de chacun des sérums.
- Nous avons mélangé soigneusement l'antigène et le sérum à l'aide d'un petit bâton propre. En agitant la plaque pendant 4 minutes et lire immédiatement.

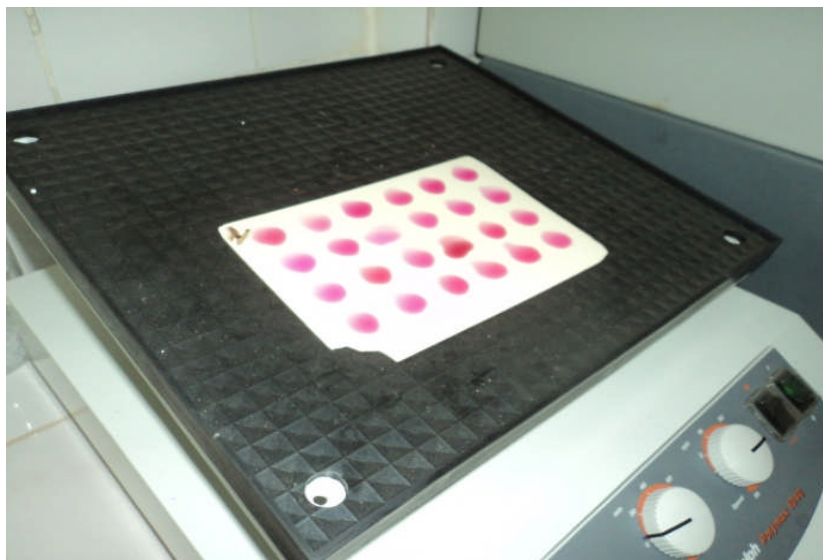
Cependant, cette épreuve a été révélée positive et même négative pour tous les sujets vaccinés par le vaccin anti-brucellique.



**Photo N°02 : Dépôt du sérum.**



**Photo N°03 :** Mélange de l'antigène avec le sérum.



**Photo N°04 :** Agitation de l'antigène avec le sérum.

**b- Lecture :**

Elle se fait immédiatement, en présence d'anticorps, il se produit une agglutination visible à l'œil nu, tandis qu'en absence d'anticorps le mélange reste homogène.

**c- Interprétation de résultats :**

- Présence d'agglutination : résultat positive.
- Absence d'agglutination : résultat négatif.



**Photo N°05 :** Interprétation des résultats.



# CHAPITRE 2

Résultats et discussions

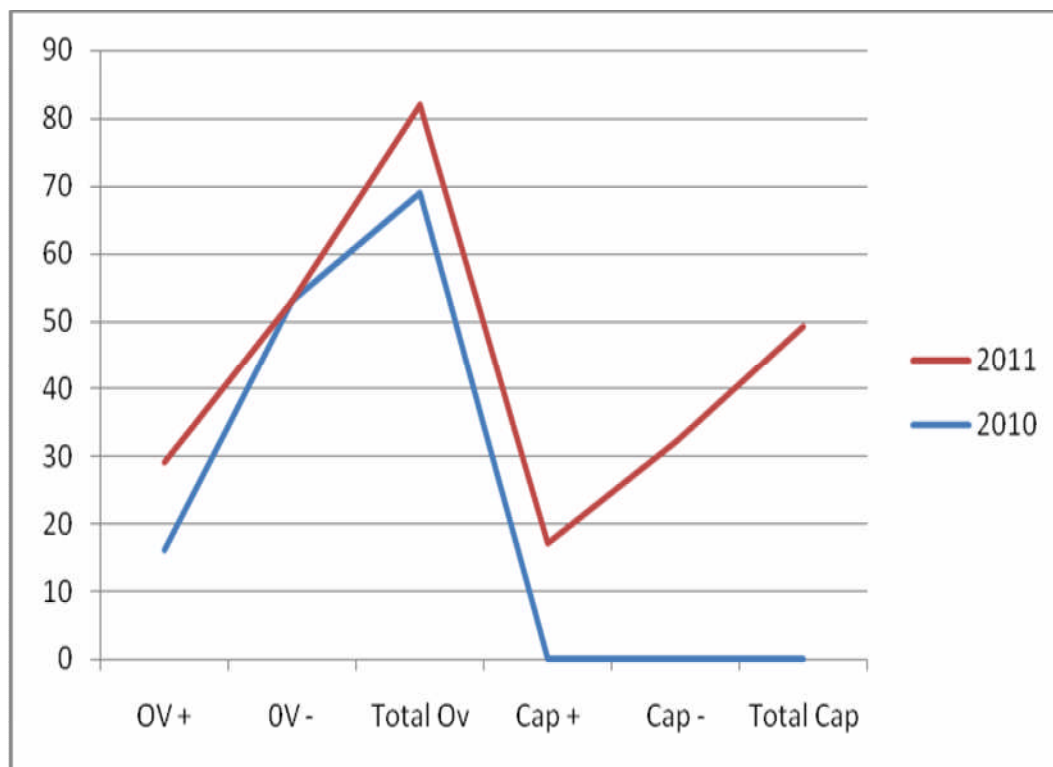
Les épreuves sérologiques les plus largement utilisées pour le diagnostic des infections à *brucella* lisses chez les ovins et les caprins sont les épreuves à l'antigène tamponné de Brucella (Buffered Brucella Antigen Tests ou BBATs), c'est-à-dire l'épreuve du Rose Bengale (RB, dénommée plus communément épreuve à l'antigène tamponné ou EAT) ou le Card-test, qui sont sensiblement identiques et le test de fixation du complément (FC). Chez les petits ruminants, l'EAT et la FC sont les méthodes les plus largement utilisées et constituent les seules épreuves prescrites pour les échanges internationaux.

La réaction de Rose Bengale n'a pas une spécificité absolue mais est adaptée au dépistage de masse des troupeaux infectés ou pour garantir l'absence d'infection dans les troupeaux indemnes.

L'avantage de ce test est simple, rapide (lecture à l'œil nu), peu coûteux et qui permet d'analyser plusieurs sérums à la fois.

**Tableau N°04 :** Tableau croisé reliant les espèces vaccinées avec les deux années d'après vaccination.

Année	OV +	OV -	Total Ov	Cap +	Cap -	Total Cap
2010	16	53	69	00	00	00
2011	13	0	13	17	32	49



**Graph N°01 :** La séropositivité et la séronégativité chez les deux espèces (ovines et caprines).

Les sérums prélevés à partir des espèces ovines et caprines après la vaccination 2010, 2011, sont pas tous positifs, alors que normalement après la vaccination, sont de test positif.

Nous avons réalisé par se tableau une analyse en traitant les résultats des tests + et – des ovins et caprins. Alors que les résultats sont beaucoup plus négatifs que positifs pour les ovins ainsi que les caprins.

Dans notre travail, on a fait une comparaison de la présence d’agglutination ou non entre les deux espèces, réalisé par le test de Rose Bengale. Le tableau N°04 et la Figure N° 02 permet de confirmer cette dernière, nous constatons que la présence de l’agglutination produit par les deux espèces est différente.

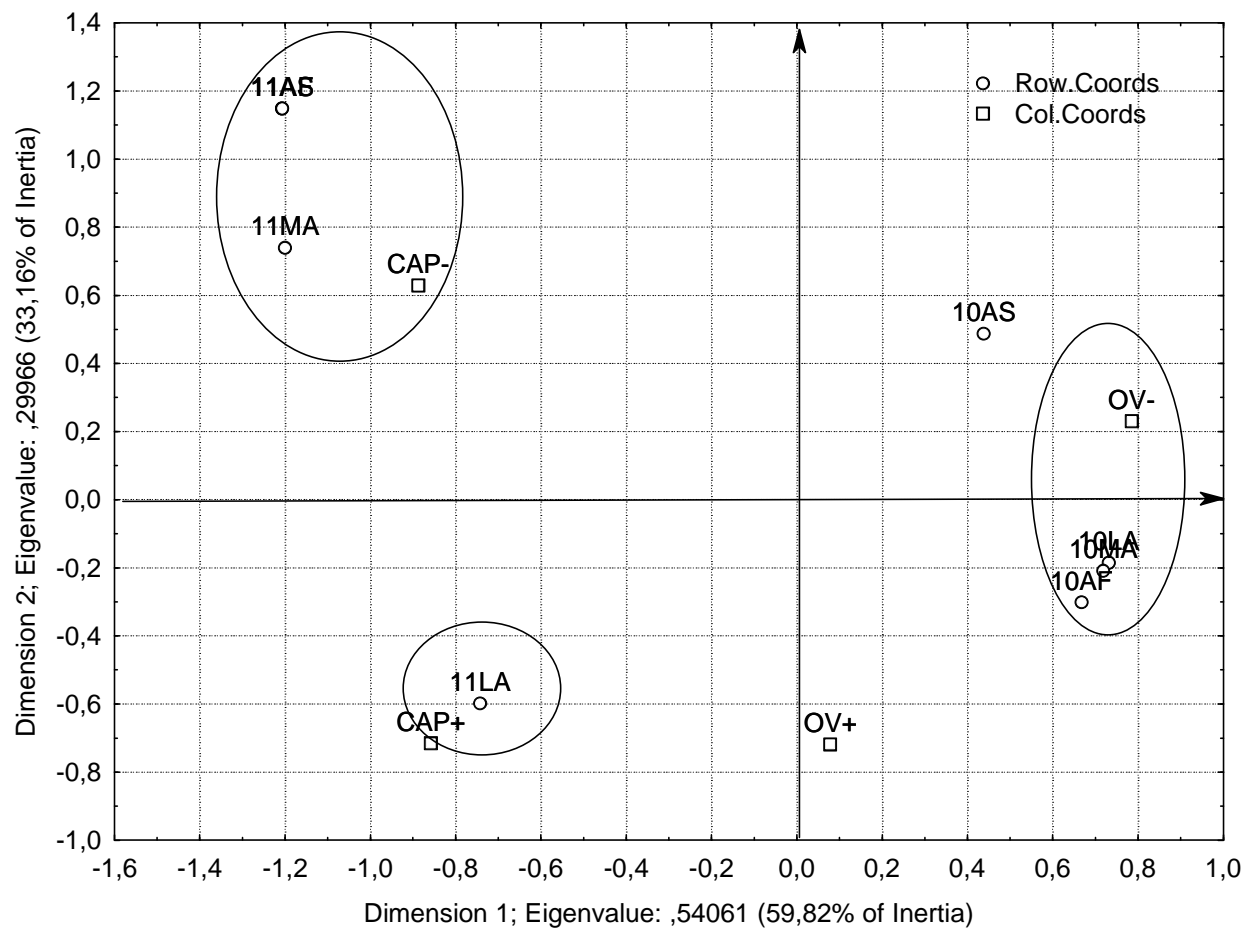
#### **Etude de la relation entre séropositivité des tests sérologique et le temps après la vaccination :**

Nous avons réalisé une analyse factorielle des correspondances en traitant les liaisons existant entre les variables : test de vaccination (positif ou négatif), et le temps après vaccination de l’année2010 à l’année 2011, pour cela, nous disposons d’un tableau à une seule entrée constitué par les temps en suite, nous relient les variables dites lignes (résultat des tests +ou -)

aux temps après vaccination à l'aide d'une table croisé (\*).Les résultats de cette table sont indiqués dans le tableau N°5

**Tableau N°5** : table croisé reliant les espèces vaccinées avec les temps après vaccination

	1 OV+	2 OV-	3 CAP+	4 CAP-
2010ASSA	0	26	2	8
2011ASSA	0	0	0	0
2010 AFLOI	5	7	0	0
2011AFLOL	0	0	0	8
2010LAGH	7	13	0	0
2011LAGH	13	0	14	11
2010 MAKH	4	7	0	0
2011 MAKH	0	0	1	5



**Figure N°02** : Résultat reliant les espèces vaccinées avec les temps après vaccination

Nous obtenons finalement une table croisée qui possède 8 lignes et 4 colonnes. Les résultats de cette AFC ont été illustrés dans la figure N°1.

Deux axes sont susceptibles d'être interprétés (le premier axe montre que près de 60% de dispersion du nuage des variables se fait dans son plan ; 33% pour le deuxième axe) :

#### **L'axe N°01 :**

##### **Coté positif:**

Correspondance de OV- avec les modalités de l'année 2010 à (Sidi Makhoulf , Laghouat, et Aflou). Nous remarquons que les sérums prélevés à partir de ces trois régions en l'an 2010 sont a peu près tous négatifs. Donc, on remarque qu'il ya une absence total des anticorps vaccinaux après une durée de 24 mois à partir de moment de vaccination.

##### **Coté négatif :**

Les espèces CAP + avec les modalités de l'année 2011 à (Laghouat), nous remarquons que les sérums qui ont été prélevés des espèces sont positives, nous constatons qu'il ya une présence des anticorps après une durée de vaccination de 12 mois.

#### **L'axe N°2 :**

Lui représente 33% de dispersion du nuage, les modalités de l'année 2011 (Sidi MAkhoulf, El Assafia) avec Cap-, ces résultat montrent qu'il y a absence total des anticorps après vaccination chez l'espèce caprine ?

Cet échec vaccinal est due à plusieurs facteurs qui sont :

- L'état de santé de l'animale ;
- L'alimentation ;
- La conservation du vaccin ;
- L'acte vaccinal ;
- La dose du vaccin ;
- La non réalisation du vaccin par Mr. Le vétérinaire.

Nous constatons d'après les résultats obtenus que la repense sérologique chez les deux espèces, est presque identique, tandis que la durée après la vaccination a une influence importante sur la durée de vie des anticorps après vaccinaux.

# Conclusion

# Conclusion

Plus que jamais, les maladies infectieuses, par leur capacité d'évolution, d'adaptation, de transformation au sein du monde vivant, apparaissent comme une menace pour la santé humaine. Malgré les immenses progrès de la science et de la médecine, malgré les innovations thérapeutiques et immunologiques, le risque infectieux demeure une réalité permanente.

En médecine vétérinaire, plus particulièrement appliquée à l'élevage ovin, toute action visant à préserver la santé des animaux devrait être, autant que faire se peut, de type préventif, si on veut réussir sur le plan de la compétitivité. Cela va du dépistage précis de la maladie ou de l'infection à la mise en place des moyens prophylactiques appropriés.

Dans ce contexte, la vaccination représente le principal moyen de prévention des maladies infectieuses animales



**R**éférences

Bibliographiques

# Références Bibliographiques

- 1- Aggad. H (2004). Etude épidémiologique de la brucellose animale et humaine en Algérie. Université d'Oran. P. 19-35.
- 2- Akermi.O (2008). Cinétique des anticorps après vaccination contre la brucellose par le vaccin Rev1 chez les petits ruminants. Université de Tiaret.
- 3- Alzart.p : (1986). Déceler les premiers signes de la brucellose. Ed VIGOT, Paris. P.19.
- 4- Barbara D. et Marc S : (2004). Diversité de méthode de lutte contre les zoonoses. *Epidémiologie et santé animale*, 46, 33, 44.
- 5- Benkirane. A : (2001). Surveillance épidémiologique et prophylaxie de la brucellose des ruminants : l'exemple de la région Afrique du Nord et Proche-Orient. *Rev.sci.Tech.Off. Int. Epiz*, 20(3), 757-767.
- 6- Blood. D-C et Anderson. J-A :(1976). *Médecine vétérinaire-Vigot Frère editeurs*, 2<sup>ème</sup> 2dition française d'après la 4<sup>ème</sup> édition anglaise. pp 426-444.
- 7- Boughalem. K (2006) : S/D Santé animale :Brucellose animale- situation et programme de lutte- page 4-11-17-18-19-21-22-23.
- 8- Boughalem. K (2007). Ministère de l'agriculture et du développement rural. Direction des services vétérinaire. Brucellose animale. Situation et programme de lutte.
- 9- Cazenav. M : (1972). *Le guide thérapeutique vétérinaire*. pp 140-149.
- 10- Chakroun. M, Bouzouaia. N : (2007). La brucellose : une zoonose toujours d'actualité, Brucellosis : A tropicale zoonosis. Service des maladies infectieuses. EPS Fattouma Bourguiba-Monastir. *Rev Tun Infectiol*.
- 11- Cleon. V : (1988). *Diseases causing abortions-Ed IEA & FEBIGER-Philadelphia- Third edition- pp 50-52.*
- 12- De Boeck et Larcier, 1999.*Bactériologie générale*.
- 13- Djendel.D-M (2000).Les avortements-Bovine & Ovine middle East & north Africa Liban;6<sup>th</sup> year-Nbr25-May-July.pp6-7.
- 14- El-Bachaane,M.M:(1998).Le vaccin contre la brucellose humaine et animale- Bovine&Ovine-middle eat £ north Africa –Liban ;6<sup>th</sup> year-Nbre 14-July-Augut-pp26-31.

## Références Bibliographiques

---

- 15- Elie .A:(2007).Enquete séroépidémiologique sur les principales maladies caprines au Liban.
- 16- Eric.C-D,Philippe G,Marc D.(2007).Enseignant à la Faculté Libre de médecine de Lille :Cours de microbiologie de la faculté libre de médecine de lille.
- 17- Flandrois .J.P :(1997).Bactériologie médicale,près Univ Lyon,France.pp219-225.
- 18- Frron .A :(1984).Bactériologie médicale à l’usage des étudiants en médecine.12<sup>ème</sup> édition .pp160-163.
- 19- Frobisher.M.et Fuerst. R :(1975).Microbiologie Clinique-Les éditions HRW-pp272-276.
- 20- Garnière J-P :(2008).La brucellose animale,Polycopié des Unités des maladies.
- 21- Gorvel J-P(2004) :Brucella :la bactérie qui se cache dans une vacuole,à l’abri des armes intracellulaires.
- 22- Hamdi H.MD.MPH :(2007).Diagnosis of Brucellosis Shahid Beheshti University of medical sciences.
- 23- INRA«Institut national de la recherché agronomique»(2007).Développement d’un nouveau vaccin contre la brucellose des petits ruminants.
- 24- Le Guyon R :(1960).Précis de bactériologie-Edition G.Doin-Paris.pp331-342.
- 25- Le Minor.L et Verron .M :(1989).Bactériologie médicale.P651-662.
- 26- Merial :(2004).La brucellose animale.Brucellose ovine et caprine.p19.
- 27- Obre .A et Buttiaux.R,1983.bactérologie médicale et vétérinaire 2<sup>ème</sup> ,édition.203-212.
- 28- Oger. Y :(1986).La brucellose bovine –comment vacciner et éviter la contamination .p17.
- 29- Philipon .A(Faculté de Médecine Paris V,Univercité René Descartes) et B.Garin-bastuji,CNR des Brucella/LNR des Brucelloses animales,AFSSA-Maisons-Alfort(Nouvelle version du 30.08.05).
- 30- Salim D :(2008).La brucellose et Brucella mélitensis (Biovars :Abortus,Canis,Suis). WHO,World Health Organisation :(1986).Joint Food and Agriculture Organisation.FAO-WHO Expert Commite on Brucellosis(6th report).Technical report series.p 740;pp 56-63.

# Annexe



**Photo N°06- Réactif(Rose Bengale)**

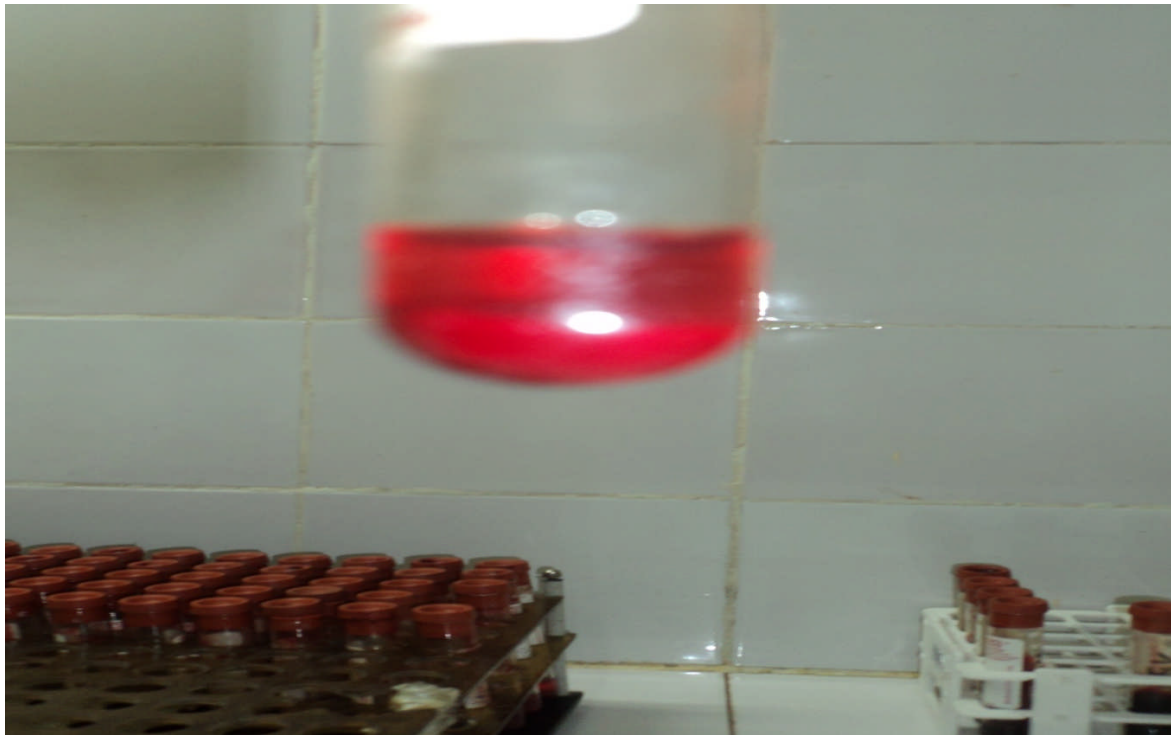


PhotoN°07-Matériel



Photo N°08-Agitateur et Centrifugeuse





**Photo N°09-Sérum**



**Photo N°10-Méthode de prélèvement**



**Photo N°11-Espèces ovines**



**Photo N°12-Espèces caprines**





**Photo N°13-Ferme d'étude**



**Photo N°14- le binome**

