

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université ibn khaldoun de Tiaret
Institut des sciences vétérinaires
Département de la santé animale



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire

Sous le thème

Etude bibliographique de la brucellose bovine

Présente par :

Biti Mohamed Amine

Abdenmour Amar

encadrée par :

M^{me} : Mahouz Fatima

Année universitaire:

2015 -2016

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à :

- ✚ Mes grands-parents, toutes Mes tantes et tous Mes oncles
- ✚ Nos cousins et cousines, neveux et nièces
- ✚ Nos parents :

Nos mères, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Nos pères, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

- ✚ Nos frères et sœurs
- ✚ Notre professeur M^{me} Mahouze Fatima qui doit voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.
- ✚ Nos amis Kadi, Fares, Oussama, Saifeddine, Sliman, Tous Nos autres amis.

Remerciement

Nulle œuvre n'est exaltante que celle réalisée avec le soutien moral et financier des personnes qui nous sont proches.

Nous tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à :

- ✚ A DIEU, pour Nos avoir donné la force dans les moments difficiles d'éditer ce mémoire.
- ✚ Nos parents qui m'ont toujours entouré et motivé à sans cesse devenir meilleur ;
- ✚ Nos frères et sœurs ;
- ✚ Nos tantes, oncles, cousins et cousines, neveux et nièces ;
- ✚ Nos amis et amies de par le monde qui n'ont cessé de m'encourager ;
- ✚ Notre professeur encadreur M^{me} Mahouze Fatima pour son aide et sa précieuse attention
- ✚ Tous Nos compagnons de promotion ;

Trouvez ici l'expression de Notre profonde gratitude et reconnaissance.

Sommaire

❖ Dédicace	
❖ Remerciement	
❖ Sommaire	
❖ Répertoire des tableaux	
❖ Répertoire des figures	
❖ Résumé	1
❖ Introduction	3
❖ I.GENERALITE	4
➤ I.1 Définition	4
➤ I.2 Historique	4
➤ I.3 Importance	5
▪ I.3.1 Répartition géographique.....	5
▪ I.3.2 Impact économique	6
▪ I.3.3 la brucellose, une Zoonose	6
❖ II.ETUDE DE GENGE BRUCELA	9
➤ II.1 Etiologie	9
➤ II.2 Caractéristique	10
▪ II.2.1 Morphologie et structure	10
• II.2.1.1 Paroi et membrane cytoplasmique	10
• II.2.1.2 Cytoplasme	11
▪ II.2.2 Culture et conditions de croissance	11
• II.2.2.1 Condition physico-chimique	11
• II.2.2.2 Besoins nutritionnels	11
• II.2.2.3 Milieux	12
• II.2.2.4 Caractère culturaux	12
▪ II.2.3 Caractère biochimique	13
• II.2.3.1 Caractère généraux du genre	13
• II.2.3.2 Caractère particuliers aux différentes espèces	13
▪ II.2.4 Caractères antigéniques	13
• II.2.4.1 Bactéries Smooth (S ou lisses)	14
♦ II.2.4.1.1 Antigènes de surface	14

➤ II.2.4.1.1.1 Le complexe LPS-S et haptène apparentes	14
➤ II.2.4.1.1.2 Les protéines de la membrane externe (PME)	15
➤ II.2.4.1.1.3 Le peptidoglycane (PG)	15
◆ II.2.4.1.2 Antigènes internes	15
◆ II.2.4.1.3 Antigènes communs avec d'autres bactéries	16
• II.2.4.2 Bactérie rough (R ou Rugueuses)	16
• II.2.4.3 Rôle des antigènes dans les épreuves de diagnostic	16
■ II.2.5 Lysogénie Lysotypie	17
• II.2.5.1 Définition	17
• II.2.5.2 Caractéristiques des phages de Brucella	17
■ II.2.6 Génétiques	18
• II.2.6.1 Génome de Brucella	18
• II.2.6.2 Mutation S-R	18
• II.2.6.3 Mutants muqueux	19
■ II.2.7 Résistance et inactivation	19
• II.2.7.1 Résistance	19
◆ II. 2.7.1.1 Résistance dans le milieu extérieur	19
◆ II.2.7.1.2 Résistance dans les denrées alimentaires	21
• II.2.7.2 Inactivation	21
◆ II.2.7.2.1 Inactivation physique	21
◆ II.2.7.2.1 Inactivation chimique	21
❖ III.PATHOGENIE	23
➤ III.1 Pouvoir pathogène expérimentale	23
➤ III.2 Pouvoir pathogène naturel	23
■ III.2.1 Condition de l'infection	23
• III.2.1.1 Facteurs tenants aux Brucella	23
◆ III.2.1.1.1 Facteurs qualitatifs	23
◆ III.2.1.1.2 Facteurs quantitatifs	23
• III.2.1.2 Facteurs tenants à l'hôte	24
◆ III.2.1.2.1 Age	24
➤ III.2.1.2.1.1 Période fœtale	24
➤ III.2.1.2.1.2 Période pré-pubère	24
➤ III.2.1.2.1.3 Période post-pubère	24
◆ III.2.1.2.2 Gestation	24

♦ III.2.1.2.3 Individu	25
▪ III.2.2 Etape de l'infection	25
• III.2.2.1 Période primaire : Brucella aigue	25
♦ III.2.2.1.1 Pénétration et multiplication loco-régionale	25
♦ III.2.2.1.2 Phase de dissémination	25
♦ III.2.2.1.3 Phase de localisation	25
• III.2.2.2 Période secondaire	26
♦ III.2.2.2.1 Guérison	26
♦ III.2.2.2.2 Persistance des Brucella	26
• III.2.3 Mécanisme de l'avortement	30
• III.2.3.1 localisation placentaire des Brucella	30
• III.2.3.2 Devenir des Brucella dans l'utérus après avortement	30
▪ III.2.4 Réactions de l'organisme infecté	31
• III.2.4.1 réponse immunitaire à médiation humorale	31
• III.2.4.2 Nature des anticorps	31
♦ III.2.4.2.1 Cinétique des anticorps	31
➤ III.2.4.2.1.1 Dans le sérum	31
➤ III.2.4.2.1.2 Dans le lait et les autres sécrétions	32
♦ III.2.4.2.2 spécialisation des anticorps	32
♦ III.2.4.2.3 Application aux tests de dépistage	33
• III.2.4.3 Réponse immunitaire a médiation cellulaire	34
❖ IV. SYMPTOMES ET LSIONS	36
➤ IV.1 atteinte génitale	36
▪ IV.1.1 femelle	36
• IV.1.1.1 avortement	36
• IV.1.1.2 Rétention placentaire	36
• IV.1.1.3 Métrite brucellique	37
• IV.1.1.4 Mammite brucellique	37
▪ IV.1.2 Mâle	37
• IV.1.2.1 Diminution de l'ardeur génésique	37
• IV.1.2.2 Orchite	38
➤ IV 2 Atteinte extra-génitale	38
▪ IV.2.1 Arthrites	38
▪ IV.2.2 Hygroma	38

▪	IV.2.3 Autres localisations	38
❖	V. EPIDEMIOLOGIE DE LA BRUCELLOSE	40
➤	V.1 Epidémiologie	40
▪	V.1.1 Les espèces animales affectées par <i>Brucella abortus</i>	40
▪	V.1.2 Les sources de contagion	40
▪	V.1.3 Les matières virulentes	40
▪	V.1.4 Les Modes de Transmission	41
▪	V.1.5 Divers facteurs de sensibilité et réceptivité	41
➤	V.2 Epidémiologie synthétique	42
❖	VI. DIAGNOSTIC	43
➤	VI.1 Diagnostic épidémio-Clinique	43
➤	VI.2 Diagnostic expérimental	43
▪	VI.2.1 Diagnostic bactériologique	43
▪	VI.2.2 Diagnostic sérologique	45
•	VI.2.2.1 Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) = Test Rose Bengale	45
•	VI.2.2.2 Epreuve de l'anneau sur le lait = Ring Test	47
•	VI.2.2.3 Séro-agglutination de Wright	48
•	VI.2.2.4 Fixation du Complément	49
•	VI.2.2.5 Epreuve de l'antigène BPA (Buffered Plate Agglutination)	50
•	VI.2.2.6 ELISA (Enzyme like Immune Sorbent Assay)	50
•	VI.2.2.7 Fluorescence Polarisation Assay	51
➤	VI.3 Diagnostique allergique	53
❖	VII. LES METHODES DE SURVEILLANCE ET DE LUTTE	54
➤	VII.1 Traitement	54
➤	VII.2 Prophylaxie sanitaire	54
➤	VII.3 Prophylaxie médicale	56
❖	Conclusion	60
❖	Références bibliographiques	

Répertoire des tableaux

- ***Tableau I : Caractéristique différentielles des espèces du genre Brucella et de leurs Biovar. [COMITE MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE.]***
- ***Tableau II : Différentiation des Biovar des espèces du genre Brucella. [COMITE MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE]***
- ***Tableau III : Présente la différenciation des espèces de Brucella par les bactériophages. [ROUX J. – Brucella]***
- ***Tableau IV : Résistance des Brucella dans l'environnement. [Source AFSSA].***
- ***Tableau V : Rôle des différentes classes d'Ig dans les réactions sérologiques. [TIZARD I. – Serologic assays]***
- ***Tableau VI : Caractéristiques des différentes techniques de diagnostic sérologique. [ECOLE NATIONALE VETERINAIRE TOULOUSE. – étude épidémiologique de la brucellose dans la province de l'Arkhangai (Mongolie)].***

Répertoire des Figures

- ***Figure 1 : anatomie de la cellule de brucella. [BERCOVICK Z., EGER A., DEKKER T., HAAGSMA J. –Production of Brucella allergens and evaluation of their biological activity in a guinea-pig bio-assay.]***
- ***Figure 2 : Les étapes de l'infection brucellique. [Source AFSSA]***
- ***Figure 3 : Cinétique des anticorps dans le sang et le lait. [LACHERETZ A. – Les brucelloses animales.]***
- ***Figure 4 : Adaptation des mesures de lutte au taux de prévalence de la brucellose. [ECOLE NATIONALE VETERINAIRE TOULOUSE. – étude épidémiologique de la brucellose dans la province de l'Arkhangai (Mongolie)]***

Résumé

Dans cette étude bibliographique on a essayé de collecté le maximum des informations concernant la maladie de brucellose.

Tout d'abord, on a commencé par une présentation générale de la maladie parlant de leur historique et leur importance ainsi leur impact économique dans la majorité des cas.

En suit, on a discuté l'agent pathogène de cette maladie leur variété, leur caractéristiques et leur capacité de ce transmet à l'homme.

On a continué par expliquer leur pouvoir pathogène et sa présentation clinique. Parallèlement on a présenté une étude épidémiologique et les méthodes de diagnostic de brucellose bovine.

Enfin, on a terminé notre étude par donner les méthodes de prévention suivi pour lutter contre la brucellose bovine

ملخص

من خلال بحثنا هذا حاولنا جمع القدر الكافي والوافي من المعلومات فيما يخص مرض الحمى المالطية عند الابقار.

تحدثنا في البداية بشكل عام عن المرض؛ تاريخه؛ أهميته؛ وتأثيره الاقتصادي.

ثم تطرقنا الى العوامل المسببة للمرض مع تعريف وذكر انواع البكتيريا المسببة له, خصائصها وكذلك قدرته على الانتقال الى الانسان.

اتمنا بحثنا بالحديث عن قدرته المرضية و كذلك اعراضه, ثم تطرقنا لبعض وسائل التشخيص المستعملة في وقتنا هذا بالإضافة الى دراسة وبائية عن الحمى المالطية

وفي النهاية اتمنا هذه الدراسة بطرق الوقاية والعلاج المتبعة في وقتنا هذا ضد الحمى المالطية عند الابقار

Introduction

La brucellose est une maladie infectieuse, contagieuse due à des bactéries du genre brucella. Sa répartition géographique est mondiale et de multiples espèces peuvent être infectées.

La maladie se traduit chez l'animal par une infection d'évolution aiguë ou chronique. Le tropisme des Brucella pour l'appareil génital se manifeste cliniquement par des avortements. Les répercussions économiques de cette maladie, matérialisées par le coût des avortements, de la stérilité, des pertes de lait ...sont considérables

Enfin, la brucellose, de par la gravité et la fréquence des cas humains est classé zoonose majeure. Elle touche principalement les professionnels de la filière viande (éleveurs bouchers ...) mais aussi les consommateurs de produits à base de lait cru

La brucellose, est une maladie importante en raison de son aspect zoonotique et des conséquences économiques qu'elle engendre (pertes de production, entraves aux échanges commerciaux). Elle appartient pour cela à la liste des maladies prioritaires de l'Office International des Epizooties.

I. Généralité

I.1 Définition

La brucellose est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à de nombreuses espèces animales et à l'homme. Elle est due à des bactéries du genre *Brucella*. C'est une anthroponose. Elle se traduit chez l'animal comme une maladie d'évolution aiguë ou chronique, affectant principalement les organes de la reproduction et dont la manifestation clinique la plus fréquente est l'avortement. [GANTIERE J.P.- 2000.]

Chez l'homme, c'est une maladie à Déclaration Obligatoire. Elle est aussi, dans certaines Circonstances, classée Maladie professionnelle. [PILLY E.- 1988]

I.2 Historique

Selon les pays, les époques et les animaux concernés, la brucellose a successivement été nommée fièvre de Malte, fièvre ondulante, *Mélicoccie*, fièvre méditerranéenne, maladie de Bange, avortement épizootique des bovidés ou plus simplement avortement contagieux. [HUNGERFORD T.G.-1967]

C'est en 1887 que BRUCE, médecin militaire à Malte, isole de la rate de 4 soldats britanniques décédés d'une « Fièvre de malte » l'agent responsable de la maladie. Il la nommera en 1893 *Micrococcus melitensis*

En 1897, au Danemark, BANG extrait de l'estomac d'avortons bovins le « bacille de l'avortement épizootique de la vache », qu'il nomma *Bacillus abortus bovis*.

La même année, WRIGHT découvre que le sérum des malades agglutine *Micrococcus Melitensis*. En 1905, ZAMMIT et HORROCKS mettent en évidence la présence de la bactérie dans le lait de chèvre apparemment saine et établissent ainsi le rôle de ces animaux tant que source de contagion.

En 1914, aux États-Unis, TRAUM isole de fœtus de truies avortées un microbe semblable au bacille de Bang : *Bacillus abortus suis*.

En 1918, EVANS démontre la parenté de ces différents germes. Ses travaux sont confirmés en 1920 par MEYER et SHAW qui proposent la création du genre *Brucella* avec deux espèces : *Brucella melitensis* et *Brucella abortus*.

Par la suite, d'autres espèces de *brucella* sont identifiées :

- Le bacille isolé par TRAUM est individualisé sous le nom de *brucella suis* par HUDDERSON en 1929

- En 1953, en Nouvelle Zélande et en Australie, BUDDLE et BOYES identifient *Brucella ovis* comme la responsable des épидidymites des béliers. [NICOLETTI P.- 1972]
- STOENNER et LACKMAN isolent *Brucella neotomac* chez les néotomes aux États-Unis.
- CRAMICHAEL et BRUNER découvrent que *Brucella canis* est responsable d'avortement contagieux dans l'espèce canine.

1.3 Importance

Depuis l'isolement de l'agent causal, la brucellose - sous toutes ses formes, bovine, ovine, caprine, porcine, canine et humaine. A mobilisé dans le monde de nombreuses équipes de recherche pour tenter de réduire son impact socio-économique considérable sur la production animale et le développement rural. [VERGER J.M.-1993]

1.3.1. Répartition géographique

Très peu de pays échappent à la maladie. Certains qui semblent indemnes ou presque se révèlent infectés lorsque l'on procède à un dépistage systématique de la maladie.

La répartition des principales espèces de brucella et de leurs biotypes n'est pas strictement liée à des aires géographiques bien définies. Dans la plupart des régions du monde, les trois principales espèces de *Brucella* sont retrouvées. Quelques caractéristiques peuvent toutefois être dégagées : *B.abortus* domine nettement en Afrique, excepté l'Afrique du nord ainsi qu'en Europe, en Asie et en Amérique du sud L'Europe centrale et l'Amérique du nord sont plutôt touchées par la présence de *B.suis* On retrouve *B.melitensis* dans les pays méditerranéens quant à *B.ovis*, elle a paru longtemps cantonnée à l'Australie mais, depuis plusieurs années elle touche divers pays du monde, son extension étant liée aux échanges économiques.[ROUX J.- 1979 ; 1989]

Si quelques pays ont éliminé la brucellose, la prévalence de celle-ci n'en est pas moins en progression dans la plupart des autres. Certains jouissant quelques temps d'une plus grande prospérité ont tenté d'accroître leur Approvisionnement en lait et en viande en développant l'élevage, généralement en important des races étrangères. Des animaux très réceptifs sont ainsi élevés dans des conditions peu satisfaisantes et les infections à *Brucella*, souvent contractées auprès d'animaux indigènes, provoquent des épidémies dans la population. D'autre part, la multiplication des voyages internationaux semble également être un facteur favorisant. [ALTON J.J., PLOMMET M.-1986 ; COMITE MIXTE FAO/OMS D'EPERTS DE LA BRUCELLOSE -1990]

1.3.2 Impact économique

La maladie entraîne des conséquences sérieuses dans les élevages. Les avortements sont responsables des pertes les plus importantes. En effet, l'obtention de produits sains et viables avec une fréquence optimale. Et la production laitière qui y est associée contribue souvent pour une part essentielle au revenu de l'éleveur. [GARIN-BASTUJI B.-1993 ; ROUX J.-1989] Or l'avortement est la cause de :

- La chute de la production de lait qui peut atteindre 20 % chez les vaches infectées ayant avorté ;
- La perte de veaux, principale source de revenu des éleveurs de races à viande ;
- L'allongement de la période inter-vêlage de plusieurs mois (il faudra 15 ou 16 mois à une vache pour produire un veau normal)
- Par ailleurs, l'avortement s'accompagne fréquemment de rétention placentaire processus infectieux à l'origine de métrite, d'infertilité voire de stérilité dont l'incidence économique est là encore évidente. [GARIN-BASTUJI B.-1993 ; HUNGERFORD T.G.- 1967]

Les pertes subies se matérialisent par :

- la différence entre la valeur des animaux en production et celle des animaux morts livrés à l'équarrissage ou saisis totalement.
- La valeur de la quantité de lait non produite ;
- La valeur totale ou partielle des veaux non obtenus lors d'avortement ou de stérilité
- La valeur de la quantité de viande non produite (mort ; retard de croissance).

Ces pertes sont très variables selon les pays, car des données très diverses doivent être prises en compte (extension de la maladie, espèces atteintes, valeur relative des animaux, possibilités de reconstituer un cheptel sain, besoins alimentaires de la population...). Mais elles sont dans tous les cas lourdes à supporter. [ROUX J.- 1979 ; 1989]

1.3.3 La brucellose, une zoonose

La brucellose demeure dans le monde, un problème important de santé publique. C'est une zoonose majeure. Ainsi en Algérie, la brucellose humaine est une maladie à déclaration obligatoire, inscrite au tableau des maladies professionnelles.

L'homme s'infecte au contact des animaux ou en consommant des aliments d'origine animale. La contamination se fait, dans 75% des cas par voie directe (cutanéomuqueuse) et dans un quart par voie indirecte. La plupart des cas concernent les professions à risque (agriculteurs, vétérinaire,

professionnels de la viande). En outre, les proportions de contaminations par le fromage frais et par des voyages dans les pays du bassin méditerranéen sont en constante augmentation. La maladie est souvent invalidante quand elle n'est pas soignée correctement à son début. [ANONYME – 1988 ; FENSTERBANK R.- 1987]

En dépit de tous les efforts et d'avances techniques majeures, la brucellose demeure en cette fin de siècle une zoonose d'importance économique et sanitaire mondiale. Cette situation préoccupe particulièrement l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est mis cette maladie au rang des priorités dans leurs programmes de financement de la recherche agronomique et médical.

[VERGER J.M. -1993]

Espèce	Biovar	Besoin en CO2	Production D'H2S	Croissance en présence de		Agglutination par des antisérums Monospécifique			Lyse des phages à la DCE				Espèce d'hôtes naturels préférés	Pathogénicité pour l'homme
				Thionine 20 µg/ml	Fushine Basique 20 µg/ml	A	M	R	Tb	Wb	BK2	Fi		
B abortus	1	(+)	+	-	+	+	-	-					Bovines et autre bovidés	Modérée, cas généralement sporadique
	2	(+)	+	-	-	+	-	-						
	3	(+)	+	+	+	+	-	-	L	L	L	L		
	4	(+)	+	-	(+)	-	+	-						
B melitensis	5	-	-	+	+	-	+	-					Ovins, Caprins	Forte, le nombre de cas peut atteindre des proportions épidémiques fortes inconnues fortes modérées forte
	6	-	(+)	+	+	+	-	-						
	7	-	(+)	+	+	+	+	-	AL	(AL)	L	AL		
	9	-	+	+	+	-	+	-						
	1	-	-	+	+	-	+	-						
	2	-	-	+	+	+	-	-						
B suis	1	-	+	+	(-)	+	-	-	AL	L	L	LP	Porcins Rennes, rongeurs	
	2	-	-	+	-	+	-	-	AL	L	L	LP		
	3	-	-	+	+	+	-	-	AL	L	L	LP		
	4	-	-	+	(-)	+	+	-	AL	L	L	L		
	5	-	-	+	-	-	+	-	AL	L	L	LP		
B neotomae		-	+	-	-	+	-	-					(neotoma lepida)	Inconnue
B ovis		+	-	+	(-)	-	-	+	AL	AL	AL	AL	Ovins	Inconnue
B canis		-	-	+	-	-	-	+	AL	AL	AL	AL	Chiens	Faible, cas clinique rares

Sérums d'agglutination : A = antisérum monospécifique anti-B. abortus ; B = antisérum monospécifique anti-B. melitensis ; R = antisérum monospécifique anti-Brucella rugueuses ; DCE = dilution courante d'épreuve , Tb = Tbilissi ; Wb = Weybridge ; BK2 = Berkeley ; Fi = Firenze ; + = toutes les souches positives ; (+) = la plupart des souches positive ; - = toutes les souches négatives ; (-) = la plupart des souches négatives ; L = lyse confluyente ; LP = lyse partielle ; AL = Absence de lyse.

Tableau I : Caractéristique différentielles des espèces du genre Brucella et de leurs Biovar.

II. Etude de genre *Brucella*

II.1 Etiologie

Le système actuel de taxonomie du genre *Brucella* se fonde sur les recommandations formulées en 1963 par le Sous-Comité de la Taxonomie des *Brucella* du Comité International de Nomenclature Bactériologiques. L'identification fait tout d'abord appel à l'examen des caractéristiques morphologiques, culturales et aux propriétés métabolique et sérologique de la bactéries. Une confirmation peut être apportée par examen de l'ADN. Enfin la différenciation des espèces se réfère à la lyse par les phages et/ou à l'étude du métabolisme oxydatif. Quant aux tentatives visant à mettre en évidence certain caractère génétique du genre *Brucella*, elles demeurent infructueuses.

Le genre *Brucella* Comprend trois espèces principales ; *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* et *Brucella suis*. Il existe des espèces moins répandues comme *Brucella ovis*, *Brucella neotomae* ; *Brucella Canis* Au sein des principales, des biotypes ont été décrit. Ainsi pour *Brucella abortus* ; neuf biotypes sont reconnus, incluant un certain nombre de souches. [RADOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W. – 2000]. L'ensemble des espèces et de leurs Biovar est présente dans le tableau I, Ci-dessous

Tableau II : Différentiation des Biovar des espèces du genre *Brucella*

Espèce	Biovard	Culture CO2	Production H2s	Uréase	Croissance			Agglutination
					Thionine	Fushine A	M	
B.melitensis	1 à 3	-	-	+	+	+	-	+
B.abortus	1 à 9	+	+	+	-	+	+	-
B.suis	1 à 5	-	++	+	+	-	+	-
B.neotomae		-	+	+	-	-	+	-
B.ovis		+	-	+	+	-	-	-
B.canis		-	-	+	+	+	+	-
B.ceti		-	-	+	+	+	+	-
B.pinnipedialis		+	-	+	+	+	+	-
B.microti		-	-	+	+	+	-	+

Source OIE Terrestrial Manual (2008) et SCHOLZ et al. (2009)

II.2 Caractéristiques

II.2.1 Morphologie et structure

Les Brucella se présentent sous la forme des petits coccobacilles de 0,5-0,7 x 0,6-1,5 µm, sporulés, immobiles mais animés de forts mouvements browniens. Elles apparaissent généralement isolées et ne produisent ni capsule, ni flagelle.

Bactéries à gram négatif, elles ne présentent pas de coloration bipolaire. Elles résistent à la décoloration par des bases ou des acides faibles comme ceux employés dans les colorations de stamp ; Ko ster, Machiavello. [NICOLETTI P.-1999 ; PILET C. BOURDON J.L., TOMA B., MARCHAI N., BALBASTRE C. -1983]

La figure 1 donne une vue d'ensemble de l'anatomie de la cellule de brucella

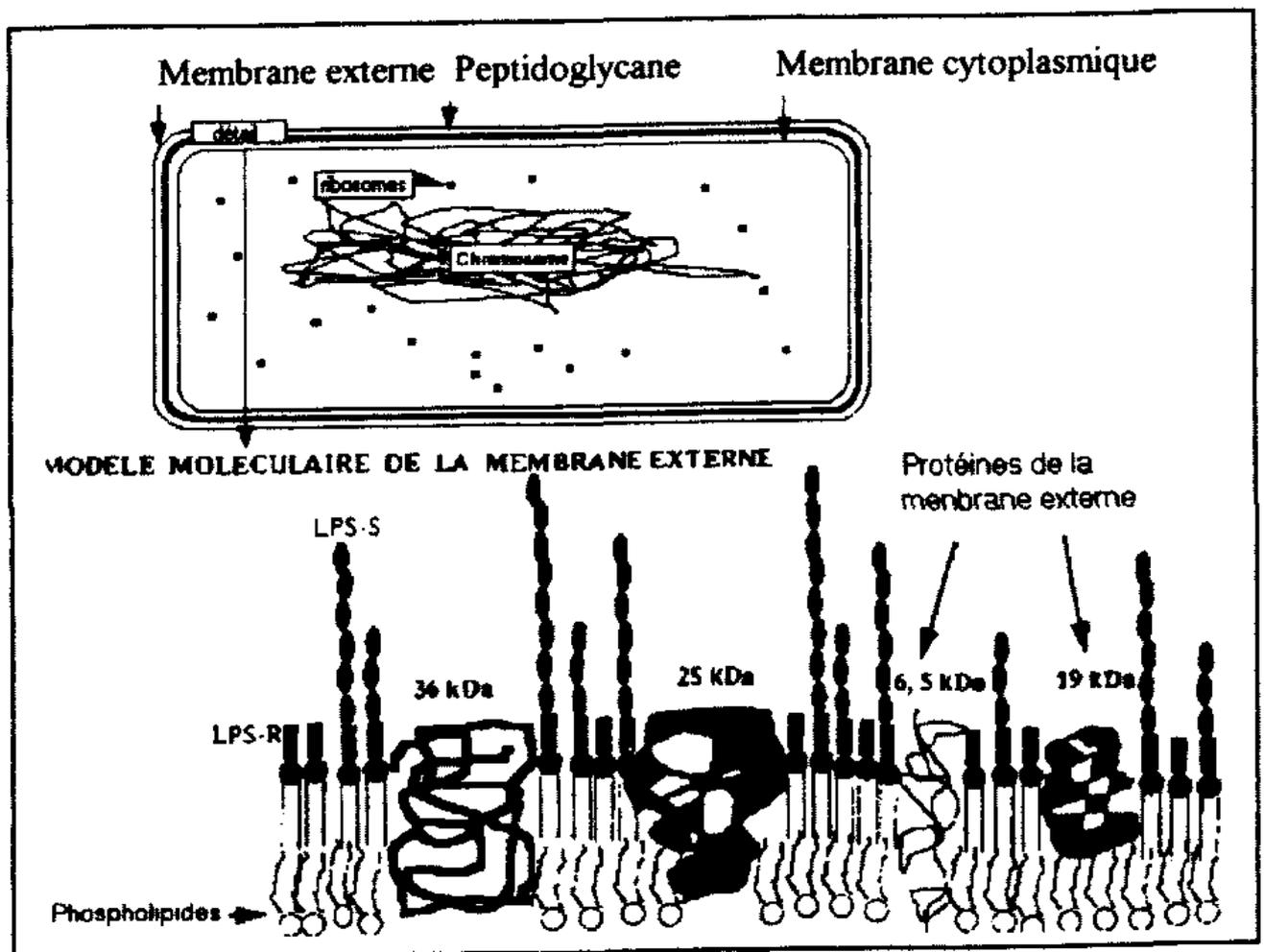


Figure 1 : anatomie de la cellule de brucella

II.2.1.1 Paroi et membrane cytoplasmique

Les brucellas ont une structure conforme à celle des autres bactéries Gram négatif. Mesure 20 à 3° nm d'épaisseur et leur membrane cytoplasmique 7 à 10 nm. Elles comportent une enveloppe cellulaire composée d'une membrane interne surmontée par une couche rigide de peptidoglycane associée à la membrane externe. Cette dernière contient des lipopolysaccharides, appelés deux formes, M et A dont les chaînes polysaccharidiques sont très semblables entre elles. Ils sont associés à des cellules de colonies en phase lisse (LPS-S) ou en phase rugueuse (LPS-R), des phospholipides et des protéines (Protéines de la Membrane Externe ou PME). [FLANDROIS.J.P.-1997 ; GARIN-BASTUJI B., DUFOUR B. – 1995]

II.2.1.2 Cytoplasme

Mésosomes et ribosomes peuvent être observés.

II.2.2 Culture et conditions de croissance

II.2.2.1 Condition physico-chimiques

Les conditions physico-chimiques nécessaires à la croissance des Brucella sont les suivantes :

- Le pH permettant la croissance des Brucella varie entre 6,6 et 7,4 ; Le pH optimal est de 6,8 ;
- La température de culture peut varier entre 20 et 37°C, la température optimale se situant à 34°C ;
- La pression osmotique optimale est de 203-607 pka ;
- Les Brucella sont aérobies strictes. L'apport d'oxygène aux cultures favorise d'ailleurs leur croissance. Toutefois,
- certaines nécessitent l'ajout de dioxyde de carbone pour leur culture (5-10%). [NICOLETTI P. - 1999]

II.2.2.2 Besoins nutritionnels

Les besoins nutritionnels sont complexes :

- L'ion ammonium et/ou certains acides aminés constituent une source d'azote pour les Brucella ;
- Le glucose, le galactose, le fructose ou l'acide lactique représentent des sources de carbone ;
- les ions sodium, soufre magnésium et fer indispensables, de même que les vitamines suivantes : thiamine, niacine et biotine.

II.2.2.3 Milieux

HORNITZKY et SEARSON ont démontré, au cours d'une étude, que le tissu mammaire, les nœuds lymphatiques supra-mammaires ainsi que les nœuds lymphatiques iliaques sont à privilégier pour des prélèvements en vue de la nature de brucella. [HORNITZKY M., SEARSON J. – 1986]

Les souches conservées au laboratoire poussent sur des milieux usuels. Mais le développement des bactéries sur ceux-ci est lent. De nombreux milieux ont été employés depuis que BRUCE en 1887, a utilisé un bouillon de viande et stafseth, en 1920, un milieu à base d'infusion de pommes de terre additionné de glycérine [PILET C. BOURDOON J.L., TOMA B., MARCHAI. N., BALBASTRE C. – 1983]. Les plus fréquemment utilisés sont :

- les milieux solides : gélose dextrosée au sérum, milieux commerciaux (gélose trypticase, soja, gélose tryptosée), gélose au sang ;
- les milieux liquides : bouillon trypticase, bouillon tryptosé
- les milieux sélectifs : ils correspondent aux milieux habituels additionnés d'antibiotiques ou antifongiques (milieu de Farrell, Kuzdas et Morse). [PILET C. BOURDOON J.L., TOMA B., MARCHAI. N., BALBASTRE C. – 1983]

Il est toutefois recommandé d'employer un milieu solide, de préférence à un milieu liquide car celui-ci facilite l'identification et l'isolement des colonies en croissance.

Par ailleurs, CORNER et coll. ont étudié la culture de *Brucella abortus* sur milieu biphasique (solide et liquide), comparativement à un milieu solide. Il en ressort que c'est un substrat efficace, mais que pour obtenir des résultats optimaux, il convient de cultiver *Brucella* sur ces deux milieux (biphasique et solide). Les travaux HORNITZKY et SEARSON confirment l'intérêt du milieu biphasique. [CORNER I.A., ALTON G.G., IYER H. – 1985 ; HORNITZKY M., SEARSON J. – 1986]

II.2.2.4. Caractère culturaux

Sur milieux solides, de fines colonies rondes et translucides apparaissent 2 à 3 jours après l'ensemencement. On en distingue plusieurs types : smooth, rough, intermédiaires, mucoides et smooth-rough.

Sur milieux liquides, la culture apparaît en 48h à 4 jours et donne un trouble homogène. Les bactéries en phase R cultivent en dépôt présentant un aspect grumeleux après agitation. [PILET C. BOURDOON J.L., TOMA B., MARCHAI. N., BALBASTRE C. – 1983]

II.2.3. Caractères biochimiques,

II.2.3.1. Caractères généraux du genre

Les principaux caractères biochimiques du genre sont les suivants :

- aérobic strict ;
- présence d'une catalase ;
- réaction oxydase+, sauf pour *B. neotomae*, *B. ovis*, et parfois *B. abortus* ;
- pas de liquéfaction de la gélatine ;
- absence d'hémolyse sur gélose au sang ;
- réaction négative au rouge de méthyle et à la réaction de Voges-Proskauer ;
- pas de réaction de l'O-nitrophénol ;
- présence des cytochromes a, a₃, b, c et o.

II.2.3. Caractères particuliers aux différentes espèces

HUDDERSON puis CRUICKSHANK ont déterminé dans leurs travaux respectifs les caractères biochimiques des trois principales espèces de *BRUCELLA* par rapport à leurs exigences en CO₂, la production de H₂S, la sensibilité à la thionine et à la fuschine.

Cette classification étant cependant un peu dépassée, on a actuellement recours à l'étude du métabolisme d'oxydation des acides aminés et des glucides

II.2.4. caractères antigéniques

Les connaissances sur la structure antigénique des *BRUCELLA* ont été améliorées grâce à de nombreuses études fondées sur des procédés physiques (ultrasons, freeze-pressing) ou sur l'analyse par immunoélectrophorèse et immunodiffusion des extraits de cellules. Ces techniques ont permis de découvrir que la majorité des antigènes des *Brucella* sont communs à toutes les souches, à l'exception des lipopolysaccharide (LPS) qui diffèrent entre les souches lisses et rugueuses et des protéines de la membrane externe qui présentent des variantes entre les espèces. [COMITE MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE.1986 ; CORBEL MJ., CULLEN GA.1985]

II.2.4.1 Bactéries Smooth (S ou lisses)

II.2.4.1.1. Antigènes de surface

II.2.4.1.1.1. Le complexe LPS-S et haptènes apparentes

Lors d'extraction à chaud par le phénol et l'eau et après purification supplémentaire, on trouve dans la phase phénolique le complexe LPS₆S, l'haptène polysaccharidique natif (HN), et le polysaccharide B (poly B).

Leurs caractéristiques sont les suivantes :

-Le LPS-S (ou lipopolyosides ou lipopolysaccharide ou endotoxine) est la structure antigénique majeure de la surface des Brucella. Il est constitué d'une chaîne polysaccharidique longue (chaîne O), d'une chaîne courte de glucides (le core) et de lipides (lipide A) qui lient le complexe à la membrane cellulaire. Parmi les constituants chimique du LPS-S, figurent des composants glucidiques (le glucose, le mannose, la desoxy-3-octanate) et des acides gras (50% d'acide palmitique, 10% d'acide stéarique, 5% d'acides gras hydrolysés). la partie glucidique du LPS-S est porteuse des epitopes A (pour abortus) et M (pour melitensis). Ces epitopes, très semblables entre eux, ont été mis en évidence par des méthodes sérologiques chez toutes les Brucella en phase S appartenant aux espèces B. abortus, B. melitensis et B. suis, [FLANDROIS J.P.- 1997]

-Les différentes souches de Brucella comportent donc les même facteurs antigéniques, mais dans des proportions différentes. ILSON et MILES ont, par leurs travaux, quantifié ces antigènes pour les souches précitées : l'antigène A prédomine dans certains biotypes de B. abortus, l'antigène M prédomine chez B. melitensis, A et M sont en quantités intermédiaire chez B. suis. [PILET C. BOURDOON J.L., TOMA B., MARCHAI. N., BALBASTRE C. – 1983]

-L'haptène natif (HN) n'aucune activité d'endotoxine et ne contient ni acide gras, ni cetodesoxyoctanate, ni protéine. il est assez semblable au LPS-S, mais non identique. il donne une réaction immunologique d'identité avec l'haptène acetopolysaccharidique obtenu par hydrolyse du complexe LPS-S.

Le polysaccharide B (poly B, aussi appelé composant 1, second composant ou PB) est de poids moléculaire faible. Il est composé principalement de glucose (89%), de traces de quinovosamine, mais ne comporte pas de cetodesoxyoctanate. Bien qu'associé à la paroi, il n'intervient pas dans l'agglutination des bactéries, mais précipite en milieu gélique contenant l'anti-sérum. il présente donc un intérêt considérable, car il est reconnu par les sérums d'animaux infectés, ce qui n'est pas le cas pour les sérums d'animaux vaccinés [CORBEL MJ., CULLEN GA. – 1985; LORD V.R., ROLO

M.R., CHERWONOGRODZKY J.W.- 1989 ; NIELSEN K.H., WRIGHT P.F., KELLY W.A., CHERWONOGRODZKY J.H.- 1988]

Les fonctions de HN et du poly B ne sont pas connues, mais on suppose qu'ils sont probablement les précurseurs de la chaîne O du LPS. [CORBEL MJ., CULLEN GA. – 1985]

II.2.4.1.1.2. : Les protéines de la membrane externe (PME)

Les PME des Brucella n'ont été isolées et partiellement caractérisées que récemment. Les PME de 25-27,36-38 et 31 et kDa sont majeures, alors que celles de 89,19 et 16.5 kDa sont considérées comme mineures. Ces groupes de protéines sont retrouvés en quantités variables dans les souches de B.abortus, B.melitensis, B.canis, B.ovis, les profils de B.suis et B.neotomae n'ayant pas encore été établis. Si certaines de ces PME ont vraisemblablement une activité de porine, la fonction des autres reste inconnue. [CORBEL MJ., CULLEN GA. – 1985 ; GARIN-BASTUJI B., DUFOUR B.- 1995]

LIMET et coll, dans leurs travaux, ont démontré l'utilité des PME (en particulier les PME de 89kDa) dans le diagnostic de la brucellose.

II.2.4.1.1.3. : le peptidoglycane(PG)

Le peptidoglycane est composé de glucosamine, d'acide muramique, d'alanine, d'acide glutamique et d'acide diaminopimélique. Il a la propriété de renforcer la réponse immunitaire par ses propriétés adjuvantes.

II.2.4.1.2 Antigènes internes

L'analyse d'extraits de Brucella à l'aide d'épreuves d'immunité précipitation permet de dénombrer entre 1 et 9 antigènes protéiques intracellulaires, dont A1, A2, A3, A4, B1, B2, et C. Ils induisent chez l'animal une réponse à la fois humorale et cellulaire. [CHERWONOGRODZKY J.W., DUBRAY G., MORENO E. MAYER H.-1990]

Peu de ces antigènes ont été caractérisés individuellement. Toutefois, l'antigène A2 a été identifié comme étant une glycoprotéine de haut poids moléculaire relativement stable à la chaleur. Il permet la différenciation entre animaux vaccinés et animaux infectés par des techniques d'immunodiffusion et d'immun-électrophorèse.

Les propriétés de certains de ces antigènes internes liées au développement d'une immunité cellulaire induisent une hypersensibilité retardée sont mises à profit dans le dépistage allergique. Le

principal allergène utilisé actuellement pour ce type de dépistage est la brucelline-INRA (Brucellergène OCB), préparation protéinique exemple de LPS. [GARIN-BASTUJI B.-1993]

II.2.4.1.3 Antigènes communs avec d'autres bactéries

Il existe des antigènes communs à brucella et d'autres bactéries (*Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, les représentant du groupe N (0 ; 30) de Kaufmann-White de *Salmonella*, *Pseudomonas maltophilia*). [FLANDROIS J.P.-1997; GARIN-BASTUJI B., DUFOUR B. – 1995] L'exposition de l'hôte à ces organismes peut donner lieu à des titres significatifs au plan diagnostique en anticorps réagissant traditionnellement avec les antigènes cellulaires ou avec le LPS-S de brucella.

Ces réactions, nommées réactions croisées, impliquent le composant glucidique du LPS-S et ont été attribuées à la présence de résidus substitués didésoxy-4, 6 amino-4 mannopyranosyle dans les chaînes O bactéries pré-citées. [GARIN-BASTUJI B., DUFOUR B. – 1995]

II.2.4.2 Bactérie rough (R ou Rugueuses)

Les mutants R obtenus à partir de *Brucella S* possèdent un LPS-R. Les préparations de LPS-R révèlent que celui-ci ne contient pas d'acides nucléiques et peu ou pas de protéines, et que ses chaînes de mannose, de cetodésoxyoctanate et de glucosamine. L'absence de quinovosamine différencie le LPS-R du LPS-S.

En outre, on retrouve chez les bactéries R l'haptène natif (NH) et le poly B présents chez les bactéries S.

Un déterminant antigénique, désigné sous le nom de déterminant R (ou haptène R) a été identifié comme étant l'antigène de surface majeur des *Brucella rugueuses*.

Les différences entre bactéries lisses et rugueuses sont donc principalement liées à la différence de composition des complexes LPS qui sont les supports des principaux antigènes de surface. [CORBEL MJ., CULLEN GA. – 1985]

II.2.4.3 Rôle des antigènes dans les épreuves de diagnostic

Le LPS-S est le principal antigène intervenant dans les épreuves classiques : agglutination, fixation du complément, épreuve au Rose-Bengale sur plaque et épreuve d'immunodiffusion radiale qui permet de différencier les animaux infectés de ceux qui ont été vaccinés. [COMITE MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE.-1986]

II.2.5 Lysogénie lysotypie

II.2.5.1 Définition

NICOLLE et MOLLARET donnent une définition de la lysogénie et de la lysotypie selon eux, une souche bactérienne lysogène possède deux propriétés:

- D'une part, elle élabore des bactériophages spontanément et les libère en quantité variable dans le milieu dans lequel elle se développe.
- D'autre part, du fait de la présence dans ou sur son chromosome du déterminant génétique de la lysogénie, le prophage, cette bactérie est généralement prémunie contre l'action lytique d'un bactériophage extérieur identique ou de bactériophage apparentés à celui dont elle détient le prophage.

Toujours selon ces auteurs, la lysotypie permet d'établir, par l'utilisation de jeux de bactériophage convenablement choisis et lorsque les souches présentent le même spectre de sensibilité, que ces souches dérivent d'un même foyer d'infection. Au contraire, si leurs réactions sont différentes, aucune relation de contamination ne saurait être envisagée entre elles.

L'étude de la lysogénie et l'application à la lysotypie sont donc d'une grande utilité. Elles rendent d'inappréciables services dans les recherches épidémiologiques de nombreuses maladies infectieuses bactériennes. [NICOLLE P., MOLLARET H., BRAULT J.- 1972]

II.2.5.2 Caractéristique des phages de Brucella

Jusqu'à récemment, on pensait que seules les bactéries en phase S étaient sensibles aux bactériophages. Mais des phages actifs sur les Brucella en phase R ont été trouvés depuis.

Il existe de nombreux phages actifs sur Brucella. On compte les phages des groupes Tbilis Weybridge, Florence, plus ou moins spécifiques, ainsi que les phages actifs sur B.melitensis et ceux actifs sur les Brucella Rough. [ANONYME – 1988]

Leur intérêt est grand en matière de taxonomie. Par exemple, le phage Tbilis (phage Tb) lyse exclusivement les brucelles dont le métabolisme d'oxydation est caractéristique de brucella *abortus*.

Le Tableau III : Présente la différenciation des espèces de Brucella par les bactériophages.

Espèce de Brucella	Bactériophage								
	TP	W/b	Fi	Bk	R	R/O	R/C		
	DCE 1000DCE	DCE	DCE	DCE	DCE	1000DCE	DCE	DCE	DCE
B. melitensis	-	-	-	-	+	-	-	-	-
B.abortus	+	+	+	+	+	LP	+	LP	-
B suis	-	LP	+	LP ^o	+	-	-	-	-
B.neotomae	-	+	+	+	+	-	LP	-	-
B.ovis	-	-	-	-	-	-	+	+	+
B.canis	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ Lyse, - absence de lyse, LP : Lyse partielle, LP^o : lyse seulement pour le biotype 4, DCE : dilution d'Epreuve, 1000 DCE fois concentrée, Bactériophages : Tb, Tbilissi ; Wb, Weybridge, Fi, Florence ; BK, Berkeley ; R, R/0, R/C, Phage actifs sur les forme R

II.2.6. Génétiques

Les tentatives visant à mieux connaître les caractères génétiques des Brucella n'ont Jusqu'à présent pas été très fructueuses. Néanmoins, un certain nombre de caractéristiques a pu être dégagé.

II.2.6.1 Génome des Brucella

Les études d'hybridation de L'ADN montrent que les bactéries du genre Brucella forment un groupe génétique étroitement apparente, avec plus de 90% d'homologie des séquences de poly nucléotides, quelle que soit l'espèce (B.abortus, B. melitensis, B. suis, B.neotomae, B.ovis, Canis). La teneur en bases G+C L'ADN des différentes espèces varie de 55 à 58 moles. [COMITE MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE,-1986 ; ROUX J. -1989]

II.2.6.2 Mutation S-R

La mutation du caractère S vers les caractères R porte sur le LPS de la paroi et entraîne un ensemble de conséquences phénotypiques :

- la résistance des R a une fort concentration de D-alanine dans le milieu, d'où avantage sélectif sur les S (D-alanine produite par le métabolisme des Brucella) ;
- la présence de l'antigène R à la place des antigènes A et M ;
- l'agglutination spontanée en eau physiologique ;

- la perte du pouvoir pathogène par sensibilité plus grande à la phagocytose.

La présence de mutants R doit être décelée (épreuve à l'acriflavine ou épreuve de thermo agglutination), car les préparations de vaccins doivent être uniquement constituées de bactéries S. [COMITE MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE 1986 ; ROUX J. 1989]

II.2.6.3 Mutants muqueux

Certaines souches de Brucella présentent des colonies muqueuses. Elles sont caractérisées par des colonies épaisses, filantes et inagglutinables sauf par sérums anti- M les bactéries qui les produisent sont mal connues.

II.2.7 Résistance et inactivation

La capacité des Brucella à résister à l'inactivation dans le milieu naturel est relativement élevée par rapport à la plupart des autres groupes de bactéries pathogènes non sporulation. En effet, dans des conditions favorables, elles peuvent survivre dans leur environnement pendant de très longues périodes. [CAMERON H.S 1932 ; KING N.B.1957 ; KUDAS C D., MORSE E.V.1954]

II.2.7.1 Résistance

II.2.7.1.1 Résistance dans le milieu extérieur

Dès le début du siècle, BRUCE avait commencé à étudier le problème de la survie des brucellas. Depuis, de nombreuses études tendent à démontrer les capacités de leur résistance dans le milieu extérieur. Ainsi CAMERON en 1932, KUZDAS et MORSE en 1957 ont testé la durée de vie de brucella dans l'eau, le sol les copeaux, la putréfaction, les fèces, l'urine, les cadavres, le purin... à différentes températures et avec une exposition à la lumière plus ou moins importante.

[CAMPBELL G.A., ADAMS L.G., SOWA B.A.1994 ; CARGILL C., LEE K., CLARCKE I.1985]

L'AFSSA a complété ces études par des travaux (tableau 3 ci-dessous)

Milieu	Température/Environnement	Viabilité
Rayonnement solaire direct	<31°C (boîte de pétri)	4 h 30
Eau	-4°C	4 mois
Eau (laboratoire)	20°C	2,5 mois
Eau (lac)	37°C, pH= 7,5	< 24 h
	8°C, pH= 6,5	> 2 mois
Sol	Séché en laboratoire	< 4 jours
	Ambiance humide	> 2 mois
	Automne (90% humidité)	8 – 73 jours
	Février (Séchage rapide)	72 jours
Urine	37°C, pH=8,5	16 h
	8°C, pH=8,5	6 jours
Lait cru	25-37°C	1 jour
	8°C	2 jours
	-40°C	2,5 ans
Lactosérum	17-24°C	< 5 jours
	5°C	>6 jours
Fumier	Été	1 jour
	25°C	1 mois
	Hiver	2 mois
	8°C	1 an
	-3°C	3 mois
Purin	Été	3 mois
	Hiver	6 mois
Lisier	En tonne	1,5 mois
	En tonne (12°C)	>8 mois
Laine	En entrepôt	4 mois
Foin		Quelques jours à quelques mois
Poussière de rue		3 – 44 jours
Barrière d'enclos ou sol en bois		4 mois
Pâture	Ensoleillée	< 5 jours
	Ombagée	> 6 jours

Tableau IV : Résistance des Brucella dans l'environnement. [Source AFSSA]

II.2.7.1.2 Résistance dans les denrées alimentaires

- La survie des Brucella dans le lait et les produits laitiers est liée à de nombreux facteurs (type de produit, teneur en eau, température, modification de PH, action biologique des bactéries présentes, durée et condition de conservation du produit). La persistance dans les fromages secs ou fermentés affinés est courts (moins de 20 jours). Par contre dans les fromages frais ou conservés sous forme de pâte, elle peut être beaucoup plus longue (3 mois). On a aussi constaté que le fromage de vache est plus longtemps infectant que le fromage de chèvre.

[ANONYME.1988]

- La survie des Brucella dans la viande est très courte. La contamination à partir de carcasse d'animaux brucelliques est donc exceptionnelle. En outre, elle peut être facilement évitée par un dépouillage rigoureux et dans de bonnes conditions d'hygiène de la mamelle, des organes génitaux et des nœuds lymphatiques l'abattoir.

Il faut toutefois préciser que la consommation de produits crus et la conservation des viandes par salage ou par réfrigération n'entraîne pas la disparition des Brucella.

-Les légumes frais peuvent être contaminés lorsque le terrain est enrichi de fumier infecté le danger semble actuellement sous-estimé. [ROUX J. 1989]

Par le biais de cette résistance, les Brucella peuvent être à l'origine de nouvelles contaminations. C'est ainsi, en effet, que se constituent et s'étendent les foyers de brucellose dans lequel l'homme va être impliqué. [FLANDROIS J.P.1997]

II.2.7.2 Inactivation

II.2.7.2.1 inactivation physique

Les Brucella en suspension diluée, sont facilement tuées par la chaleur (pasteurisation). Cependant, en suspensions dense, il sera nécessaire de les soumettre à un traitement thermique répété ou à des températures proches du point d'ébullition pour les inactiver en totalité.

Elles sont aussi sensible aux radiations ionisants à des doses normales à condition de veiller à ce que l'exposition soit complète. [COMITE MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE.1986]

II.2.7.2.2 inactivation chimique

Les Brucella ont une sensibilité in vivo aux antibiotiques à bonne pénétration cellulaire (tétracyclines).

En suspension aqueuse, elles sont facilement tuées par la plupart des désinfectants : phénol, formaldéhyde, xylène, cyanamide calcique, On peut aussi employer l'éthanol, l'isopropanol, les eidophores ou des solutions diluées d'hypochlorite. A l'inverse, les ammoniums quaternaires sont inefficaces. [COMITE MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE.1986; FLANDROIS J.P.1997]

La décontamination thermique reste la plus utile.

III. Pathogénie

III.1 Pouvoir pathogène expérimental

Des expérimentations ont été menées d'une part sur les ruminants domestiques (bovins, ovins, caprins, porcs), le plus souvent pour tester l'efficacité des vaccins et d'autre part sur les animaux de laboratoire et en particulier le cobaye, en vue d'étudier la pathogénie et l'aspect immunitaire de l'infection. [PILLY E.1988] Ces études ont permis entre autres de montrer que le pouvoir pathogène expérimental varie en fonction

- De l'espèce bactérienne ;
- De l'animal en cause .En effet, le tropisme des Brucella dépend de l'espèce animale, avec un tropisme génital chez les gros animaux et une absence de ce tropisme chez les petits animaux ;
- De la souche utilisée et de son état de dissociation : S est pathogène contrairement à R [ROUX J. 1989]

III.2 Pouvoir pathogène naturel

III.2.1 conditions de l'infection

III.2.1.1. Facteurs tenant aux Brucella

III.2.1.1.1. Facteurs qualitatifs

Le pouvoir pathogène des Brucella varie selon les espèces (B.melitensis étant classiquement plus virulente) et les souches. Le mécanisme de ce pouvoir pathogène reste en grande partie inexpliqué. Cependant, la fraction soluble dans le phénol des LPS de la membrane externe de la paroi semble jouer un rôle important, car les souches R (rough). Dont les chaînes polysaccharidiques du LPS sont incomplètes, sont peu pathogènes. [FLANDROIS J.P.1997; GARIN-BASTUJI B.1993 ; ROUX J. 1989]

III.2.1.1.2. Facteurs quantitatifs

Le pouvoir pathogène est aussi lié à l'importance de l'inoculum. Selon MAC EWEN, l'installation conjonctivale de 100000 B. abortus à des génisses permet d'obtenir un taux d'infection de 50 % ; pour 15x 100000 brucella, il devient supérieur à 90%. [GARIERE J.P.2000]

III.2.1.2 Facteurs tenant à l'hôte

La susceptibilité des bovins à B.abortus est influencée par l'âge, le sexe et le stade physiologique de l'animal.

III.2.1.2.1. Age

III.2.1.2.1.1.Période fœtale

L'infection de fœtus in utero se solde généralement par une septicémie mortelle et l'avortement. Cependant, dans certains cas ; en fin de gestation et lors de contamination faible. Le veau jusqu'à l'âge adulte, l'animal restant séronégatif et cliniquement sain jusqu'à sa première mise-bas.

[GARIERE J.P.2000]

Certain veaux nés d'animaux sains sont séropositifs durant les 4 à 6 premiers mois de vie du fait des anticorps colostraux, puis deviennent séronégatifs. Ce type d'infection congénitale est cependant assez rare. On estime qu'elle touche 2.5 à 9 % des animaux nés de mère infectées. [RASDOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W.2000]

III.2.1.2.1.2.Période pré-pubère

Si l'animal jeune pré-pubère (avant 6 mois) est bien réceptif, sa sensibilité à l'infection est nulle. La maladie n'est par conséquent jamais exprimée durant cette période. Dans le cas contraire, l'animal récupère très rapidement. [GARIN-BASTUJI B.1993 ; RASDOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W.2000]

Il est par ailleurs d'autant plus résistant qu'il est la progéniture d'une vache infectée.

[HUNGERFORD T.G. 1967]

III.2.1.2.1.3.Période post-pubère

La période post-pubère, après développement complet des organes génitaux, est la phase de sensibilité maximale. [GARIERE J.P.2000; GARIN-BASTUJI B.1993 ; HUNGERFORD T.G.1967]

III.2.1.2.2 Gestation

La sensibilité augmente avec le stade de gestation. De surcroît, plus le nombre de vaches avortant ou vêlant est grand, plus le risque de contamination des autres vaches augmente peu de femelles infectées guérissent complètement et doivent donc être considérées comme des porteurs permanents. [RASDOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W.2000]

III.2.1.2.3 Individu

Le pouvoir pathogène des Brucella est aussi fonction de l'individu. C'est la raison pour laquelle, sur le terrain tous les intermédiaires peuvent être observés entre l'infection aiguë typique avec avortement, et la résistance totale à l'infection. [GARIN-BASTUJI B.1993]

III.2.2 Etapes de l'infection

III.2.2.1. Période primaire : brucellose aigue

III.2.2.1.1.Pénétration et multiplication loco-régionale

La Brucella pénètrent dans l'organisme par la porte d'entrée ; muqueuses oculaire, nasopharyngée, digestive, génital, peau érodée... La pénétration semble toutefois se faire principalement par les voies aériennes supérieures chez les animaux d'élevage. Les bactéries migrent ensuite par voie lymphatique, jusqu'au premier relais ganglionnaire où elles se multiplient. Ce ganglion constitue le foyer primaire, périphérique ou profond (ganglions de la tête, ganglions mésentériques...). La multiplication se fait à l'extérieur des cellules. [GARIN-BASTUJI B, DUFOUR B.1995]

La phase loco-régionale correspond à la période d'incubation de la maladie. Peu caractéristique, elle peut passer inaperçue ou même se limiter à cette étape lors de contamination par des Brucella peu pathogènes. Elle dure environ 8 à 15 jours et n'excède pas 3 semaines. [FLANDROIS J.P.1997]

III.2.2.1.2.Phase de dissémination

A partir des ganglions colonisés, les Brucella disséminent par voie lymphatique (prépondérante chez les bovins) ou hémotogène. C'est lors de cette phase de bactériémie que l'hémoculture peut être positive. Cette étape peut elle aussi passer cliniquement inaperçue. [FLANDROIS J.P.1997]

Dans le même temps, les Brucella sont phagocytées par les neutrophiles et macrophages du ganglion colonisé. Dans certaines cellules, elles sont dégradées et libèrent leurs antigènes et leur endotoxine. Dans d'autres, elles se multiplient en provoquant des lésions. [NICOLETTI P.1999]

III.2.2.1.3.Phase de localisation

Enfin, les Brucella s'implantent et se multiplient dans certains sites d'élection :

- Les organes riches en cellules réticulo-histiocytaires comme le foie, la rate et les groupes ganglionnaires (nœuds lymphatique mammaires et iliaques) ;

- Les organes génitaux : utérus gravide, fœtus et ses annexes embryonnaires chez la femelle, testicules et annexes chez le mâle ;
- La mamelle ;
- Les bourses séreuses et synoviales. [GARIN-BASTUJI B.1993 ; HUNGERFORD T.G.1967; NICOLETTI P.1999 ; RASDOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W.2000]

Des foyers bactériens intracellulaires se constituent alors dans ces lieux, entourés d'une réaction histio-monocytaire et lymphocytaire. Dès la deuxième semaine, la formation d'anticorps s'oppose au développement de l'infection.

La période primaire de l'infection peut donc se traduire, selon le stade physiologique et le sexe, par une atteinte générale mais légère, l'avortement, une orchite, une épididymite, une arthrite ... et la dissémination du germe. De nombreux animaux asymptomatiques demeurent cependant porteurs et excréteurs potentiels. [GARIN-BASTUJI B.1993]

III.2.2.2. Période secondaire

La période secondaire est associée à un état de résistance de l'hôte plus ou moins prononcé, lié au développement de l'immunité. Cette étape voit soit la disparition des Brucella soit, le plus souvent, leur persistance à l'état quiescent dans les ganglions lymphatiques. [GARIERE J.P.2000; GARIN-BASTUJI B.1993]

III.2.2.2.1. Guérison

Elle est peu fréquente. Seul un faible pourcentage des bovins guérissent spontanément. [NICOLETTI P.1999]

III.2.2.2.2. Persistance des Brucella

La persistance des Brucella dans les ganglions lymphatiques (notamment ganglions rétro mammaires et ceux de la sphère génitale) est le cas le plus fréquent, Elle peut s'étendre sur une longue période. En effet, B.abortus a été retrouvé 9, 10 et 11 ans après l'infection chez certains bovins. Ceci s'explique par le fait que Brucella est une bactérie intracellulaire facultative, capable de se multiplier et de survivre dans les macrophages une fois phagocytée par une cellule des Brucella. La nature de ce dernier est discutée. [GARIN-BASTUJI B.1993 ; LAPRAIK R.D., MOFFAT R. R.1982 ; RASDOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W.2000 ; WOOLCOCK J.B.1979]

Les mécanismes de persistance consistent en :

- Une inhibition partielle de la fusion phagolysosomiale ;
- Une résistance à l'action létale des molécules des lysosomes ;
- Un échappement rapide de Brucella de la vacuole phagocytotique vers le cytoplasme. Des travaux récents ont montré que cet échappement serait plus particulièrement dû à des fonctions mitochondria-like de Brucella. Cette dernière gagnerait ainsi le réticulum endoplasmique rugueux. [FLANDROIS J.P.1997 ; PATRICK S., LARKIN M.J.1995; RAMIREZ- ROMERO R.1998]

Par ailleurs, il semblerait que les Brucella soient capables de synthétiser des protéines dites de « choc thermique » qui pourraient jouer un rôle important dans leur survie intracellulaire. [FLANDROIS J.P.1997]

En outre, la lésion granulomateuse qui se forme autour des Brucella phagocytées a l'avantage de protéger ces dernières contre les anticorps sériques et les antibiotiques. [HERBERT W.J.,- Veterinary immunology, Revised reprint, Blackwell scientific ; LAPRAIK R.D., MOFFAT R. R.1982]

Les travaux de CAMPBELL et coll. Étudient ces mécanismes au niveau moléculaire et confirment l'importance de la phagocytose dans la résistance de Brucella. [CAMPBELL .G A. ADAMS L. G SOWA B.A. – Mechanisms of binding of Brucella abortus to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis]

La réactivation de l'infection reste alors possible par la suite, notamment lors de gestation ou consécutivement à une baisse de l'état général (carence, vaccination, maladie concomitante...) ou à une baisse de la résistance locale (arthrite suite à une plaie articulaire).

Elle se produit souvent de façon intermittente. [GARIERE J.P.2000; GARIN-BASTUJI B.1993] les conséquences en sont :

- Des manifestations de brucellose subaiguë ou chronique, de type apathie, atteinte ostéo-articulaire, et plus rarement nerveuses, hépatospléniques, génitales ou bronchiques ;
- Des vaches qui n'avortent en général qu'une fois du fait de l'acquisition d'une « tolérance » à la maladie. Cependant, bien qu'elles n'avortent plus par la suite, elles restent porteuses et sont donc capables de disséminer les germes, notamment par le biais de l'urine et des décharges utérines émises lors d'un part apparemment normal. Ces animaux qui représentent une véritable menace pour le statut indemne des cheptels peuvent expliquer certaines

résurgences de la maladie qui apparaissent dans les programmes d'éradication
[FLANDROIS J.P.1997 ; GARIN-BASTUJI B.1993 ; HUNGERFORD T.G.1967 ;
LAPRAIK R.D., MOFFAT R. R.1982]

Figure 2 reprend de manière synthétique les étapes de l'infection.

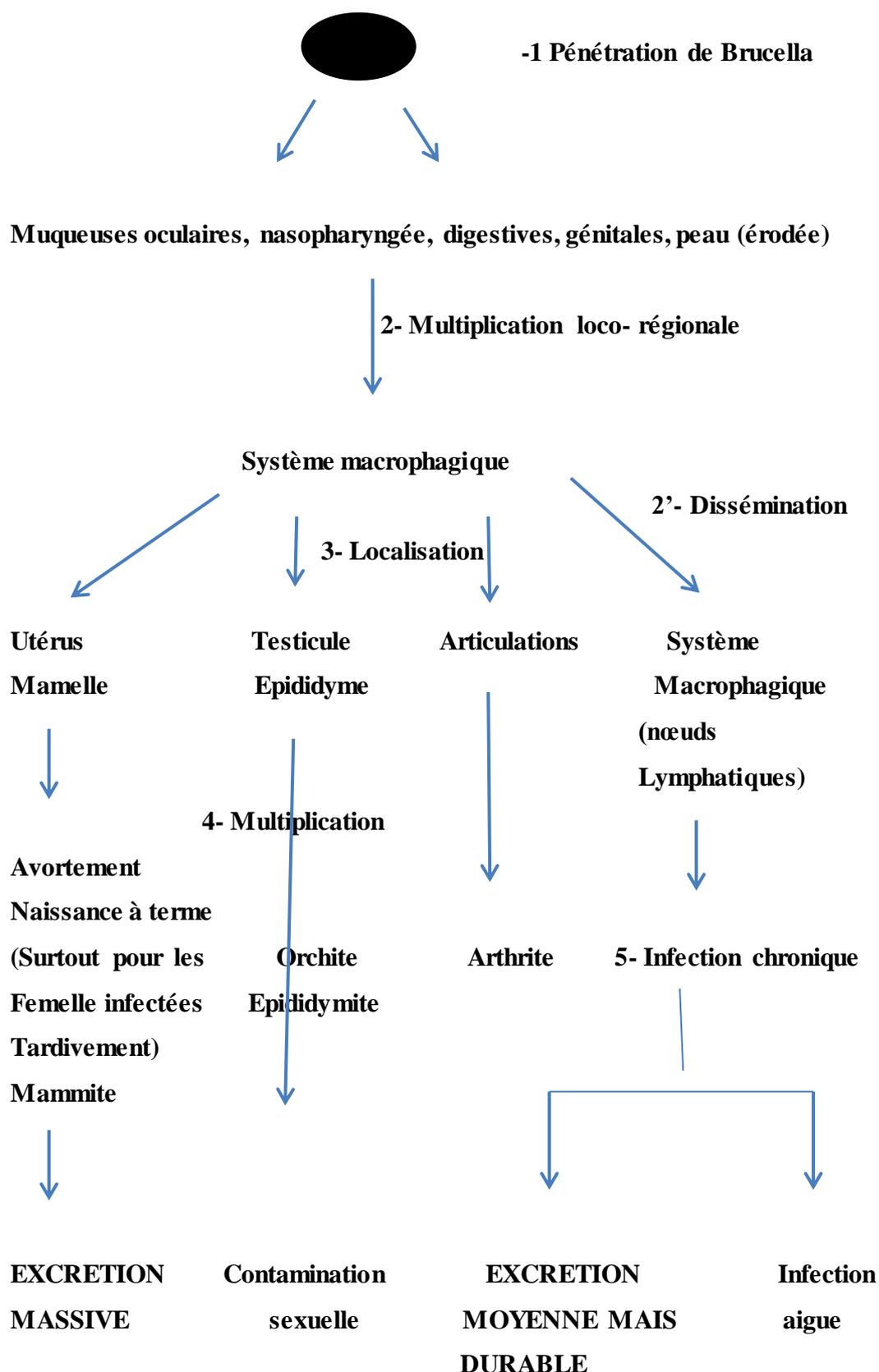


Figure 2 : Les étapes de l'infection brucellique.

III.2.3. Mécanisme de l'avortement

III.2.3.1. localisation placentaire des Brucella

B. abortus a une spécificité tissulaire vis-à-vis du placenta de bovin. Dans les infections aiguës chez les vaches gestantes, plus de 85% des bactéries se situent dans les cotylédons, les membranes placentaires et le liquide amniotique.

En 1962, WILLIAMS et coll. Isolent et identifient, à partir de tissus extraits de vaches gestantes et de fœtus, concentration dans le liquide amniotique et le placenta : l'erythritol. Naturellement en forte concentration dans le liquide amniotique et le placenta, l'erythritol est responsable de la localisation de l'infection dans ces tissus. Les *Brucella* l'utilisent comme source d'énergie. [NICOLETTI P.1999 ; WOOLCOCK J.B.1979]

La colonisation de l'utérus gravide par les bactéries a pour conséquence le développement d'une endométrite ulcéreuse sévère de l'espace utéro-chorial, avec foyers de nécrose au niveau du placenta. L'allanto-chorion, le liquide amniotique et les cotylédons sont ensuite envahis et la villosité détruites. Enfin, le fœtus peut être à son tour infecté par de très nombreuses *Brucella* qui se disséminent dans tous ses organes. [ROUX J. 1989] A moins que ce dernier ne soit assez âgé pour survivre et que les lésions peu étendues, sa mort suivie de son expulsion est l'issue la plus fréquente. Les causes de mort du fœtus sont :

- L'anoxie due aux lésions placentaires qui interrompent les échanges nutritifs entre la mère et le fœtus ;
- La septicémie après ingestion de liquide amniotique contaminé ou après infection par voie hématogène [GARIERE J.P.2000; HUNGERFORD T.G.1967 ; NICOLETTI P.1999]

III.2.3.2. Devenir des Brucella dans l'utérus après avortement

La sévérité de l'infection utérine varie, mais le nombre de brucella est maximal au moment de l'avortement ou de parturition. Généralement, l'infection génitale disparaît dans les 30 jours suivant l'avortement ou le vêlage, mais peut réapparaître au cours des gestations suivantes, avec ré-excrétion dans les produits du part. Dans ce laps de temps, les bactéries persistent dans les ganglions (ganglions rétro mammaires, ganglions de la sphère génitale) et autres sites de l'organisme. [GARIERE J.P.2000]

III.2.4 Réactions de l'organisme infecté

La réponse immunitaire de l'hôte est provoquée par un antigène appelé encore immunogène. Celui-ci est capable d'induire la synthèse des molécules de reconnaissance, à savoir les anticorps par les lymphocytes B (réponse immunitaire humorale), et les récepteurs sur les lymphocytes T (réponse immunitaire cellulaire) qui peuvent se combiner *in vivo* ou *in vitro* avec une partie de la molécule d'antigène (épitope ou déterminant antigénique composé de quelques pour les polysides).

Il existe deux types de réponse immunitaire : humorale et cellulaire, potentiellement utilisables pour le dépistage des animaux ayant été en contact avec les *Brucella*. En générale, la réaction de l'hôte face à l'infection se traduit en période post pubère par une réponse à la fois humorale et cellulaire. Toutefois, la réponse peut varier en fonction de la virulence de la souche, de la dose infectante, de la voie d'entrée et du stade physiologique. Ceci explique que l'une ou/et l'autre des réponses puissent manquer. [GARIN-BASTUJI B.1993] par exemple, la réponse immunitaire est très transitoire et parfois absente chez les animaux impubères. [GARIN-BASTUJI B, DUFOUR B.1995]

III.2.4.1 réponse immunitaire à médiation humorale

Les antigènes de *Brucella* les plus impliqués dans la réponse humorale sont portés par le LPS-S, complexe moléculaire recouvrant la majeure partie de la bactérie. [GARIN-BASTUJI B.1993]

III.2.4.2 Nature des anticorps

Les isotypes d'immunoglobulines présents à des concentrations significatives dans les sérums de bovins sont les IgG1, IgM, IgA. Ils sont principalement dirigés contre l'antigène LPS-S ; mais les bovins infectés produisent également ces anticorps, surtout des IgG1, à l'égard des haptènes HN ou du polysaccharide B. [COMITE MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE.1986; GARIERE J.P.2000]

III.2.4.2.1 Cinétique des anticorps

III.2.4.2.1.1 Dans le sérum

Chez l'animal pubère, ces immunoglobulines sont détectables au bout d'un délai moyen variant entre 4 semaines et 6 mois en fonction de la taille, de la voie d'entrée de l'inoculum et du stade de gestation.

Les IgM sont les premiers isotypes formes après une forte infection. Ils sont rapidement suivis par les IgG, les IgG1 étant les plus abondants dans le sérum et leur concentration dépassant celle des

IgG2. Les deux titres des classes IgM et IgG s'élèvent prédominamment dans les phases plus tardives de l'infection aiguë et subaiguë. Dans la brucellose chronique, les IgM ont disparus, tandis que les IgG persistent et se maintiennent à un taux décelable pendant 2 ou 3 ans. [GARIERE J.P.2000; ROUX J. 1989]

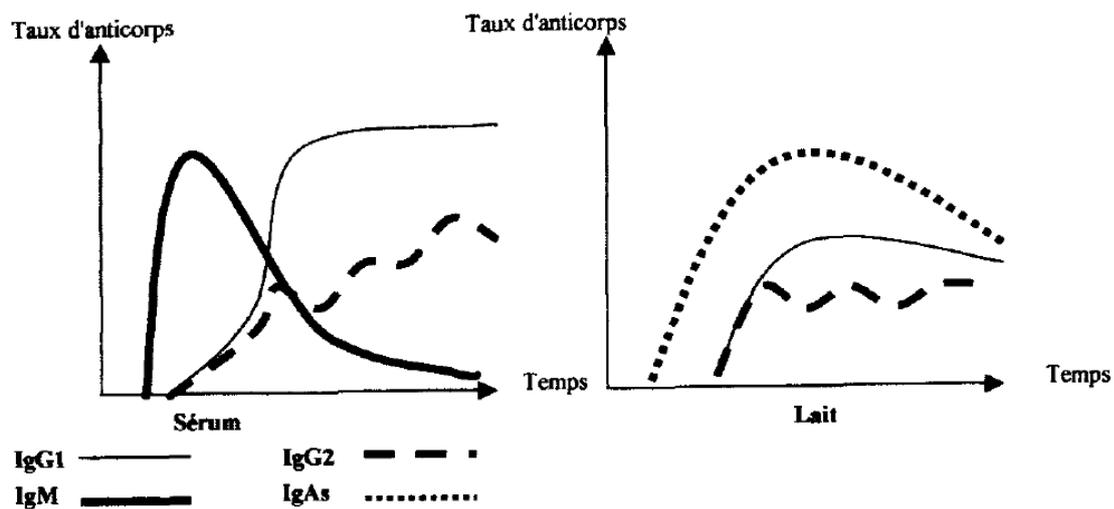
Les concentrations en IgA sont généralement très faibles dans les sérums bovins.

Les titres sont extrêmement variables. Différents cas ont été observés sur le terrain :

- Dans les environnements infectés, les animaux exposés à de faibles doses peuvent présenter passagèrement de faibles titres d'anticorps.
- Certains animaux ne produisent pas d'anticorps de la classe des IgG avant la parturition ou même 1 à 3 semaines après la parturition, mais peuvent présenter de faibles titres d'IgM quelques semaines plus tôt.
- Certains animaux atteints de brucellose chronique peuvent ne posséder aucun anticorps décelable. [GARIERE J.P.2000]

III.2.4.2.1.2. Dans le lait et les autres sécrétions

Es IgA, anticorps sécrétoires, prédominent. A contrario, les IgM et IgG sont présents en quantité plus faible. Les cinétiques des différents anticorps sont reprises sur la figure 3.



III.2.4.2.2. spécialisation des anticorps

Bien que les anticorps de toutes les classes puissent participer à un certain nombre de réactions sérologiques différentes, ils réalisent certaines fonctions mieux que d'autres :

- Les IgM, multivalents et antigènes, mais sont à peu près incapables d'entraîner la précipitation ou de neutraliser les toxines. Ils sont après à déclencher la voie du complément lorsqu'ils sont liés à l'antigène.
- Les IgG, formé plus tardivement, ont une haute affinité pour les antigènes. Par conséquent, les IgG forment des complexes de précipitation stables avec les antigènes solubles et sont capables de neutraliser les toxines.
- Les IgA ne peuvent fixer le complément par la voie classique. Leur fonction majeure in vivo est de bloqué l'adhérence de l'antigène à la surface des organismes.

Ces propriétés sont résumées dans le tableau V ci-dessous

Tableau V : Rôle des différentes classes d'Ig dans les réactions sérologiques.

Test	IgG	IgM	IgA	IgG
Agglutination	+	+++	+	-
Fixation du complément	+	+++	+	-
Précipitation	+++	+	+ /-	+/-
Neutralisation	+++	+	+	+
Stade de production	Tardif	Précoce	Tardif	Tardif
Affinité	Elevée	Faible	Elevée	Elevée

L'efficacité varie de - à +++

III.2.4.2.3 Application aux tests de dépistage

La spécialisation des fonctions des anticorps permettent différentes application aux tests de dépistage :

- Les anticorps des isotypes IgA, IgM, IgG1 et IgG2 peuvent tous réagir dans l'épreuve d'agglutination en tubes, mais ceux de la classée de IgM sont de loin plus efficaces.

- Lorsque l'on réalise l'épreuve de fixation du complément (FC), on peut mettre efficacement en évidence l'isotype IgG1, voire les IgM. Bien que les IgG2 ne fixent pas le complément, ils peuvent interférer avec cette épreuve par les IgG1 et induire des phénomènes zone, réaction atypique ou réactions faussement négatives.
- Les anticorps de tous les isotypes, à l'exception des IgM, réagissent dans le test à l'antiglobuline de Coombs. Les plus importants au plan quantitatif sont les IgG et IgG2.
- Les IgA sécrétoires du lait jouent un rôle conséquent dans l'épreuve de l'anneau (ou Ring-Test ou RT). Les IgM participent aussi à cette réaction, alors que les IgG1 provoquent une agglutination au fond du tube et peuvent interférer avec la formation de l'anneau par les autres isotypes. [COMITE MIXTE FAO/OMS D4EXPERTS DE LA BRUCELLOSE.1986 ; GARIN-BASTUJI B, DUFOUR B.1995]

III.2.4.3 Réponse immunitaire à médiation cellulaire

Contrairement III.2.4a la réponse humorale, la réponse cellulaire est davantage dirigée contre des protéines internes, localisées dans le cytoplasme. [GARIN-BASTUJI B.1993]

La Brucella sont, comme nous l'avons vu précédemment, des pathogènes intracellulaires facultatifs. Elles sont phagocytées par les macrophages et leucocytes polymorphonucléaires à la suite d'un enchaînement complexe d'étapes; le contact des bactéries avec les lymphocytes T immuns spécifiques stimule ces derniers qui libèrent alors des lymphokines (interleukines) ; ces lymphokines sont ensuite à leur tour responsable de l'activation des macrophages, les rendant aptes à la phagocytose, ce mécanisme dépend donc de la reconnaissance de l'antigène approprié par le lymphocyte T est sujette à la régulation par l'intermédiaire du système majeur d'histocompatibilité [CHARLEY B., BLECHA F. 1991 ; ROUX J. 1989] SPLITTER et coll. Ont au cours d'une étude démontre que la réponse cellulaire dirigée contre B.abortus est principalement dépendante des cellules TCD8+. [SPLITTER G., OLIVERIA S., CAREY. MILLER C., KO J., COVERT J.1996]

Les germes vivants capables d'établir une infection intracellulaire persistante et certains types d'antigènes sont donc les meilleurs indicateurs de l'immunité à médiation cellulaire. Cette dernière est associée à la réaction d'hypersensibilité retardée. La réaction est une infiltration cellulaire. Cet état d'hypersensibilité peut être mis à profit pour le diagnostic (intradermoréaction ou IDR à l'aide de brucilline-INRA, antigène extrait selon une méthode bien codifiée) ou in vitro (test de transformation lymphoblastique ou épreuve à l'interféron- γ) notamment dans le cas des brucelloses chroniques à sérologie négative. [GARIERE J.P.2000; GARIN-BASTUJI B, DUFOUR B.1995] il

faut par ailleurs noter que certains vaccins antibrucelliques contenant des adjuvants induisent de manière efficace une hypersensibilité retardée à l'égard des antigènes de Brucella.

L'hypersensibilité retardée est accompagnée d'une augmentation de l'activité bactéricide des macrophages.

En revanche, le rôle des cellules cytotoxiques, y compris les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules tueuses naturelles(NK) et tueuses (K), dans l'immunité médiation cellulaire a l'égard des Brucella n'a pas été élucidé.

IV. symptômes et lésions

Les signes cliniques observés dépendent du statut immunitaire du troupeau [RASDOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W.2000]

IV.1 atteinte génitale

IV.1.1. femelle

IV.1.1.1. avortement

Généralement, la femelle ne présente pas de symptôme tel que l'hyperthermie, ni de signe évident.

L'avortement peut se produire à des stades variés de la gestation, mais plus généralement entre le quatrième et le neuvième mois. Lorsqu'un animal infecté est introduit dans un troupeau, une explosion d'avortements a lieu : un certain nombre de vaches avortent chaque mois, le pic étant obtenu environ 12 mois après la première introduction. Puis, l'immunité du troupeau se développe, et la présence de la maladie est seulement marquée par des troubles persistants de la reproduction, des rétentions placentaires et des avortements occasionnels. A l'inverse, l'introduction d'une vache saine dans un troupeau antérieurement infecté provoquera l'avortement de cette dernière dans la majorité des cas. [ROUX J. 1989].

Les lésions découvertes ne sont pas pathognomoniques .Il s'agit essentiellement de placentine exsudative et nécrotique au niveau du chorion. Sur le fœtus, on observe soit des lésions d'anoxie dues aux atteintes placentaires, soit, en cas de septicémie, une hyperplasie de multiples nœuds lymphatiques associée à des inflammations disséminées et à une pneumonie. [GARIERE J.P.2000 ; HUNGERFORD T.G. 1967]

L'infection brucellique chez les femelles ne se manifeste cependant pas nécessairement par l'avortement, et une femelle infectée peut excréter des *Brucella* par le colostrum et le lait en l'absence de signes cliniques. [ROUX J. 1989]

IV.1.1.2. Rétention placentaire

Elle est fréquente, qu'il y ait avortement ou non. La solidité des adhérences utéro-choriales et la fragilité des enveloppes en sont la cause. [GARIERE J.P.2000 ; RADOSTIS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W. 2000]

IV.1.1.3. Métrite brucellique

Les métrites sont elles aussi des séquelles possibles de l'avortement .On observe alors des sécrétions muscidés rouge-brunes et des exsudats grumeleux blanchâtres pendant environ un mois.

Des germes secondairement contaminants, souvent des Streptocoques ou des Escherichia coli, sont généralement la cause de ces métrites .Dans les cas les plus graves, elles peuvent être aiguës et sont suivies d'une septicémie ou de la mort. Plus couramment, elles sont chroniques et entraînent la stérilité, notamment si l'infection se propage dans les trompes de Fallope et perturbe le fonctionnement ovarien.

Chez de tels animaux, la reproduction échoue fréquemment et il n'est pas rare que l'intervalle vêlage-vêlage soit multiplié par trois. [RASDOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W.2000]

IV.1.1.4. Mammite brucellique

Elle atteint 5% à 10% des vaches brucelliques et présente les caractéristiques suivantes:

- La vache ne présente pas de symptômes généraux.
- Les symptômes locaux sont discrets et tardifs (quartiers atteints tuméfiés, chauds, douloureux et rouges, puis, atrophie, voire sclérose avec parfois présence de noyaux indurés perceptibles à la palpation).
- Les symptômes fonctionnels sont de type chronique : modification de l'aspect du lait (grumeaux, caillots de fibrine) et diminution de la production.
- Il n'y a pas de guérison possible. [GUERIN P.2000]

L'infection persistante de la mamelle et des ganglions lymphatiques rétro mammaires est fréquente et se traduit par une dissémination intermittente ou continue de Brucella dans le lait, y compris lors de la lactation ultérieures. [GARIN-BASTUJI B.1993]

IV.1.2. Mâle

IV.1.2.1. Diminution de l'ardeur génésique

Elle est liée à l'apparition d'une orchite. [NICOLETTI P.1999]

IV.1.2.2 Orchite

Chez le mâle, l'infection se localise fréquemment dans l'appareil génital, engendrant des orchites et épидидymites. Une ou les deux bourses vont alors être affectées et présenter une hypertrophie (deux fois la taille normale) extrêmement douloureuse, bien que les testicules eux-mêmes ne soient généralement pas très enflés. Les testicules subissent ensuite une abcédation et une névrose conduisant parfois jusqu'à leur destruction. Les vésicules séminales

Peuvent aussi être affectées et leur hypertrophie, due à une forte inflammation, peut être détectée par palpation transrectale. Les mâles infectés sont généralement stériles lorsque l'orchite est aiguë, mais conservent une fertilité normale si seul l'un des deux testicules est touché. [HUNGERFORD T.G.1967 ; NICOLETTI P.1999]

De tels animaux représentent un danger potentiel lorsqu'ils sont utilisés pour l'insémination artificielle (risque de dissémination par le sperme). On considère cependant qu'ils jouent un rôle épidémiologique relativement faible. [GARIN-BASTUJI B.1993]

IV.2 Atteinte extra-génitale

IV.2.1.Arthrites

Des arthrites progressives érosives et non suppuratives des articulations ont été décelées sur

Certains animaux. On peut alors détecter des antigènes dans le liquide synovial et les tissus articulaires.

Ces arthrites touchent particulièrement le grasset, le jarret, et parfois le genou et l'articulation coxo-fémorale. [GARIERE J.P.2000 ; RADOSTIS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W. 2000]

IV.2.2.Hygroma

Ce symptôme reste occasionnel et est lié à une hypertrophie douloureuse d'une articulation

L'articulation du genou est la plus touchée. [HUNGERFORD T.G. 1967]

IV.2.3. Autres localisations

Elles sont rares. Il s'agit de localisations ostéo-articulaires, nerveuses, hépatiques et spléniques ... [PILLY E.1988]

En conclusion, le signe clinique majeur est donc l'avortement .Cependant, de nombreux animaux asymptomatiques demeurent porteurs chroniques et excréteurs potentiels. [GARIN-BASTUJI B.1993]

V. Epidémiologie de la brucellose

V.1. Epidémiologie

V.1.1. Les espèces animales affectées par *Brucella abortus* :

sont surtout les bovins, mais aussi d'autres ruminants domestiques (buffles d'Asie, yaks, dromadaires, zébus, moutons et chèvres) et sauvages (buffles d'Afrique, gnous, bison d'Amérique...), et plus rarement les suidés, équidés, carnivores, et rongeurs. Un cheval infecté par *Brucella abortus* présente une infection chronique des bourses séreuses du cou et du garrot. Les ovins, caprins et porcins sont peu sensibles à *Brucella abortus*.

L'infection des bovins par *Brucella melitensis* provoque une maladie identique. [ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses).2003; ACHA N.Pedro, SZYFRES 2005]

V.1.2. Les sources de contagion :

Sont tous les bovins infectés, malades ou apparemment sains (puisqu'ils peuvent rester porteurs à vie). Mais la contagiosité est variable et souvent intermittente : elle est maximale durant la période de reproduction, la phase la plus dangereuse étant la vidange de l'utérus gravide. Tout animal sensible infecté peut aussi être source de contamination. [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003]

V.1.3. Les matières virulentes :

Les plus importantes sont le contenu de l'utérus gravide, expulsé pendant l'avortement ou la mise bas, avec une excrétion qui débute dès la liquéfaction du bouchon muqueux obturant le col et qui disparaît généralement deux ou trois semaines après l'expulsion du fœtus. Les sécrétions vaginales et l'urine peuvent également être virulentes. Et enfin, il existe une excrétion transitoire (quelques jours après la mise bas) et discrète de bactéries dans le lait et le colostrum (surtout importante après un avortement). [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003]

Chez le mâle, il peut y avoir une excrétion de *Brucella* dans le sperme.

Des bactéries sont parfois présentes dans les produits de suppuration (hygromas), dans les fèces (jeunes nourris avec du lait infecté), et dans les viscères infectés (contamination humaine).

[LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003]

Les *Brucella* sont sensibles à la pasteurisation, mais elles peuvent résister plusieurs semaines à plusieurs mois dans les matières virulentes et le milieu extérieur (pâturages, points d'eau, lisier...) :

- Plus de huit mois dans un avorton à l'ombre ou dans des fosses à purin
- Deux ou trois mois dans un sol humide
- Trois ou quatre mois dans les fèces

V.1.4. Les Modes de Transmission :

Il existe de nombreux **modes de transmission** de la maladie entre animaux. La transmission verticale a lieu in utero ou lors du passage dans la filière pelvienne. Les jeunes se débarrassent généralement de l'infection, sauf dans 5-10 % des cas (infection persistante sans réaction sérologique décelable). Les signes cliniques n'apparaîtront que chez les jeunes femelles infectées, lors de leur première gestation ou plus tard.

Quant à la transmission horizontale, elle peut être directe par contacts lors de cohabitation, ou par ingestion (d'eau, de nourriture, de colostrum ou de lait contaminés) ou encore par voie vénérienne, lorsque les taureaux excrètent des bactéries dans leur sperme. Elle peut également avoir lieu de manière indirecte par l'intermédiaire de locaux, pâturages, aliments, eaux et matériels, ou par léchage de placentas, avortons ou appareils génitaux. [ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses) La Brucellose]

La pénétration de la bactérie se fait donc par voie cutanée, conjonctivale, respiratoire, digestive ou vénérienne. [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003]

V.1.5. Divers facteurs de sensibilité et réceptivité :

Ont été identifiés. En effet, la gestation est un important facteur de sensibilité, et lors de contamination hors gestation, on observe une infection transitoire et guérissant spontanément dans plus de 50 % des cas. De plus, il semble que l'âge le plus sensible soit après le développement complet des organes génitaux : les bovins pubères restent généralement infectés toute leur vie,

tandis que les jeunes guérissent souvent de leur infection. [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003]

V.2. EPIDEMIOLOGIE SYNTHETIQUE

Les causes les plus fréquentes de contamination d'un cheptel sont l'introduction d'un bovin infecté inapparent et la « contaminations de voisinage » (animaux et milieux contaminés). De plus, la contamination de l'environnement et la conservation de jeunes femelles nées de mères infectées sont à l'origine de résurgences dans les cheptels assainis. Parfois enfin, il y a intervention d'autres espèces, comme les ovins et caprins.

Une fois introduite, l'infection peut se répandre largement et la maladie peut s'exprimer de différentes façons. On observe alors des avortements en série, avec une expression épizootique de la maladie, ou une propagation progressive de l'infection, détectable par sérologies (mode enzooties).

Il semble que l'intensification de l'élevage soit un facteur favorisant l'extension de la maladie. L'existence d'un réservoir dans la faune sauvage est difficile à évaluer (la bactérie a été isolée chez le buffle d'Afrique du sud). [ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; ACHA N.Pedro, SZYFRES 2005]

VI. Diagnostic

VI.1. Diagnostic épidémiologique-clinique

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. [ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; ACHA N.Pedro, SZYFRES 2005)]

VI.2. Diagnostic expérimental

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. [ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE. – 2006]

VI.2.1. 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. [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003]

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 confirmé 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 « Sérum 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 gros et plus foncées.

L'identification d'espèce et le bio typage 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 Biovar.

Les souches vaccinales sont identifiables par certaines techniques bactériologiques (milieux sélectifs), ainsi que par PCR (mais son intérêt est limité). [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003 ; ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; ACHA N.Pedro, SZYFRES 2005]

VI.2.2. DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

Le diagnostic et le dépistage sérologiques sont très utilisés, sur sérum ou lait. Les anticorps détectés sont ceux dirigés contre les epitopes 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* biovar1 d'indépendance vis-à-vis du CO₂. [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003 ; ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; ACHA N.Pedro, SZYFRES 2005]

VI.2.2.1. 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 œuvre 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. Si 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. [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003 ; ECOLES

VI.2.2.2. 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 positif 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. [INSTITUT POURQUIER]

VI.2.2.3. 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. [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003 ; ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; ACHA N.Pedro, SZYFRES.2005)]

VI.2.2.4. 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 Complément Fixation Test Unit) 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. [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003 ; ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; ACHA N.Pedro, SZYFRES 2005]

VI.2.2.5. 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'œil nu.

Ce test est très sensible, notamment pour la détection d'anticorps vaccinaux, mais les positifs doivent être confirmés par un test plus spécifique. [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003 ; ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; ACHA N.Pedro, SZYFRES 2005]

VI.2.2.6. ELISA (Enzyme like Immune 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. Si 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. [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003 ; ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; ACHA N.Pedro, SZYFRES 2005]

VI.2.2.7. 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

Test	Sensibilité	spécificité	Immunoglobulines détectées	Distinction vaccinés/malades	cout	Faisabilité
EAT	+++ Selon situation épidémiologique	+++	IgM IgG1 IgG2	NON	Faible	Facile : peut se faire sur le terrain
Ring Test	+++ Selon la taille du troupeau	++	IgG	OUI généralement	Faible	Assez facile, mais nécessite une étuve
Séro-agglutination de Wright	++	+	IgG2	NON	Faible	Facile
FC	+++	++++	IgG1 IgG2	NON	Elevé	Compliqué et nécessite matériel de pointe
BPA	+++	+++	IgG	NON	Faible	Plus compliqué que EAT pour résultats équivalents
ELISA indirect	++++	+++	IgG1 IgG2	NON	Elevé	Difficile
ELISA de compétition	+++	++++	IgG1 IgG2	OUI	Elevé	Difficile
FPA	+++	+++		OUI	Moyen	Facile faisable sur le terrain, mais nécessite matériel spécifique

Tableau IV : Caractéristiques des différentes techniques de diagnostic sérologique

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 quant 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.

[LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003 ; ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; ACHA N.Pedro, SZYFRES 2005]

VI.3. 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 œuvre 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 : œdème 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. [LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE.2003 ; ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; ACHA N.Pedro, SZYFRES 2005]

VII. Les méthodes de surveillance et de lutte

VII.1. Traitement

Brucella abortus étant sensible aux antibiotiques, notamment à la tétracycline, le traitement est théoriquement possible. Mais il est interdit en raison de son coût très élevé, des risques d'apparition de résistance, et de l'absence de garantie quant au statut infectieux d'un animal traité. [ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; ACHA N.Pedro, SZYFRES 2005]

VII.2. Prophylaxie sanitaire

Elle consiste en un assainissement des cheptels bovins infectés et une protection des cheptels indemnes.

Elle comporte d'une part la prise de mesures offensives :

- Dépistage des animaux infectés (persistance parfois toute la vie), et isolement de ceux-ci, puis leur élimination rapide vers la boucherie
- Elimination des jeunes femelles nées de mère infectée
- Contrôle de toutes les espèces réceptives et élimination des infectés
- Utilisation de l'insémination artificielle, pour limiter la transmission vénérienne
- Isolement strict des animaux infectés, surtout lors de mise bas, dans un local facile à désinfecter, et mesures de désinfections adaptées (destruction du placenta, traitement des fumiers...)

...et d'autre part des mesures défensives :

- Introduction de bovins certifiés indemnes, avec quarantaine et contrôle individuel par sérologie
- Maintien du cheptel à l'abri des contaminations de voisinage
- Hygiène de la reproduction : monte publique ou insémination artificielle
- Désinfections périodiques des locaux
- Isolement des parturientes et destruction des placentas
- Contrôle régulier des cheptels

Pour les petits ruminants, l'assainissement des troupeaux infectés repose sur l'isolement et l'élimination précoce de tous les ovins reconnus infectés, ainsi que sur la destruction du germe éventuellement présent dans l'environnement. Le résultat sera définitif uniquement si le taux d'infection est faible, avec un renouvellement fréquent des contrôles, et un cheptel à l'abri de

Contaminations extérieures. Si ces conditions ne sont pas réunies, la seule solution est l'élimination en bloc du troupeau.

Quant à la protection des troupeaux indemnes, elle demande de contrôler les introductions et la transhumance (interdite pour les troupeaux infectés), et de réaliser un contrôle sérologique et/ou allergique régulier des cheptels.

Dans les pays en développement où la prévalence de la maladie est élevée, il faut commencer par une lutte individuelle (vaccination, assurance), pour aller progressivement vers une lutte collective (vaccination, éradication). L'objectif est d'abord le **contrôle**, soit le maintien des coûts de la maladie à un niveau compatible avec la rentabilité économique, puis ensuite **l'éradication**, afin d'éliminer l'infection brucellique d'une région (elle est donc limitée dans le temps, à l'inverse du contrôle qui se poursuit à l'infini).

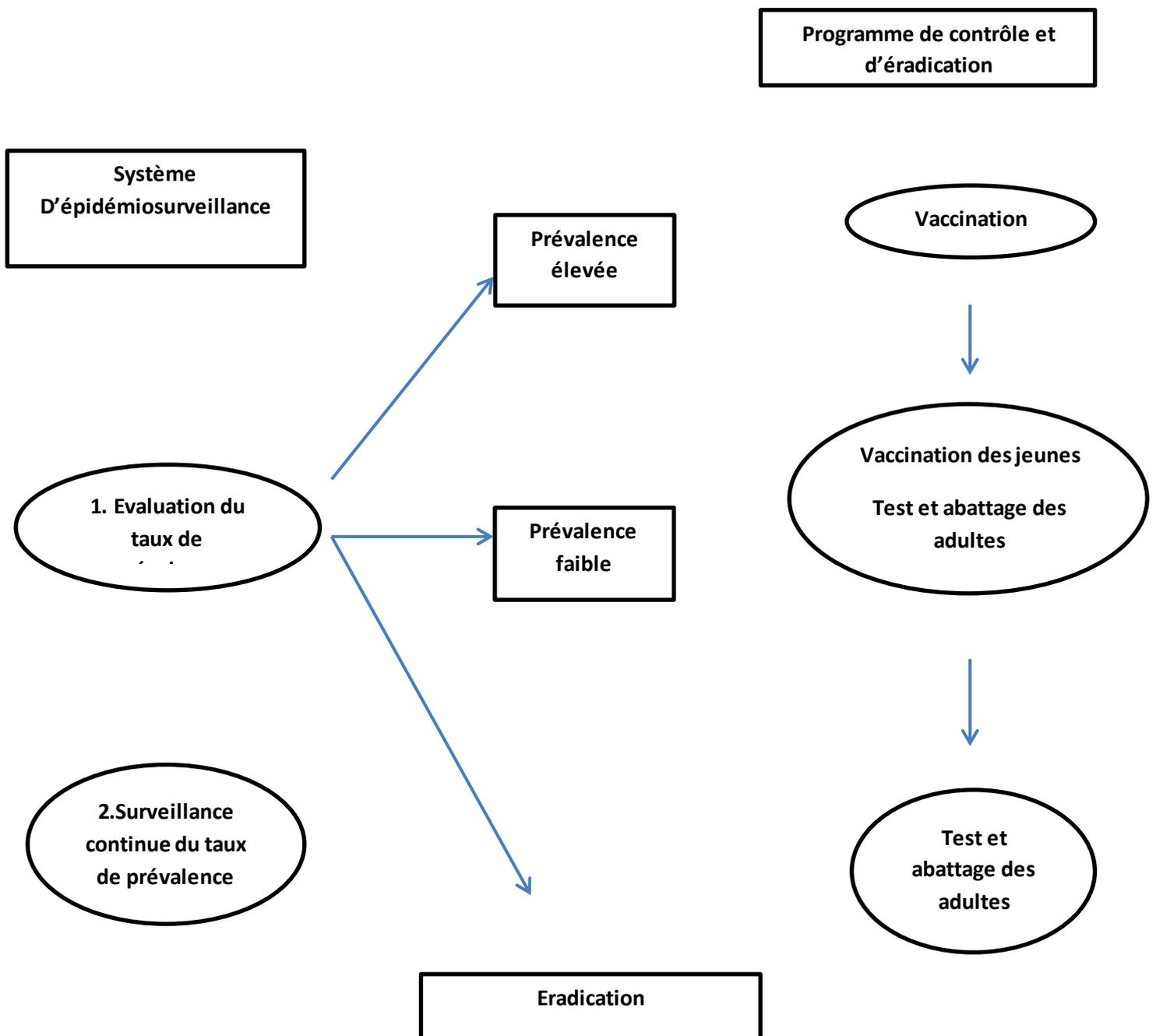


Figure 3 : Adaptation des mesures de lutte au taux de prévalence de la brucellose

Dans tous les cas, pour une prophylaxie sanitaire efficace, il faut utiliser une méthode de dépistage telle que les animaux infectés soient détectés avant d'avoir pu infecter d'autres animaux. La maladie étant asymptomatique pendant longtemps, le dépistage est donc basé sur la mise en évidence indirecte de l'infection, soit la présence d'anticorps, et le vaccin S19 complique cela. Avec les tests sérologiques, les animaux seront « positifs » ou « négatifs », ce qui ne correspond pas forcément aux statuts « infectés » et « indemnes ». En général, dans une population où la prévalence relative est importante, la Valeur Prédictive Positive des tests sera plus élevée. Il faut donc faire des tests de contrôle sur les échantillons « positifs » au dépistage. On peut alors réaliser une interprétation en série : un sérum est considéré « infecté » quand il est positif aux différents tests de contrôle, et la spécificité sera alors très bonne. Ou bien on fait une interprétation en parallèle : un sérum est dit « infecté » quand il est positif à un test de contrôle au moins. La sensibilité sera bonne, mais la spécificité moindre.

Ainsi, aucun test diagnostic n'étant idéal, il faut faire une combinaison de différents tests, avec un test de dépistage sensible, et un ou plusieurs tests de contrôle pour améliorer la Valeur Prédictive Positive, puis une interprétation en série pour améliorer la spécificité. Ces techniques sont à adapter à la situation épidémiologique de la maladie et aux infrastructures existant dans chaque pays.

[ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses.2003 ; OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES.2004]

VII.3. Prophylaxie médicale

La vaccination est recommandée par l'Office International des Epizooties pour le contrôle de la brucellose dans les zones où la prévalence de l'enzootie est élevée. Le vaccin S19 est le vaccin de choix pour les bovins car il protège durant toute la durée de vie utile de l'animal, et il est peu onéreux. Pour éviter de gêner le diagnostic, il est recommandé de limiter la vaccination aux jeunes animaux (veaux de 3 à 8 mois) chez lesquels les anticorps vaccinaux disparaissent rapidement. On estime que 65% à 80% des animaux vaccinés bénéficient d'une protection durable contre l'infection. De plus, le vaccin ayant un puissant effet anti-abortif, il diminue une des principales sources d'infection, à savoir les fœtus. Dans un programme de vaccination systématique, les meilleurs résultats sont obtenus pour une couverture annuelle de 70% à 90% des veaux en âge

d'être vaccinés. Les femelles de plus de huit mois et les mâles ne doivent pas être vaccinés, et la vaccination de rappel n'est pas recommandée. Le principal objectif d'un tel programme est de réduire le taux d'infection et de faire en sorte que les troupeaux soient résistants à la brucellose, pour que l'éradication de la maladie puisse ensuite être entreprise. On estime que 7 à 10 ans de vaccination systématique sont nécessaires pour atteindre cet objectif.

Pour les bovins, deux vaccins existent actuellement contre la brucellose : le vaccin B19 et le vaccin RB51.

Le vaccin B19 n'est pas un vaccin idéal mais c'est le plus utilisé à travers le monde. C'est un vaccin à agent vivant fabriqué à partir de la souche S19, qui appartient au biotype 1 de *Brucella abortus*, mais n'a pas besoin de supplément de CO₂ pour sa croissance, et n'est pas inhibé par le bleu de thionine, la safranine, la pénicilline et l'érythrol.

Son efficacité est très bonne, mais il a quelques inconvénients majeurs. En effet, il induit une réponse humorale identique à celle qui se produit lors d'une infection (déterminant antigénique majeur porté par le LPS de la membrane externe), avec des anticorps résiduels dans le lait et le sérum posant problème pour le dépistage. De plus, il peut être infectieux pour l'Homme, et a un effet abortif chez certaines vaches.

Il peut être injecté par voie sous cutanée à la dose de 50-80 milliards de bactéries vivantes. Il induit alors une réaction positive aux tests sérologiques, d'autant plus durable que la vaccination se fait tard. Il provoque également des avortements quand il est administré à une vache en gestation, mais ceci est rare (moins de 1% des cas). Enfin, dans 2% des cas, il y a des infections vaccinales persistantes chez la vache laitière, avec excrétion de souche vaccinale dans le lait (ou dans le sperme pour le taureau) pendant trois mois après le vaccin.

L'usage de ce vaccin à cette dose est donc réservé aux femelles de 3 à 6 mois, chez lesquelles il induit parfois des arthropathies, particulièrement à l'articulation fémoro-tibial.

En réalité, la persistance des anticorps vaccinaux dépend plus de l'âge et de la dose de vaccin que de la voie d'administration. Lorsqu'on l'injecte à dose réduite, il y a moins d'interférences avec les tests sérologiques.

Il est possible par exemple de l'administrer en sous cutané à la dose de 0,3 à 3 milliards de bactéries, pour les vaches adultes. Le degré de protection est alors supérieur que lors d'une vaccination à 4-10 mois mais il y a plus de chances que la vache réponde positivement aux tests

sérologiques. En effet, certains animaux développeront des titres en anticorps persistants, et des avortements peuvent survenir, ainsi que l'excrétion de souche vaccinale dans le lait

On utilise enfin la voie conjonctivale pour les animaux de tous âges, avec deux administrations de 5-9 milliards de bactéries vivantes, à six mois d'intervalle : la première à 6-10 mois, en SC ou conjonctivale, et la deuxième à 10-16 mois, toujours en conjonctivale.

Ce protocole assure une bonne protection sans réponse en anticorps persistants, et il réduit le risque d'avortement et d'excrétion dans le lait.

Ces différents protocoles ont tous une grande efficacité et un large éventail d'utilisation. Cependant, les bovins vaccinés peuvent parfois résister à l'infection tout en disséminant la souche d'épreuve en quantité et pendant une longue période, et les animaux sensibles non vaccinés peuvent alors être infectés. Il est donc important de vacciner tous les animaux pour épuiser le relais par lequel *Brucella abortus* se perpétue.

En résumé, les bactéries se comportent comme une souche atténuée lorsqu'elles sont administrées à des bovins non pubères. Cependant, dans de rares cas, il peut se produire des infections locales du tractus génital. Une réponse en anticorps persistants six mois ou plus se produit chez une proportion substantielle de bovins vaccinés selon les doses adultes. Enfin, quelques veaux adultes développeront plus tard des arthropathies, sur tout à l'articulation fémoro-tibiale. Ce vaccin est donc sans danger pour la plupart des animaux si administré aux veaux entre 3 et 8 mois. Chez les adultes, il faudra utiliser des doses réduites.

La durée précise de la protection est inconnue. La protection contre *Brucella Melitensis* est peu évidente. La réversion vers la virulence est très rare.

Le vaccin RB51 est devenu le vaccin officiel pour la prévention de la brucellose bovine dans plusieurs pays. Chaque pays utilise cependant des protocoles de vaccination différents.

Il a été reporté que ce vaccin induisait des placentites sévères et des infections du placenta chez la plupart des animaux, et qu'une excrétion de bactéries dans le lait existait chez une part importante de la population vaccinée. Son inoculation à des femelles gravides peut également provoquer des avortements. L'utilisation de la dose réduite permet de supprimer ces problèmes, mais n'est alors efficace que chez des animaux adultes.

L'avantage de ce vaccin est qu'il ne se produit pas de séroconversion des animaux vaccinés car la souche utilisée n'a pas de LPS. Cependant, lorsqu'il est administré en dose réduite, il faut répéter les injections, ce qui peut mener à une réponse en anticorps interférant avec les tests sérologiques.

Il permet une immunité durable mais pendant une durée inconnue. Il n'y a pas de réversion possible, mais il peut exister une virulence chez l'Homme, dont la gravité est mal connue.

Pour les petits ruminants, une prophylaxie médicale est justifiée dans les régions fortement infectées, où elle est la seule méthode de lutte économiquement utilisable. Elle peut aussi compléter la prophylaxie sanitaire quand le taux d'infection est élevé, mais elle est à proscrire en région indemne ou peu infectée. Le vaccin le plus efficace est un vaccin à agent vivant préparé à partir de la souche **REVI** de *Brucella melitensis*, qui a un pouvoir pathogène atténué pour les petits ruminants.

Son inoculation provoque une hyperthermie transitoire avec anorexie passagère, et parfois une réaction inflammatoire au site d'inoculation. La souche persiste ensuite dans l'organisme. Mais elle est labile en conditions naturelles et doit donc être conservée au frigo.

Une seule injection sous cutanée ou conjonctivale aux jeunes femelles de 3-6 mois assure une protection pendant plusieurs années, avec une réponse sérologique limitée qui n'empêche pas le dépistage sérologique de l'infection des adultes.

La dose classique en sous cutanée est de 10-20 milliards de bactéries : les anticorps persistent alors deux ans. Cette même dose injectée par voie conjonctivale entraîne une persistance des anticorps pendant seulement quatre mois. [OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. 2004]

Il existe deux stratégies vaccinales :

- Vaccination systématique de tous les jeunes (3 à 6 mois) destinés à remplacer les animaux plus âgés du troupeau. C'est la meilleure stratégie pour limiter la diffusion de la maladie et éviter la contamination de l'Homme.
- Vaccination généralisée avec élimination des animaux porteurs d'anticorps.

Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence l'important de la maladie de fièvre de malt à travers le monde pendant plusieurs années.

La brucellose bovine ou la fièvre de malt est une maladie très dangereuse en effet de leur impact sur la santé animal et humaine ainsi que sur l'économie. Cependant, malgré les efforts réalisés ces dernières décennies dans la recherche scientifique, notamment à travers la caractérisation des agents pathogènes au niveau de plusieurs pays à travers le monde, les aspects épidémiologiques de cette maladie a encore été très peu investigués à ce jour. De même, les conséquences économiques et sanitaires de cette zoonose ont été peu ou pas évaluées.

Malgré cette difficulté, les recherches aidées a amélioré des méthodes basé surtout sur vaccination et de prophylaxie sanitaire afin d'améliorer notre défense contre cette maladie et évité le maximum de perte économique

Références bibliographiques

- **ALTON J.J PLOMMET M – Brucellose : le sommet de Genève**
Chronique OMS, 1986, 40, 20-22
- **ANONYME – Animaux de rente : risque sanitaire pour l'homme.**
La Dépêche Vétérinaire, 1988 suppléments techniques n3, 3.
- **ACHA N.Pedro, SZYFRES Boris Zoonoses and communicable diseases common to Man and Animals – Volume1: Bacterioses and Mycoses. 3ème édition. Office International des Epizooties. 2005**
- **CAMERON H.S – The viability of Brucella abortus.**
Cornell Vet., 1932, 22, 212-224
- **CAMPBELL .G A. ADAMS L. G SOWA B.A. – Mechanisms of binding of Brucella abortus to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis.**
Vét. Immunol. Immunopathol.1994, 41, 295-306.
- **CHARLEY B ., BLECHA F . – les cytokines : leur rôle dans la régulation du système immunitaire, leur utilisation potentielle chez l'animal.**
Point Vét., 1991, 23, 71- 77
- **CARGILL C., LEE K., CLARCKE I. – Use of an enzyme-linked immunosorbent assay in à bovine brucellosis eradication program.**
Austr. Vet.J., 1985.62.49-52
- **CHERWONOGRODZKY J.W., DUBRAY G ., MORENO E ., MAYER H. – Antigens of Brucella, in :Animal brucellosis, Nielsen & Duncan Eds., CRC Press, Boca Raton, USA, 1990, 19-64**
- **COMITE MIXTE FAO/OMS D4EXPERTS DE LA BRUCELLOSE.**
Sixième rapport, OMS Eds, Genève ,1986 ,740, 145pp.
- **CORBEL M.J. – Recent advances in the study of Brucella antigens and their serological Cross-reactions.**
Vet.Bull. 1985, 55,927-942
- **CORNER L.A, ALTON G.G., IYER H. – An evaluation of a biphasic medium for the isolation of Brucella abortus from bovine tissues.**
Austr. Vet.J., 1985, 62, 187- 188.
- **DUBRAY G.- Etude ultra structurale des bactéries de colonies lisses (s) et rugueuses (R) du genre Brucella.**

- Ann. Inst. Pasteur, 1972, 132, 171-193**
- **ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES (enseignants de maladies Contagieuses) La Brucellose. Edition 2003**
 - **ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON. – Etude du phénomène « BRUCELLOSE ATYPIQUE » Dans le département de la Loire de 1995 a 2000**
Chpt1 ; P 22-44
 - **ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE. – Contribution à l'étude épidémiologique de la brucellose dans la province de l'Arkhangai (Mongolie)**
Chpt2 ; P 42-55
 - **FLANDROIS J P.- Brucella, in:**
Bactériologie médicale, flandrois Eds, Presses universitaire de lyon, Collection Azay, 1997,219-224
 - **FENSTERBANK R.- Rapport de synthèse : Brucellose des bovins et des petits ruminants : Diagnostic, prophylaxie et vaccination, in :**
Brucellose des bovines, ovins et caprins, série technique n°6, OIE Eds, 1987,286pp.
 - **GARIERE J.P. – la Brucellose animale. Document des Ecole Nationales Vétérinaires de France, Chaires de maladies contagieuses 2000, 89pp**
 - **GARIN-BASTUJI B, - Le dépistage de la brucellose des ruminant et ses difficultés. Le cas des sérologies atypiques en brucellose bovine.**
Point Vét, 1993, 25, 23-32
 - **GARIN-BASTUJI B – Editorial**
Point Vét; 1997, 28, 1-3
 - **GARIN-BASTUJI B. – Brucelloses bovine, ovine et caprine: contrôle et prévention.**
Point Vét, 1993, 25, 15-22.
 - **GARIN-BASTUJI B – Brucellose humaines et animales : une évolution favorable, une eradication difficile.**
Point Vét, 1994, 26, numéro spécial « ruminants et santé publique »,25-32
 - **GARIN-BASTUJI B, DUFOUR B. – Acquis de la recherché sur les reactions sérologiques non spécifiques en brucellose.**
Colloque national du 11 Janvier 1995 organisé par la DGAL, le CNEVA et la FNGDSB, CNEVA Eds, 89pp.
 - **GUERIN P. - Les mammites de la vache.**
Course de reproduction, Chaire de Pathologie de la Reproduction de l'Ecole Nationale vétérinaire de Lyon 4^{ème} année, 2000.
 - **HERBERT W.J.- Veterinary immunology, Resived reprint, Blackwell scientific**

Publication, Oxford, England, 1970, 367pp.

- **HORNITZKY M., SEARSON J. – The relationship between the isolation of Brucella abortus and serological status of infected, non-vaccinated cattle.**
Austr. Vet. J., 1986, 63, 172-174.
- **HUNGERFORD T.G. – Brucellosis of cattle, in:**
Diseases of livestock, 6th Ed; Angus and Robertson Eds., Sydney, Australia, 1967. 191-195.
- **INSTITUT POURQUIER Fiches techniques : Réalisation du test Rose Bengale et du Ring Test**
- **KING N.B. – The survival of Brucella abortus(U.S.D.A. strain 2308) in manure.**
J.A.V.M.A., 1957.131. 349-352.
- **KUZDAS C.D., MORSE E.V. – The survival of Brucella abortus. USDA. Strain 2308, under controlled conditions in nature.**
Cornell Vet, 1954, 44216-228.
- **LAPRAIK R.D., MOFFAT R. R- latent bovine brucellosis**
Vet. Rec, 1982, 111, 578-579.
- **LEFEVRE Pierre-Charles, BLANCOU Jean, CHERMETTE René Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail (Europe et Régions Chaudes) Editions Tec et Doc, Editions Médicales Internationale. Londres, Paris, New York. 2003**
- **LIMET J.N., CLOECKAERT A., BEZARD G., VAN BROECK J., DUBRAY G. – Antibody response to the 89-kDa outer membrane protein of Brucella in bovine brucellosis J. Med. Microbiol., 1993, 39,403-407**
- **LORD V.R., ROLO M.R., CHERWONOGRODZKY J.W. – EVALUATION of humoral immunity to Brucella sp. In cattle by use of an agar-gel immunodiffusion test containing a polysaccharide antigen.**
Am.J.Vet.Res., 1989 , 50, 1813-1816.
- **NICOLETTI P. – Brucellosis, in : Current veterinary Therapay 4 : Food Animal practice, HOWARD J.L. & SMITH R.A., W. B. Saunders Company, A999, Philadelphia, USA, 364-368.**
- **NICOLETTI P. – MOLLARET H., BRAULT J. – Fréquences variées de la lysogénie et des lysotypie suivant les origines zoologiques et géographiques des souches de Yersinia enterocolitica.**
Bull. Acad. Med., 1972, 156,712-721.
- **NIELSEN K.H., WRIGHT P.F., KELLY W.A., CHERWONOGRODZKY J.H.- A review of enzymes immunoassay for detection of antibody to Brucella abortus in cattle.**

- VET. Immunol. Immunopathology. 1988, 18,331-347.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES Chapitre 2.3.1: Bovine Brucellosis
In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 13ème édition, 2004
 - PATRICK S., LARKIN M.J. – Intracellular invasion, survival and growth, in :
Immunological and molecular aspects of bacterial virulence, Wiley J. & Sons
Eds., Chichester, GB, 1995, 181
 - PILET C., BOURDON J.L., TOMA B., MARCHAL N., BALBASTRE C. – Genre
Brucella, in : Bactériologie médicale et vétérinaire – systématique bactérienne, 2ième
édition, 3ième tirage, Doin Editeurs, Paris, 1983, 203-212
 - PILLY E. – Brucelloses, in : Maladies infectieuses à l'usage des étudiants en médecine
et des praticiens, 10ième édition, Eds. C. et R., La Madeleine, 1988, 179 – 184.
 - POUILLOT R., GERBIER G., GARIN-BASTIUI B. – Synthèse des travaux
épidémiologiques sur les réactions sérologiques faussement positives en brucellose
bovine.
Épidémiol. Santé animale, 1999, 35, 1-10.
 - RADOSTIS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W. – Brucellosis caused
by Brucella abortus (Bang's disease), in: Veterinary medicine – a text book of the
diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9th Ed., W.B. Saunders Company,
London, 2000, 867-881.
 - RAMIREZ- ROMERO R. – Is Brucella abortus a facultative intracellular pathogen
with mitochondria-like activity?
Med. Hypotheses., 1998, 51, 41-45
 - ROUX J.- Epidémiologie et prévention de la brucellose .
Bull. OMS, 1979, 57, 179-194.
 - ROUX J. - Brucella, in: Bactériologie médicale, 2ième Edition, Le Minor L & Véron M;
Eds., Médecine sciences, Flammarion, Paris, 1989, 651 – 668.
 - SPLITTER G., OLIVERIA S., CAREY. MILLER C., KO J., COVERT J. – T
lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria.
Vet. Immunol. Immunopathology. 1996, 54, 309-319.
 - TIZARD I. – Serologic assays.
J.A.V.M.A., 1982, 181, 1162-1165.
 - TOMA B., DUFOUR B., SANAA M., BENET J.J., ELLIS P., MOUTOU G., LOUZA
A. – Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales
transmissibles majeurs, AEEMA, Maisons-Alfort, France, 1998, 551pp.

- **VERGER J.M – Editorial.**
Point Vét, 1993, 25, 1-3.
- **WOOLCOCK J.B. – Tissue specificity and host specificity , in : Bacterial infection and immunity in domestic animals, Development in animal and veterinary science 3, Elsevier scientific Publishing Company, Oxford, new york, 1979,228-229.**
- **WOOLCOCK J.B. – Tissue specificity and host specificity , in : Bacterial infection and immunity in domestic animals, Development in animal and veterinary science 3, Elsevier scientific Publishing Company, Amsterdam, 1979,79-80.**