

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES



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

THEME :

Etude sérologique de la brucellose bovine

à Tiaret

Présenté par :

Melle Kamir Souad

Encadré par :

Pr AGGAD hebib

Année universitaire : 2016 – 2017

SOMMAIRE

	Page
Dédicaces	I
Remerciements	II
Résumé en français	III
<i>Introduction</i>	1
Introduction	7
<u><i>Chapitre I : La brucellose : pathologie et prophylaxie</i></u>	8
I- Historique	8
II- Ethiopathogénie	9
III- Facteurs de virulence	10
IV- Physiopathologie	14
V- Lésions et symptômes	15
VI- Réactions de l'organisme à l'infection	15
IX- Prophylaxie et surveillance chez les animaux	16
XI- Diagnostic biologique	
XII- Politique de contrôle de la brucellose	

DEDICACES

Ce travail est dédié à mes chers parents ;

Pour leur encouragements continus ;

A tous les membres de ma famille ; mes sœurs (Melouka, Rachida, Zahra, Ftaima),

A mes frères (Bouziane, Mohamed et AbdelKader)

A mes belles-sœurs ; Houaria, Mokhtaria

A mes beaux-frères : Tizgha Mohamed, Habani Mahmoud

A mes nièces ; Douaa, Malek, Hanane, Boutaina et Sabrina

A mes neveux : Youcef, NourEddine

A toute la famille Kamir Chlef et Drif

A mes cousines ; Zhor, Nadjat

Au Dr Habous NorEddine

A mon cher ami Benzia Mohamed

A mes chères amies Djidi Imene, Guediri Khadidja

et Kasmi hadjira

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tous ceux et celles qui ont contribué directement ou indirectement à sa réalisation.

Le Professeur Hebib AGGAD, mon encadreur, pour avoir accepté de nous aider. Il était toujours présent pour nous conseiller et nous aider malgré ses occupations nombreuses.

A tous les enseignants et à tout le personnel de l'Institut des sciences vétérinaires, , Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

A tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la finalisation de ce travail.

A tous, nous tenons à exprimer nos plus sincères remerciements.

Résumé

La brucellose est une zoonose responsable de graves conséquences et qui demeure toujours présente en Algérie que ce soit chez l'homme ou les animaux.

Pour dépister sérologiquement la brucellose, nous avons examinés 14 échantillons de sérums pris aléatoirement de plusieurs élevages de la région de Tiaret.

L'utilisation du kit ELISA indirect a permis de détecter une vache infectée ce qui correspond a une prévalence de 7,14 %.

Malgré la faible taille de l'échantillon, ceci montre que cette infection est bien présente dans nos élevages.

Des mesures de prophylaxie doivent être entreprises pour protéger et améliorer nos élevages.

Mots-clés : brucellose, ELISA ; prévalence, bovins.

Abstract

Brucellosis is an important zoonotic disease that can be responsible for severe consequences but is always present in Algeria.

In order to evaluate serologically its prevalence, we have analyzed 14 serum bovine samples from different farms.

Using ELISA indirect, we found one cow positive that represent an apparent prevalence of 7.14 %.

Despite the low sample, this demonstrates this infection is really present in Algerian farms.

Prophylactic measures have to be taken in order to improve hygienic breeding status.

Key-words: brucellosis, ELISA; bovine, prevalence.

Introduction

La brucellose demeure une zoonose majeure de part les conséquences qu'elle entraîne : pertes économiques en élevages et aussi sur le consommateur (impact socio-économique et sanitaire).

En Algérie, cette maladie depuis longtemps, continue à sévir avec des milliers de cas humains chaque année et ce, malgré les grands efforts déployés par l'état pour combattre ce fléau.

La lutte contre ce fléau implique une bonne sensibilisation de tous les acteurs mais aussi une bonne pratique d'hygiène, conjugués à la vaccination animale qui n'est pas encore appliquée chez les bovins en Algérie.

L'objectif de ce travail est la recherche de l'infection brucellique chez quelques bovins de la région de Tiaret en utilisant la méthode ELISA.

Première partie: Synthèse bibliographique

I. Généralités

I.1.Définition:

La brucellose est une maladie bactérienne, virulente, inocuable et contagieuse. Commune à de nombreuses espèces animales et à l'homme. Elle est due à des bactéries du genre *Brucella*. C'est une zoonose majeure. Cette anthroponose 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.

Chez l'homme, c'est une maladie à déclaration obligatoire, (MDO n 16). Elle est aussi, dans certaines circonstances, classée Maladie professionnelle.

I.2. Historique:

Les bactéries du genre *Brucella* sont responsables des brucelloses, maladies humaines et animales, qui ont longtemps porté des noms divers, variables selon les pays, les époques et les animaux concernés: fièvre de Malte, mélitococcie, fièvre méditerranéenne, maladie de Bang, avortement épizootique des bovidés, Fièvre ondulante, Fièvre sudoro-algique etc. La maladie semble être connue depuis fort longtemps, peut être depuis l'antiquité, mais la première description clinique complète a été publiée par Martson, **en 1859**, sous le nom de fièvre méditerranéenne.

C'est **en 1887** que Sir David Bruce, médecin militaire anglais détaché à Malte, isole l'agent de la maladie par culture de la rate d'un soldat mort de la maladie, et l'appelle *Micrococcus melitensis*. **En 1897**, un vétérinaire danois, Bang, isole de l'estomac d'avortons bovins le "bacille de l'avortement épizootique de la vache", qu'il appelle *Bacillus abortus bovis*. La même année Wright découvre que le sérum des malades agglutine *Micrococcus melitensis* et met au point la réaction d'agglutination qui porte son nom.

En 1914, aux Etats-Unis, Traum isole des fœtus de truies avortées un microbe semblable au bacille de Bang, *Bacillus abortus suis*. Un peu plus tard, Alice Evans, **en 1918**, devait démontrer la parenté de ces différents germes et Meyer et Shaw, **en 1920**, les regroupaient dans le genre *Brucella*.

Une autre étape importante fut la découverte par Burnet **en 1922** de l'intradermoréaction à la mélitine.

En France les premiers diagnostics certains de la maladie humaine ont été établis **en 1905** dans l'île de Sorgue en Vaucluse mais c'est l'étude magistrale par Cantaloube de l'épidémie de Sumène (Gard) **en 1909**, portant sur 106 malades, qui constitue le premier document important sur la maladie en France.

II. Etude du genre *brucella*:

II.1. Classification: Le genre brucella fait partie de la famille des Parvobacteriaceae: bâtonnets de petite taille, très souvent en coccobacilles, ne gardant pas le Gram, dont le pouvoir glucidolytique est faible. Ce genre comprend trois espèces principales, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, et des espèces moins répandues, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae*, *Brucella canis*. Au sein des espèces principales, plusieurs biotypes sont décrits: 03 biotypes pour *B. melitensis*, 9 biotypes pour *B. abortus*, 4 biotypes pour *B. suis*.

II.2. caractéristiques:

II.2.1. morphologie et structure: Les brucella sont parmi les plus petites bactéries, parfois en coccobacilles de 0,5 micromètre, parfois légèrement allongées en bacilles de 1 à 1,5 micromètre de longueur, immobiles.

II.2.1.1. Paroi: sa structure rentre dans le cadre de celle des bactéries à Gram négatif; d'une épaisseur de 20 à 30 nm, elle est formée de plusieurs couches: la membrane externe, ondulante, a une épaisseur de 9 à 10 nm et est constituée de 03 feuillettes, sous cette membrane externe, une couche dense ou couche rigide, d'environ 10 nm d'épaisseur, correspondant au peptidoglycane; qui est une couche interne homogène ou périplasme, de 3 à 6 nm d'épaisseur chez les bactéries Smooth, d'épaisseur variable dans les formes.

II.2.1.2. La membrane cytoplasmique: Formée de deux feuillettes denses entourant un feuillet central transparent.

II.2.1.3. Le cytoplasme: comme chez les autres bactéries, des mésosomes et des ribosomes peuvent être observés.

II.2.1.4. Constitution chimique: La membrane externe est constituée principalement de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides spécifiques des *Brucella* Smooth et d'autres lipopolysaccharides communs aux cellules S et R.

II.2.2. culture et conditions de croissance:

II.2.2.1. Conditions physico-chimiques: Le pH varie entre 6.06 et 7.4, le pH optimal se situe à 6.8. Les brucella sont aérobies strictes. La température varie entre 20 et 37°C, la température optimale étant 34°C.

II.2.2.2. besoins nutritionnels: Sources d'azote, l'ion ammonium constitue une source d'azote suffisante pour certaines souches mais la croissance est moins bonne que si on leur fournit des acides aminés. d'autres souches sont plus exigeantes et nécessitent un ou plusieurs acides aminés. le glucose est le sucre habituellement utilisé mais il peut être remplacé par la galactose.

II.2.2.3. facteurs de croissance: bien que la plupart des milieux utilisent le chlorure de sodium, les ions sodium peuvent être remplacés par les ions potassium. Le soufre peut être apporté sous forme organique ou minérale, le magnésium et le fer sont indispensables.

II.2.2.4. Milieux de culture:

Les souches conservées au laboratoire cultivent sur les milieux usuels. En milieu liquide, la culture apparaît en 48h à 4 jours, et donne un trouble homogène. Sur milieu solide, les colonies apparaissent en 2 à 3 jours; sont rondes et lisses et de diamètre de 3 à 4 mm.

Les bouillons à l'extrait de viande, additionné d'extrait de levures, de glycérine ou de sérum du bovin ou de cheval donnent satisfaction.

La gélose glucosée au sérum, la gélose glucosée au glycérol, la gélose à l'infusion de pomme de terre, la gélose additionnée de 5p.100 de sang de mouton sont les milieux les plus habituels.

L'isolement des Brucella à partir de prélèvements contaminés par d'autres bactéries ou par des champignons nécessite l'emploi de **milieux sélectifs**, on ajoutant des antibiotiques et des antifongiques.

Divers milieux ont été proposés, dont les principales caractéristiques ont été bien analysées par Gerhardt. Tous les milieux proposés sont riches en facteurs de croissance, notamment en thiamine, acide nicotinique et biotine, la source de carbone étant le glucose ou l'acide lactique.

II.2.3. Caractères biochimiques:

II.2.3.1. Caractères généraux du genre: Aérobie strictes, toutes les brucella ont une catalase; la réaction des oxydases est +.

II.2.3.2. Métabolisme glucidique: L'utilisation des sucres est assez lente.

L'acidification ne se produit pas dans les milieux de culture, ceux-ci étant alcalinisés notamment par la production d'ammoniaque.

II.2.3.3. Métabolisme protéique: Les substrats habituellement utilisés sont:

L-alanine, L-asparagine, acide L-glutamique, D-L-citrulline, L-lysine, L-arginine et D-L-ornithine. A partir des acides aminés soufrés, la production d'hydrogène sulfuré est variable suivant les milieux et les espèces.

II.2.4. caractères antigéniques:

II.2.4.1. Bactéries Smooth (S ou lisses): Deux antigènes de surface, A et M agglutinogènes, se rencontrent chez toutes les Brucella en phase S des espèces *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis* et *B.neotomae*.

II.2.4.2. Bactéries Rough (R ou rugueuses): Les mutants R obtenus à partir des Brucella S perdent les antigènes A et M qui sont remplacés par un antigène R, commun à toutes les espèces de Brucella sous forme R. *B.ovis* et *B.canis* n'ont pas d'antigène A et M, mais possèdent l'antigène R.

II.2.5. Génétique:

Assez curieusement les brucella ont été à un certain moment à la pointe de la génétique bactérienne par l'étude de la mutation S R, en particulier grâce aux travaux de Braun.

II.2.5.1. Génome des brucella: Les études d'hybridation du ADN montrent que les bactéries du genre brucella forment un groupe génétique étroitement apparenté. La teneur en G+C/100 de l'ADN des différentes espèces varie de 56 à 58 moles.

III. Physiopathologie

III.1. Pouvoir pathogène naturel

III.1.1. Brucellose humaine

Après pénétration du germe par voie cutané-muqueuse, ou par voie digestive, l'incubation de 8 à 20 jours correspond à l'infection focale primaire. La bactérie est entraînée par voie lymphatique vers le premier relais ganglionnaire, qui constitue le foyer primaire, périphérique ou profond: ganglion axillaire, ganglion médiastinal et ganglion mésentérique. Après s'être multipliée, la bactérie passe dans la circulation générale et les signes cliniques apparaissent.

III.1.1.1. Brucellose aiguë septicémique : Aucun symptôme caractéristique ne marque le début de maladie; une asthénie, quelque malaise, la fièvre, s'installent insidieusement. Des myalgies, des arthralgies et des sueurs sont associées à une fièvre dont le tracé marque des ondulations étalées sur 15 à 20 J: c'est la fièvre classique ondulante sudoro-algique.

Cette forme septicémique s'accompagne de splénomégalie, d'hépatomégalie, d'adénopathies et parfois de localisations diverses.

Les formes ostéo-articulaires sont les plus fréquentes: arthrites synovites, ostéo- périostites, ostéo-arthrites atteignant surtout l'articulation sacroiliaque et le rachis

III.1.1.2. Brucellose chronique: La brucellose chronique a été souvent qualifiée de (patraquerie brucellienne). Avec un état générale bien conservé, les signes fonctionnels à tonalité neuro-psychique dominant: asthénie physique, psychique et parfois sexuelle, pouvant entraîner des troubles de caractère. Un tableau de dystonie neuro-végétative donne des signes très variables d'un sujet à l'autre, mais très stéréotypé pour chaque malade.

III.1.2. Brucellose animale:

La maladie animale, variable dans sa symptomatologie, souvent cliniquement inapparent

III.1.2.1. Bovins: La maladie, due le plus souvent à *B. abortus*, peut rester latente, sans manifestation clinique, pendant longtemps. Le plus souvent la maladie clinique apparaît chez la vache vers le cinquième mois de la gestation. Les brucella se multiplient très rapidement dans la placenta, entraînant l'avortement entre le cinquième et le 9 mois. On constate des

foyers de nécrose au niveau du chorion, tandis que le fœtus mort est infecté par de très nombreuses brucella dans tous ses organes.

III.1.2.2. Caprins et ovins: La brucellose caprine et ovine est bien connue, notamment par les travaux de Renoux.

Les chèvres sont infectées par *B. melitensis*. Après contamination, l'invasion des ganglions lymphatiques est suivie d'une bactériémie avec localisation utérine chez les chèvres gestantes et avortement. Mais la chèvre n'avorte qu'une fois, exceptionnellement deux, ne comme chez les bovins, la maladie peut devenir latente. Si certaines chèvres guérissent, chez d'autres la maladie devient chronique, avec atteinte de la glande mammaire et persistance pendant des mois et même des années de l'excrétion de *Brucella* dans le lait. Ce fait explique que la chèvre soit l'animal le plus dangereux pour la dissémination de la maladie et la contamination humaine.

III.1.2.3. Porcins: Bien qu'on ait signalé des infections porcines par *B. melitensis* et par *B. abortus*, le responsable essentiel de la brucellose du porc est *B. suis*. L'infection aiguë provoque l'avortement chez les truies. Mais il peut arriver que quelques fœtus seulement soient atteints et meurent, sans être expulsés.

III.2. Situation intracellulaire des *Brucella*:

Chez la souris, les modifications histologiques des cellules de la zone corticale des ganglions lymphatiques apparaissent dès la 6h après l'infection. On observe une importante multiplication bactérienne extracellulaire dans les sinus ganglionnaires. Après phagocytose par les macrophages et les cellules réticulaires, la dégradation bactérienne commence dans les phagolysosomes. Après phagocytose par les macrophages et les cellules réticulaires, la dégradation bactérienne commence dans les phagolysosomes. Cette destruction des structures bactériennes qu'on peut suivre en marquant les antigènes bactériens par des anticorps couplés à la peroxydase, provoque la libération de l'endotoxine et des antigènes, et en conséquence les phénomènes toxiques et immunitaires. Au contraire, dans d'autres cellules des ganglions lymphatiques ou de la rate, notamment les cellules mésenchymateuses, il n'y a formation de phagolysosomes mais les bactéries se multiplient dans des vacuoles, entraînant ultérieurement la destruction de la cellule. La multiplication intracellulaire des *Brucella* constitue un des phénomènes les plus importants de l'infection. On a montré qu'à l'intérieur d'une cellule, les *Brucella* pouvaient se diviser toutes les 8 h, c'est -à-dire presque aussi rapidement qu'à l'extérieur.

V.3. Diagnostic sérologique:

Ces épreuves sérologiques, utilisées sur sérum ou lait, font toutes intervenir des suspensions antigéniques de cellules totales inactivées par le phénol de *B. abortus* biovar 1 souche 99 ou 1119 en phase lisse. Les anticorps détectés sont alors pour la plupart spécifiques d'épitopes portés par le LPS-S.

Il existe dans la littérature scientifique de très nombreux tests de diagnostic, plus ou moins faibles, plus ou moins compliqués. Nous détaillerons les plus classiques—séroagglutination **de Wright**, épreuve à l'antigène tamponné (**Rose-Bengale**), fixation du complément, ring-test, ELISA—et nous ne ferons qu'évoquer les autres.

V.3.1. Séroagglutination lente (de Wright) (SAW, SAL, SAT, ou TAT):

Essentiellement décrit par MALKIN, la SAW représente la méthode la plus largement utilisée pour titrer les anticorps anti-brucella en vue du commerce international des animaux.

C'est un test précocement positif car il met en évidence la présence des anticorps des classes IgG 2 et IgM. Il fait appel à un antigène de *B. abortus*.

La technique employée consiste à additionner le sérum à tester et un volume équivalent de suspension de brucelles tuées par la chaleur et dont on suspecte que l'animal est infecté. Après mélange, les tubes sont incubés pendant 48 heures à 37°C puis examinés en lumière oblique.

Dans le cas d'un sérum sain, on observe une suspension homogène des bactéries. En présence d'un animal infecté, les anticorps ont réagi avec les bactéries et l'on constate la présence d'un agglutinat au fond du tube. On mesure alors la quantité totale d'anticorps agglutinants, les résultats étant exprimés en unité internationale (UI). La réaction est considérée comme:

- Positive lorsque le titre est supérieur ou égal à 80 $\mu\text{l/ml}$.
- Négative lorsque le titre est inférieur à 30 $\mu\text{l/ml}$.
- Douteuse lorsque le titre est supérieur ou égal à 30 $\mu\text{l/ml}$ et inférieur ou égal à 80 $\mu\text{l/ml}$.

V.3.2. Epreuves à l'antigène tamponné (EAT) (Card-test, Rose-Bengale et BPAT):

Ce sont des épreuves simples d'agglutination rapide sur lame de sérum pur, utilisant des antigènes colorés et tamponnés à un faible pH, généralement de 3.65 ou 4.00. Les immunoglobulines responsables de la réaction sont les IgG1, dont l'activité agglutinante est facilitée à pH acide, et parfois les IgM, en fonction de mode de préparation de l'antigène.

Les plus communes sont l'épreuve sur carte (**Card-test**), l'épreuve au Rose-Bengale.

Cette dernière développée par DE.PIETZ aux USA plus de 20 ans auparavant et largement appliquée comme test de dépistage pour le diagnostic individuel dans les troupeaux de bovins lors d'enquêtes et de programmes de surveillance. L'antigène standard est préparé à partir de cultures des souches de brucella abortus biovar1 A-dominant.

Ce test, décrit et utilisé à l'origine par SAMAGH et BOULANGER, détecte les anticorps des classes IgG1 et IgM.

V.3.3. La fixation du complément (FC):

Les complexes antigènes-anticorps ont la propriété de fixer le complément. La fixation de ce dernier sur les immunocomplexes est appréciée par la disparition du pouvoir hémolytique.

La réaction comporte deux temps:

- Dans un premier temps, on met en contact le sérum à étudier, le complément et l'antigène. Si le sérum renferme un anticorps, ce dernier se combine à l'antigène et l'immunocomplexe fixe le complément.
- Dans un deuxième temps, on introduit les hématies et le sérum hémolytique. Si le complément introduit a été au préalable fixé par un complexe antigène-anticorps, les hématies ne sont pas lysées: la réaction est positive, s'il n'y a pas eu union entre l'antigène et l'anticorps, le complément demeure libre, les hématies sont lysées: la réaction est négative.
- Lorsque la FC est l'épreuve principale de diagnostic dans les campagnes d'éradication, c'est la méthode de fixation à chaud qui est employée (37°C pendant ½ heure).
- La lecture se fait par référence au tube intermédiaire pour lequel l'hémolyse est de 50%. Tous les tubes de dilution ¼ ou plus représente une hémolyse de 50% peuvent être imputable à la brucellose.

Pour l'interprétation de l'épreuve, la comite mixte FAO-OMS d'experts de la brucellose a recommandé un système d'unité basé sur le deuxième étalon international de sérum anti-B. abortus (EISAb). Le résultat est donné en unité internationale fixant le complément (UIFC). En revanche, en Europe les résultats sont exprimés en unités CEE sensibilisatrices/ml (UCEES/ml) par rapport à l'étalon qui a pour titre 1000 UCEES/ml. Ce sérum étalon donne une positivité (hémolyse à 50%) pour une dilution de 200ème. Pour une dilution au quart, le seuil de positivité est donc de 20 UCEES/ml.

Les difficultés de standardisation inhérentes à cette épreuve proviennent du fait que les différentes techniques favorisent sélectivement la fixation du complément par divers isotypes

d'immunoglobulines. Or l'EISAb ne tient compte que des IgG. Le cinquième rapport du comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose traite en détail des divergences d'opinions liées au titre duquel un résultat doit être considéré comme positif. Des désaccords persistent à ce jour.

La FC a par ailleurs l'inconvénient d'être d'une grande complexité technique rendant difficile l'examen de séries de sérums.

V.3.4. Ring-test (RT) ou épreuve de l'anneau:

Ce test détecte les immunoglobulines de lait, soit provenant du sang par filtration (IgM), soit produites localement dans la mamelle (IgA).

Utilisé sur lait de mélange, il permet de détecter des agglutinines brucelliques dans le lait de 4 à 50 vaches. Il consiste à mettre en présence 1 ml d'un mélange de laits suspects et d'une ou deux gouttes d'antigène coloré par l'hématoxyline. L'ensemble est mélangé et placé en incubateur à 37°C pendant 40 à 50 minutes. En cas d'infection le complexe antigène-anticorps a entraîné à la surface du lait par des globules graisseux de la crème, forment alors un anneau pourpre. En l'absence d'infection, l'antigène coloré est réparti également dans tout le mélange, donnant à ce dernier une couleur homogène.

Ce test peut également être utilisé au niveau individuel et permet alors de rechercher les vaches responsables de la positivisation du RT de mélange. Le prélèvement réalisé sur les quatre quartiers, en mélange ou séparément. Le lait est ensuite dilué au laboratoire au 1/4, 1/8, 1/16, voire au 1/32 dans un lait de mélange exempt de brucella.

Le résultat est considéré comme positif lorsque l'épreuve est encore positive à la dilution de 1/8 au moins. Les réactions faibles et lentes sont douteuses. Quant aux réactions fortes, elles sont indiscutablement positives.

V.3.5. 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.

V.3.6. ELISA (Enzyme Like Immuno Sorbent Assay):

C'est une technique qui utilise des antigènes solubles fixés par absorption sur l'alvéole des plaques de microtitration. Les anticorps qui viennent s'y fixer sont révélés par des antiglobulines humaines liées par une enzyme (souvent la peroxydase) qui, en agissant sur un substrat incolore entraîne l'apparition d'une coloration plus ou moins intense en fonction de la quantité d'enzymes présentes, donc du complexe anticorps-antiglobulines humaines fixés.

La lecture se fait à l'œil nu, après dilutions successives, le titre étant l'inverse de la plus forte dilution ayant donné un résultat encore positif, soit au spectrophotomètre, par la mesure d'une densité optique sur une seule dilution.

V.3.6.1. Avantages et inconvénients:

V.3.6.2.1. Avantages: Les avantages de cette technique sont nombreux : grande sensibilité, automatisation,

détection sélective possible des immunoglobulines (IgE, IgM, IgA), économie de réactifs et de sérums.

V.3.6.2.2. Inconvénients:

- Nature et qualité de l'Ag.
- Efficacité de son adsorption sur la plaque.

De bons résultats ont été obtenus en matière de diagnostic chez les ovins et caprins avec les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) indirects ou de compétition.

L'ELISA indirecte sur sérums est très sensible mais peu spécifique surtout dans les troupeaux vaccinés. Elle peut s'effectuer sur sérum individuel ou sur mélange de dix sérums. Dans ce dernier cas, sa spécificité augmente tout en restant sensible. Elle peut également être utilisée sur le lait de mélange.

V.3.7. 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.

V.3.8. Diagnostic allergique:

Le diagnostic allergique est une épreuve immunologique de substitution, utilisable pour le dépistage des troupeaux non vaccinés, surtout chez les bovins de plus de 12 mois mais rarement chez les petits ruminants (**Fensterbank, 1977**).

L'épreuve cutanée allergique (ECA) se pratique, après repérage du lieu d'inoculation et mesure du pli cutané, par injection intradermique (ID) au milieu de l'encolure de 0,1mL de brucelline.

Tout épaissement du pli cutané ≥ 2 mm constaté 72 heures après injection est considéré positif. Cette épreuve souffre d'erreurs par défaut (seuls 60 à 80% des bovins infectés réagissent) mais présente l'avantage d'être spécifique (spécificité de 100%) (**Ganière et Dufour, 2009**).

la spécificité des tests est définie comme étant la probabilité que les non brucelliens aient été dépistés négatifs par le laboratoire central, parmi l'ensemble des animaux réellement non atteints dépistés $(D/(B+D)*100)$.

Tableau : Caractéristiques des différentes techniques de diagnostic sérologique:

Test	Sensibilité	Spécificité	Immunoglobulines détectées	Distinction vaccinés/ malades	Coût	Faisabilité
EAT	+++ selon situation épidémiologi que	+++	IgM IgG1 IgG2	NON	Faible	Facile : peut se faire sur le terrain
Ring Test	+++ selon la taille du troupeau	++	IgG	OUI généraleme nt	Faible	Assez facile, mais nécessite une étuve
Séroa ggluti	++	+	IgG2	NON	Faible	Facile

natio n de Wrig ht						
FC	+++	++++	IgG1 1gG2	NON	Elevé	Complicé et nécessite matériel de pointe
BPA	+++	+++	IgG	NON	Faible	Plus complicé que EAT pour résultats équivalents
ELIS A indire cte	++++	+++	IgG1 1gG2	non	Elevé	Difficile
ELIS A de comp étitio n	+++	++++	IgG1 IgG2	OUI	Elevé	Difficile
FPA	+++	++++		OUI	Moye n	Facile, faisable sur le terrain, mais nécessite matériel spécifique

1) Physiopathologie et immunité

La physiopathologie des brucelloses pose des énigmes passionnantes qui sont loin d'être résolues. Seules les premières étapes de l'infection sont à peu près connues. Les germes pénètrent à travers le revêtement cutané-muqueux (excoriation cutanées, conjonctive), par voie digestive (ingestion de lait ou de fromage frais contaminé) ou pulmonaire (aérosols infectieux produits lors du conditionnement industriel de viandes contaminées). Ils sont alors drainés par voie lymphatique vers le premier relais ganglionnaire, dont la topographie peut être axillaire, mésentérique ou médiastinale selon la porte d'entrée. Le devenir de ces bactéries dans un organisme non immun dépend probablement de leur nombre, de la virulence de la souche et des capacités de défense de l'hôte. Très souvent, les *brucelles* sont éliminées plus ou moins rapidement par les macrophages ganglionnaires et la maladie reste inapparente. Dans d'autres cas, la majorité des germes sont détruits par les macrophages, mais certains sont capables de résister, voire de croître dans ces cellules.

Les bactéries peuvent alors passer dans la circulation générale et essaimer dans tout l'organisme en se localisant dans les phagocytes résidents des tissus (macrophages de la rate et de la moelle osseuse, cellules de Kupffer du foie...). Les *brucelles* sont donc des parasites intracellulaires facultatifs, à l'instar de *listeria monocytogenes* ou de *Mycobacterium tuberculosis*. Les mécanismes qui permettent à ces coccobacilles de survivre ou de se multiplier dans les cellules macrophagiques sont inconnus à ce jour. (BERECHE, 1988).

Comme pour les autres bactéries à croissance intracellulaire facultative, l'immunité à médiation cellulaire joue un rôle capital dans l'élimination des *brucelles* qui ont résisté aux premières défenses de l'hôte et dans la protection de l'organisme vis-à-vis de réinfections exogènes. Des cellules T spécifiques interviennent au cours de la primo-infection en augmentant l'activité bactéricide intrinsèque des macrophages (activation macrophagique) et en provoquant un afflux local de cellules mononuclées provenant de la moelle osseuse (recrutement des monocytes). Dans la majorité des cas, ces événements sont observés dans la brucellose et conduisent à la destruction des bactéries au sein d'un granulome caractéristique d'une infection à parasite intracellulaire (présence de cellules épithélioïdes, de cellules géantes, de cellules T). Cependant, la brucellose se présente parfois comme une maladie d'évolution prolongée, avec des rechutes fréquentes malgré un traitement antibiotique adapté et des (réactivation) toujours possibles à partir d'un foyer jusque là -quiescent. En d'autres termes, et c'est là que réside la deuxième énigme, les *Brucella* sont parfois capables d'échapper aux mécanismes immunitaires spécifiques qui devraient aboutir à leur élimination.

Les mécanismes de cette résistance restent obscurs, mais les macrophages infectés par les *brucelles* semblent capables d'empêcher l'action des cellules T spécifiques mobilisées dans les foyers infectieux.

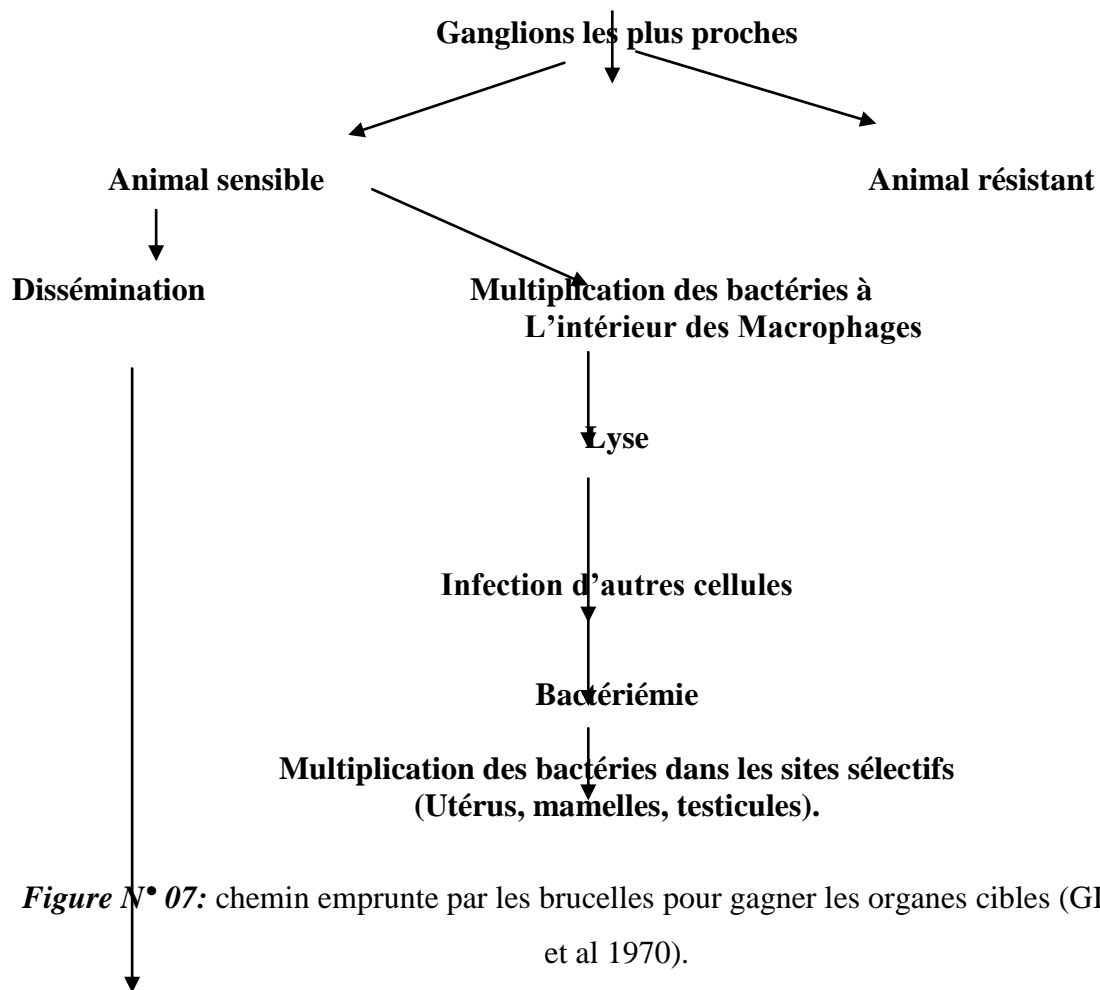
Cet effet inhibiteur sur les cellules T locales aboutirait essentiellement à un défaut de recrutement des monocytes médullaires. Par ailleurs, l'introduction de cellules T spécifiques lors de la primo-infection permet de protéger l'hôte contre des réinfections par des *brucelles*. Cette véritable mémoire immunologique n'apparaît qu'après l'introduction de bactéries vivantes dans l'organisme. La vaccination contre la brucellose requiert donc en théorie l'emploi de vaccins (atténués). (Type *B. abortus* souche B19) pour obtenir une protection efficace et de longue durée.

Une réaction immunitaire de type humorale est constamment observée au cours de la brucellose et permet d'ailleurs de diagnostiquer des formes inapparentes ou méconnues. Les IgM apparaissent dès la fin de la première semaine de la maladie clinique, alors que les IgG sont mises en évidence à partir de la deuxième ou de la troisième semaine. On observe une élévation des titres des IgM et des IgG puis un déclin en cas de guérison, jusqu'à une disparition totale des anticorps circulants.

En revanche, le titre des IgG reste élevé en cas d'infection persistante et la présence d'IgG à un taux significatif est donc très évocateur d'une maladie en évolution.

Le titre des IgA suit habituellement une cinétique similaire à celle du taux des IgG. En fin de compte, des IgE spécifiques peuvent être mises en évidence chez des personnes présentant des rashes cutanés lors d'expositions répétées aux *brucelles* (vétérinaires...). Si les anticorps ne semblent jouer aucun rôle protecteur lors d'une primo-infection par les *brucelles*, ils pourraient intervenir dans la résistance acquise contre ces germes. En théorie, des molécules purifiées comme des protéines de membrane externe peuvent donc être utilisées comme antigènes vaccinaux en suscitant l'apparition d'anticorps protecteurs. Cependant, ces antigènes doivent être administrés en association avec des adjuvants pour amplifier la réponse humorale et en prolonger la durée (BURECHE, 1988).

Cheminement des bactéries par les canaux lymphatiques



2) Etude Clinique

2-1 Mode de transmission :

L'eau de boisson et l'alimentation contaminée par les sécrétions des animaux atteints.

L'insémination artificielle par un mâle atteint.

La saillie des femelles par des mâles infectés.

Le léchage du placenta, des sécrétions utérines ou des produits avortés atteints (BAHOUT, 1996).

Le lait provenant des animaux atteints transmet les *brucella* aux nouveaux nés est particulièrement dans les grandes exploitations, ce qui augmente le risque est aggravée la situation, du fait que le lait est un milieu propice pour la production ultra rapide des *brucelles* (pendant chaque demi heure, une cellule brucellienne peut donner naissance à un million de *brucella*).

2-2. La brucellose caprine :

Le principal agent de la maladie chez les caprins est *B.melitensis* qui comporte trois biotypes .On a parfois trouvé des infections à *B.suis* et *B.abortus*.

Les caprins sont une des sources dominantes de la contamination humaine, ils représentent l'essentiel du bétail des pays pauvres à climat sec ou semi désertique, pays où la lutte contre l'enzootie est impossible, vaccination, contrôle et abattage n'y étant que peu ou pas appliqués (JAMBON, 1993).

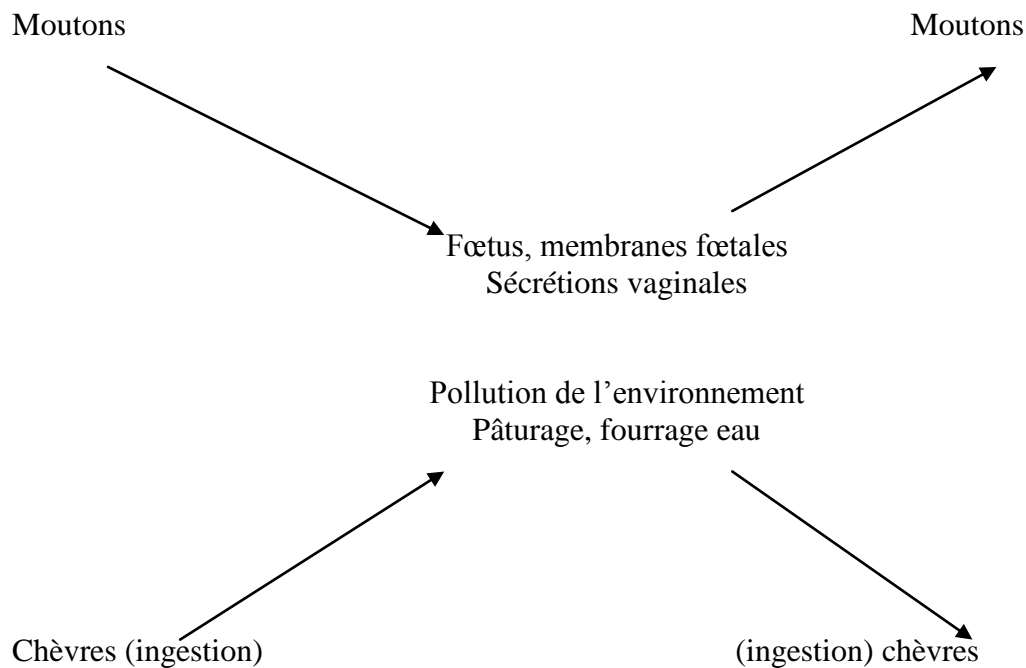


Figure N° 08: Mode de transmission de la brucellose caprines et ovine. (ACHA et SZYFRES, 1989)

Les signes cliniques :

Le symptôme principal est l'avortement qui se produit le plus souvent au cours du troisième ou du quatrième mois de gestation chez les chèvres (ACHA et SZYFRES, 1989).

On observe aussi des hygromas, de l'arthrite, de la spondylite et de l'orchite, la mammite est courante chez la chèvre.

2-3. Brucellose humaine :

La brucellose humaine est une maladie cosmopolite, essentiellement sporadique (CRAPLET et THIBIER, 1980). La maladie chez l'homme est plus fréquemment appelée : fièvre ondulante, fièvre de Malte, fièvre méditerranéenne ou maladie de Bang. Il n'existe pas de différences caractéristiques dans la symptomatologie de la maladie humaine suivant le germe en cause. La maladie est surtout professionnelle : fermiers, vétérinaires, employés d'abattoirs sont souvent exposés.

Quatre variétés peuvent être pathogènes pour l'homme : *B.melitensis*, *suis*, *abortus*, et *canis* (PECHERE et al, 1983).

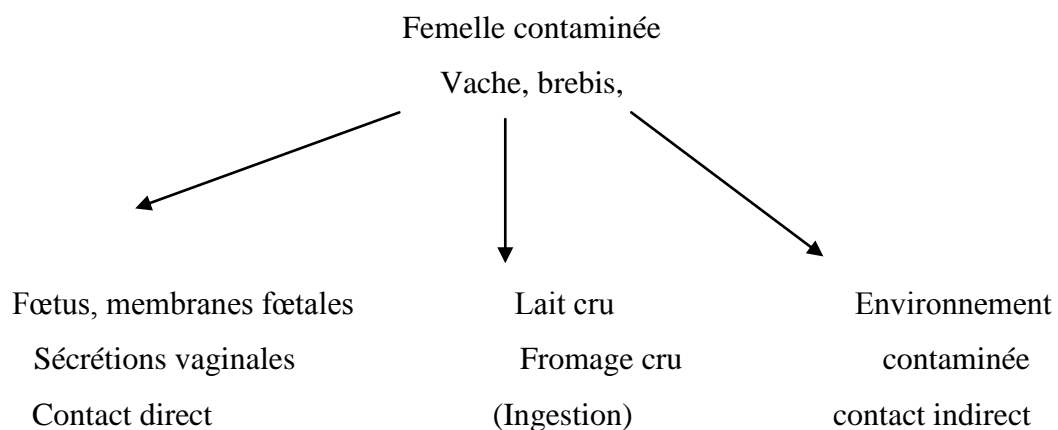
C'est une maladie sous estimée, car les formes inapparentes sont nombreuses.

La durée d'incubation après pénétration se caractérise par un stade préliminaire long durant des jours ou des semaines (de 8 à 20 jours), ce qui correspond à l'infection focale primaire. Une fois la bactérie pénètre, elle sera entraînée par voie lymphatique vers le premier relais ganglionnaire qui constitue de foyer primaire périphérique ou profond, ganglions

axillaires, ganglions médiastinaux, ganglions mésentériques. Après multiplication, la bactérie passe dans la circulation générale et les signes cliniques apparaissent (LE MINOR et VERON, 1989).

2-3-1. Contamination humaine dans les foyers brucelliens :

Peu de personnes vivant dans une exploitation infectée échappent à la contamination. Ceux qui donnent les soins aux animaux –trayeurs, bergers – sont les plus exposés en touchant les organes malades ou simplement la toison fréquemment porteuse de brucelles provenant de la litière. De même, les vétérinaires, les employés d’abattoirs et de l’industrie alimentaire des viandes et des laits, les bouchers, sont également exposés. Il s’agit le plus souvent d’une contamination par voie cutanéomuqueuse : infection à travers les excoriations de la peau des mains, au niveau de la muqueuse buccale ou nasale. La possibilité de contamination par voie aérienne ou par voie conjonctivale, dans les laboratoires où sont manipulé des brucelles. La contamination humaine par voie alimentaire, viandes, lait et dérivés, légumes.(Figure N° 03).



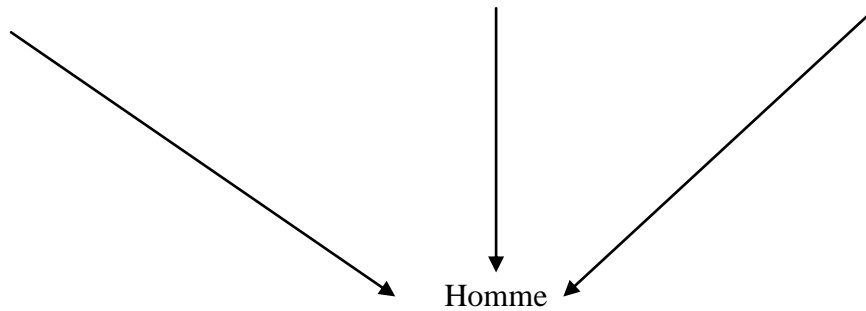


Figure N° 09 : les différents modes de contaminations de l'homme. (ACHA et SZYFRES, 1989)

VI. Traitement:

Les antibiotiques sont utilisés pour traiter la brucellose. Il est important de mettre en place un traitement rapide pour éviter une infection chronique. Comme *Brucella* est une bactérie intracellulaire, il faut utiliser des antibiotiques à la fois actifs sur la bactérie et pénétrant dans les cellules.

Les tétracyclines et la rifampicine sont utilisés souvent associées à la streptomycine au chloramphénicol et aux sulfamidés. Par exemple, l'OMS recommande rifampicine 600 mg/j et doxycycline 200 mg/j. Les doses sont adaptées si le malade est une femme enceinte ou un jeune enfant, mais il n'y a pas de contre-indication.

Le traitement dure environ 6 semaines pour la brucellose en phase septique. En phase focalisée, le traitement dure de deux à quatre mois car la majorité des bactéries sont alors intracellulaires et donc plus difficiles d'accès aux molécules.

VII. Prophylaxie:

Chez les humains, la prévention est basée sur des règles d'hygiène et de sécurité :

- Port de gants et de masque pour les professionnels en contact avec des produits biologiques potentiellement infectés.
- Lavage des mains.
- Hygiène des étables.
- Hygiène des produits laitiers. Consommation de produits laitiers pasteurisés.
- Éviter la consommation de crudités en région endémique.

Il existe un vaccin préventif humain à base de germes tués qui n'est plus commercialisé depuis 1992 et un vaccin vivant atténué chez les animaux (Sa virulence relative ne permettait pas de l'employer chez l'homme).

MATERIEL ET METHODES

1- Animaux

14 bovins provenant de différents élevages de la région de Tiaret ont été prélevés.

Le tableau suivant récapitule la provenance de ces animaux

Tableau1 : Distribution des échantillons animaux

N° série	8	23	25	55	59	65	89	92	10	11	11	13	171	193
bovins									4	4	8	2		
Age (ans)	02		5	5	7	7	4	6	2	5	7	4	4	3
sexe	F	F	F	F	F	F	F	F	M	F	F	F	F	M
Race	FL	PR	PN	PN	PN	PN	PR	PN	PR	PN	PN	PR	PN	PR
Taille du troupeau	18	6	16	16	27		8	12	9	5	13	26	15	13

F : femelle ; M : mâle ; FL : Frisonne ; PR : Pie-rouge ; PN : Pie-noire

Le sang prélevé sur tubes secs a été centrifugé à 5000 tours pendant 10 mn et les sérums congelé à -20 °C jusqu'au moment de l'analyse sérologique par ELISA.

2- Technique de l'ELISA indirecte:

8.2. Matériel non fourni:

1. Micropipettes. Volumes: 5; 50; 100; 500 µl.
2. Tubes (1 ml) pour la dilution des échantillons.
3. Lecteur de microplaque (ELX800) capable de lire l'absorbance à 450.
4. Eau distillée.
5. Serviettes en papier, embouts de pipette à usage unique et chronomètre.

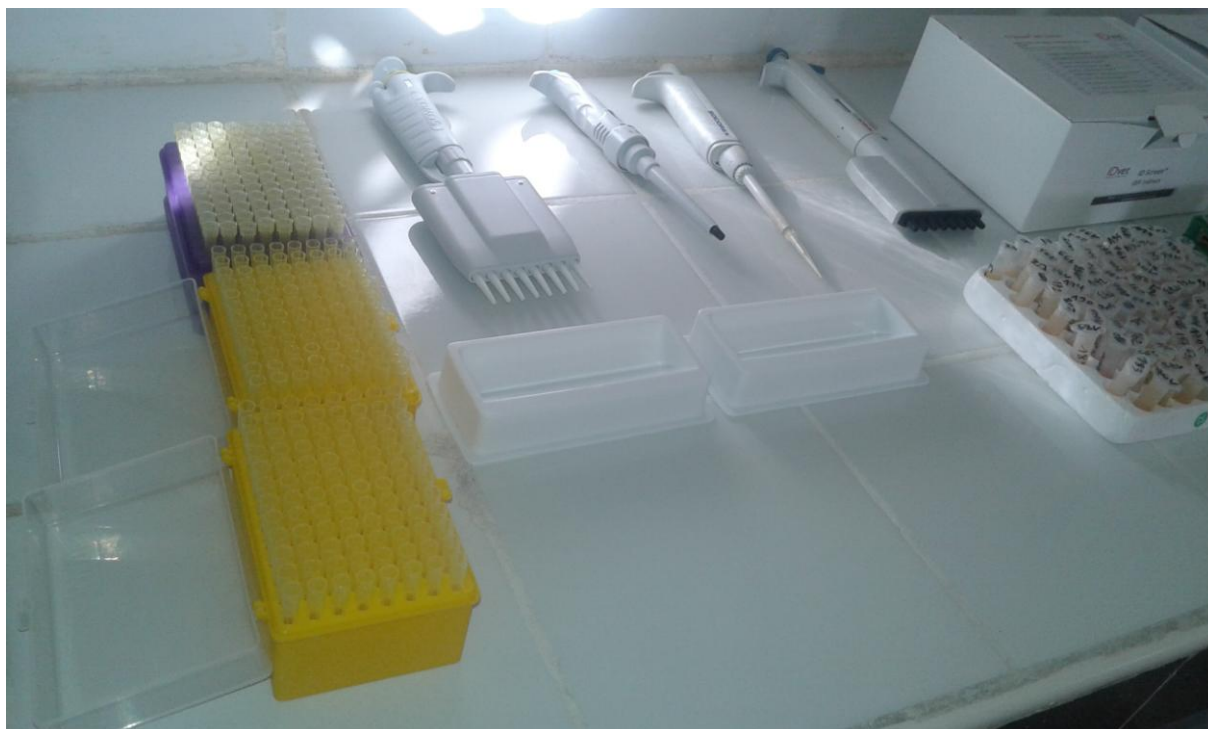


Figure 01 : matériel de laboratoire utilisé

1- Constituants du kit ELISA

Les réactifs du kit et la technique du test sont mentionnés dans l'annexe N° 01. Ce kit a été fourni par la firme ID.vet Innovative Diagnostics. Grabels. France.

a. Composants du kit:

Symbole	Composant
MTP	Microplaque: Barrettes sécables et sensibilisées avec du LPS.de Brucella (12×8)
ENZCONJ	Conjugué Enzymatique concentré (10×): Coloré en rouge. Prêt(e) à l'emploi. Contient: anticorps, conjugués à de la peroxydase.
	Contrôle Négatif
	Contrôle Positif
DILBUF	Tampon Diluant: Tampon de dilution 2 Prêt à l'emploi. Contient: PBS Tampon, BSA, < 0.1 % NaN ₃ .
	Tampon de dilution 3
WASHBUF CONC	Solution de Lavage, Concentré (20x) Contient: PBS Tampon, Tween 20.

TMB SUBS	Solution de révélation (TMB): Prête à l'emploi. Contient: TMB.
TMB STOP	Solution d'Arrêt: Prête à l'emploi (0.5 M) H ₂ SO ₄ .

b. Précautions d'emploi

- Seulement prévu au diagnostic in-vitro et à l'usage professionnel.
- Lire les instructions complètement et avec attention avant de commencer le test. Utiliser la version valide de la fiche technique incluse dans le kit. S'assurer que tout a été bien compris. La composition du kit est indiquée sur l'étiquette de dessus de kit.
- Suivez le numéro du lot et la date de péremption. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots. Ne pas utiliser de réactifs périmés.
- Suivre les bonnes pratiques de laboratoire et les directives de sécurité. Porter des blouses de laboratoire, gants en latex à usage unique et lunettes de protection si nécessaire.
- Les réactifs de ce kit contiennent du matériel dangereux pouvant irriter les yeux et la peau. Consulter le matériel fourni et les étiquettes pour les détails. Les Fiches de Données de Sécurité pour ce produit sont disponibles sur le site internet IBL ou sur demande particulière à IBL, la solution de révélation peut être irritante pour la peau.
- Les réactifs chimiques préparés ou utilisés doivent être traités comme matériel dangereux en accord avec les directives et règlements nationaux de sécurité pour tout matériel à risque.
- Eviter tout contact de la solution d'arrêt avec la peau (S24-37). Elle peut provoquer des irritations et brûlures cutanées.
- Quelques réactifs contiennent de l'acide de sodium (NaN₃) comme conservateur. Laver abondamment à grande eau en cas de contact avec les yeux ou la peau.
- La solution d'arrêt (0,5M) peut être nocive en cas d'ingestion et peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau (R22-43)
- Les composants portant la même dénomination (solution de lavage, Tampons de dilution) peuvent être utilisés dans l'ensemble de la gamme IDvet.
- Ne pas pipeter à la bouche.
- La qualité des résultats dépend du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit par d'autres provenant d'autres fabricants.

Respecter les techniques de laboratoire réduisant au minimum la contamination microbienne et chimique. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption se trouvant sur l'étiquette.

c. Stockage et stabilité

Le kit est envoyé à température ambiante et doit être stocké entre 2 °C et 8 °C. À conserver à l'abri de la chaleur ou de la lumière directe, ne pas exposer la solution de révélation à une lumière vive ni à des agents oxydants. Les barrettes de la microplaque sont stables jusqu'à la date de péremption du kit en étant stockées entre 2 °C et 8 °C dans le sachet déjà ouvert, mais hermétiquement refermé.

Il est conseillé de décontaminer l'ensemble des éléments à usage unique utilisés au cours des essais par immersion pendant 1 heure minimum dans l'hypochlorite de sodium à 5% fraîchement préparé, avant de les éliminer ou d'autoclaver à 120°C.

Ne pas employer le réactif s'il est trouble ou si un précipité s'est formé. Tous les réactifs doivent être portés à température ambiante (22-30°C) avant l'utilisation.



Figure 02 : Kit ELISA utilisé

d. Principe du test:

Le test immuno-enzymatique sur phase solide (ELISA) est basé sur la technique sandwich. Les puits sont coatés avec un antigène. Les anticorps spécifiques, contenus dans l'échantillon et se liant à l'antigène fixés aux puits, sont détectés par un second anticorps conjugué lié à une

enzyme (E-Ab). Suite à la réaction substrat, l'intensité de la couleur développée est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques.

La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration de l'anticorps, est lue sur un spectrophotomètre à 450 nm. La densité optique des échantillons est comparée avec la densité optique de l'étalon (résultat qualitatif).

Le kit de diagnostic est destiné à la mise en évidence d'anticorps dirigés contre *Brucella abortus* (bovins), *melitensis* (ovins et caprins) et *suis* (porcs).

Il peut être utilisé sur sérums et plasmas individuels bovins, ovins, caprins et porcins ou sur mélanges bovins jusqu'à 10 sérums.

E. principe du test ELISA

- Les cupules sont sensibilisés avec du LPS de *Brucella abortus*, qui se fixe au fond des cupules (par effet électrostatique).
- Les échantillons à tester et les contrôles sont distribués dans les cupules, dilués au 1/20.
- Les anticorps anti-*Brucella*, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps.
- Un conjugué ou anticorps de détection multi-espèces marqué à la peroxydase (HRP) est distribué dans les cupules.
- Il se fixe aux anticorps anti-*Brucella*, formant un complexe antigène-anticorps-conjugué-HRP.
- Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB) contenant un substrat de la peroxydase : le TMB (tétra-méthylbenzidine) qui se colore en bleu en présence de l'enzyme.
- La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester:
- En présence d'anticorps dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage.
- En l'absence d'anticorps dans l'échantillon, il n'apparaît pas de coloration.
- La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 450 nm.
- Le lavage de la microplaque est important. Des puits mal lavés provoqueront des résultats erronés. Il est recommandé d'utiliser une pipette multicanaux ou un système de lavage de microplaque automatique.
- Ne pas laisser sécher les puits entre les incubations. Ne pas gratter les puits coatés pendant le rinçage ou l'aspiration. Rincer et ajouter les réactifs avec précaution. Lors du rinçage,

vérifier que tous les puits soient régulièrement remplis avec le tampon de lavage, et qu'aucun reste ne soit ensuite visible.

- L'humidité affecte les puits coatés. Ne pas ouvrir le sachet avant que celui-ci n'ait atteint la température ambiante. Les puits inutilisés doivent être rangés immédiatement dans le sachet refermé avec le dessiccateur.

f- Mode opératoire:

Ramener tous les réactifs à température ambiante ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.

On va distribuer ultérieurement 300 μl de solution de solution de lavage dans chaque cupule et laver 3 fois donc le total: $300 \times 3 = 900\mu\text{l}$ et on va répéter ce procédure pour la 2^{ème} fois c'est-à-dire le total: $900 \times 2 = 1800\mu\text{l}$.

On a puits 16 puits, donc $16 \times 1800 = 28800 / 20 = 1440\mu\text{l}$ de Tampon de dilution (parce que on doit diluer la solution de lavage avec l'eau distillée au 1/20), et on doit compléter ce volume: 1440 μl de Tampon de dilution avec le reste c'est-à-dire: $28800 - 1440 = 27360\mu\text{l}$ de l'eau distillée.

10.1.1. Préparation du conjugué:

Si nécessaire, ramener le conjugué concentrée ($\times 10$) à température ambiante ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) et bien agiter pour assurer la dissolution des cristaux.

Mode opératoire:

On va distribuer ultérieurement 100 μl du conjugué dans chaque cupule et on a 16 puits donc le total: $100 \times 16 = 1600\mu\text{l}$. On doit diluer ce volume: 1600 μl avec le Tampon de Dilution 3 au 1/20 donc: $1600/20 = 80\mu\text{l}$, et on doit compléter ce volume: 80 μl du conjugué avec le reste c'est-à-dire: $1600 - 80 = 1520 \mu\text{l}$ du Tampon de dilution 3.

On va distribuer ultérieurement

11. Mode opératoire:

On a 14 sérums à tester.

La cupule A1 correspond au contrôle positif et la cupule A2, correspond au contrôle négatif.

Distribuer 190 μl de Tampon de dilution 2 dans chaque puits pour les puits E1, F1, G1, H1, A2 et B2 correspondent aux sérums à tester.

10 μl de contrôle négatif du sérum (suspension bactérienne autre que celle de l'espèce recherchée) dans la cupule B1.

10 μl de contrôle négatif du disque buvard (suspension bactérienne autre que celle de l'espèce recherchée) dans la cupule C1.

10µl de contrôle positif du sérum (suspension d'une souche type de l'espèce bactérienne recherchée) dans la cupule D1.

10µl de contrôle positif du disque buvard (suspension d'une souche type de l'espèce bactérienne recherchée) dans la cupule A1.

10µl de chaque échantillon des 6 sérums à tester dans les cupules E1, F1, G1, H1, A2 et B2.

200µl de chaque échantillon des 6 échantillons de sang prélevés sur papier buvard wattman

2. Incuber 45 min (\pm 4 min) à 21°C (\pm 5°C).

Pour les sérums individuels uniquement, il est aussi possible de réaliser une incubation de nuit (protocole long), entre 16 et 20 heures à 21°C (\pm 5°C).

3. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300µl de solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.

4. Préparer le conjugué 1× en diluant le conjugué (\times 10) au 1: 10 (protocole court) ou au 1:20 (protocole long- sérums individuels uniquement) en Tampon de Dilution 3.

5. Distribuer 100 µl de conjugué 1× dilué dans chaque cupule.

6. Incuber 30 min \pm 3 min à 21°C (\pm 5°C).

7. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 µl de solution de lavage.

8. Distribuer 100 µl de Solution de révélation dans chaque cupule.

9. Incuber 15 min \pm 2 min à 21°C (\pm 5°C) à l'obscurité.

10. Distribuer 100 µl de Solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction.

Possibilité de stopper la réaction de coloration (dans le cas où les résultats ne sont pas exploités tout de suite)

Ajouter dans les puits 100 µL d'acide sulfurique (N HCL: l'acide bloque l'enzyme) : le TMB vire au jaune.

11. Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

RESULTATS

Pour la validation: on doit vérifier est ce que la test iElisa est valide?

Le test est validé si:

La valeur moyenne de la densité optique des contrôles positifs (DOcp) est supérieure à 0,350.

DOcp > 0,350, ici c'est vérifié (tableau x).

Le rapport entre la moyenne des contrôles positifs (DOcp) et la moyenne des contrôles négatifs (DOcn) est supérieur à 3. DOcp /DOcn > 3

Dans notre travail, DOcp /DOcn > 3. 0,537/0,057 = 9,42. Donc, le test ELISA est validé.

Tableau xx : résultats des longueurs d'ondes des différents échantillons

	1	2	S/P
A	0,537 (CP)	0,057 (CN)	
B	0,082 (92)	0,07 (118)	
C	0,059 (104)	0,107 (193)	
D	0,072 (23)	0,083 (171)	
E	0,085 (114)	0,083 (132)	
F	2,416 (55)	0,173 (65)	
G	0,068 (25)	0,2 (89)	
H	0,091 (59)	0,058 (8)	

Donc: on conclure que le test est valide.

14. Les résultats du test iElisa des sérums et des échantillons prélevés sur papier buvard wattman:

Pour chaque échantillon, calculer le pourcentage S/P (S/P%):

$$S/P\% = \frac{DO_{\text{échantillon}} - DO_{\text{cn}}}{DO_{\text{cp}} - DO_{\text{cn}}} \times 100\%$$

Pour sérum ou plasma individuels, une incubation courte ou de nuit:

Les échantillons présentant un S/P:

-Inférieur ou égal à 110% sont considérés comme négatifs.

-Supérieur à 110% et inférieur à 120% sont considérés comme douteux.

- Supérieur ou égal à 120% sont considérés comme positifs.

Résultat	Statut
$S/P \leq \%110\%$	négatif
$110\% < S/P < \%120\%$	douteux
$S/P \geq \%120\%$	positif

Calcul:

Pour les sérums: $DO_{cp} - DO_{cn} = 0,537 - 0,057 = 0,48$

Tableau cc : calcul de la S/P% pour chaque échantillon

Numéro de boucle	Densité optique	s/p %
92	0,082	5,208333
104	0,059	0,416667
23	0,072	3,125
114	0,085	5,833333
55	2,416	491,4583
25	0,068	2,291667
59	0,091	7,083333
118	0,07	2,708333
193	0,107	10,41667
171	0,083	5,416667
132	0,083	5,416667
65	0,173	24,16667
89	0,2	29,79167
8	0,058	0,2083333

Interprétation:

L'ELISA a été réalisée aussi sur les sérums selon la méthode développée par LIMET et *al.*

(1988) au Centre d'Etudes et de Recherche Vétérinaire et agrochimique

(CERVA) en Belgique selon la Norme ISO 17025. Les seuils de positivité utilisés étaient ceux recommandés par les fabricants. Les pourcentages (%) de densité optique (D.O.) sont obtenus selon la formule normalisée suivante : $\% D.O. = (D.O.Echantillon - D.O.Témoin Négatif) / (D.O.Témoin positif - D.O.Témoin Négatif)$. Le seuil est de 0,166- 0,210-.

L'échantillon positif a une valeur moyenne minimale (D.O 450 du lecteur ELISA) de 2,416.

Les tests habituels ont des sensibilités peu satisfaisantes (plus de faux négatifs) mais des spécificités plus ou moins satisfaisantes (94 % pour l'EAT) par rapport à celles de l'ELISA (98%). La brucellose est une maladie contagieuse, chronique qui passe inaperçue et grave (économiquement et hygiéniquement) pour laquelle il est important d'utiliser à l'échelle du

troupeau (lait de mélange) un test plus sensible afin d'éviter le plus possible des faux négatifs, même s'il y a des faux positifs. Dans le contexte d'éradication

Nous remarquons que parmi 14 animaux testés, un seul s'est révélé positif, c'est-à-dire qu'il présente un fort taux d'anticorps.

Pour la prévalence individuelle apparente, elle est donc de $1/14 = 7.14\%$.

Ce test a permis de montrer que la brucellose bovine est bien présente au niveau de nos troupeaux.

Le diagnostic indirect de la brucellose dépendant de la détection des anticorps des brucelles demeure un problème. En effet, actuellement, il y a un pourcentage élevé de résultats faux positifs et faux négatifs. Les résultats faux négatifs sont probablement dus à la présence de faibles quantités d'anticorps qui ne peuvent être détectés par des tests sérologiques traditionnels. D'autre part, les résultats faux positifs peuvent être dus à la réactivité antigénique croisée des espèces de brucelles et d'autres espèces bactériennes comme *Pasteurella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Bordetella bronchiseptica*, *Vibrio cholerae* et *Yersinia enterocolitica* [Straut et Corbel, 1982 ; Corbel, 1985b].

Les résultats obtenus par le rose Bengale (photo III-5) sont de 6.66 %, 8.20 % et 5.78 % respectivement chez les caprins, les bovins et les ovins avec une prévalence totale de 6.80 % au niveau de la population animale étudiée (tableau III-6).

Tableau III-6 : Résultats des différents tests selon l'espèce animale :

Espèce	Total	Tests							
		Rose Bengale		SAT		Mélitine		LACTELISA	
		Positif	%	Positif	%	positif	%	Positif	%
Caprine	75	5	6.66	5	6.66	2	2.66	--	--
Bovine	97	8	8.20	7	7.21	5	5.15	6	6.18
Ovine	121	7	5.78	5	4.13	4	3.30	--	--
TOTAL	293	20	6.80	17	5.80	11	3.75	--	--

La séropositivité à la brucellose est donc plus élevée chez les bovins, suivis par les caprins et les ovins enfin sont les moins touchés, sachant que le rose Bengale est un test dont la sensibilité est plus élevée par rapport à la spécificité, et qui permet de classer les animaux en positifs et négatifs (test qualitatif).

Les limites de ce test peuvent se résumer en :

- Réactions croisées avec les anticorps des autres espèces bactériennes ;
- Variations dans les résultats selon l'antigène utilisé (espèce brucellienne utilisée et sa concentration).

Cependant ce test est utile dans les campagnes de dépistage et il peut être transformé en test quantitatif (cf. : partie efficacité comparée de plusieurs antigènes d'agglutination rapide sur lame).

L'utilisation du rose Bengale est facile et le test est considéré comme un test de dépistage valable [Farina, 1985] mais moins efficace que le RFC pour détecter la brucellose surtout chez les individus ovin et caprins [FAO/WHO, 1986].

De plus, son efficacité est influencée par la concentration cellulaire et la procédure de standardisation de l'antigène [Hosie et al, 1985; Blasco et al, 1994b].

Les prévalences obtenues par le SAT (photo III-7) sont de 6.66 % ; 7.21 % et 4.13 % respectivement pour les caprins bovins et ovins avec une prévalence générale de 5.80 %.

Le test SAT est devenu la méthode standard recommandée pour la collection d'informations quantitatives sur les réponses immunitaires et est le test sérologique le plus fréquemment utilisé : une réponse au SAT est détectée au moment du stade précoce de la maladie, quand les immunoglobulines M sont apparues ; malheureusement, les individus ayant des anticorps élaborés par des bactéries ayant des réactions croisées, peuvent exhiber un schéma similaire de réactivité sérologique [WHO, 1993]. Le test SAT est relativement aisé à accomplir et adéquatement utilisé, il peut détecter l'infection aigue. Cependant, il peut manquer à agglutiner avec les anticorps Brucella présents dans les sérums des ovins et des caprins et peut donner des réactions avec des phénomènes de zones marqués [Le Pennec, 1967].

Le test bruceallergène révèle 2.66 %, 5.15 % et 3.30 % de résultats positifs, respectivement chez les caprins, les bovins et les ovins. La prévalence de la brucellose par ce test est plus élevée chez les bovins suivis par les caprins et ensuite les ovins comme c'est le cas avec d'autres tests. La prévalence totale au niveau de cette population des 3 principales espèces de ruminants a été de 3.75 %.

Les résultats révèlent une certaine spécificité du bruceallergène par rapport au rose Bengale. Cette spécificité a été rapportée de 99 à 83 % et la sensibilité, déterminée sur des génisses expérimentalement infectées entre 93 % et 78 %, mesurée respectivement entre un et six mois après infection [Saegerman et al, 1999].

Cependant, nous avons remarqué deux avortements chez les brebis, le lendemain de l'intradermoréaction à la mélitine ; ils pourraient résulter de la qualité de l'allergène utilisé, ou au stress subis par l'animal au moment de l'injection. Cependant, ce test même s'il paraît plus spécifique que d'autres, tels que le rose Bengale et le SAT, a comme inconvénient son interférence avec les résultats d'autres tests sérologiques; en effet, un animal testé par la mélitine produit pendant longtemps des anticorps susceptibles d'entraîner à des réactions

croisées avec d'autres tests tels que le rose Bengale (impossibilité de discerner entre anticorps infectieux et ceux dus aux tests allergiques, lors de la sérologie).

En Algérie, les tests de laboratoire utilisés pour le diagnostic de la brucellose demeurent le rose Bengale, le test RFC et la SAT qui ne peuvent différencier entre anticorps anti-brucella et anticorps développés suite à l'administration de la mélitine; il est préconisé d'éviter ce dernier, même s'il est d'application et de lecture faciles.

Une préparation d'allergène à partir de souches lisses de *Brucella* a été décrite, n'ayant pas cet inconvénient [Fensterbank, 1977 ; Cunningham et al, 1980].

Sachant que le test allergique dermique peut servir comme un test important et accessoire dans la surveillance de la brucellose des animaux, il est nécessaire d'introduire dans les programmes de surveillance de la brucellose d'autres tests de laboratoire tels que l'ELISA dont les résultats ne sont pas faussés par la mélitine.

Cependant, certains animaux infectés ne sont pas assez sensibles à la réaction par ce test en cas d'avortement, retard de gestation, malnutrition et les autres facteurs de stress [WHO, 1993]. La possibilité de l'anergie cutanée surtout chez les bovins ne doit pas être oubliée lors de l'utilisation du bruceallergène dans le diagnostic de la brucellose , pouvant interférer avec le test [Chukwi, 1985].

Le test à la brucelline peut être utilisé en complément dans les troupeaux non vaccinés comme c'est le cas actuellement en Algérie, à condition qu'un antigène purifié, standardisé et sans lipopolysaccharides (LPS) soit utilisé [Garin-Bastuji et al, 1998]. Ce test ne doit être utilisé chez les animaux vaccinés qu'après 2 ans [Fensterbank et Pardon, 1977].

Le test LACTELISA, appliqué sur le lait écrémé, est positif chez 6.18 % des vaches laitières testées. La haute prévalence obtenue par ce test (6.18 %), le désigne comme plus sensible par rapport aux 03 autres. En effet, ce test permet de détecter de très faibles quantités d'anticorps [Zaghawa et al, 1993]. Certains auteurs préconisent le test ELISA comme test de confirmation pour la détection des anticorps anti-brucella dans le lait avec le ring test pour le dépistage [Morgan et al, 1978; Alton, 1977].

La présence de *Brucella melitensis biovar 3* dans le lait a été rapporté en Egypte [Ammar, 1995 ; Ammar, 2000 ; Montasser et al, 2001], alors que l'espèce *B. melitensis* dans le lait de vache a été reportée au Moyen-Orient [Davidson et al, 1990].

La faible positivité de la culture microbienne est due à plusieurs facteurs :

- Les brucelles ne sont décelables que durant certaines périodes de la maladie ;
- En présence d'une infection quelconque, que ce soit chez les humains ou encore chez les animaux, il est de notoriété en pratique médicale, d'administrer des antibiotiques à large

spectre, ce qui influe négativement les analyses microbiologiques et peut aussi entraîner l'apparition de souches bactériennes résistantes.

Cependant, toutes les recherches microbiologiques au niveau des autres tissus ont été négatives, ce qui est dû au fait que dans les cas chroniques, les analyses microbiologiques sont toujours négatives [Richard et Kordjian, 1992] ou alors que ces animaux ont déjà reçu un traitement antimicrobien.

Dans l'éventualité de ce dernier cas, une telle situation est très sérieuse et préoccupante en l'absence de tout contrôle dans le commerce et l'administration des produits vétérinaires; nous avons relevé un taux de 79 % d'éleveurs questionnés (200/253) ayant reconnu avoir l'habitude de "traiter" eux-mêmes leurs animaux (cf. partie enquête). En effet, l'achat d'antibiotiques et autres médicaments vétérinaires est aisé pour toute personne, et de plus, ces dernières années les produits vétérinaires se trouvent exposés même au niveau des marchés de bestiaux. La plupart des vétérinaires vendent les antibiotiques, même injectables à toute personne désirant traiter son cheptel. Parmi les médicaments antibiotiques les plus vendus figure l'oxytétracycline.

Cette anarchie dans la procédure de traitement des animaux malades est due à un manque flagrant en contrôle sur les modalités d'application de la loi concernant l'exercice de la médecine vétérinaire. Les conséquences de telles pratiques peuvent être désastreuses et parmi lesquelles, pour ne citer que celles-ci, l'apparition de souches microbiennes résistantes ou multirésistantes pouvant se transmettre par les produits animaux, aux consommateurs entraînant une difficulté de traitement. Le second risque est que l'administration des xénobiotiques, parfois à fortes doses et sans respect des délais d'abattage, peut entraîner des toxicités humaines à cause des résidus.

La trouvaille de *Brucella melitensis* dans lait de vache représente une importance épidémiologique et zoonotique, puisque cette espèce est plus virulente et plus pathogène que les autres espèces chez l'homme et les animaux [Elberg, 1986 ; Laying et al, 1989] ; elle est rapportée comme prédominante parmi les animaux et les personnes affectés dans les pays de la région méditerranéenne [Alton, 1990].

Puisque la consommation du lait et des sous-produits laitiers non pasteurisés est habituelle dans la région, ceci signifie que la présence *Brucella melitensis* dans l'espèce bovine vient d'émerger comme un problème important en Algérie. Le réservoir primaire habituel étant les petits ruminants ; cette souche est donc passée vers les bovins à cause du contact étroit entre les 03 espèces de ruminants, et par le lait, elle s'est transmise à l'homme. Puisque la fabrication de fromage traditionnel est très faible en Algérie, on peut avancer l'hypothèse que le fromage n'est pas considéré actuellement comme un facteur de risque de la brucellose humaine.

L'isolement de *Brucella melitensis* des vaches, hôte non préférentiel, avait déjà été réalisé à Malte [Shaw, 1996] et en Egypte [El-Sheery, 1993 ; Hamdy, 1992 ; Hosein et El-Kholy, 1993] avec des taux variables de 0,9 % à 1,6 %.

Ainsi, le concept selon lequel *Brucella melitensis* infecte seulement les ovins et les caprins est un paradoxe hypothétique ; quand *B. melitensis* est endémique chez les ovins et les caprins, la maladie peut se transmettre aux bovins conduisant à l'infection humaine [Verger, 1985].

L'espèce *Brucella melitensis* affecte surtout les ovins et caprins, mais quand elle est enzootique dans certaines régions, elle devient la cause majeure de l'avortement chez ces animaux et chez les vaches [Zowghi et Ebadi, 1985; Zowghi et Ebadi, 1988].

Ceci montre que cette région peut être considérée comme enzootique pour la brucellose et des moyens de lutte peuvent la cibler spécifiquement, en parallèle avec d'autres études visant à déterminer l'explication de cette haute prévalence dans la zone.

La vaccination des bovins pourrait réduire la prévalence à un niveau acceptable comme il a été rapporté en Syrie [Darwesh et Benkirane, 2001].

La vaccination des petits ruminants est programmée prochainement par les autorités compétentes, et le projet débutera au niveau de quatre wilayas parmi lesquelles figure la wilaya de Tiaret.

Conclusion

La contrainte de l'ELISA est que ce test est plus onéreux, il demande une chaîne de lecture ELISA au laboratoire et de l'expérience. De surcroît, l'un des principaux problèmes posés par le kit I-ELISA étudié dans les conditions d'interprétation prévues par le fabricant, est l'existence d'un intervalle de résultats douteux (entre 10% D.O. et 50% D.O.).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ✓ Abela B (1999): Épidémiologie et prophylaxie de la brucellose chez les ruminants à Malte entre 1986 et 1996. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 18 (3); 648-659.
- ✓ Aboudaya MA (1986): An evaluation of diagnostic methods for bovine brucellosis in Libya. *Int. J. Zoonoses.* 13; 282-286.
- ✓ Abou-shehata MN and Robinson M (1999): Risk factors for human brucellosis in Jordan. 1st int. conf. on sheep and goat. Univ. Sc. Tec, fac vet med, Irbid, Jordan.
- ✓ Acha PN and Szyfres B (1989): Zoonosis and transmissible diseases common to humans and animals. Pan American Health Organisation, WHO. 2nd edition; 19-35.
- ✓ Ackermann MR; Cheville NF and Deyoe BL (1988): Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: Endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet Pathol.* 25(1); 28-35.
- ✓ Aggad H (2002): Epidemiological situation of some zoonoses in Algeria. Proc. 10th Sci. cong. Fac. Vet. Med. Assiut univ. Egypt; 110-116.
- ✓ Aggad H (2003a): Malta fever seroprevalence at Tiaret (Western Algeria). *Assiut Vet. Med. J.*; 130-139.
- ✓ Aggad H (2003b): Serological studies of animal brucellosis in Algeria (2003), *Assiut Vet. Med. J. Egypt*; 121-130.
- ✓ Ahmed TM; Bassiony MM and Brahim IGA (2002): Field evaluation of complement fixation test and enzyme linked immunosorbent assay for detection of brucellosis in bulls. *J.Egypt vet. Med. ass.* 62(1); 119-125.
- ✓ Al-Dubooni HM; Al-Shirkat SR and Nagi NA (1986): Brucellosis in children in Iraq. *Annals of tropical paediatrics.* 6; 271-274.
- ✓ Al-Eissa YA (1990): Probable breast-milk borne brucellosis in a young infant. *Ann. Trop. Paediatr.* 10;305-307.
- ✓ Al-Eissa YA; Kambal AM; Al-Nasser MN; Al-Habib SA; Al-Fawaz I and Al-Zamil FA (1990a): Childhood brucellosis: a study of 102 cases. *Paed. Infect. Dis. J.* 9; 74-79.
- ✓ Al-Eissa YA and Al-Mofada SM (1992): Congenital brucellosis. *Pediatr Infect Dis J*,11; 667-671.
- ✓ Al-Eissa YA, Kambal AM, Al-Rabeeah AA, Abdullah AM, Al-Jurayyan NA and Al-Jishi NM (1990b): Osteoarticular brucellosis in children. *Ann Rheum Dis.* 49; 896-900.
- ✓ Al-Khalaf SAS, Mohamad BT, Nicoletti P (1992): Control of brucellosis in Kuwait by vaccination of cattle, sheep and goats with *Brucella abortus* strain 19 or *Brucella melitensis* strain Rev. 1. *Tropical Animal Health and Production*, 24(1): 45-49.

- ✓ Allan GS; Chappel RJ; Williamson P and Naught Mc (1976): A quantitative comparison of sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *J. Hyg.* 76; 287-295.
- ✓ Alorman F and Cheville NF (2000): Development, Testing and Commercialization of a New Brucellosis Vaccine for Cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 916; 147-153.
- ✓ Al-Shamahy HA (1999): Seropositivity for brucellosis in a sample of animals in the Republic of Yemen, *EMHJ*, 5(5); 1035-1041.
- ✓ Al-thoweiny AN (1999): The relationship between *Brucella* isolation and diagnosis from human and animal products. 1st int conf on sheep and Goat. Univ Sc. Tec, Fac Vet Med, Irbid, Jordan; 125.
- ✓ Alton GG (1977): Development and evaluation of serological test. Bovine brucellosis, an international symposium. Texas A& M University Press, College Station; 61-97.
- ✓ Alton GG (1985): Rev.1 and H38 *Brucella melitensis* vaccines. *Brucella melitensis*, CEC seminar, Brussels; 215-227.
- ✓ Alton GG (1990): *Brucella melitensis*, 1887-1987. (Nielson, K., Duncan, J. R. (Eds). CRC Press, Boston; 383-409.
- ✓ Alton GG and Jones LM (1967): Bacteriological methods. Laboratory techniques in brucellosis, World Health Organization, Geneva; 17.
- ✓ Alton GG; Jones LM; Angus RD and Verger JM (1988): Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris; 21-145.
- ✓ Alton GG; Jones LM; Pietz OF (1975): Laboratory techniques in brucellosis. 2nd. ed. Geneva: World Health Organisation; 64-85.
- ✓ Amato Gauci AJ (1995): The return of brucellosis. *Maltese Medical Journal.*7; 7-8.
- ✓ Ammar KM (1995): Further studies on brucellosis in farm animals. Ph D thesis (infectious diseases). Faculty of Vet. Med. Zagazig University.
- ✓ Ammar KM (2000): Some epidemiological aspects of bovine, ovine and caprine brucellosis in Egypt. *SCVMJ*, 3(1), 145-155.
- ✓ Anderson TD and Cheville NF (1986): Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis: Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. *Am J Pathol.*124(2); 226-237.
- ✓ Anderson TD, Cheville NF and Meador VP (1986): Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*, II: Ultrastructural studies. *Vet Pathol.*23(3); 227-239.
- ✓ Angus RD and Barton CE (1983): The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis, 3rd Int. Symp.on Brucellosis, Algiers, Algeria, *Dev. Biol. Stand.* 56; 349-356.

- ✓ Anon R (1984): Instructions for conducting brucellosis serological tests. National veterinary services. Ames, Iowa, USA.
- ✓ Awad R (1998): Human brucellosis in the Gaza Strip, Palestine, East. Med. Jour, WHO V 4 (2); 225-233.
- ✓ Bachanan TM; Faber LC (1980): 2-mercapto-ethanol brucella agglutination test: usefulness for predicting recovery from brucellosis. Journal of clinical microbiology. 11(6); 691-696.
- ✓ Badrane MA (1997): Contribution for the study of the brucellosis. Int Bio Tlemcen, Algeria; 7.
- ✓ Bang B (1897): The etiology of epizootic abortion. J. Cong. Pathol. Ther. 10; 125.
- ✓ Bartelt MA (2000): Diagnostic bacteriology. F.A. Davis Company, Philadelphia, USA; 121-128.
- ✓ Bazin H (1990): Mesure de l'immunité humorale. Immunologie animale. Ed. Med. Sci. Flammarion ; 49-53.
- ✓ BEH, Bulletin épidémiologique hebdomadaire (1996) : La brucellose en France de 1990 à 1994, N° 34.
- ✓ BEH, Bulletin épidémiologique hebdomadaire (2000): Bulletin épidémiologique annuel de l'Institut de Veille Sanitaire France, 02.
- ✓ Benhabyles N, Benkirane A, Boudilmi A, Benchouk S et Bouayoune H (1992).
- ✓ Berthet B; Moutardier V; Stein A; Raoult D; Le Treut YP et Assadourian R (1994): Formes tumorales hépatiques des affections bactériennes : considérations diagnostiques et thérapeutiques à propos de 3 cas. J. Chir. Paris. 131; 291-295.
- ✓ Bikas C; Jelastopulu E; Leotsinidis M and Kondakis X (2003): Epidemiology of human brucellosis in a rural area of northwestern Peloponnese in Greece. Eur. J. Epidemiol.18(3); 267-74.
- ✓ Guemour D (2000): Epidémiologie de la brucellose et son impact sur la population de la wilaya de Tiaret. These Mag Université de Tiaret.
- ✓ Handa R; Singh S; Singh N and Wali JP (1998): Brucellosis in North India: results of a prospective study. J. Commun. Dis. 30(2); 85-87.
- ✓ Harmon BG, Adams LG, Frey M (1988): Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. Am J Vet Res. 49(7);1092-1097.
- ✓ Harrington JM and Shannon HS (1976): Incidence of tuberculosis, hepatitis, brucellosis and shigellosis in British medical laboratory workers. Br. Med. J. 1; 759-762.
- ✓ Hartigan P (1997): Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. Irish Veterinary Journal; 508-512.
- ✓ Hirsh DC and Zee YCh (1999): Veterinary Microbiology. Blackwell Sci. Inc, Massachusets.USA; 123-128.

- ✓ Hosie BD; Al-Bakri OM and Futter RJ (1985): Survey of brucellosis in goats and sheep in the Yemen Arab Republic: comparison of tests for *Brucella melitensis* infection in sheep. *Tropical Animal Health and Production*. 17(2): 93-99.
- ✓ Huber JD (1989): Principles of immunology and serology. Brucellosis seminar, Cairo, Egypt; 25-27.