

Dédicace

A mes très chers Parents...

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle pour toute l'affection que vous n'avez jamais cessé de me prodiguer. Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé et bonheur Inchallah.

A ma femme Feriel...

Ton soutien moral, ta compréhension, ton profond attachement m'ont permis de réussir ce travail. Que dieu te protège et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance.

A ma fille Maria...

Qui m'a donné la joie, je lui souhaite une longue vie pleine de succès et de réussite près de tous ceux qui lui sont chères.

A mes beaux-parents, merci pour votre aide, vos encouragements et vos conseils précieux. Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé et bonheur Inchallah.

A mes frères Mohamed et Abdelkader. A mes sœurs Fatma et Hanane, et leurs petites familles.

A tous ceux que j'ai oublié de citer, qui ont participé de loin ou de près à la concrétisation de ce modeste travail.

Mammar Khames

Remerciements

Au terme de ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements au Professeur Oumouna Mustapha ; Professeur en immunologie et doyen de la faculté des sciences, Université de Médéa, qui en dépit de ses responsabilités a bien voulu m'encadrer, me conseiller et m'encourager, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier infiniment Professeur Ignacio Moriyon, Professeur à l'Université de Navarre, Espagne, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, et de m'avoir appris beaucoup de choses sur le plan scientifique ainsi que humain. Merci beaucoup à Amaia Zúñiga-Ripa, Raquel Conde-Álvarez et Alberto Delgado-Lopez, pour leur aide et leur gentillesse, merci aussi à toute l'équipe du laboratoire.

J'adresse mes vifs remerciements au Professeur Khelef Djamel, de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, pour ses conseils, son soutien et son professionnalisme.

Mes remerciements vont au Professeur Ait-Oudhia Khatima de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Azzag Nawel, de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Menoueri Nabil, de l'Institut Vétérinaire de Blida, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Grand merci au département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Médéa d'avoir financé mes séjours à l'étranger durant la réalisation de la partie expérimentale. Très grand merci à l'Université de Navarre (Espagne), pour m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui je n'ai pas pu citer, et qui m'ont aidé directement ou indirectement pour réaliser ce travail.

Résumé

La brucellose est une zoonose causée par des bactéries du genre *Brucella* qui provoque des pertes économiques importantes et des souffrances humaines dans le monde entier. Le contrôle de la brucellose nécessite une compréhension des espèces de *Brucella* circulant chez le bétail et chez l'homme et, bien que répandu dans les pays africains du bassin méditerranéen, les données pour cette zone sont principalement limitées aux isolats obtenus des humains et des petits ruminants. Le but de ce travail est d'évaluer la présence de la brucellose bovine, ovine et humaine, par la réalisation des enquêtes sérologiques ; et l'isolement et la caractérisation phénotypique et génotypique des souches de *Brucella* chez les bovins.

Un total de 402 et 203 de sérums de bovins et ovins ont été prélevés au niveau des abattoirs d'El-Harrach et Rouiba et examinés par le test du rose Bengale, le test de fixation du complément, l'immunoprécipitation avec l'haptène native et l'ELISA indirect ; 42 sérums des professionnels sont récoltés de l'abattoir de Rouiba, ils ont été analysés par le test au rose Bengal (RBT), le test de séro-agglutination (SAT), le test de Coombs et le test de Brucellacapt. Une étude épidémiologique des cas de brucellose humaine reportés par la DSP de Médéa durant 10 années (2004-2014), est réalisée. Une étude sérologique, bactériologique et moléculaire est effectuée sur 520 bovins dans la région de Médéa (295 à partir des fermes, et 225 à partir des abattoirs).

Au niveau de l'abattoir de Rouiba, vingt-quatre sérums bovins étaient positifs avec le test au rose Bengal, parmi lesquels, 23 étaient positifs avec la fixation du complément et l'immunoprécipitation et 16 avec le test ELISA indirect (ajusté à 100% de spécificité). Seulement 2 sérums ovins étaient positifs avec le test au rose Bengale.

Aucun professionnel de l'abattoir de Rouiba n'a été trouvé séropositif vis-à-vis de la brucellose. Un total de 884 cas de brucellose humaine a été enregistré durant 10 ans (2004-2014) à Médéa.

Nous rapportons la caractérisation de vingt-quatre souches de *Brucella* isolées de bovins dans la région de Médéa. La PCR multiplexe (bruceladder) et le typage conventionnel ont montré que les bovins algériens sont principalement infectés par *B. abortus* biovar 3, et dans une moindre mesure par *B. abortus* biovar 1 et *B. melitensis* biovar 3. La PCR AMOS-ERY a montré que toutes les souches algériennes de *B. abortus* biovar 3 appartenaient au sous-groupe 3b. Bien que, l'analyse par la technique MLVA a montré que la plupart des isolats étaient plus proches des homologues européens, cinq souches présentaient des caractéristiques

distinctes des isolats européens et ceux des pays subsahariens, y compris trois répétitions du marqueur Bruce55.

Ce travail montre que la brucellose constitue un vrai problème pour le cheptel bovin, qui est fortement infecté. La brucellose humaine est endémique dans la région d'étude. Ces données fournissent une base d'études épidémiologiques et moléculaires supplémentaires en Afrique du Nord et indiquent que d'autres études bactériologiques et moléculaires sont nécessaires pour une compréhension complète de l'épidémiologie de la brucellose bovine dans les pays au nord et au sud du Sahara.

Mots-clés: Brucellose, bovins, ovins, brucellose humaine, *Brucella*, Algérie, MLVA, PCR AMOS-ERY, bruceladder, sérologie, bactériologie.

Abstract

Brucellosis is a zoonosis caused by bacteria of the genus *Brucella* that causes significant economic losses and human suffering worldwide. Control of brucellosis requires an understanding of circulating *Brucella* species in livestock and humans and, although widespread in African countries of the Mediterranean Basin, data for this area are mainly limited to isolates obtained from humans and small ruminants. The purpose of this work is to evaluate the presence of bovine, ovine and human brucellosis by conducting serological surveys; isolation and phenotypic and genotypic characterization of *Brucella* strains in cattle.

A total of 402 and 203 sera of cattle and sheep were collected from El-Harrach and Rouiba slaughterhouses and examined by the Rose Bengal test, the complement fixation test, the immunoprecipitation with the native hapten, and the indirect ELISA; 42 professional sera were collected from Rouiba slaughterhouse, they were analyzed by the Bengal Rose (RBT), the sero-agglutination test (SAT), the Coombs test and the Brucellacapt test.

An epidemiological study concerning the human brucellosis cases reported by Medea's DSP for 10 years (2004-2014) is carried out. A serological, bacteriological and molecular study is carried out on 520 cattle in Medea (295 cattle from farms, and 225 cattle from slaughterhouses). At Rouiba slaughterhouse, 24 bovine sera were found positive with the rose Bengal test, 23 were positive with complement fixation and immunoprecipitation, and 16 with the indirect ELISA test (adjusted to 100% specificity). Only 2 sheep sera were positive with the Rose Bengal test. Professionals of Rouiba slaughterhouse were found seronegative. A total of 884 of human brucellosis cases were recorded during 10 years (2004-2014) in Medea.

We report the characterization of twenty-four strains of *Brucella* isolated from cattle in Medea. Multiplex PCR (bruceladder) and conventional typing have shown that Algerian cattle are mainly infected with *B. abortus* biovar 3, and to a lesser extent with *B. abortus* biovar 1 and *B. melitensis* biovar 3. Extended AMOS-ERY PCR showed that all Algerian strains of *B. abortus* biovar 3 belonged to subgroup 3b. Although MLVA analysis showed that most isolates were closer to European counterparts, five strains exhibited distinct characteristics of European and Saharan isolates, including three replicates of the Bruce marker55.

This work shows that brucellosis is a real problem for cattle in Algeria, which is strongly infected. Human brucellosis is endemic in the study area. These data provide a basis for additional epidemiological and molecular studies in North Africa and indicate that further bacteriological and molecular studies are needed for a full understanding of the epidemiology of bovine brucellosis in countries north and south of the Sahara.

Keywords: Brucellosis, cattle, sheep, human brucellosis, *Brucella*, Algeria, MLVA, AMOS-ERY PCR, bruceladder, serology, bacteriology.

ملخص

الداء البروسيلا هو مرض حيواني المنشأ الذي تسببه بكتيريا جنس البروسيلا الذي يسبب خسائر اقتصادية كبيرة ومعاناة إنسانية في جميع أنحاء العالم. وتتطلب مكافحة داء البروسيلات فهم أنواع البروسيلا المتداولة في الماشية والبشر، وعلى الرغم من انتشارها في البلدان الأفريقية في حوض البحر الأبيض المتوسط، فإن البيانات الخاصة بهذه المنطقة تقتصر أساساً على العزلات التي يتم الحصول عليها من البشر والحيوانات المجترة الصغيرة. والغرض من هذا العمل هو تقييم وجود البروسيلا البقر والأغنام والبروسيلا البشرية عن طريق إجراء المسوحات المصلية. والعزلة والوصف المظهري والتوصيف الوراثي لسلاسل البروسيلا في الماشية.

تم جمع ما مجموعه 402 و 203 ميرا من الماشية والأغنام من مسالخ الحراش وروبويا وفحصها اختبار روز البنغال، واختبار التثبيت التكميلي و إيسا غير المباشرة. 42. مصل المهنية جمعت من مسلخ روية، تم تحليلها من قبل روز البنغال (RBT)، واختبار تراس المصلية (SAT)، واختبار كومبس واختبار البروسيلا النقيب. وقد أجريت دراسة وبائية تتعلق بحالات الحمى المالطية البشرية التي أبلغ عنها في مدينة لمدة 10 سنوات (2004-2014). أجريت دراسة مصلية وبكتريولوجية وجزيئية على 520 رأس من الماشية في مدينة (295 رأس من الماشية من المزارع و 225 رأس من الماشية من مذابح. في مذبح الروبية، وجد أن 24 بقرة كانت إيجابية مع اختبار البنغال، و 23 كانت إيجابية مع تثبيت مكمل و الترسيب المناعي، و 16 مع اختبار إيسا غير مباشر (معدلة لنسبة 100%). وكان مصالان الأغنام 2 فقط إيجابية مع اختبار روز البنغال. تم العثور على عمال مجزرة الروبية سا ليين. وسجل ما مجموعه 884 حالة من داء البروسيلات البشرية خلال 10 سنوات (2004-2014) في المدينة

ونبلغ عن توصيف أربع وعشرين سلالة من البروسيلا المعزولة من الماشية في المدينة. الماشية الجزائرية مصابة بشكل رئيسي *B. abortus* biovar 3، وبدرجة أقل *B. abortus* biovar 1 و *B. melitensis* biovar 3. أظهرت AMOS-ERY PCR أن جميع السلالات الجزائرية من *B. abortus* biovar 3 تنتمي إلى المجموعة الفرعية 3 ب. وعلى الرغم من أن تحليل MLVA أظهر أن معظم العزلات كانت أقرب إلى نظرائها الأوروبيين، أظهرت خمس سلالات خصائص متميزة من العزلات الأوروبية والصحراء، بما في ذلك ثلاث تكرارات من علامة بروس 55. ويظهر هذا العمل أن داء البروسيلات هو مشكلة حقيقية بالنسبة للماشية في الجزائر، وهي مصابة بشدة. داء البروسيلات البشري متوطن في منطقة الدراسة. وتوفر هذه البيانات أساساً لدراسات وبائية وجزيئية إضافية في شمال أفريقيا، وتشير إلى أن هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات الجراثومية والجزيئية لفهم كامل لوبائيات داء البروسيلات البقرية في بلدان شمال وجنوب الصحراء.

كلمات البحث: الحمى المتموجة، الماشية، البروسيلا، brucellader، الجزائر، أفريقيا، MLVA، AMOS-ERY PCR، الأمصال.

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

AMOS PCR : *abortus, melitensis, ovis, suis*

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

DR : Doxycycline-rifampicine

DS : Doxycycline-streptomycine

DSP : direction de la santé publique

DSV : Direction des services vétérinaires

EAT : Epreuve à l'Antigène Tamponné

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

FAO : Food and agriculture organisation

FC : Fixation de complément

HSR : Hypersensibilité retardée

iELISA : indirect enzyme-linked immunosorbent assay

IFN γ : Interferon gamma

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IMC : Immunité à médiation cellulaire

INSP : Institut National de la Santé Publique

LPS (S,R) : Lipopolysaccharide (Smooth, Rough)

MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural

MLVA : multi locus variable analysis

NK : Naturel killer

OIE : Office international des epizooties

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Polymerase chain reaction

RBT : Rose bengale test

Riv : Rivanol

SAT : Séroagglutination test

SAW : Séroagglutination de Wright

Liste des tableaux	Page
Tableau 1. Caractéristiques différentielles des espèces du genre <i>Brucella</i> (Alton et al., 1988).....	12
Tableau 2. Caractéristiques différentielles des biovars de <i>Brucella</i> (Alton et al., 1988).....	13
Tableau 3. Effecteurs de la réponse humorale contre la brucellose	27
Tableau 4. Prévalence, intervalle de confiance 95% et les valeurs p du test khi deux: sexe, âge, race, identification et gestation.....	55
Tableau 5. Résultats des sérums des bovins analysés par différents tests en fonction des caractéristiques des bovins prélevés.....	57
Tableau 6. Lieu des différents marchés à bestiaux hebdomadaires.....	58
Tableau 7. Résultats d'analyse sérologique des sérums des ovins au niveau des abattoirs Rouiba and El-Harrach.....	67
Tableau 8. Résultats d'analyse sérologique des sérums des ovins en fonction de l'âge et du sexe.....	67
Tableau 9. Répartition des professionnels collaborés à l'enquête en fonction de la profession exercée.....	75
Tableau 10: Répartition des professionnels collaborés à l'enquête en fonction du sexe.....	75
Tableau 11: Données socio-épidémiologiques de 39 ouvriers de l'abattoir de Rouiba dépistés contre la brucellose.....	77
Tableau 12: Données socio-épidémiologiques des 4 inspecteurs vétérinaires de l'abattoir de Rouiba dépistés contre la brucellose.....	79
Tableau 13. Evolution de l'incidence de la brucellose humaine à Médéa de 2004 à 2014.....	84
Tableau 14. Cas de brucellose humaine selon le sexe de 2004 à 2014.....	86
Tableau 15 : Oligonucléotides utilisés dans le test de PCR multiplex PCR Bruce-ladder.....	96
Tableau 16 : Les résultats positifs d'analyse sérologique par le RBT et le DDG-NH immunoprécipitation.....	100

Tableau 17 : Nombre de bovins positifs et négatifs, et les pourcentages correspondants en fonction des troupeaux.....	100
Tableau 18 : Nombre de bovins positifs et négatifs, et les pourcentages correspondants en fonction des classes d'âges.....	101
Tableau 19 : Répartition du nombre de bovins et les pourcentages associés en fonction du sexe.....	101
Tableau 20 : Répartition du nombre de bovins et les pourcentages associés en fonction du type de bovins.....	102
Tableau 21 : Répartition du nombre de bovins et les pourcentages associés en fonction d'antécédents d'avortements.....	102
Tableau 22 : Numéro et nombre de foyers pour chaque commune.....	103
Tableau 23 : Les résultats positifs d'analyse sérologique par le RBT et le DDG-NH immunoprécipitation.....	104
Tableau 24 : Nombre de bovins positifs et négatifs, et les pourcentages correspondants en fonction des abattoirs.....	105
Tableau 25 : Prévalence de la brucellose en fonction des caractéristiques des bovins prélevés.....	105
Tableau 26 : Résumé des résultats bactériologiques.....	107

Liste des figures	Page
Figure 1. Evolution de la brucellose chez l'animal (Garin-Bastuji, 1993).....	25
Figure 2. Représentation simplifiée de la réponse immunitaire contre <i>Brucella</i> (Skendros and Boura, 2013).....	29
Figure 3. Agglutination du sérum avec le rose Bengal test (photo originale).....	52
Figure 4. Prévalence apparente de la brucellose par RBT en fonction des caractéristiques des bovins prélevés.....	56
Figure 5. Test d'immunoprécipitation avec S-LPS et NH montrant cinq résultats négatifs et un résultat positif. (Photo originale).....	58
Figure 6. Lieux des différents marchés à bestiaux hebdomadaires.....	59
Figure 7. Mouton vacciné contre la brucellose (présence de boucle sanitaire à l'oreille) (photo originale).....	64
Figure 8. Prélèvement sanguin au niveau de la veine jugulaire chez les ovins (photo originale).....	65
Figure 9. Evolution du taux d'incidence de la brucellose humaine à Médéa de 2004 à 2014.....	85
Figure 10. Les cas de brucellose humaine selon différents groupes d'âge de 2004 à 2014.....	86
Figure 11. Cas de brucellose humaine enregistrés mensuellement de 2004 à 2014....	87
Figure 12. Abattoirs de Médéa et d'El Azizia (application google earth).....	91
Figure 13. Type d'élevages inclus dans notre étude.....	98
Figure 14. Présence des avortements dans les élevages.....	99
Figure 15. Fréquence des avortements.....	99
Figure 16. Connaissance de la brucellose.....	99
Figure 17. Distribution des foyers brucelliques dans la wilaya de Médéa.....	103
Figure 18a. Résultats de l'analyse des souches Algériennes par la PCR multiplex bruceladder.....	108
Figure 18b. Résultats de l'analyse des souches Algériennes par la PCR multiplex bruceladder.....	108

Figure 19. Résultats de l'analyse des souches Algériennes <i>B. abortus</i> par la PCR AMOS-ERY.....	109
Figure 20. MST des génotypes MLVA11 de 89 isolats mondiaux <i>B. abortus</i> biovar 3, y compris Tulya.....	110
Figure 21. Répartition des génotypes MLVA-16 de 89 isolats mondiaux <i>B. abortus</i> biovar 3, y compris Tulya.....	111
Figure 22. Dendrogramme de génotypes MLVA-16 groupés de 104 isolats mondiaux de <i>B. abortus</i> bv 3 (distance catégorielle, algorithme UPGMA).....	112
Figure 23. Dendrogramme des génotypes MLVA-16 groupés de 49 isolats mondiaux de <i>B. abortus</i> bv 1 (Distance catégorique, algorithme UPGMA).....	113
Figure 24. Dendrogramme des génotypes MLVA-16 groupés de 195 isolats mondiaux de <i>B. melitensis</i> bv 3 (distance catégorique, algorithme UPGMA).....	114

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Partie bibliographique	
I. Etude de l'agent pathogène.....	3
I.1. Définition.....	3
I.2. Historique.....	3
I.3. Taxonomie.....	4
I.4. Morphologie et structure.....	5
I.5. Caractères antigéniques.....	5
I.5.1. Bactéries Smooth (S ou lisses).....	5
I.5.1.1. Antigènes de surface.....	5
I.5.1.1.1. Le complexe LPS-S et haptènes apparentés.....	5
I.5.1.1.2. Les protéines de la membrane externe (PME).....	6
I.5.1.1.3. Le peptidoglycane (PG).....	6
I.5.1.2. Les antigènes internes.....	6
I.5.1.3. Antigènes communs avec d'autres bactéries.....	6
I.5.2. Bactéries Rough (R ou rugueuses).....	7
I.5.3. Rôle des antigènes dans les épreuves de diagnostic.....	7
I.6. Caractères cultureux.....	7
I.6.1. Conditions physico-chimiques.....	7
I.6.2. Besoins nutritionnels.....	7
I.6.3. Culture.....	8
I.6.3.1. Les milieux de culture de base.....	8
I.6.3.2. Les milieux de culture sélectifs.....	8
I.6.3.3. Collecte et culture d'échantillons.....	10
I.6.4. Identification et typage phénotypique.....	11
I.6.5. Typage moléculaire.....	14
I.6.5.1. AMOS-PCR.....	14
I.6.5.2. Bruce-ladder.....	14
I.6.5.2. Multiple Locus VNTR Analysis (MLVA).....	16
I.6.6. Identification des souches vaccinales.....	16
I.7. Habitat de <i>Brucella</i>	16

I.7.1. Survie de <i>Brucella</i> dans l'environnement.....	17
I.7.2. Survie des <i>Brucella</i> dans les produits alimentaires.....	17
II. La brucellose animale.....	18
II.1. Définition.....	18
II.2. Les espèces affectées.....	18
II.3. Répartition géographique.....	19
II.4. Importance de la brucellose.....	19
II.4.1. Impact sur le plan économique.....	19
II.4.2. Importance hygiénique.....	20
II.5. Epidémiologie.....	20
II.5.1. Epidémiologie analytique.....	20
II.5.1.1. Les sources de contagion.....	21
II.5.1.2. Les matières virulentes.....	22
II.5.1.3. Mode de transmission.....	22
II.5.1.3.1. Transmission horizontale.....	22
II.5.1.3.2. Transmission verticale.....	22
II.5.1.4. Voie de pénétration.....	23
II.5.2. Epidémiologie synthétique.....	23
II.6. Pathogénie.....	23
II.6.1. Période primaire.....	24
II.6.2. Période secondaire.....	24
II.7. Mécanisme de l'avortement.....	25
II.8. Réaction de l'organisme à l'infection.....	26
II.8.1. Réponse humorale.....	26
II.8.2. Réaction cellulaire.....	27
II.9. Etude clinique.....	30
II.10. Diagnostic.....	31
II.10.1. Diagnostic clinique.....	31
II.10.2. Diagnostic expérimental.....	31
III.10.2.1. Diagnostic direct.....	31
II.10.2.2. Diagnostic indirect.....	32
II.10.2.2.1. Diagnostic sérologique.....	32
II.10.2.2.1.1. L'épreuve à l'antigène tamponné (EAT, Card-test, Rose-Bengale).....	32

II.10.2.2.1.2. Réaction de fixation du complément (FC) (Un test recommandé pour le commerce international).....	33
II.10.2.2.1.3. Séro-agglutination de Wright ou séroagglutination lente en tubes (SAW)..	33
II.10.2.2.1.4. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	33
II.10.2.2.1.5. Ring-test (RT) ou épreuve de l'anneau.....	34
II.10.2.2.1.6. Tests à base de protéines haptène et cytosol (Native hapten and cytosol protein-based tests).....	35
II.10.2.2.2. Diagnostic allergique (Test cutané de Brucellin).....	35
II.11. Traitement.....	36
II. Vaccination.....	36
II.1. Vaccin S19.....	36
II.2. Vaccin RB51.....	37
II.3. Vaccin Rev1.....	37
III. La brucellose humaine.....	39
III.1. Mode de contamination.....	39
III.1.1. Contamination cutanéomuqueuse.....	39
III.1.2. Contamination respiratoire et conjonctivale.....	40
III.1.3. Contamination alimentaire.....	40
III.1.4. Autres modes de contagion.....	40
II.2. Pathogénicité et biologie de la brucellose.....	40
III.3. Diagnostic.....	43
III.3.1. Diagnostic clinique.....	43
III.3.2 Diagnostic de laboratoire.....	44
III.3.2.1. Diagnostic sérologique.....	44
III.3.2.1.1. Test d'agglutination du sérum.....	44
III.3.2.1.2. Test au rose Bengal.....	45
III.3.2.1.3. Test de Coombs.....	45
III.3.2.1.4. Test de Brucellacapt.....	46
III.3.3. Culture.....	46
III.3.3.1. Techniques de culture conventionnelle.....	46
III.3.3.2. Techniques d'hémoculture semi-automatisée.....	47
III.3.3.3. Technique de culture du sang lysé et centrifugé.....	47
III. Traitement de la brucellose humaine.....	47

Partie expérimentale

Chapitre I : Etude la brucellose bovine au niveau de l'abattoir de Rouiba.....	49
I.1. Matériels et méthodes.....	49
I.1.1. Lieu et période d'étude.....	49
I.1.2. Matériels.....	50
I.1.3. Méthodes.....	51
I.1.3.1. Inspection <i>ante mortem</i>	51
I.1.3.2. Prélèvements sanguins.....	51
I.1.3.3. Diagnostic de la gestation.....	52
I.1.3.4. Analyse sérologique des prélèvements.....	52
Rose Bengal test.....	52
Fixation du complément.....	53
La réaction d'immunoprécipitation en double gel (DGD-NH).....	53
ELISA indirect (test développé au laboratoire).....	53
I.1.3.5. Collecte des données, analyse statistique et calcul des intervalles de confiance...	54
I.2. Résultats.....	54
I.3. Discussion.....	59
Chapitre II : Etude la brucellose ovine au niveau de deux abattoirs, Rouiba et El-Harrach.....	63
II.1. Matériels et méthodes.....	63
II.1.1. Lieu et période d'étude.....	63
II.1.2. Population étudiée et taille de l'échantillon.....	64
II.1.3. Méthodes.....	64
II.1.3.1. Prélèvements.....	64
II.1.3.2. Analyse sérologique des prélèvements.....	65
II.1.3.3. Analyses statistiques.....	66
II.2. Résultats et discussion.....	67
Chapitre III : enquête sérologique sur la brucellose chez les professionnels de l'abattoir de Rouiba, Alger.....	71
III.1. Matériels et méthodes.....	71
III.1.1. Echantillonnage.....	71
III.1.2. Matériels.....	71
III.1.3. Méthodes.....	72

III.1.3.1. Prélèvements sanguins.....	72
III.1.3.2. Analyse sérologique.....	72
III.1.3.2.1. Rose Bengal Test (RBT).....	72
III.1.3.2.2. Test de séro-agglutination (SAT).....	73
III.1.3.2.3. Test de Coombs.....	73
III.1.3.2.4. Test de Brucellacapt.....	73
III.1.3.2. Analyse statistique.....	74
III.2. Résultats.....	74
III.2.1. Répartition des professionnels collaborés à l'enquête en fonction de la profession exercée.....	74
III.2.2. Répartition des professionnels collaborés à l'enquête en fonction du Sexe.....	75
III.2.3. Description de l'échantillon des professionnels prélevé au sein de l'abattoir de Rouiba.....	76
III.2. Discussion.....	80
Chapitre IV : Situation épidémiologique de la brucellose humaine dans la région centre, exemple de la wilaya de Médéa.....	83
IV. 1. Matériel et méthodes.....	83
IV.1. 1. Site d'étude.....	83
IV.1. 2. Collecte de données.....	83
IV. 2. Résultats.....	83
IV. 2. 1. Evolution de la brucellose humaine à Médéa.....	83
IV. 2. 2. La brucellose humaine selon l'âge.....	85
IV. 2. 3. Brucellose humaine selon le sexe.....	86
IV. 2. 3. Brucellose humaine selon la saison.....	87
IV. 2. Discussion.....	87
Chapitre V : Etude la brucellose bovine dans la région de Médéa.....	90
V.1. Matériel et Méthodes.....	90
V.1.1. Région d'étude.....	90
V.1.2. Echantillonnage.....	91
V.1.3. Prélèvements.....	92
V.1.4. Analyse sérologique des sérums.....	92
V.1.4.1. Rose Bengal test.....	92

V.1.4.2. La réaction d'immunoprécipitation en double gel (DGD-NH).....	93
V.1.5. Collecte des données, analyse statistique et calcul des intervalles de confiance....	93
V.1.6. Culture bactériologique des prélèvements laitiers et ganglionnaires.....	93
V.1.7. Typage phénotypique.....	94
V.1.8. Typage moléculaire.....	94
V.1.8.1. PCR multiplex Bruceladder et PCR AMOS-ERY.....	95
V.1.8.2. Analyse de plusieurs locus VNTR (MLVA-16).....	97
V.2. Résultats.....	98
V.2.1. Résultats d'analyse des fiches d'élevage.....	98
V.2.2. Résultats sérologiques des bovins prélevés au niveau des fermes.....	100
V.2.3. Résultats sérologiques des bovins prélevés au niveau des abattoirs.....	104
V.2.4. Résultats d'analyse microbiologique.....	106
V.2.4.1. Typage phénotypique.....	106
V.2.2. Typage génotypique.....	107
V.3. Discussion.....	116
Conclusion.....	118

Introduction

Les bactéries du genre *Brucella* provoquent la brucellose, une zoonose hautement contagieuse affectant principalement le bétail domestique et une variété d'espèces sauvages. La brucellose animale est caractérisée par un échec reproductif et la brucellose humaine est une maladie grave et débilitante qui nécessite un traitement antibiotique prolongé et coûteux (Godfroid et al., 2011). Ainsi, cette maladie représente une menace sérieuse pour l'industrie animale et la santé publique (McDermott et al., 2013). Bien que éliminée des ruminants dans la plupart des pays européens, USA, Canada, Australie et quelques autres pays, la brucellose est encore endémique dans de nombreuses régions du monde, notamment en Afrique du Nord et de l'Est, au Moyen-Orient, en Asie centrale et l'Amérique du Sud (Corbel, 2006).

Jusqu'à présent, douze espèces de *Brucella* ont été décrites (<http://www.bacterio.net/allnamesac.html>), parmi lesquelles *B. abortus* et *B. melitensis* qui infectent préférentiellement les bovins et les petits ruminants, respectivement. Malgré cette gamme d'hôtes typique, *B. melitensis* est également une source d'infections bovines dans les systèmes d'élevage mixtes (Verger, 1985)(Corbel, 1997)(Godfroid et al., 2013), et moins fréquemment certains biovars *B. suis* peuvent également infecter les bovins (Alton et al., 1988)(Corbel, 1997)(Ewalt et al., 1997)(Musser et al., 2013), ce qui rend nécessaire l'identification des espèces de *Brucella* pour une compréhension complète de l'épidémiologie de la maladie chez ces animaux (Ducrotoy et al., 2016).

L'Algérie est un pays représentatif des conditions des pays d'Afrique du Nord du bassin méditerranéen. Puisque dans la plupart des cas, la brucellose humaine est le meilleur indicateur de la maladie animale, le nombre élevé de cas de brucellose humaine signalés ces dernières années (819 human cases in first four months of 2016:<http://www.aps.dz/sante-sciences-tech/40490-ghardaïa-819-cas-de-brucellose-humaine-diagnostiqués-dsp>), est révélateur de l'impact de cette zoonose en Algérie. Cependant, les données sur la prévalence de la maladie animale sont rares. Il y a une trentaine d'années, Benelmouffok et ses collaborateurs (Benelmouffok et al., 1984), ont résumé des preuves antérieures indiquant une séroprévalence apparente élevée (jusqu'à 25%), telle que déterminée par le test standard d'agglutination sérique (SAT). Plus récemment, une séroprévalence apparente du troupeau de 26,3% (test de Rose Bengale [RBT]) et de 15,7% (test de fixation du complément CFT)) a été rapportée chez les bovins de la région de l'Ouest (Tiaret) (Aggad and Boukraa, 2006). Bien que ces rapports aient montré une prévalence élevée de la brucellose bovine, la rareté des

données et indiquent clairement la nécessité d'études supplémentaires. De même, il existe peu de travaux sur la brucellose chez les petits ruminants (Hamdi-Chérif et al., 1999)(Meskoud-taïbi and Benzadi, 2009). En plus des déficiences de la surveillance, cette rareté des données reflète les problèmes de diagnostic de la brucellose dans les milieux à ressources limitées. Lounes et al. (Lounes et al., 2014) ont présenté les résultats d'une MLVA de 90 souches de *B. melitensis* d'origine humaine, mais à notre connaissance il n'y a pas d'analyses moléculaires d'ADN des isolats de *B. abortus* obtenus dans cette zone.

Dans ce travail, nous procédons à l'obtention des données supplémentaires sur l'état de la brucellose en Algérie et de comparer certains tests sérologiques, par la réalisation des enquêtes sérologiques sur la brucellose bovine, ovine et humaine d'un côté, et l'isolement et la caractérisation génétique des souches de *Brucella* à partir des bovins, de l'autre côté.

Partie bibliographique

I. Etude de l'agent pathogène

I.1. Définition

La brucellose est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à de nombreuses espèces animales et transmissible à l'homme (Edward and Young, 1995). Elle est due à des bactéries Gram négatif du genre *Brucella*, c'est une anthroponose. Elle a connu différentes appellations : la fièvre méditerranéenne, la fièvre de Malte, la fièvre ondulante, la fièvre de Gibraltar, la fièvre de Crimée, la fièvre de Crète, la fièvre de Chypre, la fièvre de Constantinople et la maladie de Bang (Maurin, 2005). 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, c'est une maladie à déclaration obligatoire et aussi une maladie professionnelle (Cognault, 2001).

I.2. Historique

Durant tout le XIX^e siècle et le début du XX^e siècle, la brucellose fit de sévères ravages parmi les soldats et les marins de la garnison maltaise, ce qui a abouti à de nombreuses recherches conduites par le corps médical de l'armée britannique et les médecins locaux. La première description a été faite par Allen Jeffery Martson en 1859 et l'agent causal nommé *Micrococcus melitensis* (Maurin, 2005).

C'est en 1887 que le médecin-capitaine Bruce isole l'agent causal de la rate d'un soldat décédé de cette maladie. Dix-huit ans plus tard et exactement en 1905, Zammit, un médecin maltais membre de la commission officielle créée pour étudier cette maladie, prouve que la chèvre joue le rôle d'un réservoir du germe (Godfroid et al., 2005).

Chez les animaux, c'est Bang, un vétérinaire danois, qui a isolé en 1897 un bacille d'un avorton bovin, nommé «bacille de Bang» s'avéra par la suite, être responsable de l'avortement contagieux des vaches. En 1918, Alice Evans, étudiant les agents responsables de la fièvre de Malte et de l'avortement contagieux des bovins, de les regrouper dans le genre Bactérium. En 1920, Meyer et Shaw proposent de classer *Brucella melitensis* et *Brucella abortus* isolés par Bruce et Bang comme deux espèces dans un nouveau genre. En 1929, ils ont découvert une nouvelle espèce, *Brucella suis* responsable de l'avortement chez la truie (Maurin, 2005).

Trois espèces supplémentaires ont été découvertes, *Brucella ovis* chez un bélier en 1950 par McFarlane et ses collaborateurs, *Brucella neotomae* isolé chez un rat du désert en 1957 par Stoenner et Lackman et *Brucella canis* isolé chez une chienne en 1968 par Carmichael et

Brunner (Godfroid et al., 2005) . En 1994, Ewalt décrit pour la première fois un avortement chez un dauphin due à une bactérie *Brucella* qui ne ressemble pas aux autres espèces déjà connues (Ewalt et al., 1994). D'autres espèces de *Brucella* ont été isolées chez des cétacés et des pinnipèdes (Bricker et al., 2000). En 2001, Cloeckaert et al proposent de grouper ces souches de *Brucella* en deux nouvelles espèces : *Brucella cetaceae* et *Brucella pinnipediae* (Godfroid et al., 2005).

En Algérie, la brucellose humaine a été découverte dès 1895 à l'Institut Pasteur d'Alger. Au début du 20ème siècle, elle fut diagnostiquée cliniquement par Brault puis bactériologiquement pour la première fois par Gillot. Ainsi, elle fût révélée en premier chez l'homme. Suite à ces observations, des recherches furent instituées en 1907 sur des élevages caprins par Sergent et collaborateurs à Alger et Oran. Ces études révélèrent l'infection non seulement des caprins mais aussi des autres animaux domestiques. Le taux était élevé dans les élevages comprenant des chèvres maltaises. A l'issue de ces travaux, le gouverneur général d'Algérie a élaboré un arrêté interdisant l'importation de caprins et bovins provenant de Malte (le berceau de la brucellose) Celles-ci furent les premières mesures prophylactiques entreprises à l'encontre de la brucellose. Entre 1911 et 1956 Plusieurs travaux de recherche ont été élaborés en Algérie confirmant ainsi l'omniprésence de la brucellose à l'Ouest (Oran), au Centre (Alger), à l'Est (Constantine) et même au Sud (Hoggar) du pays. Dès la découverte de la brucellose en Algérie, plusieurs travaux relient son origine au nord, à l'importation de chèvres espagnoles et de chèvres et vaches maltaises et à l'ouest par les caravanes marocaines (Refai, 2002).

I.3. Taxonomie

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 Bactériologique (Cognault, 2001). Les *Brucella* appartiennent au groupe alpha des proteobacteria (Moreno et al., 1990) et à la famille des Rhizobiaceae (Yanagi and Yamasato, 1993) sur le plan phylogénique, les brucelles sont proches des *Bartonella*, autres bactéries responsables de zoonoses, des bactéries de l'environnement aussi, rarement isolés chez l'homme (*Ochrobactrum anthropi*, *Afipia*, *Bosea*) ; et des bactéries symbiotes ou pathogènes de plantes (*Rhizobium*, *Agrobacterium*) (Maurin, 2005). Il existe une seule espèce de *Brucella* si on se base sur des tests d'homologie de l'ADN. Mais par convention, on a l'habitude de les classer en six espèces (Godfroid et al., 2005).

Actuellement, neuf espèces de *Brucella* sont reconnues, sept parmi elles affectent les animaux terrestres : *B. abortus* (7 biovars), *B. melitensis* (3 biovars), *B. suis* (5 biovars) , *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* and *B. microti* (Seleem et al., 2008) et deux espèces touchent les mammifères marins : *B. ceti* et *B. pinnipedialis* (Foster et al., 2007).

I.4. Morphologie et structure

Brucella sont des coccobacilles ou des tiges courtes mesurant de 0,6 à 1,5 µm de long et de 0,5 à 0,7 µm de large. Ils sont généralement disposés seuls, et moins fréquemment en paires ou en petits groupes. La morphologie de *Brucella* est assez constante, sauf dans les anciennes cultures où les formes pleomorphes peuvent être évidentes. *Brucella* sont non mobiles. Elles ne forment pas de spores, et les flagelles, les pili, ou les vraies capsules ne sont pas produits. *Brucella* sont Gram négatif et ne montrent généralement pas de coloration bipolaire. Elles ne sont pas vraiment acides, mais sont résistants à la décoloration par des acides faibles et se colorent ainsi par la modification de Stamp de la méthode de Ziehl-Neelsen. C'est la procédure habituelle pour l'examen des frottis d'organes ou de fluides biologiques qui ont été préalablement fixés à la chaleur ou à l'éthanol, et par cette méthode, les organismes *Brucella* se colorent sur un fond bleu. On peut également utiliser une technique à base de conjugué d'anticorps marqué par un fluorochrome ou une peroxydase (Roop et al., 1987). Cependant, ces méthodes ont une faible sensibilité dans le lait et les produits laitiers où *Brucella* sont souvent présentes en petit nombre, et l'interprétation est souvent entravée par la présence de globules gras. Des précautions doivent également être prises lors de l'interprétation des résultats positifs dans la méthode de Stamps car d'autres organismes provoquant des avortements, p. Ex. *Chlamydophila abortus* (anciennement *Chlamydia psittaci*) ou *Coxiella burnetii*, sont difficiles à différencier des organismes *Brucella*. Les résultats, positifs ou négatifs, doivent être confirmés par culture (Oie, 2009a).

I.5. Caractères antigéniques

I.5.1. Bactéries Smooth (S ou lisses)

I.5.1.1. Antigènes de surface

I.5.1.1.1. Le complexe LPS-S et haptènes apparentés

Le LPS-S (lipopolyoside 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, la partie glucidique du LPS-S est porteuse des épitopes A (*abortus*) et M (*mélitensis*). Les différentes souches de *Brucella* comportent donc les mêmes facteurs antigéniques, mais dans des proportions différentes, l'antigène A prédomine dans certains biotypes de *B. abortus*, l'antigène M prédomine chez *B. mélitensis*, A et M sont en quantités intermédiaires chez *B. suis* (Pilet, 1987).

I.5.1.1.2. Les protéines de la membrane externe (PME)

Ces protéines (PME) sont divisées en majeurs (25-27, 36-38 et 31 KDa) et mineurs (89, 19 et 16,5 KDa), ces groupes de protéines sont retrouvés en quantités variables dans les souches de *B. abortus*, *B. mélitensis*, *B. canis*, *B. ovis*, les profils de *B. suis* et *B. neotomae* n'ayant pas encore été établis. Si certains de ces PME ont une activité de porine, la fonction des autres restes inconnus (Garin-Bastuji and Dufour, 1995).

I.5.1.1.3. 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 l'immunité par ses propriétés adjuvantes (Cognault, 2001).

I.5.1.2. Les antigènes internes

L'analyse d'extraits solubles de *Brucella* à l'aide d'épreuves d'immunoprécipitation 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 et al., 1990). Les propriétés de certains de ces antigènes internes liées au développement d'une immunité cellulaire induisant une hypersensibilité retardée sont mises à profit dans le dépistage allergique (Garin-Bastuji, 1993).

I.5.1.3. Antigènes communs avec d'autres bactéries

Il existe des antigènes communs à *Brucella* et à d'autres bactéries (*Yersinia enterocolitica* O :9, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, les représentants du groupe N(O :30) de Kaufmann-White de *Salmonella*, *Pseudomonas maltophilia*), 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* (Garin-Bastuji and Dufour, 1995)

I.5.2. Bactéries Rough (R ou rugueuses)

Les mutants R obtenus à partir de *Brucella S* possèdent un LPS-R, ce LPS-R ne contient pas d'acides nucléiques et peu ou pas de protéines, et des acides gras identiques à ceux du LPS-S, et des sucres, le glucose, le mannose, le céto-désoxyoctanate et la glucosamine. L'absence de quinovosamine différencie le LPS-R du LPS-S (Roux, 1989). 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, donc les différences entre bactéries lisses et rugueuses liées principalement à la différence de composition des complexes LPS qui sont les supports des principaux antigènes de surface (Corbel, 1985).

I.5.3. 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 de l'anneau sur le lait. Les haptènes HN et polysaccharides B apparentés au LPS-S sont utilisés dans l'épreuve d'immunodiffusion radiale qui permet de différencier les animaux infectés de ceux qui ont été vaccinés (FAO/OMS, 1986).

I.6. Caractères cultureux

I.6.1. Conditions physico-chimiques

Les conditions physico-chimiques nécessaires à la croissance des *Brucella* sont un PH permettant la croissance des *Brucella* et qui varie entre 6,6 et 7,7 ; le PH optimal est de 6,8, et une température de culture qui peut varier entre 20 et 37 °C, la température optimale se situant à 34 °C. Les *Brucella* sont des bactéries aérobies strictes, certaines souches se développent mieux en atmosphère contenant 5 à 10 % de CO₂ (Freney et al., 2007).

I.6.2. 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 sont indispensables de même que les vitamines thiamine, niacine et biotine (Cognault, 2001).

I.6.3. Culture

I.6.3.1. Les milieux de culture de base

L'isolement direct et la culture de *Brucella* sont habituellement effectués sur des milieux solides, c'est généralement la méthode la plus satisfaisante car elle permet d'isoler et de reconnaître clairement les colonies en développement. De tels milieux limitent également l'établissement de mutants non lisses et le développement excessif de contaminants.

Cependant, l'utilisation de milieux liquides peut être recommandée pour des échantillons volumineux ou à des fins d'enrichissement. Une large gamme de milieux basiques commerciaux déshydratés est disponible, par exemple milieu de base *Brucella*, tryptose (ou trypticase)-agar de soja (TSA). L'ajout de 2 à 5% de sérum bovin ou équin est nécessaire pour la croissance de souches telles que *B. abortus* biovar 2, et de nombreux laboratoires ajoutent systématiquement du sérum aux milieux basaux tels que la gélose au sang (Oxoid) ou la Columbia agar (BioMérieux), avec d'excellents résultats. On peut utiliser d'autres milieux satisfaisants, tels que l'agar sérum-dextrose (SDA) ou la gélose de glycerol dextrose. Le SDA est habituellement préféré pour l'observation de la morphologie des colonies (Oie, 2009a). Un milieu biphasique non sélectif, connu sous le nom de milieu Castañeda, est recommandé pour l'isolement de *Brucella* à partir de sang et d'autres fluides corporels ou le lait, où la culture d'enrichissement est généralement conseillé. Le milieu de Castañeda est utilisé parce que les brucelles ont tendance à se dissocier dans le milieu de bouillon, ce qui interfère avec le biotypage par des techniques bactériologiques conventionnelles (Oie, 2009a).

I.6.3.2. Les milieux de culture sélectifs

Tous les milieux de base mentionnés ci-dessus peuvent être utilisés pour la préparation de milieux sélectifs. Des antibiotiques appropriés sont ajoutés pour supprimer la croissance d'organismes autres que *Brucella*. Le milieu sélectif le plus utilisé est le milieu de Farrell (Farrell, 1974), qui est préparé par l'addition de six antibiotiques à un milieu de base. On ajoute les quantités suivantes à 1 litre d'agar: sulfate de polymyxine B (5000 unités = 5 mg); Bacitracine (25 000 unités = 25 mg); Natamycine (50 mg); L'acide nalidixique (5 mg); Nystatine (100 000 unités); Vancomycine (20 mg) (Oie, 2009a).

Un complément antibiotique lyophilisé est disponible sur le marché (Oxoid). Cependant, l'acide nalidixique et la bacitracine, à la concentration utilisée dans le milieu de Farrell, ont des effets inhibiteurs sur certaines souches de *B. abortus* et *B. melitensis* (Marín et al., 1996). Par conséquent, la sensibilité de la culture augmente significativement par l'utilisation simultanée de Farrell et du milieu Thayer-Martin modifié. Le milieu de Thayer-Martin modifié peut être préparé avec du milieu GC (agar chocolat) (38 g / litre, Biolife Laboratories, Milan, Italie) supplémenté d'hémoglobine (10 g / litre, Difco) et de méthanesulfonate de colistine (7,5 mg / litre), de vancomycine (3 mg / l), de nitrofurantoïne (10 mg / litre), de nystatine (100 000 Unités Internationales [IU] / litre = 17,7 mg) et d'amphotéricine B (2,5 mg / litre De l'Amérique [Etats-Unis]) (Marín et al., 1996). Un autre milieu sélectif développé en 2011 par M. J. De Miguel et al ; Dans l'ensemble, les résultats des différentes expériences ont permis de sélectionner les composantes les plus adéquates pour formuler un nouveau milieu sélectif (CITA) approprié pour l'isolement de toutes les espèces de *Brucella*. En plus d'une combinaison antibiotique appropriée (colistine (7,5 mg / litre), de vancomycine (20 mg / l), de nitrofurantoïne (10 mg / litre), de nystatine (100 000 Unités Internationales [IU] / litre = 17,7 mg) et d'amphotéricine B (4 mg / litre), ce nouveau milieu contient BAB-CS (agar de base *Brucella*-sérum du voeu) comme constituant basique, ce qui donne un milieu translucide, ce qui est important pour faciliter l'identification des brucelles en évaluant la morphologie des colonies.

Contrairement à plusieurs biovars de *B. abortus*, la croissance de *B. melitensis* ne dépend pas d'une atmosphère de 5-10% de CO₂. Tous les milieux de culture doivent être soumis au contrôle de la qualité et devraient favoriser la croissance de souches de *Brucella* à partir de petits inoculums ou de souches fastidieuses, comme *B. abortus* biovar 2. Sur des milieux solides appropriés, les colonies de *Brucella* peuvent être visibles après une période d'incubation de 2 à 3 jours. Après 4 jours d'incubation, les colonies de *Brucella* sont rondes, de 1 à 2 mm de diamètre, avec des marges lisses. Elles sont translucides et d'une couleur miel pâle lorsque les boîtes de Pétri sont vues à la lumière du jour à travers un milieu transparent. Lorsqu'elles sont vues de dessus, les colonies apparaissent convexes et nacrées. Plus tard, les colonies deviennent plus grandes et légèrement plus sombres. (Oie, 2009a).

Les cultures de *Brucella* lisses (S) ont tendance à subir des variations pendant la croissance, en particulier avec des sous-cultures, et à se dissocier à des formes rugueuses (R). Les colonies sont alors beaucoup moins transparentes, ont une surface plus granuleuse, terne, et une couleur qui varie du blanc mat à brun dans la lumière réfléchie. La vérification de la dissociation est facilement testée par coloration au violet cristal, les colonies rugueuses

apparaissent colorées en rouge / violet et les colonies lisses ne se colorent pas. Si les colonies sont lisses, elles doivent être vérifiées contre l'antisérum pour *B. abortus* lisse, ou de préférence avec les sérums monospécifiques anti-A et -M. Dans le cas de colonies rugueuses, les isolats doivent être contrôlés avec de l'antisérum anti-antigène *Brucella* R. Les modifications de la morphologie des colonies sont généralement associées à des changements de virulence, de propriétés sérologiques et / ou de sensibilité aux phages. La morphologie des colonies typique et l'agglutination positive avec un antisérum de *Brucella* fournissent une identification présomptive de l'isolât comme *Brucella*. L'identification complète ultérieure est mieux effectuée par un laboratoire de référence (Oie, 2009a).

I.6.3.3. Collecte et culture d'échantillons

Pour le diagnostic de brucellose animale par culture, le choix des échantillons dépend généralement des signes cliniques observés. Les échantillons les plus précieux incluent les fœtus avortés (contenu de l'estomac, rate et poumon), les membranes fœtales, les sécrétions vaginales (écouvillons), le lait, le sperme et l'arthrite ou les fluides hygromatiques. A partir des carcasses d'animaux, les tissus préférés pour la culture sont ceux du système réticulo-endothélial (c'est-à-dire la tête, les ganglions lymphatiques mammaires et génitaux et la rate), l'utérus en fin de gestation ou en post-partum et la mamelle. La croissance apparaît normalement après 3-4 jours, mais les cultures ne doivent pas être jetées comme négatives jusqu'à ce que 8-10 jours se soient écoulés. Les échantillons de tissu sont préparés par élimination de matière étrangère comme les matières grasses, ensuite coupés en petits morceaux et macérés à l'aide d'un «Stomacher» ou d'un broyeur de tissu avec une petite quantité de solution saline tamponnée au phosphate stérile (PBS) avant d'être ensemencés sur des milieux solides. Un écouvillon vaginal pris après l'avortement ou la parturition est une excellente source pour la récupération de *Brucella* et beaucoup moins risqué pour le personnel que le matériel d'avortement (Oie, 2009a).

Les échantillons de lait doivent être recueillis proprement après le lavage et le séchage du pis entier et la désinfection des trayons. Il est essentiel que les échantillons contiennent du lait de tous les trayons et que 10 à 20 ml de lait soient prélevés de chaque trayon. Les premiers jets doivent être éliminés, et l'échantillon est récupéré directement dans un récipient stérile. Le lait est centrifugé tout en évitant la contamination par les aérosols. La crème et le culot sont étalés sur un milieu sélectif solide, séparément ou mélangés. Si les brucelles sont présentes dans les échantillons de lait en vrac, leur nombre est généralement faible et l'isolement est très peu

probable. Les produits laitiers, tels que les fromages, doivent être cultivés sur les milieux décrits ci-dessus. Comme ces matériaux sont susceptibles de contenir un petit nombre d'organismes, l'enrichissement est conseillé. Les échantillons doivent être soigneusement homogénéisés avant la culture, après avoir été broyés dans un broyeur de tissus ou macérés et broyés dans un Stomacher avec un volume approprié de PBS stérile. Les couches superficielles et le cœur du produit doivent être cultivés. Tous les échantillons doivent être refroidis immédiatement après leur prélèvement et transportés au laboratoire de la manière la plus rapide. À l'arrivée au laboratoire, les échantillons de lait et de tissus doivent être congelés s'ils ne doivent pas être cultivés immédiatement. (Oie, 2009a).

I.6.4. Identification et typage phénotypique

L'identification des organismes *Brucella* peut être réalisée par une combinaison de différents tests comme morphologie de l'organisme après la coloration de Gram ou Stamp, la morphologie des colonies, les caractéristiques de croissance, les tests d'uréase, d'oxydase et de catalase et le test d'agglutination à l'aide d'un sérum polyclonal anti-*Brucella*. L'identification des espèces et des biovars nécessite des tests tels que la lyse par les phages et l'agglutination avec des sérums monospécifiques anti-A, -M ou -R, dont la performance est laissée aux laboratoires de référence ayant une expertise dans ces méthodes. L'utilisation simultanée de plusieurs phages, par ex. Tbilissi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar (Iz) et R / C fournissent un système de typage basant sur les phages, qui entre des mains expérimentées, permet une identification pratique des espèces lisses et rugueuses de *Brucella*. Cependant, plusieurs caractéristiques, par exemple l'addition de CO₂ requis pour la croissance, la production de H₂S (détectée par les papiers d'acétate de plomb) et la croissance en présence de fuchsine basique et de thionine à des concentrations finales de 20 µg / ml, sont révélées par des tests de routine qui peuvent être effectuée dans des laboratoires non spécialisés, modérément équipés (Oie, 2009a).

Tableau 1. Caractéristiques différentielles des espèces du genre *Brucella* (Alton et al., 1988)

Lyse par les phages ^a											
Espèces	Morphologie des colonies ^b	Exigence du sérum	Tb		Wb		Iz ₁		R/C		Hôtes préférés
			RTD ^c	10 ⁴ RTD	RTD	RTD	RTD	RTD	Oxydase	Urée	
<i>B. abortus</i>	S	- ^d	+	+	+	+	-	+	+ ^e	+ ^f	Bovin et autres bovidés
<i>B. suis</i>	S	-	-	+	+ ^g	+ ^g	-	+	+	+ ^h	Biovar 1 : porc
											Biovar 2 : porc, lièvre
											Biovar 3 : porc
											Biovar 4 : renne
											Biovar 5 : Rongeurs sauvages
<i>B. melitensis</i>	S	-	-	-	- ⁱ	+	-	+	+	+ ^j	Ovins et caprins
<i>B. neotomae</i>	S	-	- ^k	+	+	+	-	-	-	+ ^h	Rat de bois du désert
<i>B. ovis</i>	R	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Béliers
<i>B. canis</i>	R	-	-	-	-	-	+	+	+	+ ^h	Chiens
<i>B. ceti</i>	S		+ ^m		+ ⁿ	+ ^o	-	+	+	+	Cétacés
<i>B. pinnipedialis</i>	S		+ ^m		+ ⁿ	+ ^o	-	+	+	+	Pinnipèdes
<i>B. microti</i>	S	-	-	+	+	+	-	+	+	+	Campagnol des champs

a Phages : Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar (Iz₁) and R/C

b Phase normale : S : lisse, R : rugueux

c RTD : Dilution d'essai de routine

d *B. abortus* biovar 2 nécessite généralement un sérum pour la croissance lors de l'isolement primaire

e Certains isolats africains de *B. abortus* biovar 3 sont négatifs

f Taux intermédiaire, à l'exception de la souche 544 et de certaines souches de champ qui sont négatives

g Certains isolats de *B. suis* biovar 2 ne sont pas ou partiellement lysés par le phage Wb ou Iz₁

h Taux rapide

i Certains isolats sont lysés par le phage Wb

j Faible taux, sauf quelques souches qui sont rapides

k Plaques minutées (toutes petites plaques)

l *Neotoma lepida*

m Certains isolats sont lysés par Tb

n La plupart des isolats sont lysés par Wb

o La plupart des isolats sont lysés par Iz

Tableau 2. Caractéristiques différentielles des biovars de *Brucella* (Alton et al., 1988)

Espèces	Biovars	Exigence en CO ₂	Production d'H ₂ S	Croissance sur les colorants ^a		Agglutination avec des sérums monospécifiques		
				Thionin	Fuchsin basique	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+ _b	+	-	+	+	-	-
	2	+ _b	+	-	-	+	-	-
	3	+ _b	+	+	+	+	-	-
	4	+ _b	+	-	+ ^c	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	+ou-	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	- ^d	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	- ^e	+	+	-
	5	-	-		-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>	-	-	+	- ^f	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	-	+	-	+	- ^e	-	-	+
<i>B. canis</i>	-	-	-	+	- ^e	-	-	+
<i>B. ceti</i>	-	-	-	+	+	+	- ^e	-
<i>B. pinnipedialis</i>	-	+	-	+	+	+	- ^e	-
<i>B. microti</i>	-	-	-	+	+	-	+	-

a Concentration de colorant dans du milieu de dextrose sérique: 20 ug / ml

b Habituellement positive sur l'isolement primaire

c Certaines souches basiques sensibles à la fuchsine ont été isolées

d Certaines souches basiques résistantes à la fuchsine ont été isolées

e Négatif pour la plupart des souches

f Croissance à une concentration de 10 µg / ml de thionine

I.6.5. Typage moléculaire

Malgré le haut degré d'homologie de l'ADN dans le genre *Brucella*, plusieurs méthodes moléculaires, y compris la PCR, le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction par PCR (RFLP) et Southern blot, ont été développées qui permettent dans une certaine mesure la différenciation entre les espèces de *Brucella* et certaines de leurs Biovars (Bricker, 2002). L'électrophorèse sur gel de champ pulsé a été développée qui permet la différenciation de plusieurs espèces de *Brucella* (Hinić et al., 2008)(Michaux-charachon et al., 1997).

Le premier essai de PCR multiplex spécifique à l'espèce pour la différenciation de *Brucella* a été décrit par Bricker and Halling (Bricker and Halling, 1994).

I.6.5.1. AMOS-PCR

Ce test, nommé AMOS-PCR, était basé sur le polymorphisme découlant de la localisation spécifique à l'espèce de la séquence d'insertion IS711 dans le chromosome de *Brucella* et comprenait cinq amorces oligonucléotidiques qui peuvent identifier sans différencier *B. abortus*, biovars 1, 2 et 4 mais n'ont pas pu identifier les biovars 3, 5, 6 et 9 de *B. abortus*. Des modifications ont été introduites à ce test au cours du temps pour améliorer la performance, et des amorces supplémentaires spécifiques de la souche ont été incorporées pour l'identification des souches vaccinales de *B. abortus* et d'autres biovars et espèces (Bricker et al., 2003b)(Bricker and Halling, 1995)(Ewalt and Bricker, 2000)(Ewalt and Bricker, 2003)(Ocampo-Sosa et al., 2005).

I.6.5.2. Bruce-ladder

Ce nouveau test de multiplex PCR (Bruce-ladder) a été proposé pour l'identification rapide et simple de *Brucella* (Garcia-Yoldi et al., 2006). L'avantage majeur de ce test par rapport aux PCR précédemment décrites est qu'il peut identifier et différencier en une seule étape la plupart des espèces de *Brucella* ainsi que les souches vaccinales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 et *B. melitensis* Rev.1. Contrairement aux autres PCR, Bruce-ladder est capable de détecter aussi l'ADN de *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* et *B. ceti*. De plus, les biovars *B. abortus* 3, 5, 6, 7, 9 et *B. suis* biovars 2, 3, 4, 5 peuvent être identifiés par cette nouvelle PCR multiplex. Le seul inconvénient mineur de Bruce-ladder est que certaines souches de *B. canis* peuvent être faussement identifiées comme *B. suis* (Macmillan and Cockrem, 1985).

D'autres tests tels que omp25, 2a et 2b PCR / RFLP sont disponibles et peuvent être utilisés pour identifier les espèces de *Brucella* (Cloekaert et al., 2002). Des approches alternatives permettant d'identifier toutes les espèces de *Brucella* sur la base de la discrimination par polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) soit par extension d'amorce soit par PCR en temps réel ont été récemment décrites (Gopaul et al., 2008)(Scotts et al., 2007). Ces tests sont rapides, simples et sans ambiguïté et, basés sur une analyse phylogénétique robuste, surmontent certains problèmes rencontrés avec Bruce-ladder, tels que l'identification erronée de certains souches de *B. canis*. Un certain nombre d'autres méthodes ont récemment été décrites et qui peuvent ajouter des informations épidémiologiques utiles. Il s'agit notamment d'une technique de séquençage multilocus (Whatmore et al., 2007) et plusieurs techniques de typage basées sur l'utilisation du nombre multiple de locus variable de l'analyse des répétitions en tandem (MLVA) (Bricker et al., 2003a)(Bricker et al., 2003b)(Le Flèche et al., 2006)(Whatmore et al., 2006).

I.6.5.2. Multiple Locus VNTR Analysis (MLVA)

Selon les marqueurs particuliers choisis, ces méthodes permettent de différencier les isolats au niveau des espèces ou de les subdiviser, ce qui peut fournir des informations épidémiologiques précieuses au niveau de la sous-espèce. Le typage des souches et des biovars des échantillons de *Brucella* isolés à partir des animaux dans les foyers de brucellose, est utile pour repérer la source d'infection. Les profils de bandes MLVA peuvent être résolus par différentes techniques allant des gels d'agarose manuels à faible coût aux systèmes de séquençage par électrophorèse capillaire plus coûteux. La méthode la plus fréquemment utilisée est le gel d'agarose. Récemment, une méthode plus rapide et peu coûteuse basée sur une technologie de puce a été proposée. Cette plate-forme miniaturisée pour les applications d'électrophorèse est capable de dimensionner et de quantifier des fragments de PCR ; elle a été utilisée précédemment pour étudier la variabilité génétique de *Brucella* spp (Santis et al., 2013).

Tout d'abord, l'ADN est isolé des échantillons positifs pour la brucellose qui doivent être génotypés. L'amplification VNTR est réalisée par PCR utilisant 16 amorces *Brucella* (Al Dahouk et al., 2007). Pour l'analyse MLVA-16, l'amplification est effectuée dans des plaques de PCR à 96 puits ou 384 puits. La puce est préparée selon les recommandations du fabricant. Chaque puce contient 5 puits actifs: 1 pour le marqueur d'ADN et 4 pour le gel-colorant. Pour chaque essai, on prépare également un puits de bande avec l'échelle (contenant des normes de taille de huit MW de 100 300 500 700 1100 1900 2900 4900 bp) inséré dans la rainure

appropriée de l'instrument. Le nombre d'échantillons par puce de préparation est de 400, équivalent ou quatre plaques de 96 puits ou une plaque de 384 puits. Après la préparation du gel, la plaque d'échantillon est chargée dans le support de plaque fixé au robot du Caliper LabChip 90. Pendant la séparation des fragments, les échantillons sont analysés séquentiellement et des électrophérogrammes, des images de gel virtuelles et des données de table sont représentés. Les estimations de la taille des produits d'amplification sont obtenues en utilisant le LabChip GX. Le logiciel permet d'importer les données dans un logiciel de tableur et ensuite dans la table de conversion qui permet d'affecter chaque taille à l'allèle correspondant. La valeur maximale et minimale des tailles observées pour chaque allèle est ainsi établie expérimentalement. Les amplicons PCR sont purifiés et séquencés par Automatic DNA Analysis System (De Santis et al., 2011).

I.6.6. Identification des souches vaccinales

L'identification des souches vaccinales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 et *B. melitensis* souche Rev.1, dépend d'autres tests. *Brucella abortus* S19 a les propriétés normales d'une souche biovar 1 de *B. abortus*, mais ne nécessite pas de CO₂ pour la croissance, ne croît pas en présence de benzylpénicilline (3 µg / ml = 5 UI / ml), de thionine bleue (2 µg / ml) et de l'érythritol (1 mg / ml) (toutes les concentrations finales), et présente une utilisation élevée de L-glutamate (Alton et al., 1988). Dans certains cas, la souche 19 se développe en présence d'érythritol, mais ne l'utilise pas. La souche *Brucella melitensis* Rev.1 présente les propriétés normales d'une souche biovar 1 de *B. melitensis*, mais développe des colonies plus petites sur milieu gélosé, ne croît pas en présence de fuchsine basique, de thionine (20 µg / ml) ou de benzylpénicilline (3 µg / ml) (concentrations finales), mais croît en présence de streptomycine à 2,5 ou 5 µg / ml (5 UI / ml) (Alton et al., 1988). La souche RB51 de *Brucella abortus* est identifiée par les caractéristiques suivantes: morphologie rugueuse et croissance en présence de rifampicine (250 µg par ml de milieu). Les souches vaccinales S19, Rev.1 et RB51 peuvent également être identifiées en utilisant des PCR spécifiques (Oie, 2009a).

I.7. Habitat de *Brucella*

Les *Brucella* se trouvent essentiellement chez les animaux qui jouent le rôle de réservoir mais peuvent également être présentes dans l'environnement et les produits alimentaires.

I.7.1. Survie de *Brucella* dans l'environnement

Au-delà du seul réservoir animal, il convient également de considérer une éventuelle survie de l'organisme dans l'environnement qui peut éventuellement jouer un rôle dans l'épidémiologie de la maladie. La survie de *Brucella* (*abortus* et *melitensis*) est influencé par différents éléments tels que la température, le PH ou encore l'humidité. La survie est favorisée en des conditions humides et à basse température. *Brucella* peut ainsi survivre dans l'eau plusieurs mois à 4 à 8 °C, 2,5 ans à 0°C et plusieurs années dans des tissus ou milieux congelés, la survie est également possible plus de 60 jours en sol humide. Concernant les substances d'origine animale, nous pouvons noter que les *Brucella* peuvent atteindre 30 jours dans les urines, 75 jours dans les avortons, 120 jours dans les déjections, plus de 200 jours dans les exsudats utérins et 7 à 8 mois dans le lisier (Ganière, 2005).

I.7.2. Survie des *Brucella* dans les produits alimentaires

La survie de *Brucella* dans le lait et les produits laitiers dépend de nombreux paramètres tels que le type et l'âge du produit considéré. L'humidité du milieu, la température, les variations de PH, l'humidité du produit, l'activité biologique des autres bactéries présentes et les conditions de stockage influent aussi sur sa survie. Dans le lait cru, la survie de *Brucella* est de 24h à 25-37 °C, 48 h à 8 °C et 2,5 ans à – 40 °C. A faible concentration en milieu liquide, les *Brucella* sont assez sensibles à la chaleur. Ainsi, les suspensions bactériennes diluées dans le lait sont facilement inactivées par pasteurisation ou par ébullition prolongée de 10 min. *Brucella* ne persiste pas très longtemps dans les fromages fermentés. Toutefois, le temps optimal de fermentation nécessaire pour atteindre un degré de sécurité suffisant n'est pas connu, mais a été estimé à trois mois (Garrido-Abellan et al., 2009). La fermentation strictement lactique et relativement courte augmente le temps de survie de *Brucella*. Une pasteurisation du lait semble être le seul moyen d'assurer la sécurité de ces produits (Bervas et al., 2006).

II. La brucellose animale

II.1. Définition

La brucellose est une maladie infectieuse et contagieuse, transmissible à l'homme et à de nombreuses espèces animales. La brucellose bovine due essentiellement à *Brucella abortus*, dont la manifestation clinique la plus habituelle est l'avortement (avortement épizootique) chez les femelles mais aussi des orchites et épидидymites avec stérilité fréquente chez les taureaux (Lefèvre et al., 2003).

La brucellose ovine et caprine est le plus souvent due à l'un des 3 biovars de *B. melitensis*. Cette maladie affecte les organes de la reproduction causant des avortements chez les brebis, et orchite et épидидymite chez les males. Il faut distinguer la brucellose ovine (brucellose sensu stricto) due à *B. melitensis* de l'infection causée par *Brucella ovis*, dénommée « épидидymite contagieuse du bélier » (Ganière, 2005).

II.2. Les espèces affectées

La caractéristique essentielle de cette zoonose est de pouvoir atteindre à peu près tous les animaux domestiques et sauvages (Roux, 1989). La maladie est due à différentes bactéries appartenant au genre *Brucella* qui infectent généralement une espèce animale spécifique. Toutefois, la plupart des espèces de *Brucella* sont également capable d'infecter d'autres espèces animales (Oie, 2009a). *Brucella abortus* affecte naturellement les bovins, mais peut aussi affecter d'autres ruminants domestiques (buffles, zébus, bisons, ovins et caprins, rennes) et sauvages (cervidés, chamois), les suidés, les équidés, les carnivores, les rongeurs. Noter que la brucellose bovine peut être aussi consécutive à l'infection des bovins par *B. melitensis* ou *B. suis*. Il faut noter que la brucellose bovine est transmissible à l'homme (zoonose majeure) (Ganière, 2005).

B. melitensis affecte naturellement les ovins, mais peut aussi affecter d'autres ruminants domestiques (bovins, buffles, zébus), sauvages (cervidés, chamois), les suidés, les équidés, les carnivores, les rongeurs, dès lors que les petits ruminants et d'autres espèces animales sont amenés sur des pâturages communs, même à des périodes différentes. Des cas sporadiques d'infection à *B. abortus* ont été rapportés chez les ovins-caprins mais les signes cliniques sont alors rares avec possibilité réduite de dissémination dans le troupeau. *B. melitensis* est aussi fortement pathogène pour l'homme (zoonose majeure) (Lefèvre et al., 2003)(Oie, 2009b).

II.3. Répartition géographique

On ne connaît pratiquement pas d'espèce animale résistante à l'infection par *Brucella* et c'est évidemment la raison de la dispersion mondiale de la maladie (Roux, 1989). De très nombreux pays sont encore infectés de brucellose bovine, avec une prévalence et une incidence variable selon les régions et la situation zoosanitaire internationale relative à la brucellose bovine évolue en effet continuellement du fait des échanges mondiaux et de l'évolution des programmes de surveillance nationaux (Lefèvre et al., 2003). L'incidence la plus élevée est constatée au Moyen-Orient, dans la région de la Méditerranée, en Afrique subsaharienne, en Chine, en Inde, au Pérou et au Mexique. Actuellement, les pays d'Asie centrale et d'Asie du Sud-est enregistrent la plus forte augmentation du nombre de cas (Oie, 2009a).

B. melitensis biovar 3 est le biovar prédominant en Méditerranée et au Moyen orient, alors que le biovar 1 est prédominant en Amérique central (Oie, 2009b). Plusieurs pays d'Europe occidentale, le Canada, le Japon, l'Australie et la Nouvelle-Zélande semblent être indemnes de la brucellose (Oie, 2009a).

II.4. Importance de la brucellose

II.4.1. Impact sur le plan économique

La brucellose entraîne des conséquences sérieuses et de graves pertes dans les élevages, avortements, mortinatalité, stérilité des adultes, pertes en lait et en viande. De plus, elle a de sévères répercussions sur les échanges commerciaux et les mesures à mettre en place pour son éradication ont un coût important. Ces pertes économiques sont très variables selon les pays, car des données très diverses doivent être prises en compte ; extension de la maladie, espèces animales atteintes, valeur relative des animaux en fonction des données économiques du pays concerné et besoins alimentaires de la population (Roux, 1989). Bien que, les programmes d'éradication de la brucellose peuvent être très chers, ils sont estimés à 7 dollars pour chaque 1 dollar dépensé pour l'éradication. Le programme d'éradication de la brucellose aux Etats-Unis coûte 3,5 billion de dollars entre 1934 et 1997, le coût de la diminution de la production laitière et de l'avortement en 1952 était 400 million de dollar (Seleem et al., 2010).

La brucellose des petits ruminants (ovins, caprins) occasionnent des pertes économiques sévères, résultant à la fois des effets directs sur les animaux (avortements, stérilité, mortinatalité, baisse de production de lait et de viande), et des effets indirects sur les industries animales, lesquels sont associés à la dépréciation des femelles ayant avorté. Aussi on note le coût de la main d'œuvre, des soins vétérinaires, ainsi que le manque à gagner lié à

l'arrêt de la commercialisation ou des exportations d'animaux et des produits dérivés (Benkirane, 2001).

II.4.2. Importance hygiénique

Tous les renseignements suggèrent que les pertes économiques mondiales causées par la brucellose sont très importantes, il n'y a pas que les pertes liées à la production animales, il y'a aussi des pertes liées à la santé publique (Seleem et al., 2010). La brucellose est une zoonose qui se transmet facilement à l'homme chez qui elle est souvent appelée fièvre ondulante ou fièvre de Malte. Les vétérinaires, les éleveurs et le personnel des abattoirs sont les plus exposés à l'infection. La brucellose fait partie des infections les plus faciles à contracter en laboratoire sans oublier le rôle du lait non pasteurisé dans la transmission de l'infection, elle appartient à la liste des maladies prioritaires de l'Office International des Epizooties (Oie, 2016). Bien qu'il soit reconnu un rôle important à *B. suis* dans les infections humaines à travers plusieurs régions du monde (Asie du sud-est, Europe centrale et occidentale, Amérique du nord), dans la région du circumméditerranéenne et le proche orient, c'est *B. melitensis* qui est l'agent responsable de la plupart des cas cliniques sévères de brucellose humaine. Elle a de sérieuses conséquences sur le développement économique et social. Ces différents aspects justifient l'inscription en Algérie de la brucellose ovine et caprine dans la liste des maladies à déclaration obligatoire (Benkirane, 2001).

II.5. Epidémiologie

II.5.1. Epidémiologie analytique

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). Les bovins sont aussi infectés par *Brucella melitensis* et peuvent développer une maladie comparable à celle induite par *Brucella abortus*, lorsque ceux-ci sont en contact avec des chèvres ou des moutons infectés. Un cheval infecté par *Brucella abortus* présente une infection chronique des bourses séreuses du cou et du garrot, de rares cas d'avortement brucellique et de stérilité ont été rapportés chez la jument. Les ovins, caprins et porcins sont peu sensibles à *Brucella abortus* (Nicoletti, 1980).

II.5.1.1. Les sources de contagion

La brucellose peut être transmise tout autant par des bovins présentant des symptômes que par ceux atteints par une infection asymptomatique. Les animaux s'infectent généralement par ingestion de nourriture, d'eau, de colostrum ou de lait contaminé ou par léchage du placenta, de l'avorton, ou de l'appareil génital d'un animal ayant avorté ou mis bas récemment, les lochies étant particulièrement riches en germes. Les animaux peuvent également s'infecter par voie conjonctivale (Nicoletti, 1980).

La brucellose peut également être transmise de la mère à son fœtus, in utero ou immédiatement après sa naissance. Les taureaux infectés peuvent excréter *B. abortus* dans leur semence et ils doivent toujours être considérés, dans les troupeaux infectés, comme potentiellement dangereux. Le matériel d'élevage, de traite ou d'insémination artificielle contaminé est une autre source d'infection. Les hygromas brucelliques peuvent contenir de grandes quantités de germes. Cependant, ils ne semblent pas participer à la diffusion de la maladie. (Lefèvre et al., 2003).

Les brebis infectées, au moment de la vidange de l'utérus gravide expulsent dans le milieu extérieur au moment de l'avortement ou à l'occasion d'un agnelage apparemment normal, le contenu de ce dernier qui représente la matière virulente essentielle et qui est une source majeure de dissémination de l'infection aux congénères ainsi qu'à l'homme. L'excrétion vaginale est plus prolongée chez les petits ruminants que chez les bovins (2-3) mois. Le colostrum et le lait des femelles infectées contiennent des matières virulentes, sans aucun symptôme de brucellose ; les *Brucella* sont excrétées dans le lait pendant un délai variable après la mise bas. Elles peuvent s'étendre à toute la lactation. La chèvre représente à cet égard l'espèce la plus dangereuse, et le niveau de production laitière est d'autant plus réduit que l'infection est grave. Le bélier peut jouer un rôle important dans la persistance et la dissémination de l'infection par l'intermédiaire du sperme ou via l'insémination artificielle. Même en l'absence de symptômes, la localisation des *Brucella* dans les organes génitaux du mâle permet leurs excrétions dans le sperme. Cette excrétion est très variable selon les espèces: elle est très fréquente voire importante chez les petits ruminants, particulièrement chez la chèvre (Garin-Bastuji, 1993).

II.5.1.2. Les matières virulentes

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. Enfin, il existe une excrétion transitoire et discrète, quelques jours après la mise bas, de bactéries dans le lait et le colostrum, cette excrétion est surtout importante après un avortement (Acha and Szyfres, 2005). Chez le mâle, il peut y avoir une excrétion de *Brucella* dans le sperme. Des bactéries sont parfois présentes dans les produits de suppuration sous forme d'hygroma, dans les fèces des jeunes nourris avec du lait infecté, et dans les viscères infectés. Les *Brucella* sont sensibles à la pasteurisation, mais elles peuvent résister plusieurs semaines à plusieurs mois dans les matières virulentes et le milieu extérieur comme les pâturages, les 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 et trois ou quatre mois dans les fèces (Lefèvre et al., 2003).

II.5.1.3. Mode de transmission

II.5.1.3.1. Transmission horizontale

Chez les animaux, les sécrétions génitales sont hautement contaminants. La transmission peut être par voie directe lors de contact entre individus infectés et individus sains lors de la cohabitation, notamment en période de mise-bas, ingestion, contamination vénérienne ou par voie indirecte, par l'intermédiaire des locaux, pâturages, véhicules de transport, aliments, eaux, matériels divers, contaminés par les matières virulentes et par d'autres animaux qui contribuent à la dissémination du germe comme les chiens et les oiseaux qui déplacent des débris du placenta (Fontaine and Cadoré, 1995).

II.5.1.3.2. Transmission verticale

Elle peut se réaliser *in utero*, lors de la naissance d'un fœtus viable mais infecté ou lors du passage du nouveau-né dans la filière pelvienne. Les jeunes plus résistants, se débarrassent généralement de l'infection. L'infection persiste toutefois jusqu'à l'âge adulte chez environ 5 à 10% des veaux nés de mère brucellique, sans susciter de réaction sérologique décelable. Les signes cliniques en l'occurrence l'éventuel avortement et la réaction sérologique

n'apparaîtront, chez les jeunes femelles infectées, qu'à la faveur de la première gestation, voir plus tard (Ganière, 2005).

II.5.1.4. Voie de pénétration

Bien que l'infection peut se produire à travers la peau, conjonctive ou les muqueuses des voies respiratoires par inhalation. La voie la plus fréquente d'infection chez les bovins est le tractus gastro-intestinal. La transmission vénérienne n'est pas une voie majeure d'infection dans des conditions naturelles, mais l'insémination artificielle avec du sperme contaminé est une source potentielle de l'infection (Crawford et al., 1990).

II.5.2. Epidémiologie synthétique

Les causes les plus fréquentes de la contamination d'un cheptel indemne sont l'introduction d'un animal infecté inapparent et les contaminations de voisinage. La contamination de l'environnement, locaux d'élevages, pâturages et la conservation de jeunes femelles nées de mère infectée sachant que 5 à 10 % hébergent des brucelles, est aussi à l'origine d'une résurgence de la maladie dans les cheptels assainis. D'autres espèces sont parfois incriminées, en particulier les ovins et les caprins (Casao et al., 2003). Une fois introduite dans un cheptel, l'infection peut s'étendre à la majorité des animaux notamment en période de mise-bas et la maladie peut s'exprimer sous des visages très variés, avortement en série affectant soudainement une large fraction du cheptel (avortement épizootique) ou propagation progressive à la majorité des animaux, associée ou non à des avortement, révélée par des contrôles sérologiques. La maladie devient enzootique, matérialisée par des avortements sporadiques et des rétentions placentaires (Akakpo and Bornarel, 1987).

II.6. Pathogénie

Les étapes initiales de l'établissement de l'infection brucellique sont peu connues. Comme dans toute maladie infectieuse, l'initiation de l'infection dépend de facteurs liés à la bactérie (dose, virulence), à l'hôte (résistance naturelle, âge, sexe, état physiologique) et à l'environnement. La voie de contamination principale au cours de la brucellose est vraisemblablement digestive (Lefèvre et al., 2003). Mais les *Brucella* peuvent aussi pénétrer au niveau de la muqueuse du nasopharynx, des conjonctives, et par voie génitale, mais également par des abrasions ou des lésions cutanées (Enright, 1990).

L'infection brucellique est une infection chronique qui évolue en deux périodes :

II.6.1. Période primaire

Après la contamination, les *Brucella* se multiplient dans les nœuds lymphatiques drainant le site d'inoculation, où les bactéries peuvent persister pendant très longtemps. Si les *Brucella* ne sont pas éliminées, il se produit une dissémination, par voie lymphatique et dans une moindre mesure par voie sanguine sous forme intracellulaire dans des neutrophiles et des macrophages, cette bactériémie va mener à l'infection de nombreux tissus, tissus lymphoïdes, surtout les nœuds lymphatiques de la sphère génitale, placenta des femelles gravides, testicules et leurs annexes, glande mammaire, bourses séreuses et synoviales et certaines articulations (Ko and Splitter, 2003). *B. abortus* a un Tropicisme fort à l'utérus pendant le dernier trimestre de la gestation, ce qui est pensé pour être en raison d'une forte concentration des hormones stéroïdes et l'érythritol. L'érythritol favorise la survie bactérienne, car il peut être métabolisé par *B. abortus* comme source de carbone et d'énergie (Samartino and Enright, 1992).

II.6.2. Période secondaire

Cette période secondaire est caractérisée soit par la disparition de *Brucella* (guérison), l'infection est généralement bien contrôlée par le système immunitaire conduisant à l'élimination plus ou moins rapide de la bactérie (Nicoletti, 1980), ou le plus souvent cette période secondaire est caractérisée par la persistance des *Brucella* à l'état latent dans les ganglions lymphatiques (surtout les ganglions rétro-mammaires ou iliaques), la réactivation de l'infection reste alors possible souvent de manière intermittente, lors de prochaines gestations avec ré-invasion de l'utérus gravis mais sans avortement, par la suite une certaine résistance locale est acquise, limitant l'intensité de la multiplication bactérienne et ce manifeste par une rétention placentaire et quelques stérilités (Gross et al., 2000). Cette persistance dans les ganglions est due à la capacité de la bactérie à survivre et à se multiplier dans les cellules phagocytaires, en particulier les macrophages. Classiquement, il est décrit que *Brucella* inhibe la fusion phagolysosomiale dans les macrophages, ainsi que la dégranulation dans les polynucléaires neutrophiles, il se produit ensuite une acidification de la vacuole de phagocytose, qui induit l'expression d'un système de sécrétion de type IV, essentiel à la virulence des *Brucella*. Il a été montré que cette acidification est importante pour la survie des *Brucella* dans les macrophages. Les *Brucella* secrètent également un facteur empêchant l'apoptose des macrophages infectés. Ainsi, *Brucella* semble avoir su développer

des mécanismes lui permettant de bloquer les défenses de l'hôte et donc d'augmenter ses chances de survie intracellulaire (Gross et al., 2000).

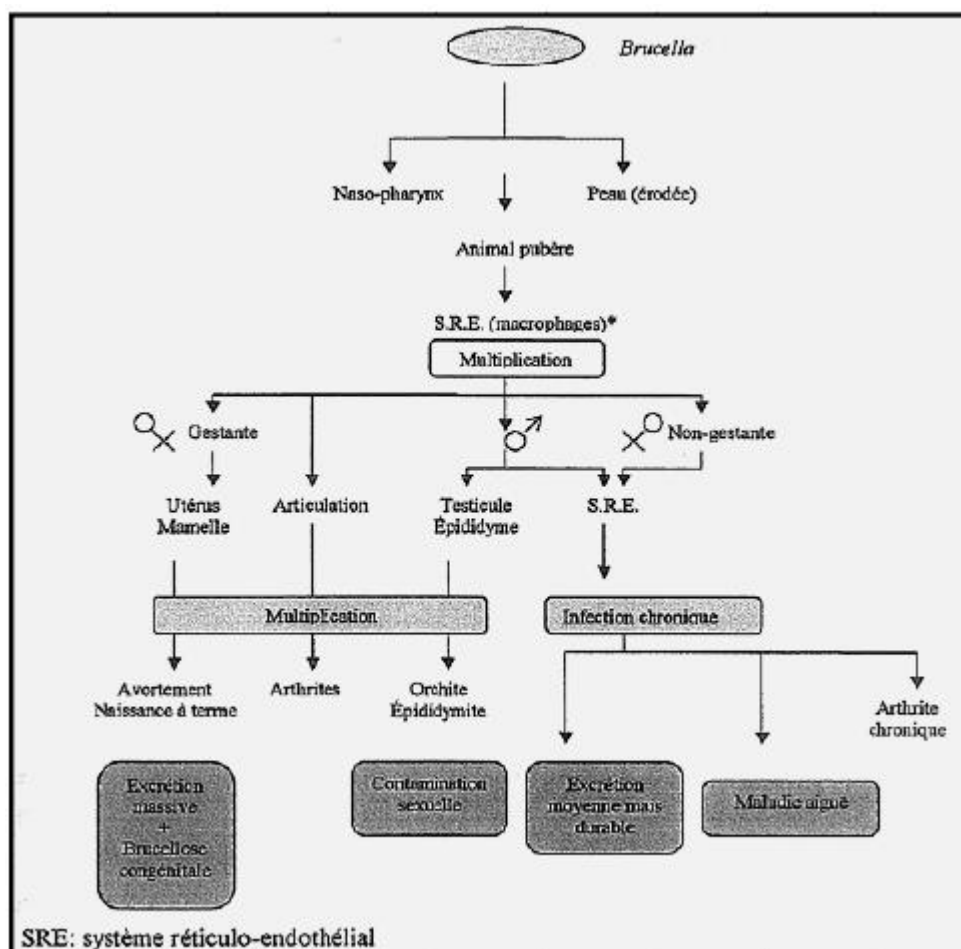


Figure 1 : évolution de la brucellose chez l'animal (Garin-Bastuji, 1993)

II.7. Mécanisme de l'avortement

L'avortement est le plus souvent provoqué par une placentite exsudative et nécrotique, due à la multiplication des *Brucella* dans l'espace utéro-chorial. En effet, cette inflammation entraîne un décollement utéro-chorial, ainsi que des adhérences fibreuses entre l'utérus et le placenta. Lorsque ces lésions sont étendues, elles empêchent donc les échanges nutritifs et le fœtus meurt d'anoxie, engendrent l'avortement. Si les lésions sont plus limitées, l'infection placentaire autorise alors la survie du fœtus, mais le nouveau-né meurt généralement dans les 48 heures après la mise-bas, à cause des lésions cérébrales d'origine hypoxique. Enfin, les adhérences utéro-placentaires sont souvent responsables de rétentions placentaires chez les femelles infectées (Ammar, 2000).

II.8. Réaction de l'organisme à l'infection

Les défenses spécifiques de l'hôte contre *Brucella* sont similaires à celles engagées contre les autres bactéries intracellulaires et mettent en jeu deux types de mécanismes immunitaire : une immunité à médiation humorale, mettant en jeu les anticorps et une immunité à médiation cellulaire. Les *Brucella* sont des bactéries intracellulaires facultatives du monocyte-macrophage (Gross et al., 2000). Le LPS, contrairement à la majorité des protéines, est un antigène dit « T-indépendant ». Ceci signifie que la production d'anticorps dirigés contre le LPS ne dépend pas du développement d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Par opposition la production d'anticorps dirigés contre des antigènes T-dépendants fait suite à l'introduction d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Cela signifie notamment que ces antigènes sont présentés en association avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité aux lymphocytes T (Lefèvre et al., 2003).

II.8.1. Réponse humorale

Se définit par l'apparition d'anticorps post-infectieux présents dans le sérum et diverses sécrétions, lait, mucus vaginal et sperme, et décelables grâce à diverses réactions sérologiques. Cependant, les taux d'anticorps mis en évidence par les différentes réactions sérologiques n'ont aucune valeur immunogène, ce sont simplement les témoins de l'infection ou de la vaccination. La réponse humorale dirigée contre *Brucella* est généralement similaire dans toutes les espèces animales infectées. Cette réponse est principalement dirigée contre l'antigène majeur de *Brucella*, à savoir son LPS et le plus particulièrement sa chaîne O. La production d'anticorps dirigés contre des protéines de *Brucella* a également été décrite (Letesson et al., 1997). Les anticorps dirigés contre la chaîne O du LPS jouent un rôle majeur dans l'induction d'une protection, grâce à son intervention dans la lyse bactérienne par la voie classique du complément et par l'opsonophagocytose, la bactérie opsonisée est rapidement phagocytée. Vue la résistance des *Brucella* à l'activité bactéricide des macrophages et malgré l'activité accrue des phagocytes, l'accroissement de la phagocytose pourrait avoir comme conséquence une extension possible de l'infection dans l'organisme de l'hôte (Lefèvre et al., 2003).

Chez l'animal pubère, les anticorps sont décelables au bout de 4-10 semaines en moyenne. Les IgM sont les premiers isotypes produits après une forte infection initiale ou une vaccination, leur concentration maximale est observée 15 jours après le début de la réaction sérologique et ils disparaissent en quelques jours. La réponse en IgG1 apparaît après les IgM,

leur concentration maximale est observée 30 à 40 jours après le début de la réponse sérologique, ces IgG1 se maintiennent longtemps, 2-3 ans en moyenne, ce sont les seuls anticorps éventuellement décelables lors d'une brucellose chronique ou chez les animaux anciennement infectés. Les IgG2 augmentent pendant la parturition à cause d'un transfert important des IgG1 dans le colostrum, ils persistent plusieurs mois, mais leur titre subit d'importantes fluctuations, rendant parfois et temporairement leur détection impossible (Ganière, 2005). La mise en évidence des immunoglobulines (Ig) spécifiques dans le lait est possible très précocement après l'infection, les isotypes les plus importants correspondent aux IgA sécrétoires produits localement dans la mamelle ; IgA, IgM qui proviennent de la circulation sanguine sont en quantité beaucoup plus faible. En cas d'infection localisée au niveau de la mamelle, il est possible de mettre en évidence une quantité appréciable d'anticorps dans le lait en absence de réaction sérologique détectable à partir de sérum par l'épreuve de l'anneau « Ring-test » utilisé pour mettre en évidence les agglutinines dans le lait. Certains animaux atteints de brucellose chronique peuvent ne posséder aucun anticorps décelable (Roux, 1989).

Tableau 3 : Effecteurs de la réponse humorale contre la brucellose

Immunoglobulines détectées				
Tests	IgG1	IgG2	IgM	IgA
SAW	-	+	+	-
EAT	+	-	+	-
FC	+	-	+/-	-
ELISA	+	+	+/-	+/-
ELISA lait	+/-	+/-	++	++

II.8.2. Réaction cellulaire

Lors d'une infection par *Brucella*, on observe également le développement d'une immunité à médiation cellulaire (IMC). Cette réponse est dirigée exclusivement contre les protéines (Lefèvre et al., 2003). Des études faites ont montré que les macrophages infectés par *Brucella* produisent plusieurs cytokines comme le TNF- α qui joue un rôle dans le contrôle précoce de l'infection et n'a aucune importance dans le développement d'une IMC. L'IL-12 semble être la cytokine-clé pour le déclenchement d'une IMC, parce que sa diminution provoque une exacerbation de l'infection et une inhibition de la production antigénospécifique d'interféron-gamma (IFN- γ) par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Zhan et al., 1996). Lors d'infection par des bactéries intracellulaires comme le cas des *Brucella*, on observe une réponse

immunitaire de type 1 (différentiation des lymphocytes précurseurs (Tp) en lymphocytes de type 1 (T1)) qui est caractérisée par la production d'IFN- γ , d'IL-2 et d'IgG2a, ces lymphocytes T1 comprennent à la fois des lymphocytes CD4⁺ (ou Th 1 pour « helper ») et des lymphocytes CD8⁺ (ou Tc pour « cytotoxique ») qui sont importantes dans le contrôle d'une infection par *Brucella* (Oliveira and Splitter, 1995). L'IFN- γ , produit par les lymphocytes Th1 et Tc, joue également un rôle crucial dans le contrôle d'une infection par *Brucella* par son stimulation aux macrophages en augmentant leur potentiel bactéricide et la production de radicaux libres et de TNF- α et il induit le changement isotypique caractéristique d'une réponse de type 1, la production d'IgM est remplacée par la production d'IgG2a et d'IgG3, ces deux classes d'anticorps sont de très bons activateurs du complément et présentent une forte affinité pour les récepteurs Fc, ce qui facilite la phagocytose de *Brucella* opsonisées (Fernandes et al., 1996). Les *Brucella* peuvent activer des cellules NK en activant les cellules présentatrices d'antigène à sécréter l'IL-12. De plus, les cellules NK peuvent, à elles seules, éliminer les cellules cibles infectées. Il est possible de mettre en évidence l'immunité cellulaire par la réaction d'hypersensibilité retardée suite à l'injection dans le derme d'antigènes de *Brucella*. La spécificité élevée de l'HSR est démontrée à maintes reprises et s'il ne permet pas de dépister tous les animaux infectés, aucune réaction positive n'est observée chez les animaux sains (Lefèvre et al., 2003)(Freney et al., 2007).

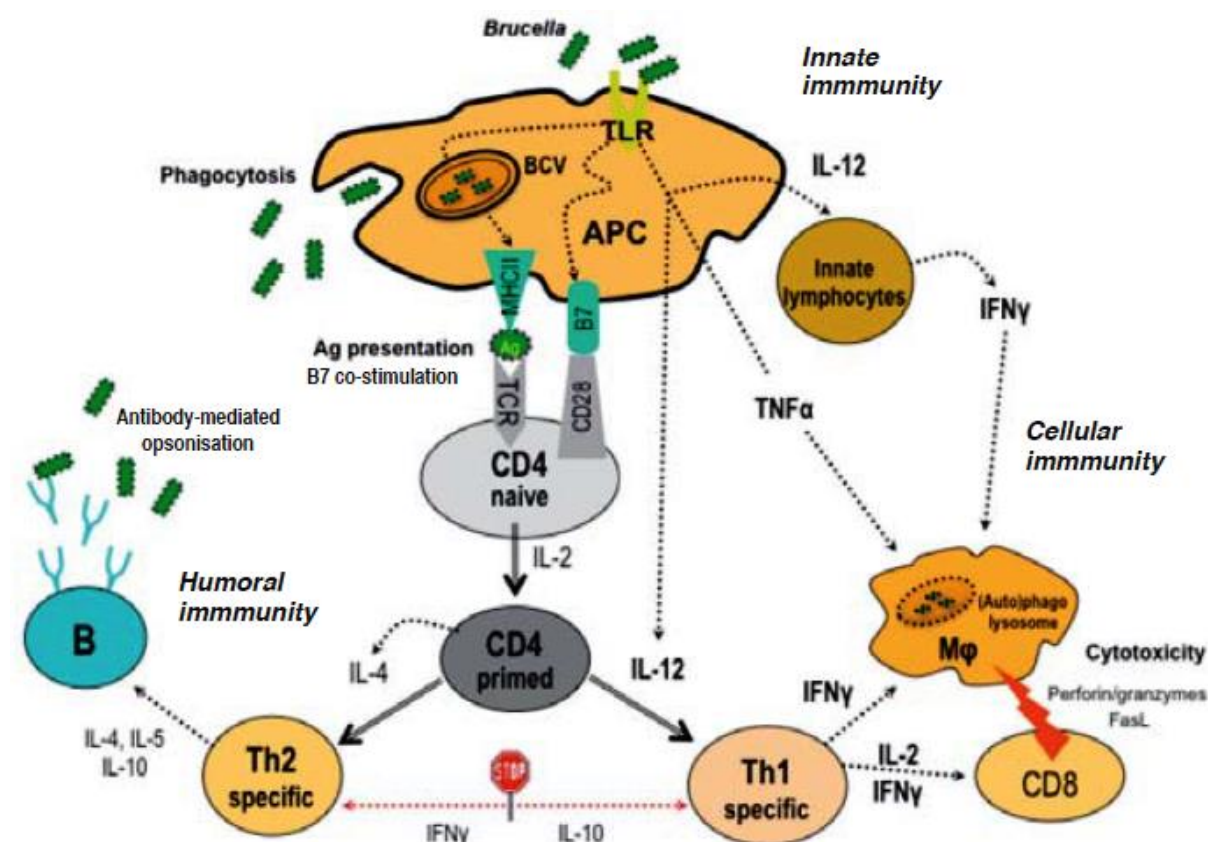


Figure 2 : Représentation simplifiée de la réponse immunitaire contre *Brucella* (Skendros and Boura, 2013).

Ag: antigène
 APC: cellule présentatrice d'antigène
 B7: molécules co-stimulatrices CD80 / CD86
 BCV: vacuole contenant *Brucella*
 CTL: lymphocyte cytotoxique
 IFN γ : interféron gamma
 IL: interleukine
 MHC II: complexe majeur d'histocompatibilité type II
 TCR: récepteur des cellules T
 TLR: Toll-like récepteur
 TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha

La phagocytose et / ou la signalisation de reconnaissance de motif (par exemple TLR) conduisent à l'activation de APC et à l'amorçage de lymphocytes T CD4 + naïfs vers un phénotype Th1 (immunité innée). Les cytokines de Th1 (TNF α , IFN γ) améliorent les mécanismes anti-*Brucella* des macrophages (M ϕ) et induisent la cytotoxicité à médiation par les CTL CD8 + contre le M ϕ infecté par *Brucella* (immunité cellulaire spécifique). Les lymphocytes innés sont des premiers producteurs d'IFN γ , qui relie l'immunité innée à la spécifique. La réponse Th2 active les lymphocytes B (B) pour la production d'anticorps, facilitant la phagocytose de *Brucella* par opsonisation (immunité humorale spécifique). Les

cytokines Th2 (par exemple IL-10) inhibent l'action des cytokines Th1 (par exemple IFN γ) et vice versa (Skendros and Boura, 2013).

II.9. Etude clinique

Après une période d'incubation qui varie de 2 semaines à 6 mois, le symptôme le plus important lors de la brucellose bovine chez les femelles gestantes est l'avortement qui intervient généralement entre le 5^{ème} et le 7^{ème} mois de la gestation lorsque la génisse est infectée au moment de la saillie ou au tout début de la gestation. Si l'infection a lieu dans la seconde moitié de la gestation, la vache infectée peut ne pas avorter mais donner naissance à un veau infecté, le nouveau-né peut succomber néanmoins dans les 24 à 48 heures du fait des lésions nerveuses secondaires à une hypoxie, s'il s'agit d'une femelle, celle-ci peut ne pas présenter d'anticorps spécifiques pendant plus de 18 mois, avant d'avorter à sa première gestation (Enright, 1990). Le pourcentage d'avortement est compris entre 50 et 70 % dans un troupeau n'ayant jamais été en contact avec l'agent pathogène. Quatre-vingts pour cent des femelles infectées n'avortent qu'une fois. Suite à l'avortement, une rétention placentaire suivie de métrite peut survenir. Chez la vache infectée, la production laitière peut chuter de 25 %, il n'y a pas de mammite apparente et le pis est normal à la palpation (Lefèvre et al., 2003). Les taureaux peuvent présenter une orchite uni ou bilatérale, une épididymite et une atteinte des vésicules séminales aigue ou chronique. Les *Brucella* se localisent dans les nœuds lymphatiques supra-mammaires et les glandes mammaires de 80 % des animaux infectés (Hamdy and Amin, 2002). Des hygromas uni-ou bilatéraux, en particulier au niveau de l'articulation du carpe peuvent se rencontrer chez 66 % des animaux lors d'infection chronique (Godfroid et al., 2005).

Chez les ovins, les avortements apparaissent massivement dans les troupeaux lors de la primo-infection avec 50 % à 90 % des brebis gravides alors, qu'une année plus tard on observe une « rémission » avec 10 % d'avortements. La troisième année, l'agnelage est pratiquement normal, la brebis et le nouveau-né restent toujours source de contagion via les sécrétions, d'où risque de contamination pour les animaux et l'homme, dans les troupeaux où la brucellose évolue de façon chronique, l'homme reste le seul révélateur de la maladie. L'avortement touche principalement les femelles primipares à tous les stades de gestation, le plus souvent au cours du 3^{ème} ou du 4^{ème} mois de gestation, sous forme enzootique. Si certaines femelles mettent bas à terme, la mortalité périnatale est élevée, les nouveau-nés sont particulièrement affaiblis et meurent dans les 24h qui suivent la naissance, parfois en dépit de

l'infection ils peuvent survivre. Tandis que la mortalité néonatale reste toujours élevée (Brugère-Picoux, 2004).

Chez les brebis, la rétention placentaire est moins fréquente que chez les bovins, et la stérilité temporaire reste fréquente, même en l'absence de rétention placentaire, elle peut toucher 10% des femelles dans un troupeau la première année d'infection. Il peut y avoir d'autres localisations tel que les mammites, elle peut affecter de nombreux sujets, et contrairement aux bovins, les mammites peuvent atteindre le stade clinique traduit par la formation de nodules inflammatoires ayant le volume d'une noix, lait grumeleux, et la production laitière est significativement diminuée avec présence du germe dans le lait. Les brebis sont rarement atteintes par des arthrites et bursites (Cutler, 2005). Chez les mâles, l'infection demeure généralement inapparente, il est possible néanmoins d'observer des cas d'orchite, d'épididymite ou une baisse de fertilité (Acha and Szyfres, 2005).

II.10. Diagnostic

Le diagnostic correspond à l'identification d'une maladie chez un sujet présentant des troubles (Toma et al., 1996).

II.10.1. Diagnostic clinique

Un avortement chez la femelle, une orchite ou une épididymite chez le male doivent faire penser à la brucellose. D'autres éléments de suspicion peuvent être des arthrites, hygromas, rétentions placentaires, métrites ou mammites, troubles de la reproduction. Il doit se rappeler que le seul signe clinique évident de la brucellose chez les animaux domestiques est l'avortement, et ce n'est pas pathognomique. Le diagnostic peut seulement être fait sur la base de l'essai en laboratoire, de la démonstration de l'organisme causal, et de la détection des niveaux significatifs de l'anticorps spécifique étant des méthodes complémentaires pour le diagnostic (MacMillan, 1990).

II.10.2. Diagnostic expérimental

III.10.2.1. Diagnostic direct

Il devrait être mis en œuvre dans toutes les situations ou contextes épidémiologiques évocateurs de brucellose, en l'occurrence, avortement, suspicion à l'abattoir, diagnostic douteux (Garin-Bastuji, 1993).

Le diagnostic bactériologique et moléculaire de la brucellose est détaillé dans le chapitre I (étude de l'agent pathogène).

II.10.2.2. Diagnostic indirect

II.10.2.2.1. Diagnostic sérologique

Le diagnostic et le dépistage sérologique sont très utilisés, sur sérum ou lait. Les anticorps détectés sont ceux dirigés contre les épitopes du LPS, ce qui entraîne des problèmes de parenté entre *Brucella abortus* et d'autres bactéries (*Yersinia enterocolitica* O :9, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O :157, *Salmonella urbana* et *Pseudomonas maltophilia*). De plus, l'intensité et la durée de la réponse humorale sont très variables en fonction des individus et des doses infectieuses. Mais aucun de ces tests ne détecte tous les animaux infectés (Garin-Bastuji, 1993). Il existe dans la littérature scientifique de très nombreux tests de diagnostic, plus ou moins fiables, plus ou moins compliqués. Nous détaillerons les plus classiques, épreuve à l'antigène tamponné (test au Rose-Bengale), séroagglutination de Wright, fixation du complément, ring-test, ELISA

II.10.2.2.1.1. L'épreuve à l'antigène tamponné (EAT, Card-test, Rose-Bengale)

L'antigène utilisé est une suspension de *Brucella abortus* (souche 99) 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 (Alton et al., 1988). 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 un 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 (Oie, 2009a). Ce test permet le diagnostic sérologique des brucelloses (*melitensis*, *suis*, *abortus*) sur lame, en milieu acide tamponné (Ph 3,65 ± 0,05). Les immunoglobulines responsables de la réaction sont les IgG1 et les IgM. C'est l'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. S'il n'y a pas d'anticorps spécifiques, le mélange reste homogène (Fensterbank, 1986). Le test au Rose-Bengale donne des réactions fausse positives avec des sérums des animaux infectés par *Yersinia entérocolitica* O :9 (Diaz and Moriyon, 1989).

II.10.2.2.1.2. Réaction de fixation du complément (FC) (Un test recommandé pour le commerce international)

C'est une méthode réglementaire de confirmation largement utilisée pour le diagnostic de la brucellose. Ce test détecte principalement la présence des IgG1, mais également des IgM. Il est considéré comme le plus spécifique en matière de brucellose. La fixation du complément présente l'inconvénient d'être délicate et longue à exécuter et nécessitant le travail d'un technicien entraîné, ce qui ne permet malheureusement pas souvent son utilisation comme épreuve de base. (Garin-Bastuji, 1993). Il existe de nombreuses variantes du CFT en cours d'utilisation, mais ce test est le plus commodément réalisé dans un format de microtitre. Une fixation chaude ou froide peut être utilisée pour l'incubation du sérum, de l'antigène et du complément: 37 °C pendant 30 minutes ou 4 ° C pendant 14-18 heures. Un certain nombre de facteurs influent sur le choix de la méthode: l'activité anti-complémentaire dans les échantillons de sérum de mauvaise qualité est plus évidente avec la fixation à froid, tandis que la fixation à 37 ° C augmente la fréquence et l'intensité des prozones et un certain nombre de dilutions doivent être testées pour chaque échantillon (Oie, 2009a).

II.10.2.2.1.3. Séro-agglutination de Wright ou séroagglutination lente en tubes (SAW)

Ancêtre des épreuves sérologiques et toujours largement utilisée. La SAW met en évidence les anticorps des classes IgG2 et IgM, ce test trouve son intérêt dans les cas de brucellose aiguë et subaiguë. La SAW dépiste parfois tardivement les animaux récemment infectés et de ne pas bien détecter l'infection chronique, ou de ne la détecter que par des titres bas et difficiles à interpréter, ce dernier défaut paraît particulièrement grave quand on connaît la chronicité habituelle de la brucellose (Alton, 1990).

II.10.2.2.1.4. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Divisé en ELISA indirecte et ELISA compétitive. Ce test a été décrit et utilisé initialement par

Nielsen et Wright (Dohoo et al., 1986). Les recherches ont conduit à développer l'ELISA pour la détection des anticorps sur le sérum et sur le lait (Nielsen et al., 1988). Pour la réalisation de ce test, le LPS de *Brucella* fourni est fixé sur les parois des puits des microplaques en polypropylène. Les sérums ou laits à tester sont dilués et mis à incuber dans les puits. S'il y a des anticorps spécifiques, il se forme alors des complexes LPS/anticorps fixés sur les puits. Après lavage, une immunoglobuline anti-anticorps dirigée contre une ou plusieurs classes d'immunoglobulines (IgG, IgM, IgA) 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. L'intensité de la coloration mesure le taux d'anticorps présents dans l'échantillon (Lucero et al., 2003). L'ELISA indirecte est un test très sensible mais il ne permet pas toujours de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés et est plutôt utilisé en dépistage alors que l'ELISA compétitive est lui très spécifique et évite la plupart des réactions dues aux anticorps vaccinaux et capable aussi de distinguer la réponse due aux réactions croisées des bactéries (Oie, 2009a).

II.10.2.2.1.5. Ring-test (RT) ou épreuve de l'anneau

C'est un test également largement utilisé. Il détecte les immunoglobulines du lait, soit provenant du sang par filtration (IgM), soit produites localement dans la mamelle (IgA) (Fensterbank, 1986). Chez les animaux en lactation, le MRT peut être utilisé pour le dépistage des troupeaux de brucellose. Dans les grands troupeaux (> 100 vaches en lactation), la sensibilité du test devient moins fiable. Le MRT peut être ajusté pour compenser le facteur de dilution des échantillons de lait en vrac provenant de grands troupeaux. Les échantillons sont ajustés selon la formule suivante: taille du troupeau <150 animaux, l'utilisation de 1 ml de lait en vrac, 150-450, l'utilisation de 2 ml d'échantillon de lait, 451-700, l'utilisation de 3 ml d'échantillon de lait. Des réactions faussement positives peuvent apparaître chez les bovins vaccinés moins de 4 mois avant le test, dans des échantillons contenant du lait anormal (comme le colostrum) ou dans les cas des mammites. Par conséquent, il n'est pas recommandé d'utiliser ce test dans de très petites exploitations où ces problèmes ont un impact plus important sur les résultats des tests (Oie, 2009a). Ce test peut également être utilisé au niveau individuel et permet alors de rechercher les vaches responsables de la positivité du RT de mélange (Fensterbank, 1986).

II.10.2.2.1.6. Tests à base de protéines haptène et cytosol (Native hapten and cytosol protein-based tests)

Les tests d'haptènes natifs sont hautement spécifiques dans les contextes de vaccination S19 et ont été utilisés avec succès dans un programme d'éradication en combinaison avec la RBT comme test de dépistage. La sensibilité optimale (proche de celle du CFT mais inférieure à celle des i-ELISA à base de RBT et sLPS) est obtenue dans un système d'immunodiffusion radiale inverse (RID) dans lequel le sérum diffuse en un gel hypertonique contenant le polysaccharide (Diaz et al., 1979)(Jones et al., 1980). Cependant, la procédure de diffusion par double gel est également utile (López-Goñi et al., 2008)(Lord and Cherwonogrodzky, 1992). Les veaux vaccinés par voie sous-cutanée avec la dose standard de S19 à l'âge de 3 à 5 mois sont négatifs 2 mois après la vaccination et les bovins adultes vaccinés par voie sous-cutanée 4-5 mois précédemment avec la dose réduite de S19 ne donnent pas de réactions positives à moins que les animaux ne soient infectés et excréter le vaccin dans leur lait (Jones et al., 1980). La vaccination conjonctivale, à la fois chez les jeunes et les adultes, réduit le temps d'obtenir une réponse négative dans les tests d'haptène natifs. Une caractéristique remarquable du test RID est qu'un résultat positif est en corrélation avec l'excrétion de *Brucella*, comme le montrent les bovins infectés expérimentalement et les bovins infectés naturellement soumis à un traitement antibiotique (FAO/WHO, 1986). Les tests de précipitation utilisant des protéines de haptène native ou de cytosol de *Brucella* ont également montré éliminer, dans la plupart des cas, les réactions FPSR provoquées par *Yersinia enterocolitica* O: 9 et FPSR d'origine inconnue (Muñoz et al., 2005)

II.10.2.2.2. Diagnostic allergique (Test cutané de Brucellin)

Un autre test immunologique est le test cutané de la brucelline, qui peut être utilisé pour cribler des troupeaux non vaccinés, à condition qu'une préparation d'antigène purifiée (sans sLPS) et normalisée (par exemple l'INRA brucelline) soit utilisée (Oie, 2009a). Le test de la brucelline cutanée a une spécificité très élevée, de sorte que les animaux séropositifs non vaccinés qui sont des réacteurs positifs au test de brucellin doivent être considérés comme des animaux infectés. En outre, les résultats de ce test peuvent aider à l'interprétation des réactions sérologiques pensées comme FPSR en raison d'une infection par des bactéries réagissant de manière croisée, en particulier dans des zones indemnes de brucellose (Pouillot et al., 1997)(Saegerman et al., 1999)(De Massis et al., 2005). Il est essentiel d'utiliser une préparation de brucelline standardisée et définie qui ne contienne pas d'antigène sLPS, car

cela peut provoquer des réactions inflammatoires non spécifiques ou interférer avec des tests sérologiques ultérieurs. Une telle préparation est la brucelline INRA préparée à partir d'une souche brute de *B. melitensis* qui est disponible dans le commerce. Bien que le test intradermique de la brucelline soit l'un des tests les plus spécifiques de la brucellose chez les animaux non vaccinés, le diagnostic ne doit pas se faire uniquement sur la base des réactions intradermiques positives données par quelques animaux du troupeau, mais doit être confirmé par un test sérologique fiable. L'inoculation intradermique de la brucelline pourrait induire une anergie temporaire dans la réponse immunitaire cellulaire. Par conséquent, un intervalle de 6 semaines est généralement recommandé entre deux tests sur le même animal (Oie, 2009a).

II.11. Traitement

Les bactéries du genre *Brucella* sont sensibles aux antibiotiques, et notamment aux tétracyclines. Théoriquement, le traitement de la brucellose est possible. Cependant, l'administration d'antibiotiques est rigoureusement interdite par les autorités sanitaires en raison d'apparition de *Brucella* résistantes aux antibiotiques, dangereuses pour l'animal comme pour l'homme, ainsi que, l'absence de garantie quant au statut infectieux de l'animal traité (Lefèvre et al., 2003).

II. Vaccination

II.1. Vaccin S19

Le vaccin *Brucella abortus* S19, qui reste le vaccin de référence auquel tous les autres vaccins sont comparés, est le vaccin le plus largement utilisé pour la prévention de la brucellose chez les bovins. Il est utilisé comme vaccin vivant et est normalement administré aux génisses âgées de 3 à 6 mois sous la forme d'une seule dose sous-cutanée de $5-8 \times 10^{10}$ organismes viables. Une dose réduite de 3×10^8 à 3×10^9 organismes peut être administrée par voie sous-cutanée à des bovins adultes, mais certains animaux développent des titres d'anticorps persistants et peuvent avorter et excréter la souche vaccinale dans le lait (Stevens et al., 1994). Il peut être administré aux bovins de tout âge en une ou deux doses de 5×10^9 organismes viables, données par la voie conjonctivale; cela produit une protection sans une réponse humorale persistante et réduit les risques d'avortement et d'excrétion dans le lait lors de la vaccination des bovins adultes. Le vaccin *Brucella abortus* S19 induit une bonne immunité contre la provocation modérée par des organismes virulents (Oie, 2009a). La vaccination des

veaux avec une dose complète de vaccin S19 est considérée comme donnant une immunité à long terme, et les rappels ne sont pas recommandés. Cependant, il n'existe aucune preuve prouvée à ce sujet et la revaccination pourrait être souhaitable dans les zones endémiques.

II.2. Vaccin RB51

Depuis 1996, la souche RB51 de *B. abortus* est devenue le vaccin officiel contre la brucellose chez les bovins dans plusieurs pays (Schurig et al., 2002). Cependant, il existe un désaccord quant à la manière dont l'efficacité de la souche RB51 se compare à la protection induite par S19 chez les bovins (Stevens et al., 1994)(Stevens et al., 1995)(Uza et al., 2000)(Moriyon et al., 2004). Chaque pays utilise des méthodes légèrement différentes pour administrer le vaccin. Aux Etats-Unis, les veaux sont vaccinés par voie sous-cutanée entre les âges de 4 et 12 mois avec $1-3.4 \times 10^{10}$ souches viables RB51 organismes. La vaccination des bovins âgés de plus de 12 mois n'est effectuée qu'avec l'autorisation des autorités sanitaires nationales ou fédérales et la dose recommandée est de $1 \text{ à } 3 \times 10^9$ souches viables RB51 (Olsen, 2000). Dans d'autres pays, il est recommandé de vacciner les bovins à l'âge de 4-12 mois avec une dose de $1-3.4 \times 10^{10}$, avec une revaccination à partir de 12 mois avec une dose similaire pour provoquer un effet de rappel et augmenter l'immunité (Samartino et al., 2000)(Schurig et al., 2002). Il a été rapporté que des doses complètes de RB51 lorsqu'elles sont administrées par voie intraveineuse chez le bétail provoquent une placentite sévère et une infection placentaire chez la plupart des bovins vaccinés (Palmer et al., 1996), et qu'il y a excrétion dans le lait chez un nombre pertinent d'animaux vaccinés. L'expérience acquise sur le terrain indique également qu'elle peut induire l'avortement dans certains cas si elle est appliquée à des bovins gravides. En raison de ces observations, la vaccination des bovins gravides doit être évitée. Une façon de réduire les effets secondaires de RB51 est de réduire la dose. La durée de l'immunité induite par le vaccin RB51 chez les bovins est inconnue, quelle que soit la dose appliquée et l'âge à la vaccination (Oie, 2009a).

II.3. Vaccin Rev1

Le vaccin le plus largement utilisé pour la prévention de la brucellose chez les ovins et les caprins est le vaccin *Brucella melitensis* Rev.1, qui reste le vaccin de référence avec lequel tous les autres vaccins doivent être comparés. Le vaccin RB51 n'est pas efficace chez les moutons contre l'infection par *B. melitensis* (el Idrissi et al., 2001). Le vaccin Rev.1 est utilisé comme suspension lyophilisée de la souche vivante de *B. melitensis* biovar 1 Rev.1 pour

l'immunisation des ovins et des caprins. Il doit normalement être administré aux agneaux âgés de 3 à 6 mois sous la forme d'une seule inoculation sous-cutanée ou conjonctivale. La dose standard est comprise entre $0,5 \times 10^9$ et $2,0 \times 10^9$ organismes viables. La vaccination sous-cutanée induit de fortes interférences dans les tests sérologiques et ne devrait pas être recommandée dans les programmes d'éradication combinés. Cependant, lorsque ce vaccin est administré par voie conjonctivale, il produit une protection similaire sans induire une réponse anticorps persistante, facilitant ainsi l'application de programmes d'éradication combinés à la vaccination (Diaz-Aparicio et al., 1994)(Marín et al., 1999). Des précautions doivent être prises lors de l'utilisation du vaccin Rev.1 afin d'éviter tout risque de contamination de l'environnement ou d'infection humaine. Dans de nombreux pays en développement et zones d'endémie, la vaccination de toute la population doit être considérée comme la meilleure option pour le contrôle de la maladie. Cependant, on sait que le vaccin Rev.1 cause souvent des avortements et il est excrété dans le lait lorsque les animaux sont vaccinés pendant la grossesse, soit avec une dose complète ou réduite. Ces effets secondaires sont considérablement réduits lorsque les animaux adultes sont vaccinés par voie conjonctivale (dose complète) avant l'accouplement ou pendant le dernier mois de grossesse. Par conséquent, lorsque la vaccination de masse est le seul moyen de lutter contre la maladie, une campagne de vaccination doit être recommandée en utilisant la dose standard de Rev.1 administrée par voie conjonctivale en dehors de la période de gestation (Blasco, 1997).

La vaccination sous-cutanée de jeunes animaux et la vaccination d'animaux adultes, même à doses réduites, peuvent conduire à une persistance à long terme d'anticorps vaccinaux chez une proportion significative d'animaux vaccinés, ce qui crée de sérieuses interférences dans le diagnostic sérologique de la brucellose. Comme indiqué ci-dessus, la vaccination conjonctivale minimise ces problèmes et est donc la méthode recommandée pour les programmes d'éradication combinés. Par conséquent, le diagnostic sérologique de la brucellose doit tenir compte de l'état vaccinal du troupeau et de la distribution générale de la fréquence des titres d'anticorps détectés dans le groupe d'animaux testés (Oie, 2009b).

III. La brucellose humaine

La brucellose est une zoonose mondiale avec un degré élevé de morbidité chez l'homme. Selon les données de l'OMS, environ 500 000 cas de cette maladie sont enregistrés dans le monde chaque année (Corbel, 1997). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la brucellose due à *B. melitensis* entraîne plus de cas humains et de dépenses de santé que n'importe qu'elle autre brucellose (Lefèvre et al., 2003).

L'épidémiologie de la maladie humaine est étroitement liée à l'infection animale. *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* sont les espèces le plus souvent en cause en pathologie humaine, *B. melitensis* étant responsable des infections les plus graves. La brucellose humaine demeure endémique dans certains pays du bassin méditerranéen, au Moyen Orient, en Asie de l'Ouest et dans certains pays d'Afrique et d'Amérique latine (Maurin, 2005).

Bien qu'elle soit endémique dans de nombreux pays en développement, la brucellose reste sous-diagnostiquée et sous-déclarée (Godfroid et al., 2005). En outre, la brucellose étant une cause importante de morbidité et de mortalité vétérinaires, la maladie peut aussi entraîner d'importantes pertes économiques dans les pays en développement (Colmenero Castillo et al., 1989).

III.1. Mode de contamination

L'homme se contamine par la brucellose animale par différents modes, contact direct avec l'animal, consommation du lait ou des produits laitiers contaminés. Il ne faut pas oublier le risque de contamination dans les laboratoires de biologie lors de manipulation des *Brucella*. La transmission interhumaine n'existe pas, sauf dans de très rares cas d'exposition au sang, d'exposition directe à des tissus infectés, par un contact sexuel, ou par allaitement maternel (Abadia and Picu, 2005).

III.1.1. Contamination cutanéomuqueuse

Elle représente la voie essentielle des contaminations professionnelles de la filière animale, vétérinaires, éleveurs, bergers, ouvriers de l'abattoir, qui manipulent les animaux infectés, avortons, sécrétions vaginales, annexes et placentas. Cette voie est dominante, favorisée par le travail à mains nues, à travers des excoriations de la peau des mains, de la muqueuse buccale ou nasale par l'intermédiaire des mains souillées, car même la peau saine est une barrière facilement franchie (Grammont-Cupillard et al., 1996).

III.1.2. Contamination respiratoire et conjonctivale

La persistance des *Brucella* excrétées par les animaux malades, dans les poussières expliquent la possibilité de contamination par voie aérienne ou par voie conjonctivale (Grammont-Cupillard et al., 1996).

III.1.3. Contamination alimentaire

Le lait cru de vache, de brebis, chèvre, et de chamelle et de ses dérivés sont les principaux produits alimentaires vecteurs de *Brucella*. Par contre, bouillis ou pasteurisés selon des normes correctes, ils ne présentent pas de danger (Acha and Szyfres, 2005). La contamination humaine par la consommation de viande est exceptionnelle, seul la consommation de produit cru pouvant être dangereuse. Les *Brucella* restent vivantes dans la viande congelée pendant plusieurs mois (Roux, 1989).

III.1.4. Autres modes de contagion

Les contaminations au laboratoire représentent une source importante d'infection, souillure des mains, portage buccal, et/ou inhalation (Breton et al., 1995). Les vétérinaires peuvent être contaminés accidentelle par les souches vaccinales. Cependant, une transmission sexuelle de la brucellose a été signalée quoique peu fréquente, il peut y avoir aussi une transmission par don de sang ou transplantation de tissus contaminés (Prescott et al., 2010).

Des données limitées soutiennent la transmission verticale de la brucellose humaine et transmission par le lait maternel (Navarro et al., 2002)(Wang et al., 2014), bien que la transmission intra-utérine, la transmission pendant l'accouchement et la transmission par le lait maternel soient effectivement parmi les principales voies de transmission dans les réservoirs de mammifères (Franco et al., 2007).

III.2. Pathogénicité et biologie de la brucellose

Les espèces de *Brucella* sont des bactéries intracellulaires facultatives qui peuvent se multiplier dans les cellules phagocytaires des êtres humains comme hôtes finaux. La brucellose peut pénétrer dans l'hôte par ingestion ou par inhalation, par abrasion de la conjonctive ou de la peau. Après avoir infecté l'hôte, le pathogène devient séquestré dans les cellules du système réticuloendothélial. Les mécanismes par lesquels *Brucella* pénètre dans les cellules et élude les tueries intracellulaires et le système immunitaire de l'hôte font l'objet de nombreuses recherches et débats. L'analyse en profondeur des génomes complets de

Brucella spp n'a permis d'identifier aucun des facteurs classiques de virulence tels que les toxines, les fimbrias et les capsules, ce qui soulève la possibilité que ces organismes utilisent des mécanismes uniques et subtils pour échapper aux défenses de l'hôte, pénétrer dans les cellules hôtes, altère le trafic intracellulaire pour éviter la dégradation et la destruction dans les lysosomes, et moduler l'environnement intracellulaire pour permettre à long terme la survie intracellulaire et la réplication (Delrue et al., 2004).

Les lipopolysaccharides lisses qui couvrent la bactérie et les protéines impliquées dans la signalisation, la régulation des gènes et le transport transmembranaire sont parmi les facteurs soupçonnés d'être impliqués dans la virulence de la brucellose (Lapaque et al., 2005).

Les recherches suggèrent que les lipopolysaccharides lisses et non endotoxiques aident à bloquer le développement de l'immunité innée et spécifique pendant le stade précoce de l'infection et à protéger l'agent pathogène des activités microbicides du système immunitaire. Les souches rugueuses (vaccin) (c'est-à-dire des souches avec un lipopolysaccharide dépourvu de la chaîne latérale O) sont moins virulentes en raison de leur incapacité à surmonter le système de défense de l'hôte (Porte et al., 2003).

Lipopolysaccharide lisse empêche la synthèse de médiateurs immunitaires et est beaucoup moins puissant que le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* dans l'induction de l'hôte à libérer des cytokines inflammatoires (Goldstein et al., 1992).

Le lipopolysaccharide lisse a également un rôle dans la pénétration cellulaire et l'évasion immunitaire de la cellule infectée. On pense que le lipopolysaccharide altère la capacité de la cellule infectée à présenter des antigènes étrangers au système de présentation d'antigène du CMH de classe II, empêchant ainsi l'attaque et la destruction de la cellule infectée par le système immunitaire (Forestier et al., 1999)(Lapaque et al., 2005).

En outre, un lipopolysaccharide lisse dans la brucelle peut être impliqué dans l'inhibition de l'apoptose (c'est-à-dire, la mort cellulaire programmée) des cellules infectées (Gross et al., 2000), Puisque la résistance à l'apoptose des cellules infectées a été observée chez les patients atteints d'une maladie aiguë et chronique (Tolomeo et al., 2003).

En revanche, les souches rugueuses ne confèrent pas la résistance des cellules hôtes à l'apoptose. Des souches de *brucella* lisse avec des mutations dans le gène de la phosphoglucomutase impliquées dans la synthèse de la chaîne O lipopolysaccharide montrent une atténuation profonde de la virulence (Lapaque et al., 2005)(Ugalde et al., 2003).

Le système de détection, le gène à deux composants BvrR / BvrS qui agit à travers une cascade de phosphorylation de protéine pour moduler l'expression génique bactérienne est considéré comme étant l'un des facteurs clés impliqués dans la modulation de la liaison et de

la pénétration des cellules. Le système BvrR / BvrS de *brucella* a un effet profond sur l'expression de diverses protéines de surface cellulaire comprenant Omp25 (également connu sous le nom Omp3a) et Omp22 (Omp3b) (Guzmán-Verri et al., 2002)(López-Goñi et al., 2002).

On pense que l'expression modifiée des protéines de surface permet aux brucelles de se lier aux cellules hôtes et de pénétrer dans celles-ci tout en s'échappant de la voie lysosomale, les mutants défectueux dans ce système présentant une pénétration cellulaire altérée et une destruction accrue par les phagolysosomes (Franco et al., 2007).

Dans d'autres bactéries pathogènes comme *Bordetella pertussis*, *Bartonella henselae*, *Helicobacter pylori* et *Legionella pneumophila*, le système de sécrétion de type IV (VirB), un système de pompage qui transporte sélectivement des protéines ou d'autres macromolécules à travers des membranes est essentiel pour la pathogénicité. La molécule transportée dans ces agents pathogènes est un facteur de virulence classique, tel qu'une toxine, qui est sécrétée dans la circulation sanguine ou injectée dans les cellules hôtes (O'Callaghan et al., 1999)(Boschiroli et al., 2002).

Dans la brucellose, VirB est considéré comme essentiel pour la survie intracellulaire; Cependant, le substrat effecteur transporté dans le cas de *brucella*, n'a pas encore été identifié et il est très peu probable que la molécule transportée soit un facteur de virulence classique. Le système de pompage VirB est construit à partir d'une série de protéines codées par l'opéron VirB. De nombreuses souches de *brucella* atténuées montrent des mutations au sein de l'opéron VirB, indiquant qu'un VirB intact est essentiel pour la virulence (Celli et al., 2005).

VirB semble avoir un rôle dans l'adhésion de la bactérie à la cellule hôte, l'entrée cellulaire, et il module le trafic intracellulaire et la réplication de la bactérie (Boschiroli et al., 2001)(Arenas et al., 2000).

Après la liaison aux macrophages, *brucella* est absorbée par des vésicules d'internalisation qui fusionnent normalement avec les endosomes. Après l'acidification, ces endosomes se lyse, détruisant leur contenu. On pense que l'acidification induit l'expression de VirB (Porte et al., 1999)(Arenas et al., 2000).

Le système VirB est suspecté d'interagir avec des composants du réticulum endoplasmique, neutralisant le pH et permettant aux brucelles de subir une division cellulaire régulée dans l'environnement sûr du réticulum endoplasmique (Boschiroli et al., 2002).

III.3. Diagnostic

III.3.1. Diagnostic clinique

La brucellose humaine présente un large éventail de manifestations cliniques, ce qui lui confère un rôle, à côté de la syphilis et de la tuberculose, parmi les «grands imitateurs» (Mantur et al., 2006)(Andriopoulos et al., 2007). Les caractéristiques cliniques de la brucellose dépendent du stade de la maladie et des organes et systèmes impliqués. *Brucella* a été signalée pour compromettre le système nerveux central et périphérique, et les systèmes, gastro-intestinal, hépatobiliaire, génito-urinaire, musculo-squelettique, cardiovasculaire et tégumentaire. Historiquement, seuls *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* ont été considérés comme des pathogènes humains, mais des rapports récents ont montré que les espèces de mammifères marins nouvellement reconnues ont un pouvoir zoonotique chez l'être humain (Sohn et al., 2003). La majeure partie de la brucellose humaine est causée par deux espèces: *B. melitensis* et *B. abortus*. Les différences cliniques entre les espèces sont difficiles à déterminer, étant donné que peu d'études ont comparé les manifestations cliniques causées par chaque espèce (Troy et al., 2005). En raison des manifestations cliniques variées de la brucellose, la pierre angulaire du diagnostic clinique réside dans la recherche d'une histoire détaillée, tout en accordant une attention particulière aux informations épidémiologiques. Une attention particulière doit être portée sur la détermination de la source de contamination, s'il s'agit de l'ingestion de produits laitiers contaminés ou contact avec des animaux infectés. Des entretiens détaillés avec les patients sont cruciaux pour le diagnostic de la brucellose humaine, en particulier dans les zones urbaines et non endémiques. Le diagnostic d'un patient atteint de brucellose devrait inciter le clinicien à prendre en considération le mode de transmission probable et éventuellement à amorcer le dépistage des contacts ayant eu la même exposition (par exemple, l'ingestion de produits laitiers contaminés ou l'exposition à des sources animales) (Almuneef et al., 2004). Des études cliniques ont montré que la fièvre est la caractéristique la plus courante de la brucellose, suivie d'une atteinte ostéo-articulaire, de la transpiration et d'autres symptômes. Lors de l'examen physique, les résultats les plus courants sont l'hépatomégalie et la splénomégalie, qui se produisent chez environ un tiers des patients. Une lymphadénopathie est observée chez environ 10% des patients. Les manifestations ostéoarticulaires (sacroiliite, spondylite, arthrite périphérique et ostéomyélite) représentent plus de la moitié des complications focales. Des complications génito-urinaires (orchépididymite, glomérulonéphrite et abcès rénal) peuvent être trouvées chez environ 10% des patients. Les découvertes neurologiques ne sont pas aussi rares qu'elles le sont souvent;

Une étude en Turquie a rapporté que dans une série de 305 patients atteints de brucellose, 20 (6,6%) patients présentaient une atteinte neurologique (Yetkin et al., 2006).

Les résultats neurologiques peuvent être divers et pourraient inclure des neuropathies périphériques, la méningoencéphalite, les crises ischémiques transitoires, les manifestations psychiatriques. Les manifestations muco-cutanées comprennent les lésions papuleuses érythémateuses, le purpura, les kystes dermiques. Les manifestations pulmonaires, y compris les épanchements pleuraux et les pneumonies, se retrouvent dans jusqu'à 16% des cas compliqués de brucellose (Kerem et al., 1994).

La leucopénie (11% des patients) et la thrombocytopénie (10% des patients) sont observées dans des fréquences similaires. L'anémie est observée plus fréquemment, touchant 26% des patients. Cependant, les résultats courants de la maladie peuvent varier selon les régions et les populations. L'endocardite avec la valve aortique étant la structure la plus communément affectée et l'implication multiple de valve étant commune dans ce sous-groupe de patients, est la complication la plus sérieuse, expliquant la plupart du taux de mortalité total de 5% de la brucellose humaine. La brucellose infantile mérite une mention spéciale. L'arthrose monoarticulaire (habituellement des genoux et des hanches) est la plus fréquente chez les enfants, alors que chez les adultes, la sacro-iliite est la plus fréquente (Franco et al., 2007).

III.3.2 Diagnostic de laboratoire

III.3.2.1. Diagnostic sérologique

III.3.2.1.1. Test d'agglutination du sérum

Le test d'agglutination du sérum (SAT) est réalisé en mélangeant des dilutions en série de sérum, habituellement 1:20 à 1: 2560, avec l'antigène *Brucella* dans des tubes à essai ou dans des puits d'une plaque ELISA. Après une nuit d'incubation, l'agglutination est lue soit à l'œil nu, soit sous une loupe. Des titres de 1: 160 ou au-dessus, sont considérés comme seuil de positivité. Dans les zones endémiques, le seuil de diagnostique devra être fixé à un titre de 1: 320, pour fournir une spécificité suffisamment élevée, car de nombreuses personnes asymptomatiques auront des titres égaux au seuil inférieur de 1: 160 (Martín et al., 1992). Parfois, le SAT est réalisé en présence des agents réducteurs 2-mercaptoéthanol (2-ME) ou dithiothréitol (DTT). Ces agents réducteurs détruisent l'activité agglutinante de l'immunoglobuline M (IgM) laissant les IgG intacts (Al Dahouk et al., 2003). Le test 2-ME ou SAT-DTT est utilisé pour augmenter la spécificité de la réaction en détectant uniquement les IgG, ce qui est important chez les patients ayant une infection plus persistante (Smits and

Kadri, 2005). Certaines réactions fausses négatives se produisent car certaines molécules d'IgG sont également sensibles à la réduction des ponts disulfure, les rendant incapables d'agglutiner, cependant, en général, la réduction des IgM augmente la spécificité (Nicoletti, 1969).

III.3.2.1.2. Test au rose Bengal

Le test d'agglutination des plaques de Bengale Rose (RBT) est un test rapide qui a été conçu à l'origine pour le dépistage en médecine vétérinaire, mais est maintenant souvent utilisé pour le diagnostic de la brucellose humaine (Morgan et al., 1969). Sa grande sensibilité, sa facilité et sa rapidité d'utilisation, ainsi que son faible coût, l'ont rendu très populaire dans les services d'urgence des hôpitaux pour le diagnostic des syndromes fébriles (Ruiz-Mesa et al., 2005).

Pour ce test, 30 µL de sérum sont déposés sur un carreau de céramique brillant blanc et mélangés avec un volume égal d'antigène RBT (préalablement équilibré à température ambiante et secoués pour resuspendre tout sédiment bactérien) en utilisant un cure-dent. La tuile est ensuite agitée à température ambiante pendant 8 minutes (au lieu des 4 minutes recommandées pour la brucellose animale) et toute agglutination visible est prise comme un résultat positif (George, 1999).

Les sérums positifs sont testés comme suit ; Huit gouttes de 30 µl de solution saline sont déposées sur la tuile et la première est mélangée avec un volume égal du sérum positif (dilution de sérum 1/2). Ensuite, 30 µl de cette première dilution sont transférés à la seconde goutte à l'aide d'une micropipette et mélangés pour obtenir la dilution 1/4. A partir de là, les dilutions 1/8 à 1/128 sont obtenues par transferts successifs en prenant soin de changer les embouts de pipette entre les transferts. Finalement, chaque goutte est testée avec un volume égal (30 µl) du réactif RBT, de sorte que les dilutions finales vont de 1/4 à 1/256 (Smits et al., 2003)(Díaz et al., 2006).

III.3.2.1.3. Test de Coombs

Pour ce test, des dilutions en série du sérum du patient sont préparées dans une solution saline rendant le volume final du sérum dilué dans chaque tube de 1 ml. Ensuite, 1 ml. de l'antigène de *B. abortus* (Serra and Vinas, 2004) est ajouté à chaque tube. Après mélange, l'incubation est effectuée à 37 ° C pendant 24 heures et à 5 ° C pendant 1 heure. Les tubes sont ensuite centrifugés à 4 000 tr / min. Pendant 15 minutes. Le surnageant est jeté. 2 ml de solution saline à 0,85% sont ajoutés aux sédiments. Après que les sédiments ont été remis en suspension par agitation, les tubes sont de nouveau centrifugés. Le lavage du sédiment est

effectué trois fois et le sédiment est ensuite remis en suspension dans 0,5 ml de solution saline. Le sérum de lapin anti-humanglobuline Coombs (0,1 ml) est ensuite ajouté à chaque tube ainsi qu'un tube témoin sans sérum immun. Après mélange, l'incubation est effectuée à 37 ° C pendant 30 minutes et l'agglutination est alors enregistrée (Wendell and Robert, 1952).

III.3.2.1.4. Test de Brucellacapt

Brucellacapt est un test breveté, et est une nouvelle forme d'essai d'agglutination pour tester les sérums vis-à-vis de la brucellose. Dans ce test, des échantillons de 0,050 ml de dilutions de sérum sont ajoutés aux puits d'une plaque de microtitrage en U revêtue d'une immunoglobuline anti-humaine totale. Ensuite, on ajoute 0,050 ml d'une suspension d'antigène (bactérie de *B. melitensis* colorée par traitement par l'aldéhyde formaldéhyde) à tous les puits. Les plaques sont scellées avec du ruban adhésif et incubées à 37 ° C pendant 24 heures dans une chambre humide foncée. Les réactions positives montrent l'agglutination sur le fond du puits. Les réactions négatives sont indiquées par une pastille au centre du fond du puits (Hasibi et al., 2013).

III.3.3. Culture

III.3.3.1. Techniques de culture conventionnelle

La culture à partir du sang d'un patient fournit une preuve définitive de la brucellose (Al Dahouk et al., 2003). Il existe une gamme de milieux de culture disponibles dans le commerce pour la culture de *Brucella*. Les milieux basaux les plus utilisés sont: Triptcase soja (BBL®), Bacto Tryptose (Difco®), Tryptic soja (Gibco®), Tryptone soja (Oxoid®). Le milieu en poudre peut être utilisé pour préparer un milieu de bouillon ou de gélose. Pour l'hémoculture et d'autres fluides corporels, on préfère utiliser un bouillon ou un milieu biphasique (Castaneda), principalement parce que *Brucella* est souvent présent en petit nombre. Pour les autres spécimens, les milieux solides avec 2,5% de gélose facilitent la reconnaissance des colonies et découragent la dissociation bactérienne. Le système à deux phases Castañeda est le plus pratique. Il se compose d'une bouteille qui contient à la fois du milieu solide et liquide avec 1-2% de citrate de sodium en phase liquide. Un inoculum de 5 à 10 ml est ajouté à la bouteille et incubé à 37 ° C en position verticale dans un récipient fermé ou un incubateur dans une atmosphère de dioxyde de carbone (CO₂) à 10%. Si aucune colonie n'est observée à la surface de la gélose, la bouteille doit être inclinée toutes les 24-48h pour permettre l'écoulement du bouillon sur la gélose. Les cultures positives peuvent être

évidentes en une ou deux semaines. Il est conseillé de ne pas rejeter les cultures qui restent négatives jusqu'à ce que quatre à six semaines se soient écoulées. Lorsque des colonies sont présentes, elles doivent être sous-cultivées pour examen et typage ultérieurs (De Santis et al., 2011).

III.3.3.2. Techniques d'hémoculture semi-automatisée

Avec le lancement de systèmes de culture sanguine automatisés, tels que BACTEC™ (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, Maryland, USA) et BacT / Alert™ (bioMérieux Inc., Durham, Caroline du Nord, Etats-Unis), qui surveillent en permanence la libération de CO₂ par les micro-organismes en croissance (Pappas et al., 2005). Le temps de détection a été considérablement réduit. *Brucella* peut être détectée dans le sang des patients infectés après quatre jours de culture ou moins (Çetin et al., 2007).

III.3.3.3. Technique de culture du sang lysé et centrifugé

Cette technique utilise la lyse des érythrocytes dans une solution de citrate, suivie par l'isolement des bacilles de *Brucella* par centrifugation de l'échantillon, qui concentre les bacilles et facilite la croissance (Espinosa et al., 2009). Pour la technique de centrifugation par lyse, une aliquote de 5 ml de sang prélevée simultanément à celle utilisée pour la culture de *Castañeda* est ajoutée à un tube de centrifugation stérile de 50 ml contenant 20 ml d'eau distillée stérile et 1,5 ml de citrate de sodium à 4%. Le contenu est mélangé doucement et le tube est centrifugé à 2000 x g pendant 30 min. Le surnageant est jeté, et le sédiment est inoculé sur des plaques d'agar infusion de cœur cérébral en double. Les plaques sont incubées à 37 ° C avec et sans dioxyde de carbone pendant 7 jours. Les bouteilles et les plaques sont observées quotidiennement. La date de l'apparition de la première colonie est enregistrée (Mantur and Mangalgi, 2004)(Çetin et al., 2007).

III. Traitement de la brucellose humaine

La brucellose humaine est une maladie multisystémique qui peut présenter un large éventail de manifestations cliniques. Les principaux objectifs de la thérapie pour la brucellose sont d'améliorer les symptômes, de réduire les complications et de prévenir les rechutes. Le choix d'un régime et de la durée de la thérapie antimicrobienne devrait être basé sur l'emplacement de la maladie et les conditions sous-jacentes. Le régime de choix est une thérapie combinée avec doxycycline pendant 45 jours et une streptomycine pendant 14 jours. Un second choix consiste en une combinaison de doxycycline et de rifampine pendant 45 jours. Les enfants de

moins de 8 ans et les femmes enceintes ne doivent pas être traités avec des tétracyclines. Chez les enfants de moins de 8 ans, le régime préféré est la rifampicine avec le cotrimoxazole ou la gentamicine. La rifampine (900 mg une fois par jour pendant 6 semaines) est considérée comme le médicament de choix pour le traitement de la brucellose chez les femmes enceintes. La chirurgie doit être envisagée chez les patients souffrant d'endocardite, d'abcès cérébral, épidurale ou splénique ou d'autres abcès, qui sont résistants aux antibiotiques (Solera, 2000).

Partie expérimentale

Chapitre I : Etude de la brucellose bovine au niveau de l'abattoir de Rouiba

I.1. Matériels et méthodes

I.1.1. Lieu et période d'étude

Pour réaliser les objectifs visés, une étude sérologique au sein de l'abattoir de Rouiba est réalisée du 26 Février au 1 Avril 2012. L'abattoir de Rouiba se situe à Rouiba en plein milieu de l'agglomération urbaine, il est bordé à l'ouest par la société des eaux et d'assainissement d'Alger (SEAAL), à l'est par une rue le séparant des habitations, au nord par des habitations et au sud par des bâtiments administratifs.

Vu que la brucellose est une maladie professionnellement transmissible lors de manipulation des carcasses des animaux atteints et le non-respect des règles d'hygiène nécessaires, nous allons décrire en détail l'abattoir de Rouiba.

L'abattoir de Rouiba mesure 64 mètres de long sur 54 mètres de large, et comprend :

- Deux bureaux : l'un pour l'inspection vétérinaire et l'autre pour le personnel gérant de l'abattoir ;
- Une aire de réception des animaux vivants et des étables pour leur repos ;
- Des chambres pour abriter une partie du personnel travaillant dans l'abattoir et habitant hors de la wilaya d'Alger ;
- Une ancienne habitation utilisée récemment par le service d'hygiène de la ville de Rouiba ;
- Un quai pour le débarquement des animaux ;
- Des sanitaires ;
- Deux salles d'abattage : l'une destinée pour l'abattage de l'espèce bovine et l'autre pour l'abattage de l'espèce ovine.

La salle d'abattage des ovins mesure 20 mètres de long sur 10 mètres de large, et possède un grand portail de 4,5 m de longueur qui sert à la fois pour l'entrée des animaux et le chargement des carcasses ainsi qu'une petite porte pour le personnel. Cette salle est divisée en deux parties ; une grande pour l'abattage des animaux et une petite salle qui sert pour le nettoyage des boyaux.

La salle d'abattage des bovins mesure 20 mètres de long sur 10 mètres de large, avec deux grands portails de 4,5 m de longueur chacun. Un pour l'entrée des animaux vivants destinés à l'abattage et l'autre pour le chargement des carcasses jugées propres à la consommation. Elle

possède aussi un petit portail pour le personnel et une chambre froide mesurant 4,5 m de long sur 3 m de large. Cette salle est également divisée en deux parties, une grande partie pour l'abattage des animaux et une petite pour le nettoyage des boyaux.

Nous avons noté que :

- Les animaux qui arrivent vivants à l'abattoir sont très souvent transportés dans des camions qui ne possèdent ni toitures ni bâches pour protéger les animaux du vent, du froid ainsi que de la pluie, ce qui peut stresser les animaux.
- Dans cet abattoir, toutes les opérations d'abattage se font en poste fixe (en un seul et même endroit) ; il n'y a pas de séparation entre les opérations sales et les opérations propres, ce qui a pour effet d'augmenter le risque de contamination des carcasses.
- Pendant les jours de grande charge d'abattage, les animaux vivants sont présents à l'intérieur de la salle en même temps que les carcasses, ce qui contribue également à la contamination de la viande.
- Les opérations d'éviscération commencent par les organes digestifs qui sont souvent perforés par les ouvriers ce qui entraîne l'écoulement du contenu du réservoir gastrique sur le reste de la carcasse.
- l'abattage sanitaire se fait au même temps que l'abattage de salubrité.
- Concernant l'abattage d'urgence, le camion qui ramène l'animal, pénètre à l'intérieur de la salle d'abattage ; après l'attachement de l'un des membres de l'animal à une barre de fer au niveau de la salle d'abattage, le camion démarre pour faire tomber l'animal de la manière la plus brutale, cette méthode augmente le stress de l'animal qui souffre déjà de sa maladie ou de son accident.
- Le matériel d'égorgeage et d'éviscération est très souillé.

Ces remarques nous permettent d'avancer que l'abattoir de Rouiba est favorable à la contamination des viandes à toutes les étapes de l'abattage et du transport par le stress qu'il entraîne et ne permet pas d'avoir une viande saine.

I.1.2. Matériels

Pour notre sécurité et la préservation de notre santé, nous avons mis à notre disposition une combinaison, des bottes, gants d'examen. Nous avons aussi été dotés d'un appareil à photos, une feuille et un stylo pour mentionner toutes les informations nécessaires ;

-Nous avons utilisé des tubes secs vacutainers, aiguilles vacutainers, et un embout vacutainer (adaptateur) pour faire les prélèvements chez les bovins ;

- Pour maintenir la chaîne du froid lors de transport des échantillons, nous avons utilisé une glacière et des plaques (icebox) congelées.
- Une fois arrivé au laboratoire (laboratoire de biochimie de l'ENSV), et après la centrifugation des prélèvements sanguins à une vitesse de 3000 tours/minute pendant 5 minutes, les sérums sont récupérés dans des eppendorf et congelés à -20°C jusqu'au jour d'analyse.

I.1.3. Méthodes

I.1.3.1. Inspection *ante mortem*

Une inspection pour déterminer le sexe, l'âge et le statut d'identification sur les deux oreilles et la saisie du numéro de la boucle chez les bovins identifiés, est effectuée. Les bovins présentant des oreilles trouées sont considérés comme non classés. Les bovins présentant des oreilles intactes (non trouées) sont considérés comme non identifiés.

Nous avons défini 4 types des bovins :

- Les bovins d'importation portent un numéro d'identification étranger.
- Les bovins locaux sont de petite taille, avec une robe de couleur uniforme.
- Les bovins croisés présentent une coloration de robe pie rouge ou pie noir, portent un numéro d'identification algérien ou non identifiées.
- Les bovins non classés présentent des oreilles trouées (boucle enlevée) ou le numéro d'identification est effacé.

I.1.3.2. Prélèvements sanguins

Pour l'étude de la prévalence, nous avons réalisé des prélèvements sanguins. Le sang est prélevé au niveau de la veine jugulaire ou la veine coccygienne selon les commodités dans des tubes secs, ou remplissage des tubes au moment de l'abattage pour les bovins difficiles à prélever. A chaque prise de sang, le tube est ensuite numéroté, et le numéro reporté sur une fiche de prélèvement où sont indiqués la description de l'animal (numéro d'identification pour les bovins identifiés, âge, sexe, race et diagnostic de la gestation pour les femelles). Les prélèvements sont par la suite centrifugés à 3000 tours pendant 10 minutes, les sérums sont ensuite récupérés et stockés entre -15°C et -20°C jusqu'au jour d'analyses.

I.1.3.3. Diagnostic de la gestation

Vu le caractère exhaustif de notre échantillonnage, et le temps écoulé dans l'inspection *ante mortem* et les prélèvements sanguins, nous avons évité l'examen du tractus génital par le fouiller rectal. En fait, nous avons procédé à une autre méthode plus facile et plus précise, qu'est la vérification de la matrice après l'abattage par une incision à l'aide d'un couteau.

I.1.3.4. Analyse sérologique des prélèvements

Les sérums ont été envoyés pour l'analyse, au département de Microbiologie et Parasitologie, Faculté de Médecine, Université de Navarra (Espagne). Ils ont été analysés par le rose Bengal test, la fixation du complément, la réaction d'immunoprécipitation et ELISA indirect.

Rose Bengal test

Les sérums ont été premièrement analysés par le test au rose Bengal, en utilisant l'antigène officiel Espagnol, et selon la méthode standard (Oie, 2016). Afin de décongeler les sérums, nous les avons laissés à température ambiante avec l'antigène, à l'aide d'une micropipette Pasteur munie d'un embout stérile et renouvelé après chaque utilisation, et après l'agitation du flacon de l'antigène, une goutte de 25 µl de sérum à tester est déposée à côté d'une goutte de 25 µl du rose Bengal, un bâtonnet en plastique/bois est utilisé pour mélanger le sérum et l'antigène, après agitation de 4 minutes, en présence d'anticorps, il se produit une agglutination visible à l'œil nu (ressemble au témoin positif), tandis qu'en absence d'anticorps, le mélange reste homogène.

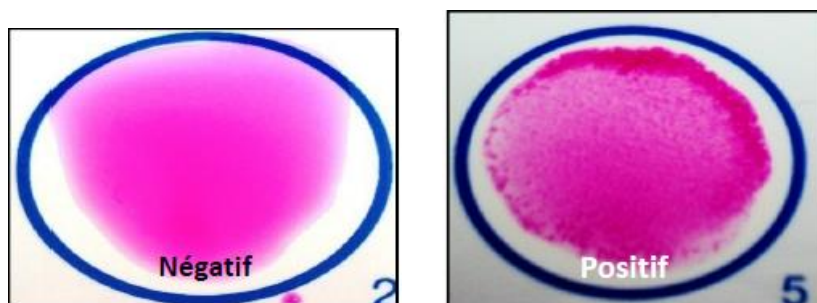


Figure 3 : Agglutination du sérum avec le rose Bengal test (photo originale)

Fixation du complément

Les sérums détectés positifs par le test au rose Bengal, ont été analysés par le test de la fixation du complément, selon la micro-méthode (Oie, 2016). Un titre égal ou supérieur à 4, qu'est l'équivalence de 20 unités internationale, est considéré positif.

La réaction d'immunoprécipitation en double gel (DGD-NH)

Ce test a été réalisé avec un extrait chaud de *B. melitensis* 16M riche en NH et S-LPS (LPS lisse) dans 10% de NaCl 0,1 M, NaOH-H₃BO₄ (pH 8,3) gel hypertonique (Diaz et al., 1981), LPS lisse brut de *B. melitensis* a été utilisé comme antigène, celui-ci est placé dans le puits central et les sérums à tester sont placés dans les puits périphériques à 3mm de distance . Les plaques ont été lues après 24 et 48 heures d'incubation dans une chambre humide à température ambiante. Les lignes de précipitation qui sont apparues après 48h sont considérées non spécifiques (Muñoz et al., 2005). Deux concentrations d'antigène (1 et 5mg/ml) ont été utilisées dans notre étude.

ELISA indirect (test développé au laboratoire)

La solution mère d'extrait du LPS a été préparée à 1 mg / ml dans l'eau distillée et conservée à -20 ° C. Des plaques de polystyrène 96 puits standard, ont été utilisées. 10 mM de tampon phosphate salin (pH 7,2) (PBS) à 4 ° C pendant une nuit a été utilisée comme condition de revêtement. La matière non adsorbée a été éliminée par quatre lavages avec 0,05% de Tween 20-PBS. Des dilutions de sérum ont été effectuées dans 0,05% de Tween 20-PBS, une aliquote de 100 µl a été distribué dans chaque puits et les plaques ont été incubées pendant 1 h à 37 ° C avant d'être lavé quatre fois avec le diluant. Un anticorps polyclonal (lapin) anti-immunoglobuline G (IgG) du mouton –peroxydase a été utilisé comme conjugué ce dernier a été dilué dans 0,05% de Tween-PBS. Une quantité de 100 µl de la solution conjuguée a été ajoutée à chaque puits, après 1 h à 37 ° C, les plaques ont été lavées et développées avec 100 µl de 0,1% 2,2'azinobis (3-ethylbenzthiazolinesulfonic sel d'acide de diammonium - 0,05 M citrate (pH 4) -0,004% de H₂O₂ par puits pendant 15 min à 20 ° C. A titre de témoins, un sérum bovin négatif et un autre positif ont été utilisés dans toutes les plaques. Les résultats ont été exprimés en densité optique (DO) à 405 nm ou en pourcentage de la DO à 405 nm du

sérum de contrôle positif à la dilution donnant la meilleure discrimination entre les animaux infectés et vaccinés (Alonso-Urmeneta et al., 1998).

I.1.3.5. Collecte des données, analyse statistique et calcul des intervalles de confiance

Les renseignements collectés (les résultats de l'inspection *ante mortem*) sont enregistrées sur un bloc note, saisie au fur et à mesure sur un programme *Microsoft Excel* 2007.

L'analyse des variables est réalisée par le test χ^2 avec un risque d'erreur de 5% (intervalle de confiance de 95%), pour cela nous avons utilisé le logiciel IBM SPSS Statistics 20. Les représentations graphiques sont réalisées à l'aide du programme Excel 2007.

Nous avons calculé les intervalles de confiance par l'utilisation de la formule suivante

$IC = [pA - 1,96 \sqrt{(pA \cdot qA / n)} ; pA + 1,96 \sqrt{(pA \cdot qA / n)}]$ (Toma et al., 1996), avec pA la prévalence apparente et qA = (1- pA), n la taille de l'échantillon.

I.2. Résultats

Durant la période d'étude (35 jours), une étude exhaustive était réalisée à l'abattoir de Rouiba :

- La moyenne des bovins prélevés par jour est de 11 (10 – 12) ;
- La moyenne des femelles prélevées par jour est de 8 (7 – 9) ;
- La moyenne des mâles prélevés par jour est 4 (3 – 5).

Le test au Rose Bengale que nous avons utilisé sur 402 bovins (138 males, 264 femelles), a révélé 24 bovins séropositifs, c'est-à-dire un taux de prévalence apparente de 5.97%, 95% IC [5.95% – 5.99%]) (tableau 4).

Tableau 4. Prévalence, intervalle de confiance 95% et les valeurs p du test khi deux: sexe, âge, race, identification et gestation.

		Bovins testés	Bovins positifs	IC 95%	P (Chi2)
Sexe	Femelle	264	23 (8.71%)	[8.69 – 8.73]	0.002 < 0.05
	Male	138	1 (0.72%)	[0.719 – 0.721]	
Age (femelles)	< 2 ans	1	0	0	0.009 < 0.05
	>5 ans	263	23 (8.74%)	[8.72 – 8.76]	
Race	Locale	33	1 (3.03%)	[2.98 – 3.08]	0.32 > 0.05
	Croisée	344	22 (6.4%)	[6.38 – 6.42]	
	Bovins importés	25	1 (4%)	[3.94 – 4.06]	
Identification	Identifiés	46	10 (21.7%)	[21.37 – 22.03]	< 0.05
	No identifiés	305	10 (3.27%)	3.27 ± 0.0001	
	Boucle d'oreille enlevée	51	4 (7.84%)	[7.78 – 7.9]	
Gestation	Gestantes	21	3 (14.28%)	[14.18 – 14.38]	0.01 < 0.05
	No gestantes	235	20 (8.5%)	[8.48 – 8.52]	
Total		402	24 (5.97%)	[5.95 – 5.99]	

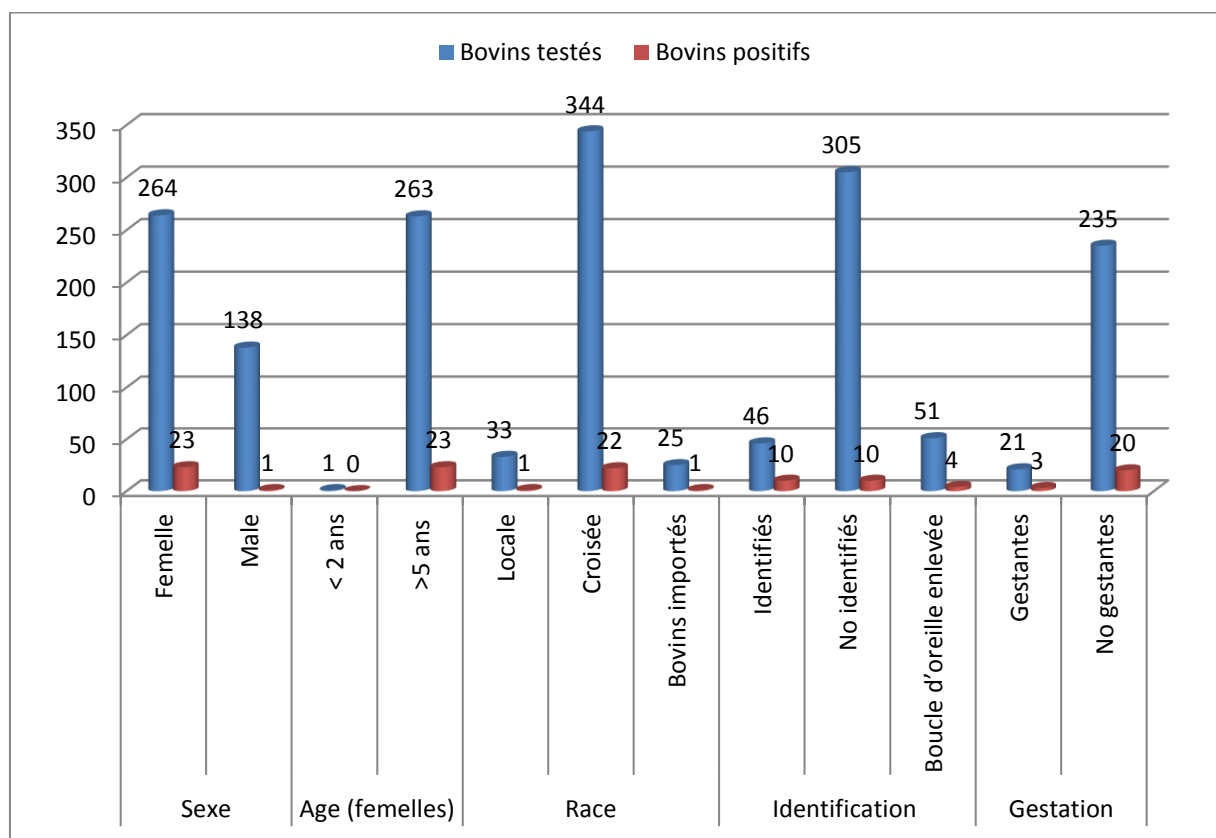


Figure 4. Prévalence apparente de la brucellose par RBT en fonction des caractéristiques des bovins prélevés

Au vu du tableau 4, les analyses statistiques par le test Chi-deux montrent qu'il y a une différence significative ($P < 0.05$) concernant le sexe (mâles et femelles), l'âge des femelles (< 2 ans et > 5 ans), le statut d'identification des bovins inclus dans notre étude (bovins identifiés, bovins non identifiés et bovins avec boucles d'oreille enlevées) et la gestation (femelles gestantes et non gestantes).

Cependant, la différence était non significative ($P > 0.05$) concernant la race des bovins (locale, croisée, et importée).

Tableau 5. Résultats des sérums des bovins analysés par différents tests en fonction des caractéristiques des bovins prélevés

		Nombre de résultats positifs (%) avec les tests indiqués				
		N° animaux	RBT	CF	DDG-NH	iELISA
Sexe	Femelle	264	23(8.71%)	22(8.33%)	22(8.33%)	16(6.06%)
	Male	138	1(0.72%)	1(0.72%)	1 (0.72%)	0(0.00%)
Age (femelles)	< 2 ans	1	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)
	>5 ans	263	23 (8.74%)	22(8.36%)	22 (8.36%)	16(6.08%)
Race	Locale	33	1 (3.03%)	1(3.03%)	1(3.03%)	1(3.03%)
	Croisée	344	22 (6.39%)	21(6.10%)	21 (6.10%)	14 (4.07%)
	Importée	25	1 (4.00%)	1(4.00%)	1 (4.00%)	1(4.00%)
Identification	Oui	46	10(21.73%)	10(21.73%)	10 (21.73%)	8(17.39%)
	Non	305	10 (3.27%)	10(3.27%)	10 (3.27%)	6(1.96%)
	Boucle enlevée	51	4 (7.84%)	3(5.88%)	3 (5.88%)	2(3.92%)
Gestation	Oui	21	3 (14.28%)	2(9.52%)	2(9.52%)	2(9.52%)
	Non	235	20 (8.51%)	20(8.51%)	20(8.51%)	14(5.95%)

Le tableau 5 montre les résultats des analyses sérologiques effectués par différents test. Vingt-quatre (24) (prévalence apparente = 5,97%, IC 95% [5,95% - 5,99%]) échantillons de sérum de bovins étaient positifs par RBT. Parmi ceux-ci, 23 étaient positifs par CFT, DDG (prévalence apparente = 5,72% IC [5,7% - 5,74%] dans tous les cas) et 16 par iELISA (prévalence apparente = 3,98% IC [3,96% - 4%]).

L'analyse par CFT a révélé que 18 sérums avaient des titres égaux ou supérieurs 1/256; 2, 1/128; 1, 1/64; 1, 1/16 et 1, 1/4. L'analyse par DDG avec l'antigène à 1mg / ml a montré que 21 échantillons de sérum ont développé deux lignes de précipitation LPS et NH, un sérum a développé juste une ligne de précipitation S-LPS, un autre sérum juste une ligne de précipitation NH, et un était négatif (aucune ligne de précipitation). Le sérum qui a développé seulement la ligne de précipitation S-LPS avait réagi faiblement au RBT, avait un titre de CFT égal à 1/4 et était positif avec iELISA. Pour le sérum qui était négatif par le DDG a également été négatif avec iELISA mais positif avec le RBT et CFT. Pour le DDG,

les résultats ne sont pas améliorés par l'augmentation de la concentration d'antigène à 5 mg / ml (voir annexe 1).

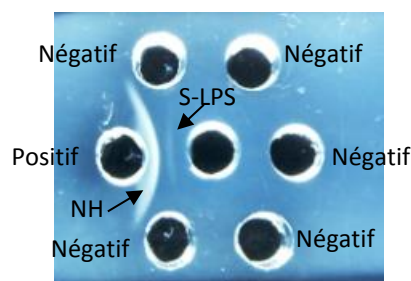
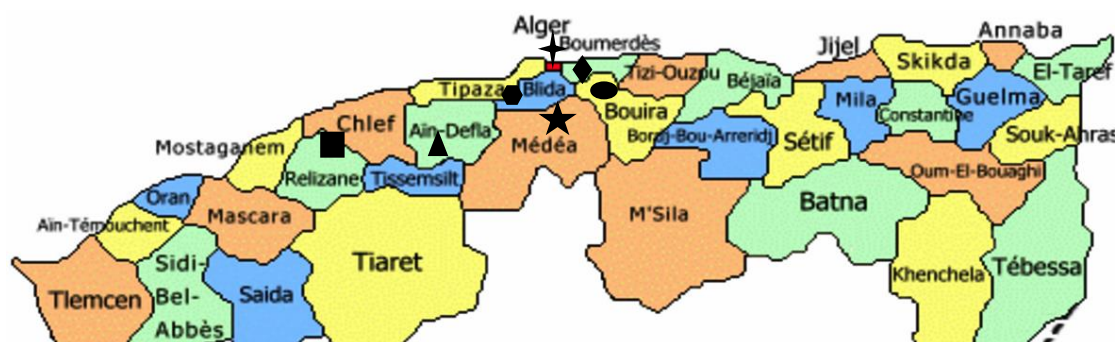


Figure 5. Test d'immunoprécipitation avec S-LPS et NH montrant cinq résultats négatifs et un résultat positif. (Photo originale)

La population bovine prélevée durant notre étude au niveau de l'abattoir de Rouiba, provient principalement à partir des marchés à bestiaux hebdomadaires, le tableau 6 montre ces différents marchés en fonction du jour et du lieu d'activité.

Tableau 6. Lieu des différents marchés à bestiaux hebdomadaires

Jours	Marchés à bestiaux	Nombre de bovins prélevés	Nombre de bovins positifs (%)
Dimanche	Médéa (Kasr El-Boukhari)	1	1 (100 %)
Lundi	Blida (Boufarik)	58	8 (13.80 %)
Mardi	Ain El-Defla (Khemis-Meliana)	74	0 (0.00 %)
Mercredi	Alger (El-Harrach)	86	1 (1.16 %)
Jeudi	Chlef et Relizane	5	1 (20 %)
Vendredi	Boumerdès (Boudouaou)	27	2 (7.40 %)
Samedi	Bouira	151	11 (7.28 %)
	Total	402	24



■ Chlef et Relizane ; ▲ Ain-Defla, ● Blida, ★ Médéa, ✦ Alger, ◆ Boumerdes,

● Bouira (<http://www.saravoyages.com/index-wilaya.html>)

Figure 6. Lieux des différents marchés à bestiaux hebdomadaires

I.3. Discussion

Il a été observé constamment, qu'un résultat positif de tests d'immunoprécipitation avec des extraits riches en S-LPS et NH corrèle avec un CFT positif ($\geq 1:4$ [20 unités internationales] ou plus) (Diaz et al., 1979)(Jones et al., 1980)(Lord and Cherwonogrodzky, 1992)(Diaz-Aparicio et al., 1993), de sorte que le premier peut se substituer à celui-ci dans le protocole du diagnostic classique qui commence par le dépistage par le RBT. Cependant, alors que CFT est techniquement exigeant, le DDG avec ces extraits représente un test beaucoup plus simple et reproductible. En outre, il a été observé qu'un résultat positif avec le test DDG est en corrélation avec l'excrétion de *Brucella* (Jones et al., 1980), ce qui rend ce test particulièrement utile dans des situations épidémiologiques difficiles lorsque l'identification des bovins excréteurs devient nécessaire de contrôler la brucellose. Les résultats présentés ici confirment les enquêtes précédentes (Diaz et al., 1979)(Jones et al., 1980)(Diaz et al., 1981)(Lord and Cherwonogrodzky, 1992)(Muñoz et al., 2005) qui démontrent qu'une combinaison du RBT et DDG peut être mise en œuvre sans perte de performance par rapport à celle obtenue avec des tests plus sophistiqués (CFT et ELISA). Il a été avancé que les tests d'immunoprécipitation avec S-LPS et NH ne sont pas suffisamment sensibles pour être utile dans le diagnostic de la brucellose, et qu'ils sont dépassés par des tests immunoenzymatiques avec une sensibilité et une spécificité de diagnostic ajustées par Youden ou les indices de performance (Nielsen, 2002). Cependant, parce que la brucellose ne se propage pas d'une manière épizootique, la détection précoce nécessitant 100% DSe (sensibilité de diagnostic) n'est pas aussi critique comme dans les épizooties hautement transmissibles. En outre, le diagnostic de la brucellose doit être interprété au niveau du

troupeau plutôt qu'au niveau individuel, et lorsque l'objectif est l'abattage des animaux positifs dans le contexte d'éradication, le dépistage est répété souvent au fil du temps, ce qui facilite la détection des animaux infectés. Ainsi, 100% DSe (sensibilité de diagnostic) est pas strictement nécessaire pour les tests de brucellose et des tests avec faible DSp (spécificité de diagnostic) génèrent l'abattage inutile des animaux provoquant des conflits avec les éleveurs, des quarantaines inutiles et des problèmes commerciaux. Les tests quantitatifs tel que le test ELISA, sont généralement ajustés en fonction de l'indice de Youden, ce qui maximise l'équilibre DSe/DSp. Cependant, comme indiqué dans les résultats d'ELISA indirect, lorsque le DSp est ajusté à 100%, le DSe diminue par rapport au RBT ou DDG. Comme ces deux derniers tests sont robustes et peuvent être réalisés avec relativement peu de matériel, ils peuvent être recommandés pour une utilisation dans les laboratoires où le personnel manque d'expérience et l'accès aux systèmes automatisés n'est pas disponible. En fait, ces tests d'immunoprécipitation ont été largement utilisés avec succès comme tests de confirmation après un dépistage par le RBT dans les campagnes d'éradication de la brucellose dans le nord de l'Espagne (Asarta, 1989)(Ducrotoy et al., 2016)(Blasco et al., 2017). En effet, le problème de DGD est la disponibilité de l'extrait de NH et de S-LPS. Bien qu'il existe des protocoles d'extraction simples (Díaz et al., 1984), l'antigène n'est pas disponible pour la commercialisation actuellement.

Chez les bovins, le parallélisme étroit entre les chiffres de la prévalence apparente obtenus avec les différents tests est remarquable. Le test d'immunoprécipitation avec NH, mais pas le CFT ou iELISA a été démontré ne pas être affecté par des réactions faussement positives causées par des bactéries à réactions croisées avec *Brucella* au niveau du LPS (Muñoz et al., 2005).

Pris ensemble, cette haute spécificité et l'absence de vaccination par le vaccin S19 dans les régions d'origine des animaux testés, appuient la conclusion que les chiffres de prévalence apparente obtenue avec ce test représentent en fait les infections réelles par *B. abortus* ou *B. melitensis*. Cette dernière espèce est connue pour être une cause d'infections chez les bovins dans les zones où ils sont élevés ensemble avec les petits ruminants (Verger et al., 1989), et comme les tests sérologiques ne peuvent pas différencier les infections par ces deux espèces (Ducrotoy et al., 2016), des études bactériologiques sont nécessaires pour une bonne compréhension de l'épidémiologie de la brucellose en Algérie. Cependant, il est important de noter que, les animaux présentés à l'abattoir de Rouiba et inclus dans notre étude, proviennent des marchés à bestiaux de quelques régions de l'Algérie, dont on a enregistré

des cas bovins séropositifs; Bouira [Centre], Médéa [Centre], Blida [Centre], Ain El-Defla [ouest], Algiers [Centre], Chlef et Relizane [ouest], Boumerdès [Centre]. Aucun bovin n'a été trouvé séropositif parmi ceux qui sont provenus de la Wilaya de Ain El-Defla [ouest] (Tableau 6 et Figure 6). Cela montre que la brucellose bovine est répandue dans le pays.

En ce qui concerne d'autres facteurs épidémiologiques, les tableaux 4 et 5 résument les résultats obtenus selon le sexe, l'âge, la race et d'autres caractéristiques enregistrées. Comme on le voit, la proportion d'animaux séropositifs était beaucoup plus élevée chez les femelles que chez les mâles. La littérature contient des rapports contradictoires sur l'influence du sexe en tant que facteur de risque de la brucellose bovine. Alors que certains auteurs rapportent que les mâles sont plus exposés au risque (Boukary et al., 2013), d'autres ont trouvé des résultats opposés (Kebede et al., 2008)(Mohammed et al., 2011)(Rahman et al., 2011)(Olabode et al., 2012). L'insémination artificielle est largement utilisée en Algérie, et dans la présente étude, 138 mâles ont été abattus pour la viande quand ils étaient âgés de moins de deux ans, au lieu de les utiliser comme mâles reproducteurs, ce qui limite la chance de leur infection par les femelles brucelliques. Parmi les femelles, une seule était âgée de moins de 2 ans. Ce biais dans l'échantillon reflète la gestion des animaux dans les élevages laitiers de l'Algérie, où les femelles âgées sont retirées des fermes lorsque la productivité diminue. De même, la plupart des animaux testés appartenaient à la catégorie de bovins croisés, et cela reflète également la préférence des agriculteurs pour ces animaux en raison de leurs meilleurs rendements laitiers et le prix abordable par rapport aux bovins importés. Toutefois, les données montrent qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les séroprévalences apparentes enregistrées chez les trois catégories de bovin (locale, croisé et importé). Sur les 46 bovins identifiés, 10 (21,73%) étaient séropositifs. Dix (3,27%) des 305 bovins non identifiés et 4 (7,84%) des 51 bovins qui présentaient des boucles d'oreille enlevées ont été trouvés séropositifs (Tableaux 4). Statistiquement, il y avait une association significative ($p < 0,05$) entre la prévalence apparente et le statut d'identification. Dans le cas normal, les animaux identifiés sont dépistés régulièrement pour la détection de la brucellose par les services vétérinaires et ceux trouvés positifs doivent être sacrifiés. Cependant, les propriétaires reportent le plus souvent l'abattage des animaux séropositifs, les envoient aux marchés après le retrait des boucles d'oreille. Ainsi, le sous-échantillon des animaux identifiés est biaisé et devrait contenir une proportion plus élevée des animaux séropositifs, comme les résultats confirment. La même explication est valable pour ces animaux dont les boucles d'oreille ont été enlevées avant d'être vendus. Il est aussi important de noter la très forte proportion d'animaux non

identifiés (305 sur 402) présentaient à l'abattoir durant notre étude. Ces observations ne sont pas anecdotiques car elles reflètent les difficultés existantes dans le contrôle de la maladie en Algérie. L'identification des animaux est un facteur incontournable pour un suivi sérologique fiable, afin d'appliquer les mesures de contrôle basé sur la vaccination individuelle (Blasco and Molina-Flores, 2011)(Blasco et al., 2016)(Blasco et al., 2017).

Trois (14,28%) sur les 21 femelles gestantes et 20 (8,51%) sur les 235 femelles non gestantes ont été trouvées positives (Tableaux 4). Statistiquement, il y avait une association significative ($p < 0,05$) entre la prévalence apparente et la gestation. Présence des femelles gestantes dans l'abattoir pourrait être expliquée par un mauvais diagnostic de gestation de la part des vétérinaires qui ont délivré les certificats d'abattage. Cependant, parmi les trois vaches gestantes et séropositives, une appartenait au groupe identifié et l'autre avait la boucle d'oreille enlevée. Cela peut être expliqué aussi par une décision du propriétaire basée sur une prise de conscience de la maladie et une volonté de fuir les mesures du contrôle sanitaire. Quoi qu'il en soit, l'existence de vaches gestantes est signifiant, car ces animaux jouent un rôle très important dans la transmission de la maladie (Blasco et al., 2016)(Blasco et al., 2017).

Les résultats de cette étude confirment d'un côté l'importance de la brucellose bovine en Algérie, et de l'autre côté, l'utilité de la combinaison de RBT et DDG qui peut être mis en œuvre pour le diagnostic de la brucellose, au lieu des tests plus sophistiqués et plus compliqués comme ELISA indirect et CFT. Comme RBT et DDG sont robustes et techniquement simples, ils devraient être utiles dans les laboratoires avec un équipement de base et une main-d'œuvre avec une expérience limitée. D'autres études, spécifiquement bactériologiques, sont urgentes afin de clarifier l'épidémiologie de la brucellose en Algérie. Enfin, l'étude a mis en évidence une absence importante des mesures (identification et contrôle des mouvements d'animaux) qui sont qualifiées nécessaires pour la réussite du contrôle de la brucellose.

Chapitre II : Etude la brucellose ovine au niveau de deux abattoirs, Rouiba et El-Harrach

II.1. Matériels et méthodes

II.1.1. Lieu et période d'étude

Notre étude sérologique a été réalisée dans la wilaya d'Alger au sein de deux abattoirs, Rouiba et El-Harrach, durant la période allant du 26 Février au 1 Avril 2012. L'abattoir de Rouiba a été décrit dans le chapitre précédent (Chapitre I : Etude la brucellose bovine au niveau de l'abattoir de Rouiba).

L'abattoir d'El Harrach se situe à El-Harrach, il est très ancien, il date de la période coloniale (1919), mais il a fait l'objet de travaux de rénovation, comme l'entretien de la faïence et le système des poulies. Il est situé dans une région urbaine ce qui est en complète contradiction avec les normes, non loin de la gare d'El -Harrach. Il est entouré au nord et au sud par deux bâtisses, à l'est par une brigade de gendarmerie et à l'ouest par un vieux bâtiment.

Il comprend :

Deux grandes salles d'abattage ; l'une est réservée pour l'abattage des animaux de boucherie (bovins et ovins) sa superficie est de 1800 m², elle contient une chambre frigorifique, l'autre salle est réservée pour l'abattage des équidés.

- Une aire de stabulation pour les bovins et les ovins, d'une superficie de 800 m²
- Un local destiné à la préparation (vidange et nettoyage) des abats blancs. Il communique directement à la salle d'abattage des animaux de boucherie.
- Un local mis à la disposition des services vétérinaires.

Il est fonctionnel de dimanche à jeudi de 5h à 8h puis de 12h à 16h, le vendredi il fonctionne uniquement le matin, alors que le samedi il n'ouvre que l'après-midi. L'inspection vétérinaire effectuée en *anté-mortem* le soir (seulement chez les femelles pour vérifier l'âge) et en *post-mortem* le matin à partir de 7h, et l'après-midi à partir de 15h.

Afin d'éviter d'obtenir des résultats faussement positifs, nos prélèvements sanguins ont été effectués au sein de ces deux abattoirs avant le lancement de la campagne de vaccination anti-brucellique des petits ruminants prévue pour le mois de Mai 2012

II.1.2. Population étudiée et taille de l'échantillon

Nous nous sommes intéressés dans notre enquête sérologique, à tous les ovins non bouclés adultes (âge égal ou supérieur à 1an) qui débarquent au sein des deux abattoirs. A cet effet pour la réalisation de notre étude sérologique, nous avons utilisé un échantillonnage aléatoire à deux degrés au sein des deux abattoirs Rouiba et El Harrach. Pour cela nous avons pris tous les ovins mâles et femelles de toutes races que nous considérons comme non vaccinés, du fait qu'ils ne possèdent ni boucle sanitaire, ni toute trace de cette dernière à l'oreille (fragment de boucle, perforation, empreinte à l'oreille) (1^{er} degré) ; dont l'âge est supérieur ou égal à 1 an (2^{ème} degré).



Figure 7 : Mouton vacciné contre la brucellose (présence de boucle sanitaire à l'oreille) (photo originale)

Cette méthode d'échantillonnage, a été réalisée sur une population de 63 ovins à l'abattoir de Rouiba, et sur une population de 140 ovins à l'abattoir d'El Harrach.

II.1.3. Méthodes

II.1.3.1. Prélèvements

Nous avons fait des prises de sang systématiquement au niveau de la veine jugulaire, à l'aide d'une aiguille vacutainer stérile, d'un porte-aiguille et d'un tube sec stérile, après la désinfection par l'alcool. Nous nous sommes intéressés aux ovins non bouclés adultes destinés à l'abattage, en procédant par une inspection de la boucle sanitaire ou toute trace de cette dernière à l'oreille (fragment de boucle, perforation, empreinte à l'oreille). Parmi les

ovins qui ne possèdent ni boucle sanitaire, ni toute trace de cette dernière à l'oreille, nous avons sélectionné seulement les ovins dont l'âge est supérieur ou égal à 1 an, par une inspection de la dentition. À chaque prise de sang, le sang est récolté dans des tubes secs vacutainers et identifiés par un numéro correspondant à l'animal prélevé. L'animal prélevé est marqué à l'aide d'un marqueur indélébile, pour le différencier des autres ovins qui n'ont pas subi de prélèvement. Puis chaque prélèvement est enregistré sur une fiche de renseignements que nous avons élaborée où sont indiqués ; la date du prélèvement, numéro du prélèvement, l'âge, le sexe, provenance géographique. Les prélèvements sont ensuite acheminés au laboratoire dans une glacière à +4°C, centrifugés par la suite à 3000 tours pendant 10 minutes, les sérums sont ensuite récupérés et stockés entre - 15°C et -20°C jusqu'au jour d'analyses.



Figure 8 : Prélèvement sanguin au niveau de la veine jugulaire chez les ovins (photo originale)

II.1.3.2. Analyse sérologique des prélèvements

Les sérums ont été envoyés pour l'analyse, au département de Microbiologie et Parasitologie, Faculté de Médecine, Université de Navarre (Espagne).

Les sérums ont été analysés premièrement par le RBT modifié (mRBT) (Blasco et al., 1994)(Diaz-Aparicio et al., 1994)(Oie, 2016). Un volume de 25 µl d'antigène et 75 µl de sérum ont été utilisés. Les sérums trouvés positifs par mRBT ont ensuite été testés par le test de fixation du complément (CFT) en utilisant la micro-méthode standard (Oie, 2016) (Un titre égal à 4 contenait 20 unités internationales CFT par ml). En outre, les sérums positifs par mRBT ont été analysés par le test d'immunoprécipitation avec un extrait de *B. melitensis* 16M riche en NH (hapten natif) et S-LPS en 10% de NaCl gels hypertonique (Diaz et al., 1981). Deux concentrations d'antigène ont été utilisées, 1 et 5 mg /ml. Enfin, ELISA indirect, avec

LPS lisse de *B. abortus* et la protéine G comme conjugué, a été utilisé selon la méthode décrite auparavant (Alonso-Urmeneta et al., 1998).

II.1.3.3. Analyses statistiques

Les informations collectées sont notées sur un bloc note, saisies au fur et à mesure sur un programme *Microsoft Excel* 2007. L'analyse des variables est réalisée par le test χ^2 avec un risque d'erreur de 5%, pour cela nous avons utilisé le logiciel IBM SPSS Statistics 20.

Nous avons calculé les intervalles de confiance par l'utilisation de la formule suivante : $IC = [pA - 1,96 \sqrt{(pA \cdot qA / n)} ; pA + 1,96 \sqrt{(pA \cdot qA / n)}]$ (Toma et al., 1996), avec pA la prévalence apparente et $qA = (1 - pA)$, n la taille de l'échantillon

II.2. Résultats et discussion

Tableau 7. Résultats d'analyse sérologique des sérums des ovins au niveau des abattoirs Rouiba and El-Harrach

Nombre de résultats positifs (%) avec les tests indiqués					
	N° of animals	RBT	CF	DDG-NH	iELISA
Rouiba abattoir	63	0 (0.00%)	0(0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
El-Harrach abattoir	140	2 (1.42%)	2 (1.42%)	1 (0.71%)	0 (0.00%)
Total	203	2 (0.98%)	2 (0.98%)	1(0.49%)	0 (0.00%)

Tableau 8. Résultats d'analyse sérologique des sérums des ovins en fonction de l'âge et du sexe

Nombre de résultats positifs (%) avec les tests indiqués						
		N° of animals	RBT	CF	DDG-NH	iELISA
Sex	Female	105	0 (0.00%)	0(0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
	Male	98	2 (2.04%)	2(2.04%)	1 (1.02%)	0 (0.00%)
Age	1 year	50	2 (4.00%)	2 (4.00%)	1 (2.00%)	0 (0.00%)
	2- 5 years	51	0 (0.00%)	0(0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
	> 5 years	102	0 (0.00%)	0(0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)

L'analyse sérologique par RBT des 203 ovins prélevés au sein des deux abattoirs de Rouiba et d'El-Harrach révèle 2 cas séropositifs (0.98%), qui sont confirmés positifs avec le test de CFT, alors qu'un seul sérum était trouvé positif avec le test d'immunoprécipitation (tableau 7). Par CFT, un sérum avait un titre de 1/4 et l'autre un titre de 1/16. Ce dernier sérum a été trouvé positif par le DDG-NH, mais seulement avec l'antigène à 1mg / ml (voir annexe 2).

La brucellose, est une zoonose majeure et les petits ruminants représentent la principale source de contamination en Algérie. De plus la situation sanitaire chez les petits ruminants n'est pas maîtrisée. Devant cette situation inquiétante, la vaccination des petits ruminants est obligatoire depuis 2006 à travers plusieurs wilayas du pays afin de réduire la prévalence de la brucellose animale (I.N.S.P, 2011).

Sur le terrain, le dépistage contre la brucellose ovine, n'est pas réalisé, et donc sa prévalence reste mal estimée, ce qui nous a amenés à conduire notre travail.

Cette situation nous a amené à estimer la séroprévalence de la brucellose ovine, en prenant exemple sur la population non vaccinée au sein de deux abattoirs Rouiba et El- Harrach de la région Centre. Nous avons décidé d'effectuer nos prélèvements sanguins au sein de ces deux abattoirs Rouiba et El Harrach respectivement durant la période du mois de Février et de Mars avant le lancement de la campagne de vaccination anti brucellique des petits ruminants prévu pour le mois de Mai 2012, car les analyses sérologiques effectuées à l'aide des tests sérologiques en l'occurrence les plus sensibles comme le test au rose Bengale, ne permettent pas de distinguer les anticorps post-infectieux, des anticorps post-vaccinaux. Et ceci dans le but de réduire le risque d'avoir des résultats faussement positifs.

Dans notre étude, nous avons effectué un total de 203 prélèvements sanguins sur des ovins adultes non vaccinés (non bouclés) au sein des deux abattoirs.

Durant notre enquête au sein de ces abattoirs, nous avons rencontré des difficultés pour trouver des ovins pubères (âge supérieur ou égal à 1an) car nous avons remarqué que la majorité des ovins qui débarquent au sein de ces deux abattoirs, sont des agneaux non bouclés. Ces agneaux constituent d'ailleurs la population la plus élevée à l'abattoir, cela s'explique par le fait que la viande d'agneaux étant de meilleure qualité, la demande se fait plus importante pour les agneaux. De plus les frais d'engraissement des moutons sont élevés, il est donc plus rentable de les vendre en agneaux.

Nous avons décidé de sélectionner tous les ovins mâles et femelles qui ne possèdent ni boucle sanitaire à l'oreille, ni toute trace de cette dernière pour les raisons suivantes : les directives énoncées par le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural pour la vaccination des petits ruminants imposent que les animaux vaccinés doivent obligatoirement faire l'objet d'apposition d'une boucle d'identification spécifique. Suivant ces instructions, nous considérons que tous les ovins ne portant pas de boucles d'identification spécifique sont apparemment non vaccinés.

Toutefois cette boucle sanitaire apposée à l'oreille peut pour différentes raisons être arrachée. La présence de toute trace de cette boucle (fragment de boucle, empreinte ou perforation),

suggère l'apposition antérieure de cette boucle et indique que l'animal est apparemment vacciné. Il se trouve parfois que certains ovins ne portant pas de boucle sanitaire soient quand même vaccinés. Cette négligence peut être due au manque de rigueur des autorités responsables et aux manques d'instruction des éleveurs.

Nous avons décidé de sélectionner tous les ovins non bouclés dont l'âge est supérieur ou égal à 1an car pour obtenir des résultats fiables, le test au Rose Bengale et les autres tests sérologiques doivent être réalisés sur des ovins pubères, et ce n'est qu'à partir de cette période que les ovins élaborent des anticorps spécifiques. De plus, la puberté des ovins n'apparaît qu'à partir de 5 à 9 mois selon les races, mais sur le terrain, il n'est pas évident de déterminer l'âge exact des ovins dont l'âge est inférieur à 1 an. Ce n'est qu'à partir d'un an qu'on peut savoir que ces ovins sont pubères. Pour ces raisons nous avons sélectionné uniquement par rapport à l'âge (dentition) tous les ovins dont l'âge est égal ou supérieur à 1an afin d'être sûr que ces ovins soient réellement pubères.

La relative faible capacité d'abattage au sein de l'abattoir de Rouiba explique le faible effectif d'animaux (ovins, bovins) sacrifiés quotidiennement. De plus nous avons remarqué que l'effectif des bovins est plus important que celui des ovins au sein de l'abattoir de Rouiba, car cet abattoir traite principalement avec des maquignons de la région centre (Tizi-Ouzou, Bouira, Boumérdes), régions à dominance production bovine.

Aussi, vu que la qualité de la viande d'agneau étant meilleure que celle des brebis âgées, ceci explique pourquoi nous avons un nombre moins élevé de femelles que de jeunes mâles à l'abattoir de Rouiba.

L'infrastructure et la position géographique (région centre) de l'abattoir d'El Harrach permettent de recevoir un nombre plus important d'animaux (ovins, bovins) qu'à l'abattoir de Rouiba.

Les résultats trouvés ici sont cohérents avec les observations précédentes démontrant que la concentration de l'antigène NH-LPS-S doit être relativement réduit pour une sensibilité optimale à une immunoprécipitation avec des sérums provenant de petits ruminants (Diaz-Aparicio et al., 1993). Les deux ovins trouvés séropositifs appartiennent à l'échantillon d'ovins prélevé au niveau de l'abattoir d'El-Harrach. La séroprévalence apparente trouvée dans notre étude est inférieure à celle rapportée par Hamdi-Chérif et al, et qui était 3,08% dans l'est de l'Algérie (Setif et M'sila) en 1999 (Hamdi-Chérif et al., 1999), elle est aussi inférieure à 7,2%, la valeur constatée par l'Institut National de Médecine Vétérinaire d'Alger en 2007 (Meskoud-taibi and Benzadi, 2009), et plusieurs circonstances pourraient expliquer les différences. Tout d'abord, ces deux enquêtes ont été réalisées avant que les avantages des

campagnes de vaccination par le Rev1 initiées au printemps de 2006, soient détectables. Il est intéressant de noter que ces quelques résultats positifs ne peuvent pas être le résultat d'anticorps post-vaccinaux, car les deux ovins en question ne portaient pas de boucles vertes qui sont les marqueurs de vaccination en Algérie. Une autre explication de la séroprévalence trouvée, est que les ovins testés provenaient de quelques exploitations intensives autour d'Alger, où les animaux sont gardés pour l'engraissement et ensuite vendus à l'abattoir, sans être trop en contact avec d'autres animaux. Les deux moutons séropositifs étaient sexuellement matures, ils ont été probablement introduits à partir d'une zone infectée. Comme chez les bovins, on pense que les males ne jouent aucun rôle important dans la propagation de la maladie par contact sexuel direct. Les béliers deviennent une source d'infection seulement en tant que fournisseurs de sperme pour l'insémination artificielle (Alton, 1990)(Nielsen and Duncan, 1990), ce qui n'est pas pratiquée en Algérie.

Toutefois, l'enquête chez les ovins révèle des lacunes dans la mise en œuvre des mesures (marquage permanent, les mouvements d'animaux de statut inconnu) qui sont essentiels à la réalisation de programmes de contrôle et d'éradication de la brucellose. Il n'existe aucun moyen de traçabilité et d'identification du cheptel national ovin ; il est donc impossible de faire des enquêtes rétrospectives et donc de connaître la provenance de leurs régions d'origine. Enfin, étant donné que notre étude a été réalisée sur chez les ovins au niveau des abattoirs de la capitale Alger, plus d'études dans les zones à dominance ovins/caprins sont nécessaires.

Chapitre III : enquête sérologique sur la brucellose chez les professionnels de l'abattoir de Rouiba, Alger

III.1. Matériels et méthodes

III.1.1. Echantillonnage

Durant la réalisation de notre étude chez les bovins et les ovins au niveau de l'abattoir de Rouiba, nous avons essayé de convaincre les professionnels de l'abattoir de Rouiba, à fin qu'ils adhèrent à notre enquête, mais la participation était facultative. Nous avons choisi de réaliser notre étude auprès des professionnels des abattoirs, car cette catégorie est considérée comme la plus exposée au risque de contamination par la brucellose.

Avant le recrutement dans l'étude, les procédures et les objectifs de l'étude ont été expliqués à chaque personne incluse, et ce n'est qu'après son consentement éclairé que les procédures de l'étude lui ont été appliquées.

En tout, 42 professionnels ont adhéré à notre enquête, parmi eux, les quatre vétérinaires inspecteurs de cet établissement. Des prélèvements sanguins, ainsi que les données socio-épidémiologiques des 42 professionnels ont été récoltés.

III.1.2. Matériels

Pour la réalisation des prélèvements, nous avons mis à notre disposition le matériel suivant :

- Une fiche de renseignements constituée de 14 questions adressée aux professionnels (voir annexe 3) et une autre fiche de renseignements constituée aussi de 14 questions adressée aux vétérinaires (voir annexe 4) ;

Ces questionnaires comportent :

- Les données sociodémographiques (l'âge, le niveau d'étude, le statut matrimonial, le lieu de résidence, le milieu de résidence, la profession),
- Les antécédents cliniques liés à la maladie, pathologies associées, antécédents d'hospitalisation
- Les facteurs de risque liés à la maladie (exposition professionnelle et non professionnelle)
- Utilisation des moyens de protection individuels
- Utilisation des moyens de protection collectifs
- Connaissances à propos de la maladie
- Des épicrâniennes, tubes vacutainers, l'alcool chirurgical concentré à 40%, coton, sparadrap, un garrot.

Un infirmier a été sollicité pour la réalisation des prélèvements, et deux personnes pour le remplissage des fiches de renseignements.

III.1.3. Méthodes

III.1.3.1. Prélèvements sanguins

Après l'obtention de l'accord du vétérinaire inspecteur principal, le gérant de l'abattoir, l'infirmier et une partie des professionnels de l'abattoir, nous avons fixé le 25 Avril 2012, comme rendez-vous pour la réalisation des prélèvements sanguins chez les professionnels. Pour réussir à prélever le maximum des professionnels, nous avons fait les prélèvements le matin et l'après-midi. Les prélèvements se sont déroulés dans le bureau des inspecteurs vétérinaires. Après le prélèvement qui est effectué au niveau de la veine brachiale, la personne prélevée est interviewée pour remplir la fiche de renseignements. Les prélèvements sont acheminés dans une glacière au laboratoire, ils ont été par la suite centrifugés à 3000 tours/minute pendant 10 minutes, les sérums sont récupérés et congelés entre -15 et -20°C jusqu'au jour d'analyse.

III.1.3.2. Analyse sérologique

Les sérums ont été envoyés au département de Microbiologie et Parasitologie (Université de Navarre, Espagne), ils ont été d'abord analysés par le test du Rose Bengal (RBT), puis par le test de séro-agglutination (SAT), Brucellacapt et le test de Coombs.

III.1.3.2.1. Rose Bengal Test (RBT)

Après avoir agité et laissé l'antigène du RBT dans la température ambiante du laboratoire, une quantité de 30 µl de sérum est déposée sur un carreau de céramique blanc brillant et mélangée avec un volume égal d'antigène de RBT. La tuile a ensuite été agitée à la température ambiante pendant 8 minutes (au lieu de 4 minutes recommandées pour la brucellose animale (Alton et al., 1988)), et toute agglutination visible et/ou l'apparition d'une réaction typique a été prise en tant que résultat positif (Alton et al., 1988). Les sérums ont ensuite été testés comme suite, huit gouttes de 30 µl de solution saline ont été déposées sur la tuile, la première goutte a été mélangée avec une quantité égale (30 µl) du sérum (une dilution de 1/2). Ensuite, 30 µl de cette première dilution ont été transférés dans et mélangés avec une deuxième goutte de solution saline à l'aide d'une micropipette, pour obtenir la dilution 1/4. De la même façon,

des dilutions de 1/8 à 1/128 ont été obtenues par des transferts et des mixages en prenant soin de changer la pointe de la pipette entre les transferts successifs. Enfin, chaque goutte a été testée avec un volume égal (30 µl) du réactif RBT, de sorte que les dilutions aient variées de 1/4 jusqu'à 1/256 (Díaz et al., 2011).

III.1.3.2.2. Test de séro-agglutination (SAT)

Ce test a été réalisé dans des plaques de polystyrène ordinaire de 96 puits. Avant de commencer le test, nous avons fait une première dilution (1/10) pour chaque échantillon (90 µl tampon phosphate salin + 10 µl de sérum), et nous avons déposé 50 µl du tampon phosphate salin (PBS) dans les autres puits. En utilisant une micropipette multi-canal, nous avons pris 50 µl de la première rangée, nous les avons mélangé avec la deuxième rangée, et de cette dernière, nous avons pris 50 µl, et nous les avons passé à la troisième rangée et ainsi de suite jusqu'à la rangée 12, nous avons donc obtenu un volume total de 50 µl dans chaque puits. Comme dernière étape, nous avons ajouté 50 µl d'antigène (l'antigène utilisé dans le test de l'anneau de lait dilué 1/80 dans du PBS) dans chaque puits (Díaz et al., 2006).

III.1.3.2.3. Test de Coombs

Nous avons effectué ce test avec les plaques du test SAT, pour révéler la possibilité d'existence d'anticorps non-agglutinants. Les plaques ont été centrifugées 15 min / 3000, le surnageant a été jeté, nous avons ensuite ajouté 150 µl du PBS à chaque puits, le surnageant a été jeté après la centrifugation, nous avons par la suite ajouté 100 µl d'IgG ou IgA antihumains dilués à 1/1000 dans du PBS. Nous avons incubé les plaques pendant 24 heures dans la température ambiante (Díaz et al., 2006).

III.1.3.2.4. Test de Brucellacapt

Le test Brucellacapt (Vircell SL) a été effectué en suivant les instructions du fabricant. Une quantité de 50 µl des sérums dilués a été ajoutée à des puits d'une plaque de microtitrage à fond en U revêtue d'anti-immunoglobuline total humaine. Ensuite, une quantité de 50 µl d'une suspension d'antigène (*B. melitensis* colorées, tuées par traitement au formaldéhyde) a été ajoutée à tous les puits. Les plaques ont été scellées avec du ruban adhésif et incubées à 37 °C pendant 24 h dans une chambre sombre et humide. Les réactions positives se manifestent par une agglutination au niveau du fond des puits. Les réactions négatives sont indiquées par un culot au centre du fond des puits (Orduña et al., 2000b).

III.1.3.2. Analyse statistique

L'analyse statistique a porté sur une description de la population étudiée selon les différentes caractéristiques sociodémographiques et les variables relatives aux facteurs de risque.

La séroprévalence de la brucellose a été évaluée selon le résultat des différents tests sérologiques utilisés :

Le nombre de prélèvements avec résultat positif pour le test Rose Bengale /Totalité des prélèvements testés.

Les renseignements collectés sont enregistrés et saisis sur un programme *Microsoft Excel* 2007.

III.2. Résultats

III.2.1. Répartition des professionnels collaborés à l'enquête en fonction de la profession exercée

L'enquête sérologique chez les professionnels qui s'est déroulée au sein de l'abattoir de Rouiba, nous a permis de classer les collaborateurs de cette enquête en différentes catégories selon la profession exercée (tableau 9).

Tableau 9. Répartition des professionnels collaborés à l'enquête en fonction de la profession exercée

Profession	Nombre	Pourcentage (%)
Inspecteurs vétérinaires	4	9,52
Sacrificateurs	10	23,80
Maquignons	7	16,66
Traitants d'abats	8	19,04
Bouchers	3	7,14
Gérants	2	4,76
Manœuvres	2	4,76
Frigoristes	6	14,28
Total	42	100

Au vu du tableau 9, on voit que les sacrificateurs constituent le pourcentage le plus élevé parmi les autres collaborateurs de l'enquête (23,80%), suivis par les traitants d'abats (19,04%), les maquignons viennent en 3ème position par un pourcentage de 16,66%, suivi par les frigoristes par un pourcentage de 14,28%, les inspecteurs vétérinaires ont occupé la 5ème position par un pourcentage de 9,52%. Trois bouchers (7,14%) ont aussi participé à notre enquête. Enfin, le même pourcentage (4,76%) a été enregistré pour les gérants de l'abattoir et les manœuvres.

III.2.2. Répartition des professionnels collaborés à l'enquête en fonction du Sexe

Tableau 10, nous montre la répartition des professionnels qui ont participé à notre enquête en fonction du sexe.

Tableau 10: Répartition des professionnels collaborés à l'enquête en fonction du sexe

Sexe	Nombre	Pourcentage (%)
Féminin	3	7,14
Masculin	39	92,85

Les trois femmes qui ont participé à notre enquête, étaient toutes des inspectrices vétérinaires au sein de l'abattoir de Rouiba

III.2.3. Description de l'échantillon des professionnels prélevé au sein de l'abattoir de Rouiba

Durant notre enquête, nous avons dépisté 38 ouvriers, dont leurs âges varient de 20 à 58 ans, avec une moyenne d'âge de 36 ± 3 ans, et une moyenne de $16 \pm 3,5$ années de pratique au sein de l'abattoir (voir tableau 11). Certains ouvriers ont commencé le travail dans d'autres abattoirs, ils ont changé par la suite vers l'abattoir de Rouiba.

Tableau 11: Données socio-épidémiologiques de 39 ouvriers de l'abattoir de Rouiba dépistés contre la brucellose

N°	de la	Age (ans)	Profession exercée	Années de travail	Connaissance de la brucellose, tuberculose, rage	Connaissance de l'aspect zootique de la brucellose	Connaissance de l'abattage sanitaire (AS)	Précaution lors AS	Lavages des mains : savon, eau de javèle	Consommation du lait cru	Signes de suspicion de la brucellose (%)	Examens médicaux	Résultats de RBT
1	26	M	11	+++	+	+	-	-	+-	+	--	+	-
2	27	Ta	16	-++	-	+	-	-	++	-	--	-	-
3	44	S	24	+++	+	+	-	-	+-	+	F+Su	+	-
4	51	S	32	+++	+	+	-	-	-+	-	--	-	-
5	29	B	15	-++	-	+	-	-	-	+	--	-	-
6	23	Mo	10	+-	-	+	-	-	-	-	F+Su	+	-
7	50	S	13	-++	-	+	-	-	+-	-	F+Su	-	-
8	33	S	8	+++	+	+	-	-	++	+	F+Su	+	-
9	42	Ta	24	-++	-	+	-	-	++	-	--	-	-
10	40	Ta	25	-+-	-	-	-	-	-+	+	--	-	-
11	52	G	44	+++	+	+	-	-	++	-	--	-	-
12	25	G	4	-+-	-	+	-	-	++	-	--	-	-
13	38	M	20	+++	+	+	-	-	-+	-	--	-	-
14	24	B	4	-+-	-	-	-	-	-	-	--	-	-
15	43	F	2	---	-	-	-	-	+-	+	--	-	-
16	58	Ta	37	-++	-	+	-	-	-	+	--	-	-
17	28	F	5	---	-	-	-	-	-	-	--	-	-
18	21	Mo	4	-++	-	+	-	-	-+	-	F+Su	+	-
19	49	S	30	--+	-	+	-	-	-+	+	--	-	-
20	44	M	30	-++	-	+	-	-	++	+	F+Su	-	-
21	33	B	8	-++	-	-	-	-	+-	+	--	-	-
22	29	S	16	-++	-	+	-	-	-	+	--	-	-
23	22	S	7	-+-	-	-	-	-	+-	+	--	-	-
24	39	M	17	-+-	-	-	-	-	-	+	--	-	-
25	31	F	2	---	-	-	-	-	-	-	--	+	-
26	48	Ta	30	-++	-	+	-	-	-	+	F+Su	-	-
27	32	S	11	+++	+	+	-	-	+-	-	F+Su	-	-
28	50	M	9	+++	+	+	-	-	-	+	--	-	-
29	30	M	10	+++	+	+	-	-	+-	+	--	-	-
30	20	Ta	10	-++	-	+	-	-	+-	-	--	-	-
31	26	F	6	-++	-	+	-	-	+-	-	--	+	-
32	42	M	27	+++	+	+	-	-	++	+	--	-	-
33	26	F	11	---	-	+	-	-	-	-	F+Su	-	-
34	55	S	35	-+-	-	+	-	-	+-	-	--	+	-
35	33	Ta	15	-++	-	+	-	-	-	+	F+Su	-	-
36	32	F	2	+++	+	+	-	-	++	-	--	-	-
37	37	Ta	19	---	-	-	-	-	-	+	--	+	-
38	31	S	6	+++	+	+	-	-	+-	-	--	-	-

Total	36± 3	7 Pr	16± 3,5	12 (31,58%)	11 (28,94%)	28 (73,68%)	0%	8 (21,05)	19 (50%)	10 (26,31%)	9 (23,68)	0%
--------------	------------------	-------------	--------------------	------------------------	------------------------	------------------------	-----------	---------------------------	---------------------	-----------------------------	---------------------------	-----------

Profession exercée : 7 Professions (7 Pr). **M** : maquignon ; **Ta** : traitant d'abats ; **S** : sacrificateur ; **B** : boucher ; **Mo** : manoeuvre ; **G** : gérant ; **F** : frigoriste.

Signes de suspicion de la brucellose : **F+Su** = fièvre + sueur

La synthèse des fiches de renseignements des employés dépistés lors de notre enquête, nous a permis de faire le tableau 11, au vu de ce tableau, on voit que 12 personnes (31,58%) connaissent les trois maladies infectieuses zoonotiques majeurs, qui sont la brucellose, la tuberculose et la rage, alors que 14 personnes (36,84%) connaissent uniquement la tuberculose et la rage, mais ne connaissent pas la brucellose. Enfin, 5 personnes (13,15%) ne connaissent aucune de ces maladies.

Concernant la connaissance de l'aspect zoonotique de la brucellose, 11 employés (29%) ont répondu positivement, le reste des ouvriers dépistés, 27 (71,05%) ne savent pas que la brucellose est une maladie qui se transmet à l'homme.

Un total de 28 employés (73,68%) connaissent l'abattage sanitaire (abattage avec certificat), et savent aussi que les vaches concernées par ce type d'abattage, leurs mamelles et leurs matrices sont inconsommables, les 10 autres ouvriers (26,31%), ne connaissent pas ce type d'abattage.

Personne, ni ceux qui connaissent l'abattage sanitaire, ni ceux qui ne sont pas au courant, ne prend les mesures de précautions lors de manipulation des animaux brucelliques présentés à l'abattoir pour l'abattage sanitaire.

Concernant l'hygiène des employés dépistés et leur propreté après la manipulation des carcasses des animaux, 8 personnes (21,05%) uniquement se lavent les mains avec le savon et l'eau de javel, 12 personnes (31,57%) se lavent les mains avec le savon, alors que 6 personnes (15,78%) se lavent les mains avec l'eau de javel. Enfin, 12 personnes (31,57%) se lavent les mains avec l'eau seule.

Notre enquête révèle que 19 personnes (50%) du personnel dépisté consomment le lait cru d'origine inconnu, et consomment même le lait des vaches présentées à l'abattoir pour l'abattage, 19 personnes (50%) ne consomment pas le lait cru. L'étude a montré que 10 personnes (26,31%) ont présenté des signes de suspicion de la brucellose (fièvre + sueur) soit anciennement ou récemment, 5 parmi eux ont fait des examens médicaux. Les 4 autres

personnes qui ont fait aussi des examens médicaux, n'ont pas présenté des signes de suspicion de la brucellose.

Les sérums des employés de l'abattoir de Rouiba ont été trouvés séronégatifs par les 4 tests utilisés (RBT, SAT, Brucellacapt et le test de coombs) (voir annexe 5).

Concernant les 4 inspecteurs vétérinaires qui ont collaboré à notre étude, 3 étaient de sexe féminin (inspectrices vétérinaires), dont une est l'inspectrice principale de l'abattoir. Ces inspecteurs vétérinaires avaient un âge qui varie de 31 à 48 ans, avec une moyenne d'âge de $40,75 \pm 7$ ans, et ils ont cumulé des expériences professionnelles oscillant de 4 à 16 ans, avec une durée moyenne de travail et d'exercice de 11 ± 6 ans à l'abattoir (tableau 12).

Tableau 12: Données socio-épidémiologiques des 4 inspecteurs vétérinaires de l'abattoir de Rouiba dépistés contre la brucellose

N° de la personne	Age (ans)	Années de pratique	Connaissance de zoonoses majeures	Port des gants lors des manipulations	Désinfection des mains à la fin des manipulations	Consommation du lait cru	Signes de suspicion de la brucellose	Atteinte par la brucellose	Atteinte par une maladie zoonotique	Résultats du RBT
1	31	9	+	-	+	-	-	-	-	-
2	42	4	+	-	+	+	-	-	-	-
3	42	15	+	-	+	-	-	-	-	-
4	48	16	+	-	+	-	-	-	-	-
Tota	40,7	11	4	0%	4	1	0%	0%	0%	0%
l	5	±	(100%)		(100%)	(25%				
	±	6				)				
	7									

La synthèse des fiches de renseignements des inspecteurs vétérinaires dépistés dans notre enquête, nous a permis de faire le tableau 12, ce dernier nous montre que les 4 inspecteurs vétérinaires qui ont collaboré à notre enquête, connaissent les zoonoses majeures (la brucellose, la tuberculose et la rage), mais aucun de ces vétérinaires porte des gants lors de

manipulation et d'inspection des carcasses, mais ils tiennent à se désinfecter les mains à la fin des manipulations.

Parmi les 4 vétérinaires dépistés, personne n'a présenté des signes de suspicion de la brucellose ; ces vétérinaires n'ont été atteints ni par la brucellose, ni par une autre maladie zoonotique.

Les inspecteurs vétérinaires de l'abattoir de Rouiba sont ont été séronégatifs par les 4 tests utilisés (RBT, SAT, Brucellacapt et le test de coombs) (voir annexe 5).

III.2. Discussion

Les résultats du diagnostic de la brucellose des 42 employés de l'abattoir de Rouiba par le RBT, SAT, Brucellacapt et le test de coombs, étaient négatifs, donc un taux de positivité de 0% ; pourtant 46,51% de ces employés consomment le lait cru, et ayant passé une moyenne de $16 \pm 3,5$ années de pratique et d'exercice à l'abattoir, et la majorité aussi ne respectent pas les règles d'hygiène nécessaires.

La discordance est nettement claire entre le résultat obtenu dans cette enquête, et les prévalences rapportées dans plusieurs enquêtes, à Tiaret, Aggad, en 2003, a trouvé une prévalence de 39,42% dans une enquête menée chez les professionnels incluant des fermiers, employés d'abattoir, bouchers et vétérinaires (Aggad and Boukraa, 2006), au Bénin, le taux d'infection était de 17,7% (Chantal et al., 1996), 19,5% des ouvriers des abattoirs sont trouvés séropositifs vis-à-vis de la brucellose en Tanzanie (Swai and Schoonman, 2009), à l'est du Sudan, une enquête menée chez les bouchers, les ouvriers des abattoirs, les trayeurs et les éleveurs, a révélé un taux de positivité de 1% (El-Ansary et al., 2001), au sud de l'Iran, dans une enquête qui a été faite chez les professionnels à risque, une prévalence de 7,2% a été rapportée (Beheshti et al., 2010).

Durant notre enquête, la participation des ouvriers au dépistage de la brucellose était facultative ; certains ouvriers ont refusé les prélèvements, donc l'échantillonnage n'était pas exhaustif, et cela pourrait être une cause de notre résultat négatif.

Certains ouvriers qui ont participé à notre enquête ne travaillent pas à l'abattoir d'une manière permanente, alors que parmi qui ont refusé d'être prélevés, travaillent d'une manière permanente et résident même à l'abattoir, ce qui peut être une autre cause de notre résultat négatif.

Les employés qui ont participé à notre enquête, n'ayant pas le même contact avec les animaux et les carcasses, certains sont en contact occasionnel (maquignons, frigoriste), alors que d'autres sont en contact permanent (sacrificateurs, traitants d'abats).

Les tests sérologiques jouent un rôle majeur dans le diagnostic quand l'agent causal ne peut être détecté par hémoculture. Cependant, leur interprétation est souvent difficile chez les patients souffrant d'une brucellose chronique, en cas de réinfection et guérison, et dans les régions d'endémie où une grande proportion de la population porte des anticorps anti-brucelliques (Orduña et al., 2000b). Meneses *et al* (2009), ont rapporté que des cas de brucellose latente peuvent aller jusqu'à 70 ans (Meneses et al., 2009).

Bien que la brucellose chez l'homme soit rarement mortelle, elle peut être gravement invalidante. La brucellose est une maladie fébrile capable de se démasquer comme une myriade d'entités, à la fois infectieuses et non infectieuses. La maladie a une tendance à la chronicité et à la persistance, devenant une maladie granulomateuse capable d'affecter n'importe quel système d'organe (Ariza, 1999)(Hasanjani Roushan et al., 2004)(Pappas et al., 2005)(Bosilkovski et al., 2007). Le diagnostic opportun et précis de la brucellose humaine continue de contester les cliniciens en raison de ses caractéristiques cliniques non spécifiques, le taux de croissance lente dans les cultures de sang, et la complexité de son sérodiagnostic (Colmenero et al., 1990).

Bien que la guérison définitive des infections par *Brucella* soit habituellement associée à des titres SAT plus faibles, des titres significatifs peuvent être trouvés chez 3% à 5% des patients jusqu'à deux ans après un traitement antibiotique réussi (Roushan et al., 2010). SAT souffre de taux de faux négatifs élevés dans les cas complexes et chroniques (Espinosa et al., 2009). Ruiz-Mesa et al. (Ruiz-Mesa et al., 2005) ont mené une étude dans laquelle des sérums des individus sans exposition régulière à la brucellose ou des antécédents de brucellose, des individus exposés à plusieurs reprises à l'infection par *Brucella* et des individus infectés par *Brucella* qui avaient reçu un traitement approprié au cours des 12 mois précédents, ont été comparés, dans laquelle la spécificité du test au Rose Bengale était respectivement de 94,3%, 91,7% et 76,9% pour les trois groupes. La sensibilité et la spécificité du test au Rose Bengale étaient de 78,3% et de 81%, respectivement, en prenant le CFT comme test de référence (gold standard). Le test est simple à effectuer, rapide (dans les 5-10 min) et a relativement bons résultats dans le diagnostic des patients atteints de brucellose aiguë, mais donne un taux élevé de faux négatifs dans les cas chroniques et compliqués. Aucun test unique n'est parfait, l'histoire clinique associée à une combinaison de deux ou plus de tests réduit les erreurs de diagnostic (Yohannes et al., 2012).

Serra et Vinas (Serra and Vinas, 2004), ont analysé des sérums obtenus à partir de patients atteints de brucellose avec infection primaire (groupe 1) et de patients ayant une infection antérieure (groupe 2) en utilisant le test rose de Bengale, l'épreuve standard d'agglutination sérique (SAT), le test de Coombs, ELISA et le test de fixation du complément. L'hémoculture était précieuse chez les patients du groupe 1, mais inappropriée dans le groupe 2. La combinaison du test positif au rose du Bengale et du test de Coombs $\geq 1/320$ a été le meilleur critère de diagnostic avec une spécificité de 80% et une sensibilité de 100%. Le test de Coombs peut être plus approprié pour la confirmation de la brucellose chez les patients en rechute ou chez les patients atteints d'une maladie persistante.

Des échantillons de sang sont obtenus auprès des patients et des témoins, ils ont été contrôlés pour détecter les anticorps anti-*Brucella* IgM et IgG par test ELISA en utilisant des kits ELISA disponibles dans le commerce selon la procédure standard. Dans une étude de Memish et al. La sensibilité du SAT pour le diagnostic de la brucellose était similaire à la combinaison du test ELISA IgM et ELISA IgG (Memish et al., 2002).

Dans une autre étude, Ciftçi et al. Ont trouvé une sensibilité de 94,3%, 97,1% et 71,4% pour les SAT, ELISA IgG et ELISA IgM, respectivement (Ciftçi et al., 2005). Hasibi et al. Ont examiné la précision du test ELISA pour le diagnostic de la brucellose humaine et déterminé la valeur de seuil optimale pour les résultats ELISA. Le test ELISA IgG était plus fiable que le test ELISA IgM dans le diagnostic de la brucellose humaine (Solis Garcia del Pozo et al., 2014). L'utilisation d'une limite de 10 UI / ml et de 50 UI / ml présentait la plus grande sensibilité (92,9%) et la plus grande spécificité (100%) pour le test ELISA IgG (Hasibi et al., 2013).

Dans une étude menée par Orduna et al. pour évaluer la validité et l'utilité du test Brucellacapt pour le diagnostic de brucellose humaine, 95,1% de sensibilité et 99% de spécificité ont été trouvés. L'efficacité du diagnostic de Brucellacapt était de 0,98 avec un intervalle de confiance de 95%. Cette étude a montré que les tests de Brucellacapt et Coombs ont des performances très similaires dans le diagnostic de la brucellose humaine. Brucellacapt est plus sensible et affiche généralement des titres plus élevés que le test de Coombs (Orduña et al., 2000a).

Chapitre IV : Situation épidémiologique de la brucellose humaine dans la région centre, exemple de la wilaya de Médéa.

IV. 1. Matériel et méthodes

IV.1. 1. Site d'étude

L'étude a été menée dans la Wilaya de Médéa (Algérie), c'est une région agropastorale, connue pour sa grande activité dans l'élevage de bovins, d'ovins et de caprins. Médéa est située dans le centre du pays, au cœur de l'Atlas Tellien, c'est une zone de transit et un trait d'union entre le Tell et le Sahara, et entre les hauts plateaux de l'Est et de l'Ouest. Le climat de Médéa se distingue par ses caractéristiques en raison de son emplacement sur les montagnes de l'Atlas Tellien et l'altitude qui atteint 1240 m et son exposition aux vents venants de l'ouest.

IV.1. 2. Collecte de données

Pour recueillir des données sur les cas de brucellose humaine enregistrés au cours des dix dernières années dans les 64 communes de la Wilaya de Médéa, nous avons contacté la Direction de la Santé et de la Population (Direction de la Santé Publique, DSP) qui nous a fourni les données nécessaires. Les données épidémiologiques des cas de brucellose humaine (âge, sexe, origine géographique) ont également été enregistrées.

IV. 2. Résultats

IV. 2. 1. Evolution de la brucellose humaine à Médéa

L'évolution de l'incidence de la brucellose humaine (nombre de cas annuels) est présentée dans le tableau 13. La figure 9 illustre l'évolution du taux d'incidence au cours de la dernière décennie.

Tableau 13. Evolution de l'incidence de la brucellose humaine à Médéa de 2004 à 2014.

années	Population	Nombre des cas déclarés	Incidence / 10 ⁵
2004	896810	72	8,03
2005	908563	104	11,45
2006	911041	252	27,66
2007	924706	109	11,79
2008	814940	71	7,79
2009	735421	56	6,15
2010	849418	79	5,82
2011	866406	54	6,23
2012	883735	31	3,40
2013	901412	24	2,63
2014	919440	32	3,48
Total	/	884	/

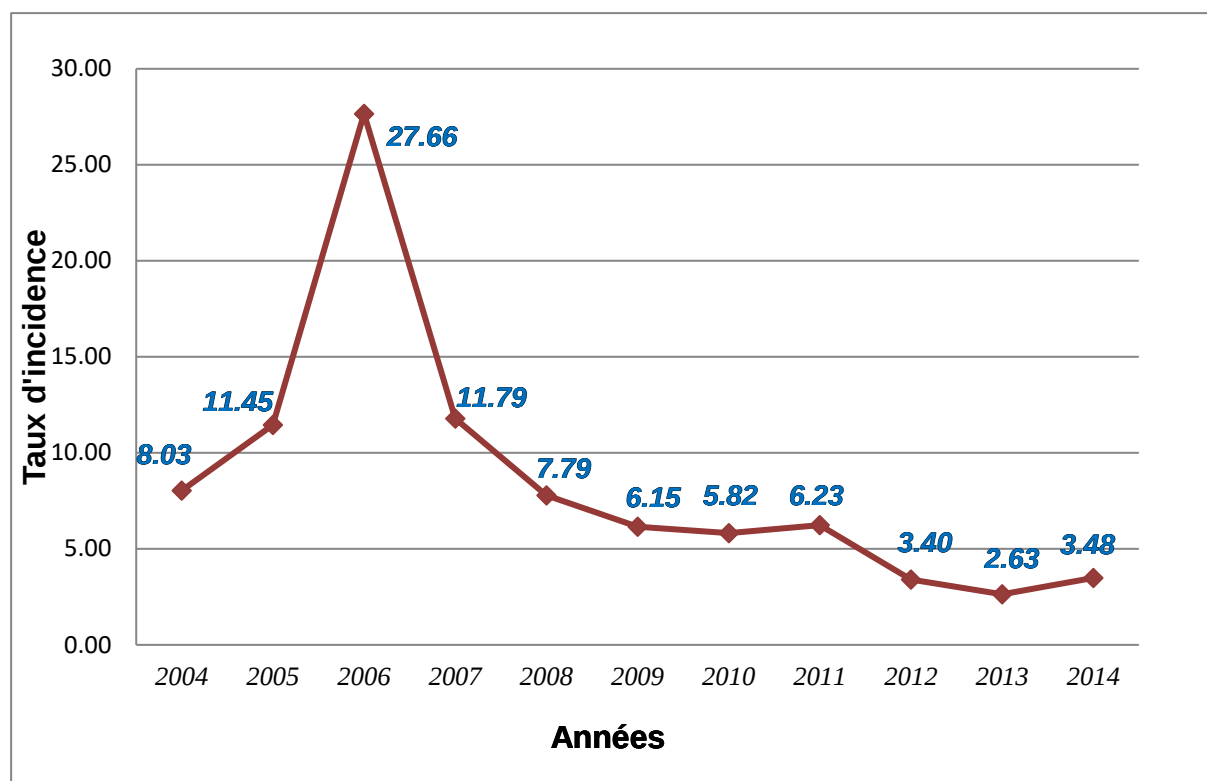


Figure 9. Evolution du taux d'incidence de la brucellose humaine à Médéa de 2004 à 2014.

Les cas de brucellose humaine signalés pendant la période d'étude de dix ans, ont augmenté de 72 cas en 2004 à un pic de 256 cas en 2006. Par la suite, une diminution remarquable entre 2007 et 2013 a été observée, suivie d'une légère augmentation en 2014 avec 32 cas.

IV. 2. 2. La brucellose humaine selon l'âge

Les groupes d'âge proposés sont représentés comme suit: 0-1 ans, 2-4 ans, 5-9 ans, 10-14 ans, 15-19 ans, 20-44 ans, 45-65 et > 60 ans (figure 10) .

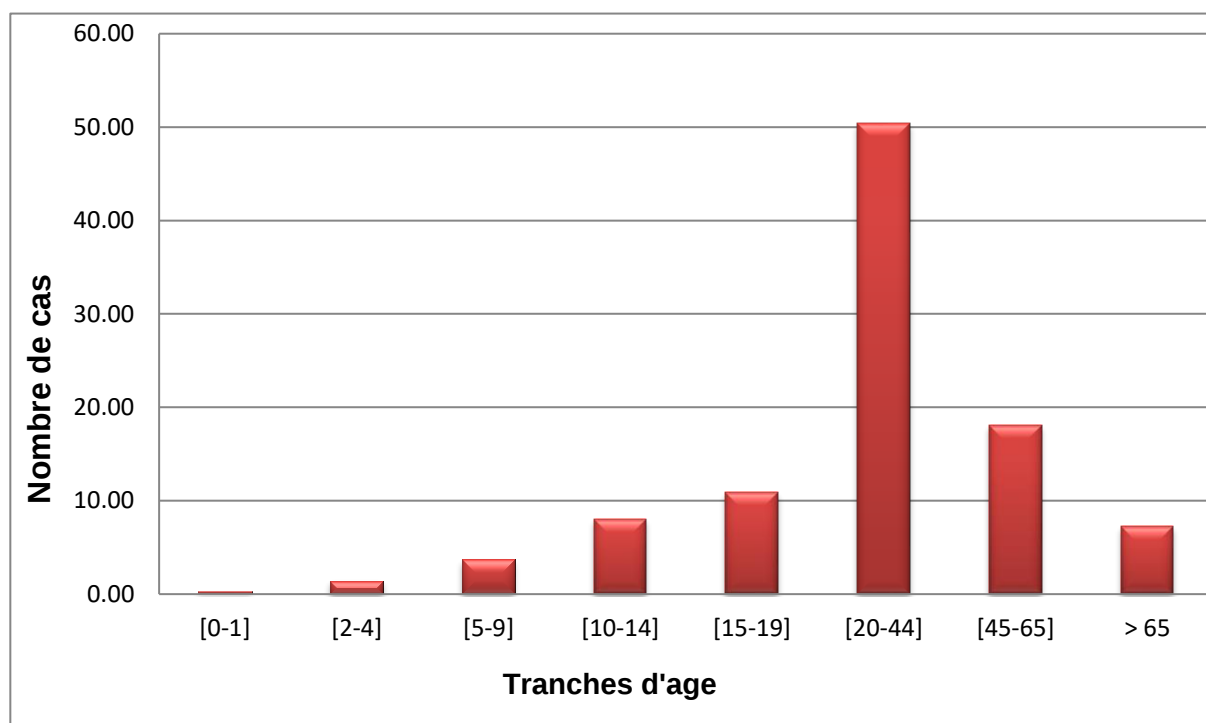


Figure 10. Les cas de brucellose humaine selon différents groupes d'âge de 2004 à 2014.

La brucellose affecte tous les groupes d'âge avec des pourcentages différents; Cela peut être confirmé par nos résultats (Figure 10). Le groupe d'âge le plus touché est de 20 à 44 ans avec 357 cas suivis par les 45-65 ans (128 cas). Au total, 38 cas de brucellose ont été enregistrés chez des enfants de moins de 10 ans.

IV. 2. 3. Brucellose humaine selon le sexe

Sur les 884 cas enregistrés, le tableau 14 montre que la majorité des cas sont des hommes, avec un ratio sexuel de 1,53.

Tableau 14. Cas de brucellose humaine selon le sexe de 2004 à 2014.

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Total	%
Mâle	36	62	150	67	43	40	48	39	18	13	19	535	60,52
Femelle	36	42	102	42	28	16	31	15	13	11	13	349	39,48
Total	72	104	252	109	71	56	79	54	31	24	32	884	100

IV. 2. 3. Brucellose humaine selon la saison

La figure 11 rapporte des cas de brucellose humaine enregistrés chaque mois pendant 10 ans (de 2004 à 2014).

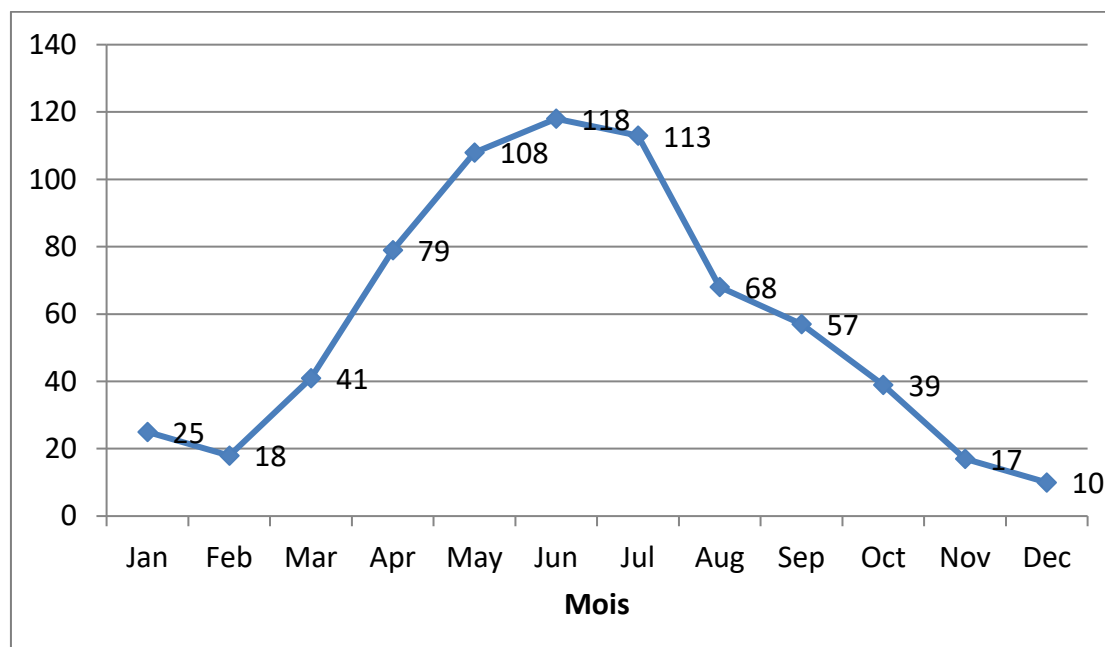


Figure 11. Cas de brucellose humaine enregistrés mensuellement de 2004 à 2014

Les variations dans les cas de brucellose humaine selon la saison indiquée dans la figure 11 montrent un pic en juin avec 118 cas sur un total de 681, tandis que le nombre le plus bas a été enregistré en décembre avec 10 cas.

IV. 2. Discussion

Les recensements effectués à la Direction de la santé publique (Direction de la santé publique) de Médéa de 2004 à 2014 ont révélé 884 cas de brucellose humaine. Selon certains spécialistes, ce chiffre est probablement plus faible qu'en réalité, car de nombreux cas ne sont pas diagnostiqués en raison de l'insuffisance des établissements de santé dans les zones rurales.

Une baisse notable du nombre de cas de brucellose humaine, à partir de 2006 a été observée. Cette régression soudaine et continue pourrait être le résultat de la mise en œuvre en 2006 d'un programme de vaccination des petits ruminants par le vaccin Rev1.

Cependant, la persistance des cas de brucellose humaine s'explique par des mouvements de troupeaux d'ovins et de caprins d'une région à l'autre, sans négliger les points de vente ainsi

que les marchés hebdomadaires, ce qui augmenterait le risque de propagation de cette zoonose.

À l'échelle nationale, les cas signalés de brucellose varient d'une région à l'autre. Une enquête rétrospective sur les maladies infectieuses à Batna (INSP, 2009), entre Janvier 2007 et Décembre 2011 a identifié 121 cas hospitalisés.

En outre, dans la région de Sidi-Belabass, le travail de Tabet et al. 2012 (Tabet-Derraz and Bestaoui, 2012), qui englobe trois décennies, a révélé une incidence annuelle de 62,8 cas par an.

Le groupe d'âge de 20 à 44 ans était le plus touché par la brucellose. Nos résultats sont proches de ceux rapportés par Dao et al en 2009 (Dao et al., 2009), qui a noté que le groupe d'âge le plus touché était celui des jeunes de 20 à 26 ans. Cette catégorie englobait principalement les personnes travaillant comme éleveurs, bouchers, sacrificateurs aux abattoirs et vétérinaires; qui pourraient être contaminés directement ou indirectement par la consommation de produits laitiers non pasteurisés considérés comme les principales sources d'infection par la brucellose.

En Tunisie, un ratio mal-femelle de 1,45 a été enregistré (Chakroun and Bouzouaia, 2007). Un ratio de 1,17 a été trouvé au Mali en 2009 (Dao et al., 2009). Cela s'explique par le fait que la plupart des professionnels de l'agriculture sont des hommes, à savoir les vétérinaires, les agriculteurs, les travailleurs des abattoirs et les charcutiers.

Nos résultats ont montré que la brucellose dans la région de Médéa a été observée au cours des douze mois de l'année avec une moyenne de 56 cas. Cependant, la période entre Mai et Juillet a été distinguée par le nombre le plus élevé de cas enregistrés estimés à 108 en Mai, 118 en Juin et 113 en juillet.

Ceci pourrait être expliqué par la littérature (Dubray, 1972), qui rapporte avec précision que dans les climats tempérés ou froids, il existe une variation saisonnière marquée de l'incidence de la brucellose aiguë avec un pic saisonnier au printemps et en été. Cela coïnciderait avec les périodes de mise-bas et / ou d'avortements chez le bétail, augmentant ainsi le risque de contamination des humains directement ou en consommant du lait infecté et des produits laitiers pendant la période chaude de l'année. Dans les zones tropicales et subtropicales, il n'y a pas d'influence saisonnière sur l'incidence de la brucellose (Dubray, 1972).

Brucella melitensis est l'espèce la plus pathogène de *Brucella* chez l'homme qui infecte de préférence des chèvres et des bovins accidentellement (Corbel, 2006). Médéa est une région où les bovins sont gardés avec des caprins et des ovins, ce qui augmente la contamination croisée entre ces espèces animales et les cas de brucellose humaine dans cette zone pourraient être les résultats d'une infection par *B. melitensis* excrétée dans le lait de bétail et les produits laitiers.

B. melitensis est la souche la plus fréquemment signalée comme une cause de brucellose humaine et la plus souvent isolée. C'est la souche la plus virulente, associée à une maladie aiguë sévère. L'infection des bovins par la brucellose présente un problème particulièrement grave en raison du volume important du lait infecté qui peut être produit par un animal, et en raison de la contamination environnementale par les produits d'avortements (Corbel, 2006).

Chapitre V : Etude de la brucellose bovine dans la région de Médéa

Les objectifs de cette étude sont :

- L'estimation de la séroprévalence de la brucellose bovine dans les fermes ainsi que les abattoirs de la région de Médéa (région rurale par excellence).
- L'évaluation des facteurs de risque, et la répartition géographique des différents foyers de brucellose bovine dans la région d'étude.
- L'isolement et l'identification phénotypique et moléculaire des souches de *Brucella* qui circulent chez la population bovine de la région

V.1. Matériel et Méthodes

Pour la réalisation des objectifs cités ci-dessus, premièrement, nous avons procédé à des visites dans certains élevages situés dans la wilaya de Médéa, au niveau desquels nous avons effectué des prélèvements sanguins et laitiers durant une période de 4 mois et demi (mi-Septembre 2014 - fin Janvier 2015), nous avons aussi élaboré des fiches de renseignements à fin de collecter les informations nécessaires aussi bien des élevages et leurs modes de gestion ainsi que des bovins prélevés (voir annexes 6 et 7).

Deuxièmement, nous avons réalisé des prélèvements sanguins et ganglionnaires au niveau de deux abattoirs, l'abattoir de Médéa (25 bovins prélevés) et celui d'Al-Azizia (200 bovins prélevés) durant la période du 14 Février au 16 Mai 2015. Une fiche de renseignements a été remplie pour chaque animal.

V.1.1. Région d'étude

L'étude a été réalisée dans la wilaya de Médéa qui a une superficie de 8775.65 Km². Cette wilaya est à vocation agropastorale connue par sa grande activité en matière d'élevage bovin, ovin et caprin.

Elle est située dans le centre du pays au cœur de l'Atlas tellien, elle constitue une zone de transit et un trait d'union entre le Tell et le Sahara, et entre les Hauts Plateaux de l'Est et ceux de l'Ouest. Elle est délimitée au nord, par la wilaya de Blida; à l'ouest, par les wilayas de Ain Defla et Tissemsilt ; au sud par la wilaya de Djelfa et à l'est, par les wilayas de M'Sila et Bouira.

La wilaya de Médéa est située dans l'Atlas tellien et se caractérise ainsi par une altitude élevée et un relief mouvementé enserrant quelques plaines de faible extension. Au sud, elle s'étend

aux confins de hautes plaines steppiques. La wilaya se caractérise par quatre principales zones géographiques:

-Le Tell montagneux : région forestière au relief marqué, au climat rude et peu peuplée, ceinturant la wilaya à l'Ouest et au Nord, depuis l'Ouarsenis jusqu'au massif de Tablat ;

-Le Tell collinien : région de peuplement à vocation agricole, située dans le centre de la wilaya ;

-Les plaines du Tell : situées à l'intérieur du Tell collinien, elles sont consacrées à la céréaliculture, toutefois la polyculture est récemment implémentée ;

-Le piémont méridional du Tell : zone de transition vers les hautes plaines steppiques, il est caractérisé par une pluviométrie irrégulière

Le climat de Médéa se distingue par des caractéristiques dues à sa position sur les monts de l'Atlas tellien et son altitude qui atteint 1240 m ainsi qu'à son exposition aux vents et aux vagues de courants venant de l'Ouest (https://fr.wikipedia.org/wiki/Wilaya_de_Médéa).

L'abattoir de Médéa se situe, à la sortie de Médéa, allant vers Ain- Defla, à côté de la route nationale N° 18.

L'abattoir d'El Azizia se situe à au centre de ville de la commune de ElAzizia côté de la ville d'El Azizia, à côté d'Oued Zeghoua.



Figure 12 : abattoirs de Médéa et d'El Azizia (application google earth)

V.1.2. Echantillonnage

Au niveau des élevages, notre population est constituée par les bovins adultes des élevages laitiers de la région d'étude, les veaux et les génisses ont été exclus de l'étude. Notre échantillon est basé sur la clientèle des vétérinaires praticiens de la région de Médéa. A cause du manque d'une base de sondage (liste exhaustive des élevages) nous avons procédé à un échantillonnage par commodité, en sollicitant 18 vétérinaires qui exercent sur 18 communes dans la région de Médéa (64 communes), 10 seulement ont accepté de collaborer à la réalisation de ce travail.

La répartition des élevages varie considérablement d'une région à l'autre, nous avons visité 58 élevages, dont le nombre d'individus varie entre 1 et 26 bovins par élevage. Vu que la région d'étude se caractérise par une prédominance des élevages à caractère familiale (< 5 bovins), nous avons jugé utile d'inclure ce type d'élevage. Chaque élevage était concerné par une fiche d'élevage remplie avec l'aide du propriétaire (voir annexe 6).

Nous avons effectué des prélèvements sanguins et laitiers. De plus, des fiches de prélèvements ont été aussi élaborées dans le but de récolter les données individuelles des animaux (statut d'identification, sexe, âge, race, la date d'introduction de l'animal dans l'élevage, gestation, avortement) (voir annexe 7).

Au niveau des abattoirs, nous avons réalisé des prélèvements sanguins et ganglionnaires (ganglions retropharyngiens et supra-mammaires). Un total de 225 vaches a été prélevé. Des fiches de prélèvements ont été élaborées à fin de récolter les données individuelles des animaux prélevées.

V.1.3. Prélèvements

Le sang est prélevé au niveau de la veine jugulaire dans des tubes secs sous vide type Vacutainer®. Après chaque prise de sang, le tube est identifié, et le numéro est ensuite reporté sur une fiche de prélèvement. Les prélèvements sont acheminés dans une glacière vers le laboratoire, où ils ont été par la suite centrifugés et les sérums ont été congelés à -20°.

Le lait est prélevé dans des tubes de 15 ml. Les prélèvements laitiers ont été acheminés dans une glacière au laboratoire, ils ont été congelés à -20°C jusqu'au jour de culture bactériologique.

Les ganglions retropharyngiens et supra-mammaires sont prélevés dans des sachets stériles, acheminés au laboratoire dans une glacière et congelés à -20°C jusqu'au jour de culture bactériologique.

V.1.4. Analyse sérologique des sérums

Nous avons analysé les sérums par le test au rose Bengal et le test d'immunoprécipitation en double gel diffusion.

V.1.4.1. Rose Bengal test

Les sérums ont été d'abords analysés par le test au rose Bengal, en utilisant l'antigène officiel Espagnol, et selon la méthode standard (Oie, 2016). Afin de décongeler les sérums, nous les

avons laissé à température ambiante avec l'antigène, à l'aide d'une micropipette munie d'un embout stérile et renouvelé après chaque utilisation, et après l'agitation du flacon de l'antigène, une goutte de 25 µl de sérum à tester est déposée à côté d'une goutte de 25 µl du rose Bengal, un bâtonnet en plastique/bois est utilisé pour mélanger le sérum et l'antigène, après agitation de 4 minutes, en présence d'anticorps, il se produit une agglutination visible à l'œil nu (ressemble au témoin positif), tandis qu'en absence d'anticorps, le mélange reste homogène.

V.1.4.2. La réaction d'immunoprécipitation en double gel (DGD-NH)

Ce test a été réalisé avec un extrait de *B. melitensis* 16M riche en NH et S-LPS (LPS lisse) dans 10% de NaCl 0,1 M, NaOH-H₃BO₄ (pH 8,3) gel hypertonique (Diaz et al., 1981), LPS lisse brut de *B. melitensis* a été utilisé comme antigène, celui-ci est placé dans le puits central et les sérums à tester sont placés dans les puits périphériques à 3mm de distance. Les plaques ont été lues après 24 et 48 heures d'incubation dans une chambre humide à température ambiante. Les lignes de précipitation qui sont apparues après 48h sont considérées non spécifiques (Muñoz et al., 2005)

V.1.5. Collecte des données, analyse statistique et calcul des intervalles de confiance

Les renseignements collectés (les résultats de l'inspection *ante mortem*) sont enregistrés sur un bloc note, saisis au fur et à mesure sur un programme *Microsoft Excel* 2007.

L'analyse des variables est réalisée par le test χ^2 avec un risque d'erreur de 5%, pour cela nous avons utilisé le logiciel IBM SPSS Statistics 20. Les représentations graphiques sont réalisées à l'aide du programme Excel 2007.

Nous avons calculé les intervalles de confiance par l'utilisation de la formule suivante

$IC = [pA - 1,96 \sqrt{(pA \cdot qA / n)} ; pA + 1,96 \sqrt{(pA \cdot qA / n)}]$ (Toma et al., 1996), avec pA la prévalence apparente et qA = (1- pA), n la taille de l'échantillon.

V.1.6. Culture bactériologique des prélèvements laitiers et ganglionnaires

Nous avons utilisé le milieu de culture sélectif CITA (De Miguel et al., 2011)(fourni par l'Université de Navarre, Espagne) pour l'isolement de *Brucella* à partir des prélèvements laitiers et ganglionnaires des animaux séropositifs.

Après décongélation, une quantité de 0.5 ml de chaque prélèvement laitier est déposée et étalée sur toute la surface du milieu de culture. Les ganglions ont été dégraissés, leurs surfaces désinfectées par immersion dans l'alcool et légèrement brûlées à l'aide d'un bec Bunsen. Ils

ont été par la suite coupés en petits morceaux avec des ciseaux à l'intérieur des sacs stomachers, et après l'ajout d'une quantité adéquate du tampon phosphate salin (PBS), ils ont été homogénéisés à l'aide d'un stomacher. Une quantité de 0.5 ml est déposée et étalée sur la surface du milieu de culture.

Les boîtes de Petri inoculées ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère aérobie et dans une atmosphère de 5 à 10% de CO₂, et examinée après 3 à 7 jours. Les colonies suspectées morphologiquement d'être *Brucella*, ont été sous-cultivées sur le milieu de base de *Brucella* (BMB; Oxoid, United Kingdom), et les colonies qui ont poussé sur ce dernier, ont été examinées par la coloration de Gram, coloration Stamp (Ziehl-Neelsen modifié) (voir annexe 8), et par agglutination avec anticorps anti-*brucella*. Les souches de *Brucella* isolées sont conservées à – 20°C dans du bouillon trypticase soja, elles ont été envoyées par la suite à l'Université de Navarre (Espagne) pour le typage phénotypique et moléculaire.

V.1.7. Typage phénotypique

Le typage phénotypique a été fait au centre d'investigation et technologie agro-alimentaire (CITA), Zaragose (Espagne). Les souches de *Brucella* ont été cultivées sur la gélose au sang complétée avec 5% de sérum bovin stérile (PAN Biotech, No 0402-P101305, USA) pendant 48-72 h à 37 °C dans une atmosphère contenant 5-10% de CO₂. Après évaluation de la dissociation par le cristal violet et absence de contamination, les colonies ont été sous-cultivées sur le même milieu pendant 24 h dans les mêmes conditions, pour un typage classique (Alton et al., 1988) : les tests d'oxydase et uréase, exigences en CO₂, agglutination avec des sérums monospécifiques anti-A et anti-M, lyse avec les phages Tb, Wb, Iz1 et R / C et sensibilité à la thionine (10 µg/mL and 20 µg/mL), La fuchsine basique (20 µg/mL) et la safranine (100 µg/mL). Les souches de référence *B. melitensis* 16 M, *B. abortus* S19, *B. suis* 1330 et *B. ovis* 63/290 (initialement fournies par le Dr JM Verger, Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie-Nouzilly, France) et maintenues lyophilisées à CITA-Espagne) ont été utilisées comme témoins.

V.1.8. Typage moléculaire

L'ADN génomique a été extrait à partir de cultures pures de *Brucella* en utilisant un kit d'extraction d'ADN microbien commercial (The PowerMicrobial® Maxi DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA).

V.1.8.1. PCR multiplex Bruceladder et PCR AMOS-ERY

La PCR multiplex Bruce-ladder (8 gènes cibles) (García-Yoldi et al., 2007) a été effectuée pour identifier les espèces de *Brucella*. La PCR AMOS-ERY qui discrimine *B. abortus* (biovars 1-2 et 4), *B. melitensis* (biovar 1-3), *B. ovis* et *B. suis* (seulement biovar 1) (Ocampo-Sosa et al., 2005) puis amélioré pour pouvoir identifier des sous-types de biovar 3 de *B. abortus* 3a (d'origine africaine) ou 3b (d'origine européenne).

Tableau 15 : Oligonucléotides utilisés dans le test de PCR multiplex PCR Bruce-ladder

Amorces ^a	Séquence (5'–3')	Taille de l'amplicon (bp)	ADN Cibles	Origine des différences génétiques
BMEI0998f BMEI0997r	ATC-CTA-TTG-CCC-CGA-TAA-GG GCT-TCG-CAT-TTT-CAC-TGT-AGC	1682	Glycosyltransferase, gene <i>wboA</i>	IS711 insertion in BMEI0998 in <i>B. abortus</i> RB51, and deletion of 15,079 bp in BMEI0993-BMEI1012 in <i>B. ovis</i>
BMEI0535f BMEI0536r	GCG-CAT-TCT-TCG-GTT-ATG-AA CGC-AGG-CGA-AAA-CAG-CTA-TAA	450 (1320 ^b)	Immunodominant antigen, gene <i>bp26</i>	IS711 insertion in BMEI0535-BMEI0536 in <i>Brucella</i> strains isolated from marine mammals
BMEII0843f BMEII0844r	TTT-ACA-CAG-GCA-ATC-CAG-CA GCG-TCC-AGT-TGT-TGT-TGA-TG	1071	Outer membrane protein, gene <i>omp31</i>	deletion of 25,061 bp in BMEII826-BMEII0850 in <i>B. abortus</i>
BMEI1436f BMEI1435r	ACG-CAG-ACG-ACC-TTC-GGT-AT TTT-ATC-CAT-CGC-CCT-GTC-AC	794	Polysaccharide deacetylase	deletion of 976 bp in BMEI1435 in <i>B. canis</i>
BMEII0428f BMEII0428r	GCC-GCT-ATT-ATG-TGG-ACT-GG AAT-GAC-TTC-ACG-GTC-GTT-CG	587	Erythritol catabolism, gene <i>eryC</i> (D-erythrulose-1-phosphate dehydrogenase)	deletion of 702 bp in BMEII0427-BMEII0428 in <i>B. abortus</i> S19
BR0953f BR0953r	GGA-ACA-CTA-CGC-CAC-CTT-GT GAT-GGA-GCA-AAC-GCT-GAA-G	272	ABC transporter binding protein	deletion of 2653 bp in BR0951-BR0955 in <i>B. melitensis</i> and <i>B. abortus</i>
BMEI0752f BMEI0752r	CAG-GCA-AAC-CCT-CAG-AAG-C GAT-GTG-GTA-ACG-CAC-ACC-AA	218	Ribosomal protein S12, gene <i>rpsL</i>	point mutation in BMEI0752 in <i>B. melitensis</i> Rev.1
BMEII0987f BMEII0987r	CGC-AGA-CAG-TGA-CCA-TCA-AA GTA-TTC-AGC-CCC-CGT-TAC-CT	152	Transcriptional regulator, CRP family	deletion of 2,203 bp in BMEII0986-BMEII0988 in <i>B. neotomae</i>

^a Les désignations sont basées sur les séquences du génome de *B. melitensis* (BME) ou *B. suis* (BR). F: vers l'avant; R: inverse.

^b En raison d'une insertion d'ADN dans le gène *bp26*, la taille d'amplicon dans des souches de *Brucella* isolées à partir de mammifères marins est de 1320 pb

V.1.8.2. Analyse de plusieurs locus VNTR (MLVA-16)

VNTR (MLVA-16) est la stratégie optimale et actuelle pour le génotypage *Brucella* (Dahouk et al., 2007). Les 16 marqueurs ont été classés en deux panneaux: le panneau stable 1 avec huit loci minisatellites (Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45, Bruce55) et le panneau hypervariable 2 avec huit loci microsatellites: panneau 2A, 3 loci (Bruce18, Bruce19 et Bruce21) et panneau 2B, 5 loci (Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 et Bruce30). Les tailles des fragments ont été converties en nombres répétés (U) et analysées en tant qu'ensemble de données de caractères, en utilisant BioNumerics v7.1 (Applied Maths, Belgique). L'analyse des grappes a été effectuée à l'aide de l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method Algorithm) avec une distance euclidienne ou un arbre d'extension minimal (MST) avec des matrices de distance pour les données catégorielles.

Les modèles MLVA-11 et MLVA-16 obtenus avec les 24 souches Algériennes isolées dans cette étude, ont été comparés avec les souches de référence *B. abortus* biovar 1 (544), *B. abortus* biovar 3 (Tulya), *B. melitensis* biovar 3 (Ether), et 115 génotypes MLVA du Nigeria, du Kenya, du Soudan, de la France et de l'Espagne précédemment publiés et / ou disponibles aux collections CITA et ANSES et à la base de données *Brucella* 2012 (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>) organisé par l'Université Paris Sud (Orsay, France).

V.2. Résultats

V.2.1. Résultats d'analyse des fiches d'élevage

Les visites effectuées sur 58 élevages étalées sur 18 communes dans la région d'étude nous ont permis de collecter quelques informations nécessaires.

La synthèse des résultats des fiches d'élevages fait ressortir plusieurs points, dont on présente les 3 principaux.

Type d'élevage

Cette question avait pour objectif, savoir si l'élevage est uniquement bovin ou mixte (bovins, ovins et/ou caprins).

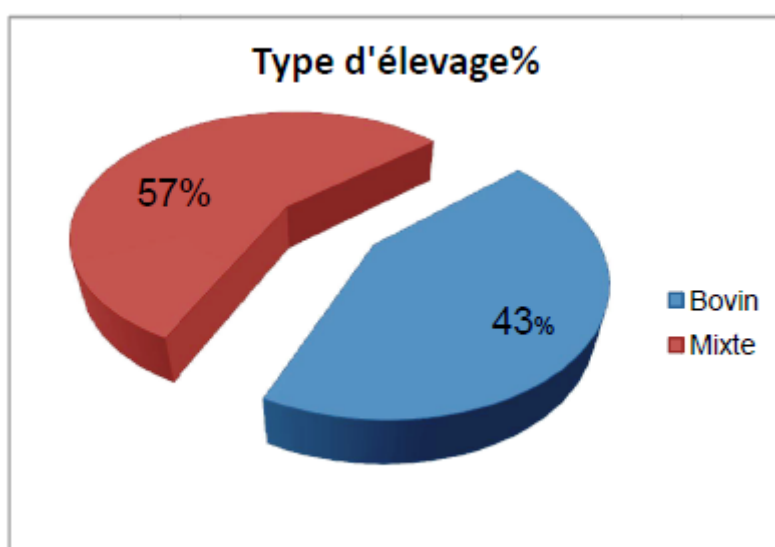


Figure 13 : type d'élevages inclus dans notre étude.

Nous constatons que la majorité des élevages sont mixte 57% par contre 43% sont des élevages bovins (figure 13). Ceci pourrait augmenter le risque de transmission interspécifique de la brucellose au sein des élevages mixtes.

Présence et fréquence des avortements

Deux questions ont été posées aux éleveurs pour connaître la présence ou l'absence des avortements, ainsi que leurs fréquences.

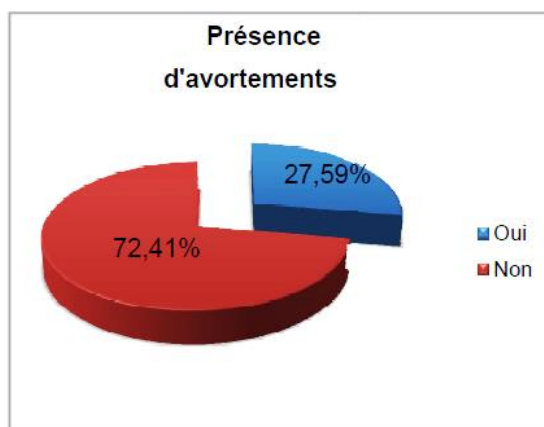


Figure 14 : présence des avortements dans les élevages

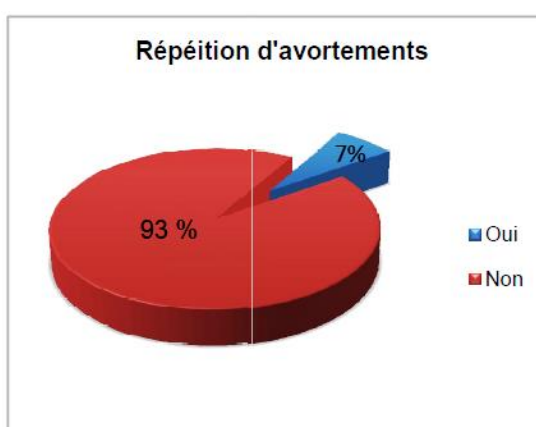


Figure 15 : fréquence des avortements

Le résultat de notre enquête révèle que les avortements étaient présents chez 27,59 % des élevages, alors que les 72,41% restant n'en présentaient pas (figure 14).

Aussi nous avons remarqué que chez la majorité des élevages (93%), les avortements répétitifs concernaient uniquement les (7%) (figure 15).

Cette question qui a traité l'avortement a engendré une hésitation de la part des éleveurs lors du remplissage des fiches d'élevage, ce qui nous laisse un peu prudent en ce qui concerne le pourcentage réel de récurrence des avortements ce qui pourrait être revus à la hausse.

Connaissance de la brucellose

L'objectif de cette question est de nous renseigner sur le degré de connaissance des éleveurs concernant cette maladie zoonotique à conséquences économiques lourdes.

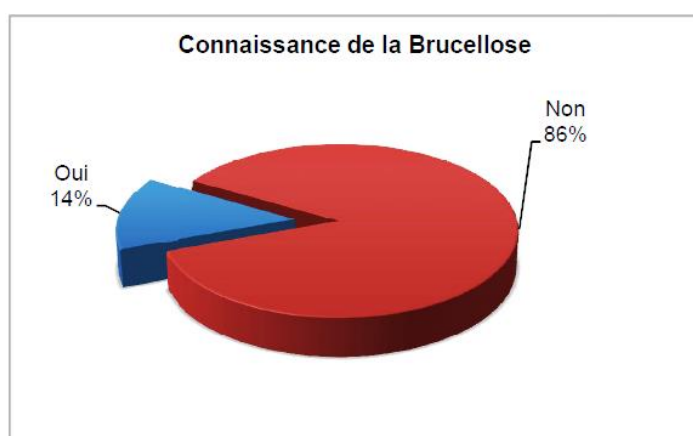


Figure 16 : connaissance de la brucellose

Nous avons constaté que la plus part des éleveurs ne connaissent pas la brucellose (86%) et que seulement une petite tranche d'entre eux prétendent la connaître (14%). Ce qui laisse la majorité d'entre eux méconnaissant vis-à-vis des conséquences qui peuvent en découler.

V.2.2. Résultats sérologiques des bovins prélevés au niveau des fermes

L'analyse de 295 sérums de bovins (34 mâles, 261 femelles) par le test au rose Bengale et confirmés avec le DDG-NH immunoprécipitation, a révélé 8 bovins séropositifs (7 femelles et 1 male), c'est-à-dire un taux de positivité de $2,71\% \pm 1.81$ (2,86 % chez les femelles et 2,94 % chez les mâles).

Les résultats positifs d'analyse sérologique par le RBT et le DDG-NH immunoprécipitation, des sérums de bovins prélevés au niveau des fermes de la Wilaya de Médéa, sont mentionnés dans le tableau 16 ci-dessous.

Tableau 16 : Les résultats positifs d'analyse sérologique par le RBT et le DDG-NH immunoprécipitation

Code prélèvement	RBT	DDG-NH
E17B10	(+)	LPS+, NH-
E19B2	(+)	LPS+, NH+
E24B4	(+)	LPS+, NH-
E29B4	(+)	LPS+, NH-
E33B2	(+)	LPS+, NH-
E43B3	(+)	LPS+, NH-
E44B1	(+)	LPS+, NH+
E55B3	(+)	LPS+, NH-

E : élevage ; B : bovin

Les 8 bovins trouvés séropositifs par le RBT, ont été confirmés avec le DDG-NH et ils ont manifesté les résultats suivants : 2 LPS+, NH+ et 6 LPS+, NH-

Les informations relatives à la prévalence troupeaux ainsi que l'intervalle de confiance sont rapportées dans le tableau 17.

Tableau 17 : Nombre de bovins positifs et négatifs, et les pourcentages correspondants en fonction des troupeaux.

	Total (%)	Positifs (%)	Négatifs (%)	[IC] %
Elevages	58 (100)	8 (13.80)	50 (87.20)	[13,73 - 13,87]

Durant notre étude, nous avons prélevé 58 élevages, dont 8 sont trouvés séropositifs, soit une prévalence troupeau de (13,80%), avec un intervalle de confiance de $13,80\% \pm 0,70$ (IC 95%).

Les informations relatives à la répartition des cheptels visités en fonction de l'âge sont rapportées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Nombre de bovins positifs et négatifs, et les pourcentages correspondants en fonction des classes d'âges.

	Total (%)	Positif (%)	Négatifs (%)	P (Chi2)
Bovins $\leq$ 2 ans	101 (100)	1 (1)	100 (99)	0,00...
Bovins de 2 à 5 ans	139 (100)	1 (0.71)	138(99,29)	
Bovins $\geq$ 8 ans	55 (100)	6 (10,90)	49 (89,09)	
Total	295 (97,28)	8 (2,71)	287 (100)	

Les tranches d'âge proposées étaient : < 2 ans, 2-5 ans puis > 5 ans. D'après le tableau 18, on remarque que les bovins âgés de plus de 8 ans sont les plus touchés avec 6 cas séropositifs (10,90%), suivie par les deux autres classes $\leq$ 2 ans et 2 à 5 ans avec 1 (1%), 1 (0.71%) respectivement. La comparaison de ces résultats par le Chi2 SPSS 20.0 a donné un résultat hautement significatif (P = 0.00...).

Les résultats de la séropositivité en fonction du sexe sont rapportés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Répartition du nombre de bovins et les pourcentages associés en fonction du sexe.

	Total (%)	Positifs (%)	Négatifs (%)	P (Chi2)
Male	34 (100)	1 (2.94)	33 (97.05)	> 0.05
Femelle	261(100)	7 (2.68)	254 (97.31)	
Total	295(100)	8 (2,71)	287 (97.28)	

Sur un total de 295 prélèvements sérologiques, 7 femelles (2.94 %) sont trouvées séropositives, alors qu'un seul male (2.68 %) était séropositif. La comparaison de ces résultats par le test Chi2 SPSS 20.0 a donné un résultat non significatif (P > 0.05).

Durant notre travail, nous avons identifié 3 types de bovins, ceux de l'importation (Montbiliard, flekveih, Holstein et brune des alpes), les bovins améliorés (bovins croisés) et les bovins de race locale Algérienne. Les résultats relatifs à la séropositivité de ces types sont rapportés dans le tableau 20.

Tableau 20 : Répartition du nombre de bovins et les pourcentages associés en fonction du type de bovins.

	Total (%)	Positif (%)	Négatif (%)	P (Chi2)
Bovins d'importation	201 (100)	5 (2,49)	196 (97,51)	> 0.05
Bovins croisés	80 (100)	3 (3.75)	77 (96,25)	
Locale	14 (100)	0 (0)	14 (100)	
Total	295 (100)	8 (2.71)	287 (97.28)	

Parmi les 201 bovins d'importation analysés, 5 sont trouvés séropositifs soit une séroprévalence de 2,49%, alors que parmi les 80 bovins croisés, 3 étaient séropositifs. Cependant, nous n'avons enregistré aucun bovin séropositif de race locale. L'analyse statistique par le Chi-2 SPSS 20.0 n'a enregistré aucune différence significative entre les différents types de bovins ($P > 0.05$).

Les résultats en fonction des antécédents d'avortement chez les vaches prélevées sont rapportés dans le tableau 21.

Tableau 21 : Répartition du nombre de bovins et les pourcentages associés en fonction d'antécédents d'avortements.

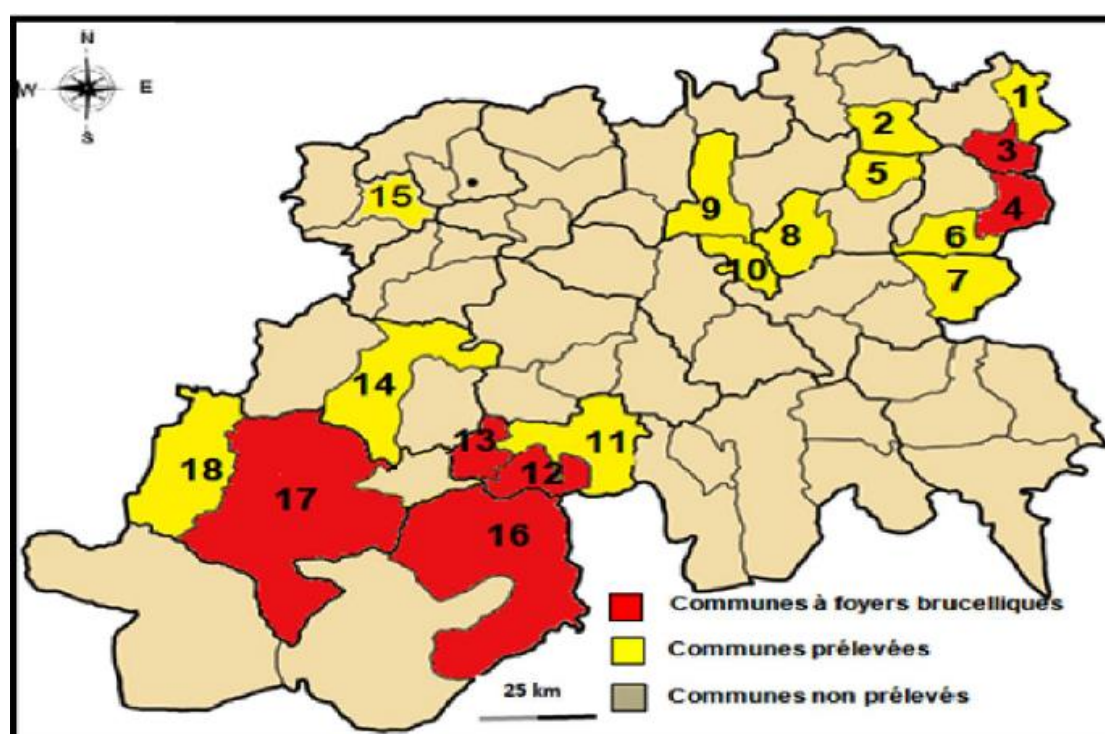
	Total (%)	Positifs (%)	Négatifs (%)	P (Chi2)
Avorté	23(100)	1 (4,34)	22 (95,65)	> 0.05
Non avorté	238(100)	6 (2,52)	232 (97,47)	
Total	261(100)	7 (2,68)	254 (97.31)	

Nos résultats montrent que parmi les 23 vaches qui ont eu un historique abortif, une était séropositive (4,34%), alors que chez les vache sans historique d'avortement, 6 (2,59%) sont trouvées séropositives. L'analyse statistique a révélé une différence non significative ($P > 0.05$).

La distribution des communes prélevées ainsi que les foyers brucelliques sont présentés dans le tableau 22 et la figure 17.

Tableau 22: Numéro et nombre de foyers pour chaque commune.

Noms des communes	Nombre de Foyers	Noms des communes	Nombre de Foyers
1- Sedraya	0	10- Bousken	0
2- Meghraoua	0	11- Mfatha	0
3- Azizia	2	12- Saneg	1
4- Elgalb Elkbir	1	13- K.E.B	2
5- Sidi rabia	0	14- Ouled Antar	0
6- Bir Benabed	0	15- Oued Herbil	0
7- Djouab	0	16- Boughzzoul	1
8- Beni Slimane	0	17- Aziz	1
9- Sidi Naamane	0	18- Bouaich	0

**Figure 17 :** distribution des foyers brucelliques dans la wilaya de Médéa.

Au cours de notre enquête, nos prélèvements ont concerné 18 communes réparties sur deux régions du territoire de la wilaya de Médéa. Un nombre de 10 communes faisaient partie de la région Est de la wilaya de Médéa (Sedraya, Meghraoua, El azizia, Elgalb Elkbir, Sidi rabia, Bir Benabed, Djouab, Beni Slimane, Sidi Naamane et Bousken) et 8 communes de la région Ouest (Mfatha, Saneg, Ksar El Boukhari, Ouled Antar, Oued Herbil, Boughezzoul, Aziz et Bouaich). Nous Avons noté qu'au total 6 communes présentaient chacune au moins un foyer brucellique. Les communes au nombre de 4 englobant Boughzoul, Saneg, Aziz et Elgalb Elkbir ne comportaient qu'un seul foyer alors que celles de Ksar Elboukhari et El Azizia en comptait 2.

V.2.3. Résultats sérologiques des bovins prélevés au niveau des abattoirs

Sur les 225 prélèvements sanguins récoltés au niveau des abattoirs de Médéa ville et El-Azizia, 24 vaches ($10,66 \pm 0,04 \%$) sont trouvées séropositives, après avoir analysé leurs sérums avec le RBT et le DDG-NH immunoprécipitation, dont les résultats sont indiqués dans le tableau 23.

Tableau 23 : Les résultats positifs d'analyse sérologique par le RBT et le DDG-NH immunoprécipitation.

Code prélèvement	RBT	DDG-NH
AM1	(+)	LPS+, NH-
AM21	(+)	LPS+, NH-
AM25	(+)	LPS+, NH-
AA7	(+)	LPS+, NH-
AA10	(+)	LPS+, NH-
AA27	(+)	LPS+, NH-
AA31	(+)	LPS+, NH-
AA33	(+)	LPS+, NH-
AA34	(+)	LPS+, NH+
AA38	(+)	LPS+, NH+
AA40	(+)	LPS+, NH+
AA48	(+)	LPS+, NH+
AA49	(+)	LPS+, NH-
AA53	(+)	LPS+, NH+
AA69	(+)	LPS+, NH-
AA111	(+)	LPS+, NH+
AA120	(+)	LPS+, NH-
AA136	(+)	LPS+, NH-
AA142	(+)	LPS+, NH+
AA156	(+)	LPS+, NH-
AA157	(+)	LPS+, NH-
AA171	(+)	LPS+, NH+
AA173	(+)	LPS+, NH-
AA186	(+)	LPS+, NH+

AM : abattoir de Médéa, AA : abattoir d'El-Azizia

Les 24 vaches trouvées séropositives par le RBT, ont été confirmées avec le DDG-NH, nous avons donc obtenu les résultats suivants : 9 LPS+, NH+ et 15 LPS+, NH-

Tableau 24 : Nombre de bovins positifs et négatifs, et les pourcentages correspondants en fonction des abattoirs.

	Total (%)	Positif (%)	Négatifs (%)	P (Chi2)
Médéa	25(100)	3 (12)	22 (88)	> 0.05
El Azizia	200(100)	21 (10,5)	179 (89.5)	

Nous avons prélevé 200 vaches au niveau de l'abattoir d'El Azizia, dont 21 (10,5 %) était séropositives et 25 vaches au niveau de l'abattoir de Médéa dont 3 (12%) sont trouvées séropositives. En utilisant le test Chi2 SPSS 20.0, la différence n'était pas significative ($P > 0.05$).

Tableau 25: Prévalence de la brucellose en fonction des caractéristiques des bovins prélevés.

Caractéristiques des vaches	variables	Population (n)	Nombre de cas positifs	Prévalence (%)	P (Chi2)
Type	Bovins d'importation	37	2	5,40	> 0.05
	Croisé	181	20	11,05	
	Locale	7	2	28,57	
Age	2 – 5 ans	110	17	15,45	<0.05
	≥ 5 ans	115	7	6,08	
Gestation	Oui	36	4	11,11	> 0.5
	Non	189	20	10,60	

Un total de 2 vaches importées (5,40%), 20 vaches issues des croisements (11,05%) et 2 vaches de race locale (28,57%) sont trouvées séropositives. La répartition selon l'âge a montré que la plus part des vaches séropositives sont celles âgées entre 2 et 5 ans avec un nombre de 17 (15,45%), alors que 7 vaches (6,08%) parmi celles âgées de plus de 5 ans étaient séropositives. Un total de 4 vaches gestantes (11,11%) et 20 non gestantes (10,60%) sont trouvées séropositives. L'analyse par le test Chi2 a montré une différence significative concernant l'âge, et non significative en ce qui concerne le type de vaches prélevées et l'état de gravidité.

V.2.4. Résultats d'analyse microbiologique

Au total, 24 souches de *Brucella* ont été isolées, 2 souches ont été isolées à partir des 7 prélèvements laitiers des vaches séropositives prélevées au niveau des fermes de la wilaya de Médéa, alors que 22 souches ont été isolées à partir des prélèvements ganglionnaires des vaches séropositives prélevées au niveau des abattoirs de la même wilaya.

V.2.4.1. Typage phénotypique

Les caractères usuels d'identification des bactéries à coloration de Gram négative sont, pour toutes les souches de l'échantillon, conformes à la définition du genre *Brucella*. Toutes les souches sont de type morphologique lisse (smooth) ; elles sont effectivement résistantes à l'action du bactériophage R/C. 22 souches sont lysées par les bactériophages Tb, Wb et Iz, ce qui est conforme au lysotype de l'espèce *B. abortus*, par contre, 2 souches sont résistantes à l'action de ces trois bactériophages, ce qui est conforme au lysotype de l'espèce *B. melitensis*. La diagnose du biotype repose sur le profil de réponse à l'agglutination par les sérums monospécifique, la croissance en présence de colorant et l'exigence en gaz carbonique (CO₂). 22 souches exigent le CO₂, sont urease positive, et agglutinent exclusivement avec le sérum anti-A. La différenciation en biovar repose donc essentiellement sur l'épreuve des colorants dont les résultats distinguent 2 groupes au sein de ces 22 souches, le premier groupe est composé de 4 souches sensibles à la thionine (10, 20 et 40 µg/ml de milieu base) mais résistantes à la fuchsine basique (10 et 20 µg/ml) et résistantes aussi à la safranine (100 µg/ml), ce qui répondent à la définition de *Brucella abortus* biovar 1 CO₂ dépendant. Le 2^{ème} groupe contient 18 souches, résistantes aux trois colorants, thionine, fuchsine basique et safranine aux mêmes concentrations citées auparavant, ce qui confirment que ces souches sont bel et bien *Brucella abortus* biovar 3. Enfin, les deux souches de *Brucella melitensis* n'exigent pas le CO₂ pour leur croissance, sont urease positive, agglutinent avec le sérum anti-A et le sérum anti-M, résistantes à la thionine (10 et 20 µg/ml) mais sensibles à la concentration 40 µg/ml, résistantes à la fuchsine basique (10 et 20 µg/ml) et à la safranine (100 µg/ml), ce qui répondent à la définition de *Brucella melitensis* biovar 3.

V.2.2. Typage génotypique

L'analyse des souches de *Brucella* isolées à partir des bovins de la région de Médéa, par la technique de PCR multiplex bruceladder, a montré que 22 souches sont *Brucella abortus*, et 2 souches sont *Brucella melitensis* (figure 18 et 19).

Tableau 26 : Résumé des résultats bactériologiques

Location ^a	Échantillon ^b	Le code de la souche ^c	Espèces et biovars (bv)	Subtype (AMOS-ERY PCR)	Bruce55 répétitions (MLVA)
Médéa (f)	Lait	AB0114	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	3
Médéa (f)	Lait	AB0115	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	3
Médéa ville (a)	Mammaire	AB0338	<i>B. abortus</i> bv 1	-	-
Médéa ville (a)	Mammaire	AB0339	<i>B. abortus</i> bv 1	-	-
El-Azizia (a)	Retropharyngiens	AB0122	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (a)	Mammaire	AB0123	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (a)	Mammaire	AB0124	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	3
El-Azizia (a)	Mammaire	AB0125	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (a)	Mammaire	AB0126	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (a)	Mammaire	AB0127	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (a)	Mammaire Retropharyngiens	AB0116 AB0117	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (a)	Mammaire Retropharyngiens	AB0129 AB0130	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (a)	Mammaire Retropharyngiens	AB0118 AB0119	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (a)	Mammaire	AB0128	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (a)	Mammaire Retropharyngiens	AB0120 AB0121	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	3
El-Azizia (a)	Mammaire Retropharyngiens	AB0336 AB0337	<i>B. abortus</i> bv 1	-	-
El-Azizia (a)	Mammaire Retropharyngiens	AZB240 AZB241	<i>B. melitensis</i> bv 3	-	-
El-Azizia (a)	Mammaire	AB0131	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1

^a (f) ferme, (a) abattoir

^b Échantillons collectés pour la culture bactériologique incluant le lait à partir des fermes, et les ganglions mammaires et retropharyngiens à partir des abattoirs.

^c Voir aussi les figures 20 et 21.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

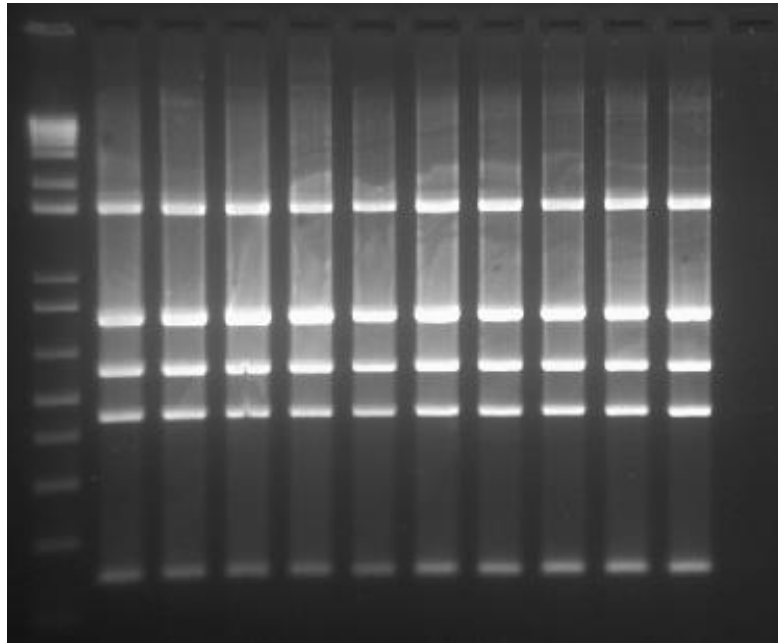


Figure 18a : résultats de l'analyse des souches Algériennes par la PCR multiplex bruceladder. (1) 1kb ADN ladder ; (2) souche de référence *B. abortus* 544 ; (3-11) souches de *B. abortus* isolées à partir des bovins de la région de Médéa ; (12) control négatif.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

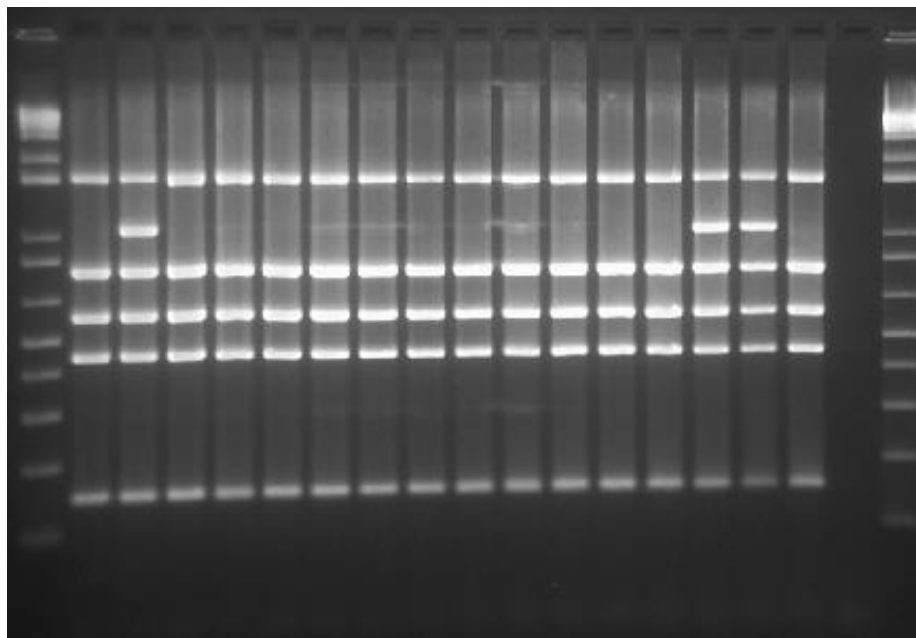


Figure 18b : résultats de l'analyse des souches Algériennes par la PCR multiplex bruceladder. (1) 1kb ADN ladder ; (2) souche de référence *B. abortus* 544 ; (3) souche de référence de *B. melitensis* 16M ; (4-14 et 17) souches de *B. abortus* isolées à partir des bovins de la région de Médéa ; (15 et 16) souches de *B. melitensis* isolées à partir des bovins de la région de Médéa ; (12) control négatif.

L'analyse des souches de *Brucella abortus* par la technique PCR AMOS-ERY, a montré que toutes les souches de *B. abortus* biovar 3 isolées à partir des bovins de la région de Médéa, sont du génotype 3b (génotype Européen) (figure 19).

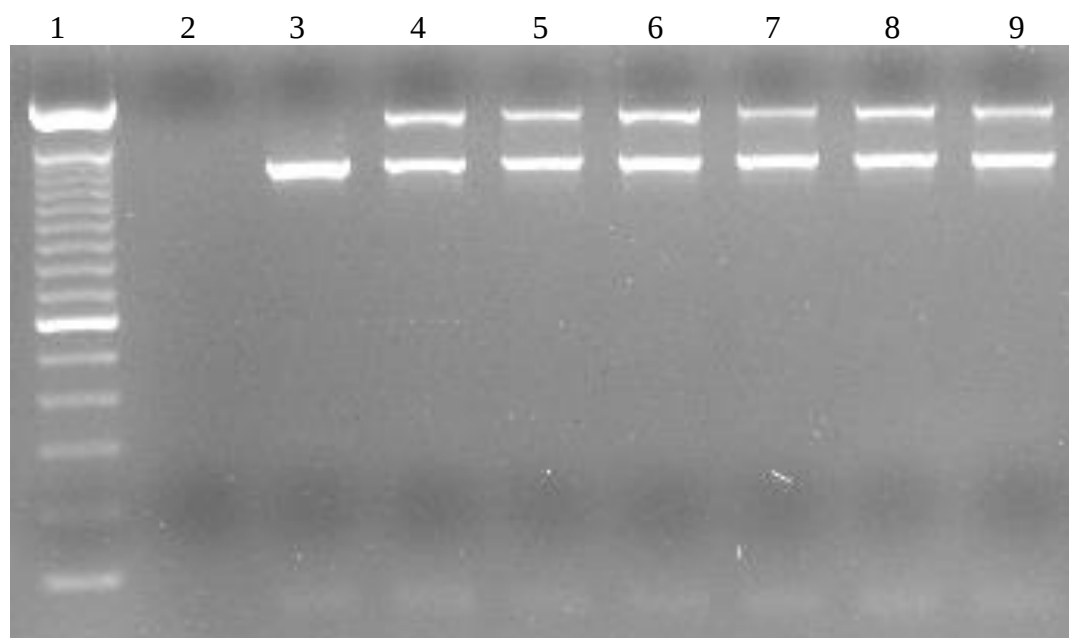


Figure 19 : résultats de l'analyse des souches Algériennes *B. abortus* par la PCR AMOS-ERY.

1. 100pb DNA ladder
2. Contrôle négatif
3. Contrôle du génotype 3a (souche de référence Tulya)
4. Contrôle du génotype 3b (*B. abortus* biovar 3, souche Espagnole de la collection CITA)
- 5-9. Souches de *B. abortus* biovar 3 isolées des bovins à Médéa (génotype 3b)

16M

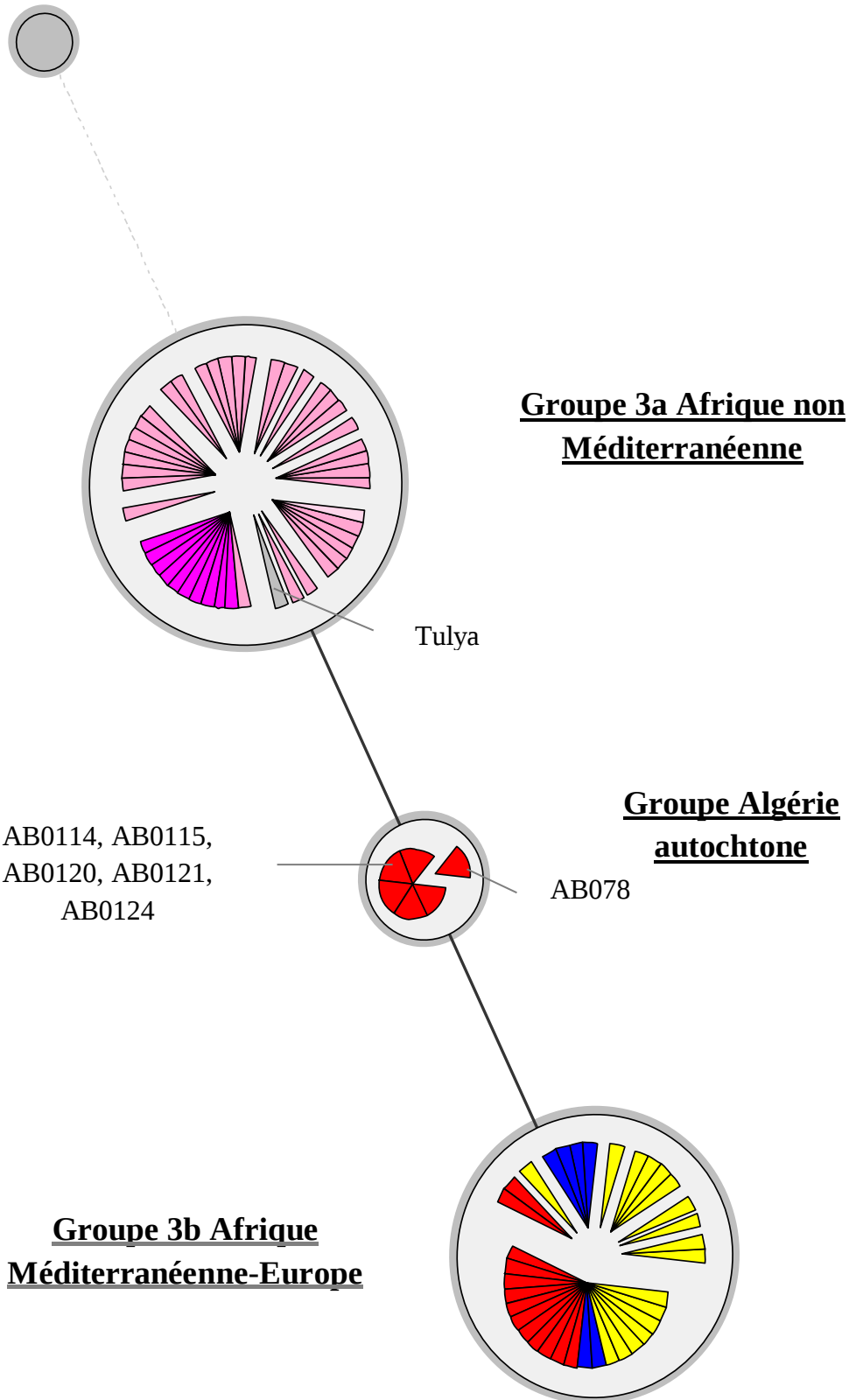


Figure 20 : MST des génotypes MLVA11 de 89 isolats mondiaux *B. abortus* biovar 3, y compris Tulya. Le MST a été construit avec un coefficient catégorique utilisant *B. melitensis* bv 1 16M comme hors-groupe. La taille des cercles reflète le nombre d'isolats avec un génotype MLVA particulier. La largeur de la ligne reflète la distance génétique entre les génotypes (les lignes courtes lourdes relient les SLV, les lignes plus minces et plus longues relient les DLV). Chaque pays reçoit une couleur différente. Bleu: France; Fuchsia: Kenya; Gris: souches de référence; Rose clair: Soudan; Rose: Nigéria; Rouge: Algérie; Jaune: l'Espagne.

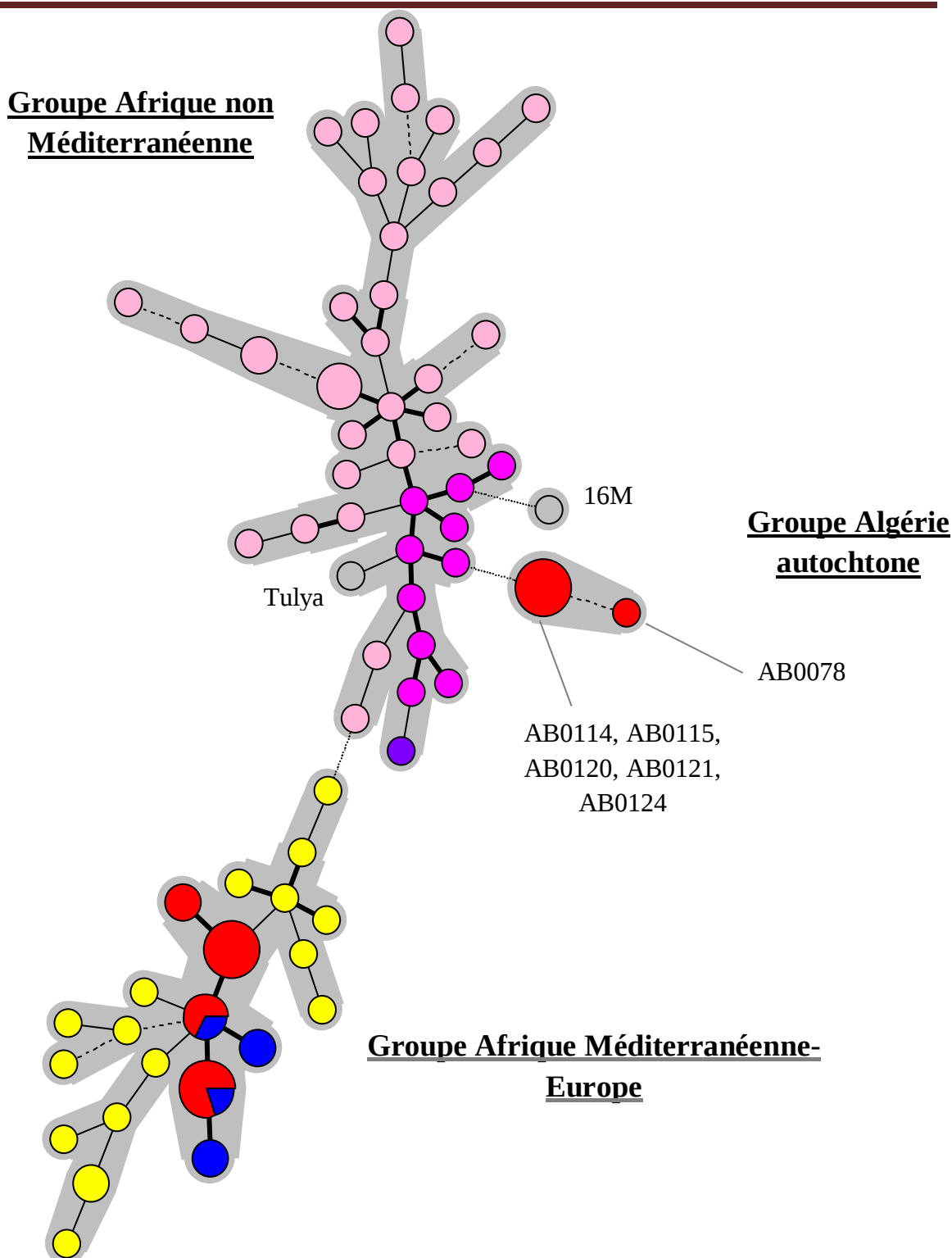


Figure 21: Répartition des génotypes MLVA-16 de 89 isolats mondiaux *B. abortus* biovar 3, y compris Tulya.

Le MST a été construit avec un coefficient catégorique utilisant *B. melitensis* bv 1 16M comme hors groupe (échelle logarithmique). La taille des cercles reflète le nombre d'isolats avec un génotype MLVA particulier. La largeur de la ligne reflète la distance génétique entre les génotypes (les lignes courtes lourdes relient les SLV, les lignes plus minces et plus longues relient les DLV). Chaque pays reçoit une couleur différente. Bleu: France; Fuchsia: Kenya; Gris: souches de référence; Rose: Nigéria; Violet: Soudan; Rouge: Algérie; Jaune: l'Espagne.

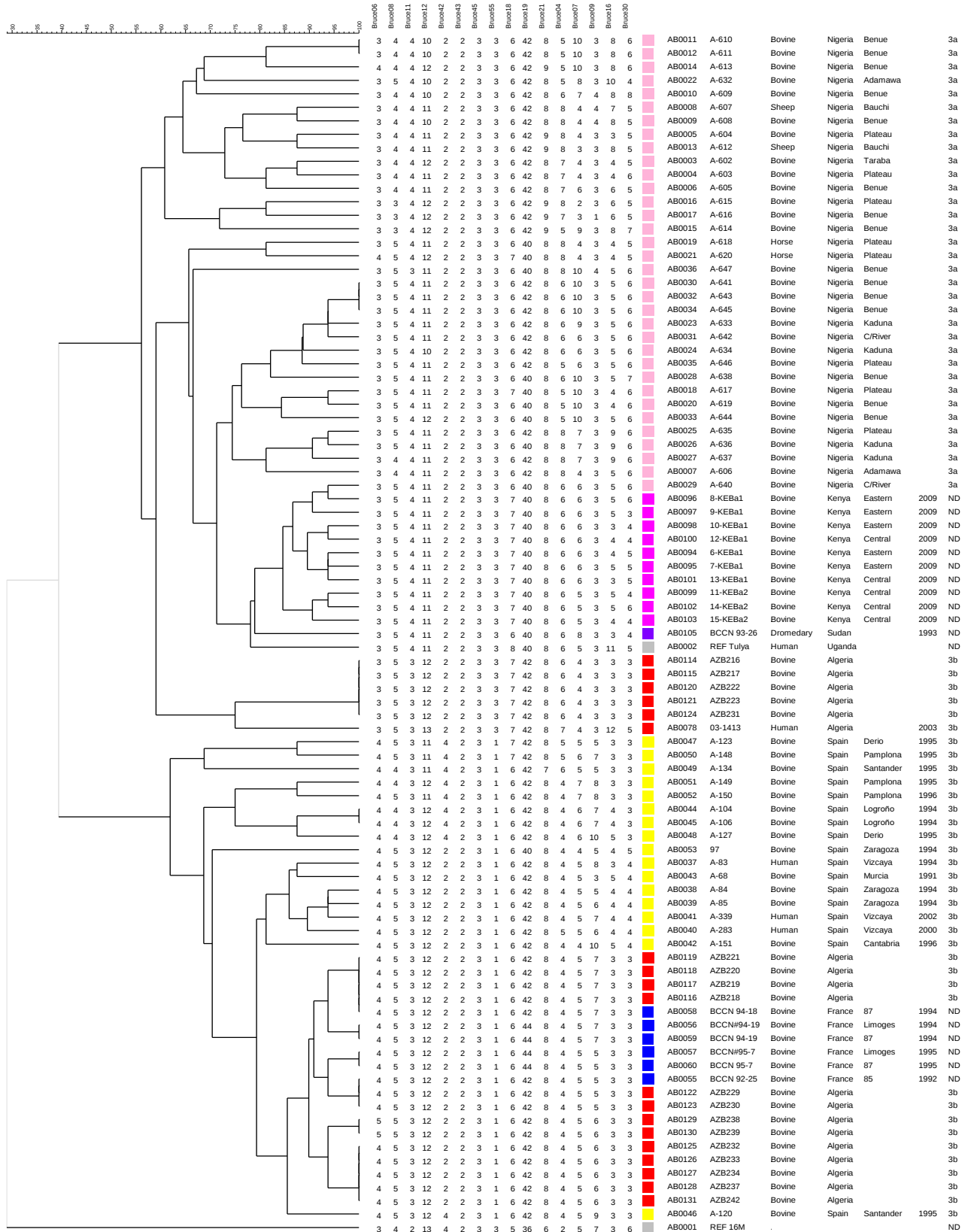


Figure 22: Dendrogramme de géotypes MLVA-16 groupés de 104 isolats mondiaux de *B. abortus* bv 3 (distance catégorielle, algorithme UPGMA). Chaque pays est représenté par une couleur différente.

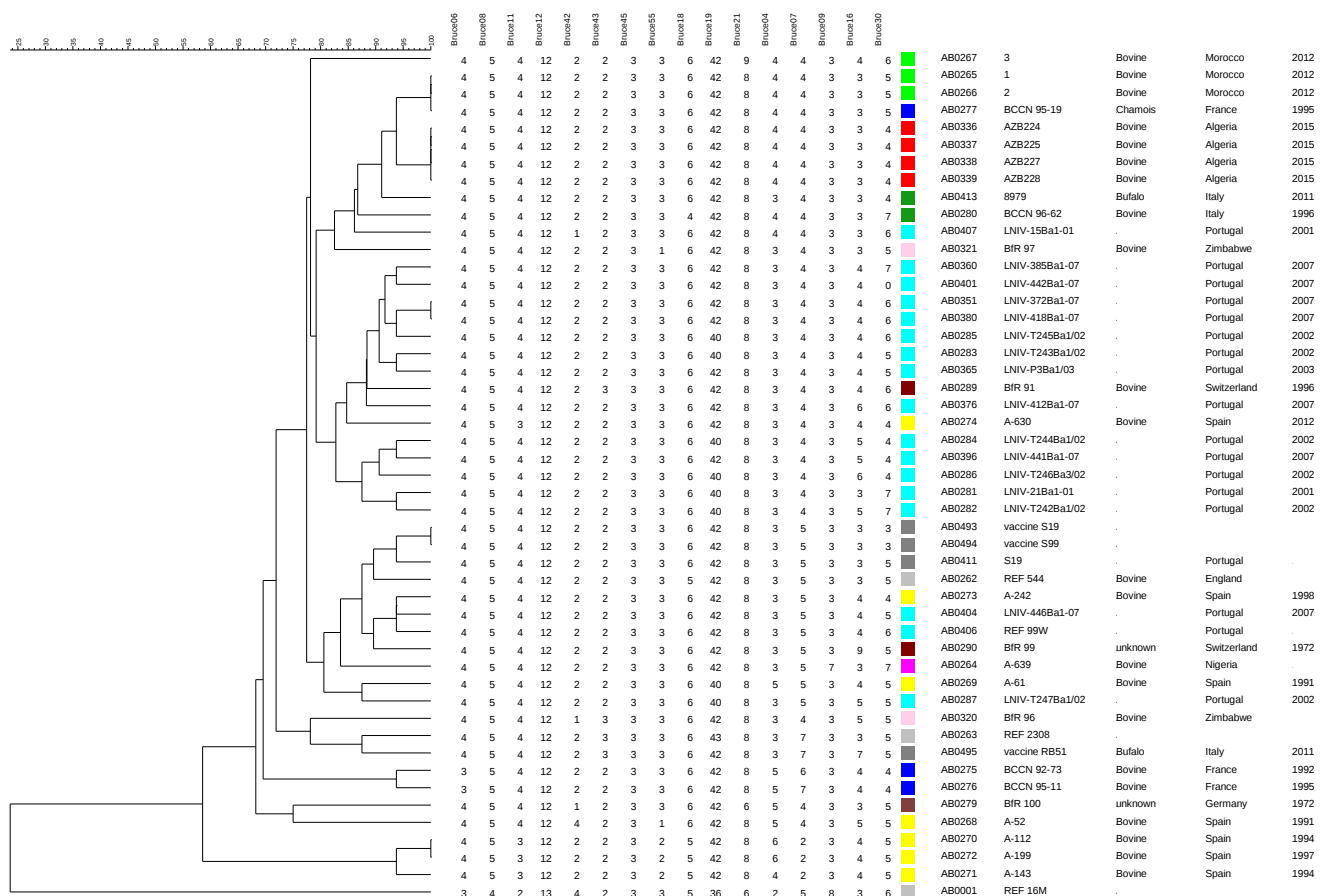


Figure 23: Dendrogramme des génotypes MLVA-16 groupés de 49 isolats mondiaux de *B. abortus* bv 1 (Distance catégorique, algorithme UPGMA).

Au total, 49 souches de *B. abortus* bv 1, y compris les souches de référence 544 et 2308, ainsi que les souches de vaccin S19 et RB51 ont été analysées. Chaque pays est représenté par une couleur différente.

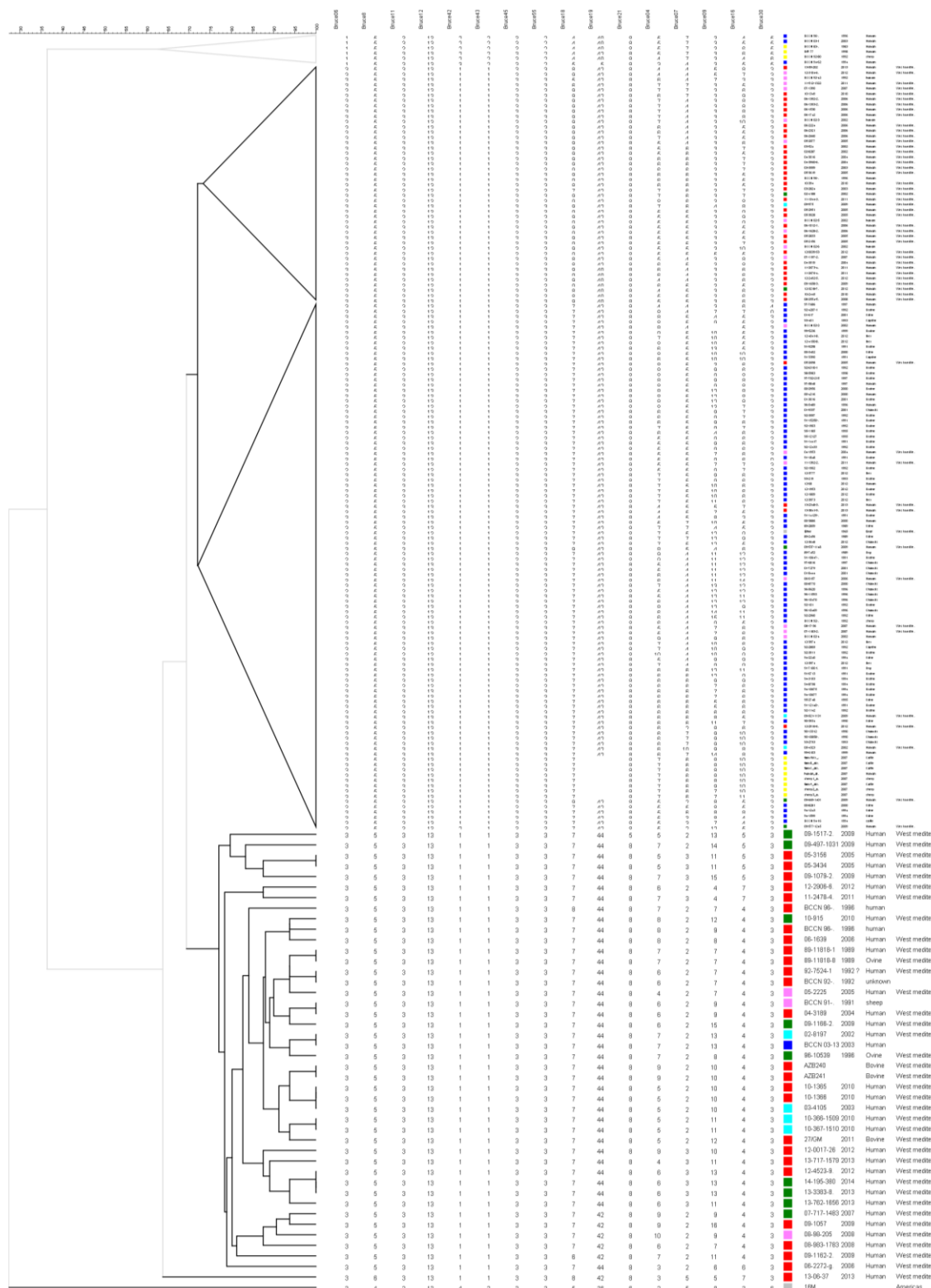


Figure 24: Dendrogramme des génotypes MLVA-16 groupés de 195 isolats mondiaux de *B. melitensis* bv 3 (distance catégorique, algorithme UPGMA).

Le grappe de la lignée Europe-Algérie précédemment décrite (Lounes et al., 2014) est concaténée. Les figures 20 et 21 montrent les données MLVA de la lignée autochtone algérienne.

La technique MLVA-16 (16 loci) a montré que les isolats du même animal (tableau 26) étaient indifférenciables par cette méthode et regroupés ensemble. En ce qui concerne les souches *B. abortus* biovar 3, MLVA-11 a permis de regrouper les 89 *B. abortus* biovar 3 inclus dans l'analyse, couvrant les 18 souches algériennes étudiées dans cette étude, en trois lignées distinctes.

De façon remarquable, 6 souches algériennes (5 de cette étude [AB0114, AB0115, AB0120, AB0121, AB0124] et une autre souche *B. abortus* d'origine humaine prise de la base de données [AB0078]) étaient dans un groupe distinct du génotype 3a typique des souches de l'Afrique non méditerranéenne (Nigeria, Kenya, Soudan et Ouganda pour Tulya), et les souches 3b européennes (espagnoles et françaises) (figures 20 et 21), montrant l'existence d'un génotype différent éventuellement lié au clade B subsaharien décrit par Whatmore et al. (Whatmore et al., 2016).

L'existence de trois lignées de *B. abortus* biovar 3, y compris ce troisième type, a été confirmée par la MLVA16 (figures 20 et 21), et un examen plus approfondi a montré que si la majorité des isolats algériens dans biovar 3 ne présentaient qu'une seule unité récurrente (1 U) pour Bruce55, le troisième groupe de souches algériennes (AB0114, AB0115, AB0120, AB0121, AB0124 et AB0078) abritait 3 U de ce marqueur.

En ce qui concerne les 4 isolats de *B. abortus* biovar 1, ils ont été regroupés avec des souches du Maroc, de la France, de l'Italie, du Portugal, de l'Allemagne et du Zimbabwe (figure 23).

En outre, bien que isolés d'un bovin, les 2 isolats de *B. melitensis* biovar 3 (AZB240 et AZB241) se sont regroupés ensembles mais intercalés entre d'autres souches de *B. melitensis* isolées de cas humains dans plusieurs pays méditerranéens africains (figure 24), tous appartenant à la lignée du Maghreb d'origine autochtone décrite précédemment (Lounes et al., 2014).

V.3. Discussion

Malgré des preuves sérologiques et cliniques solides et qui datent de longtemps, sur la présence de la brucellose chez les ovins et les caprins et par conséquent chez les humains en Algérie et dans d'autres pays du Maghreb (Benhabyles et al., 1992)(Lounes et al., 2014), les données sur la brucellose bovine dans cette région sont plutôt maigres et sont rarement soutenues par des preuves bactériologiques (Verger and Grayon, 1984). À notre connaissance, c'est la première étude menée pour clarifier les souches de *Brucella* spp. prédominantes chez les bovins en Algérie, élucidant ainsi des informations essentielles lorsque la possibilité d'infections des bovins par *B. melitensis* acquises à partir de la population abondante des petits ruminants doit être prise en considération (Verger, 1985)(Corbel, 1997)(Godfroid et al., 2013). Bien que les résultats indiquent la prédominance du biovar 3 classique de *B. abortus* ainsi que la présence de *B. melitensis* biovar 3, MLVA montre une image plus complexe.

En ce qui concerne *B. abortus*, plusieurs travaux ont suggéré que les souches méditerranéennes et subsahariennes peuvent représenter différentes lignées. (Verger and Grayon, 1984) a étudié 273 souches d'origine africaine isolées de 1976 à 1983 qui comprenaient 12 souches marocaines, les autres étaient du Sénégal, de la Guinée Bissau, du Rwanda et du Niger. Même si leur étude était basée sur le typage classique, ces auteurs ont souligné que les souches de *B. abortus* biovar 1 et 3 du Maroc avaient été isolées des bovins «Pied Noir» et étaient semblables à celles isolées en Europe mais différentes de celles des autres pays africains représentés dans la collection. Des analyses moléculaires récentes ont confirmé cette perspicacité sur l'hétérogénéité des souches africaines de *B. abortus* et l'existence de différences entre les souches européennes et maghrébines d'une part et celles des pays subsahariens de l'autre part (Matope et al., 2009)(Bertu et al., 2015)(Mathew et al., 2015)(Whatmore et al., 2016)(Ducrotoy et al., 2017). En effet, la plupart des souches de *B. abortus* biovar 3 caractérisées dans le présent travail montrent également un modèle MLVA plus proche des souches espagnoles et françaises, qui présentent les caractéristiques du biovar 3b identifié par Ocampo-Sosa et les collaborateurs comme sous-groupe dans biovar 3 (Ocampo-Sosa et al., 2005). Cependant, il y avait des exceptions. Un sous-groupe de 6 souches, y compris un isolat humain, représentait une lignée distincte, et la répétition de Bruce55 montre que, contrairement à ce qui était suspecté (Bertu et al., 2015), Bruce55 lui-même n'est pas un marqueur pour le groupement biovar 3a. À l'heure actuelle, il est difficile de déterminer si ces résultats reflètent des lacunes dans la capacité des méthodes MLVA à discriminer quelques souches locales ou une connexion réelle de ces souches avec celles des

pays du Sahara (Whatmore et al., 2016). Cependant, en tenant compte de la validation répétée de la méthodologie MLVA et des résultats antérieurs en utilisant un BruMLSA21 étendu (Whatmore et al., 2016), nous sommes favorables à la deuxième conclusion. En effet, la connexion des souches *B. abortus* biovar 3b dans le groupe principal et les souches de *B. abortus* biovar 1 avec celles de l'Espagne et du Maroc est plus facile à interpréter en tenant compte des liens socio-économiques et commerciaux existant entre les pays méditerranéens. De même, la présence de *B. melitensis* chez les bovins n'est pas surprenant et confirme que lorsque les bovins sont maintenus en étroite association avec les ovins ou les caprins, ils peuvent être infectés par *B. melitensis* (Corbel, 1997)(Verger, 1985)(Godfroid et al., 2013).

Conclusion

En Algérie, malgré les efforts et les stratégies de lutte contre la brucellose animale instaurés depuis 1970 et renforcés en 1995 par un programme d'assainissement (dépistage/abattage) chez les bovins et les caprins, puis en 2006, par la vaccination des petits ruminants, la brucellose constitue toujours un problème de santé animale, qui a des répercussions sur la santé publique ainsi que sur l'économie du pays.

Les données officielles relatives à la brucellose animale sont difficiles à analyser du moment que le programme de lutte mis en place contre cette pathologie chez les bovins (dépistage/abattage) ne touche qu'une portion minime du cheptel national (population identifiée), alors que le statut de la population non identifiée demeure inconnu et représente une source de contamination importante d'une part pour la population identifiée et dépistée régulièrement, et pour l'homme d'une autre part, représentant ainsi un problème de santé publique.

Les résultats de notre étude réalisée sur les bovins et les ovins au niveau des abattoirs d'Alger, confirment l'importance de la brucellose bovine en Algérie et qu'une combinaison du RBT et de DDG peut être mise en place à la place de la fixation du complément et de l'iELISA plus sophistiquées pour déterminer la prévalence apparente. La prévalence élevée chez la population bovine identifiée dépistée contre la brucellose lors de notre étude, nous permet de dire qu'il y'a une irrégularité concernant l'abattage de tous les cas dépistés et révélés positifs. Comme le RBT et le DDG sont robustes et techniquement simples, ils devraient être utiles dans les laboratoires dotés d'un équipement de base.

Le manque de contrôle du mouvement des animaux, conjugué à leur non identification et le faible taux d'indemnisation, appliqué en plus seulement pour certaines espèces, sont un frein sérieux à la réussite du programme de prophylaxie contre la brucellose en Algérie.

L'enquête sérologique sur la brucellose qui a été réalisée chez les professionnels de l'abattoir de Rouiba, n'a révélé aucun cas positif, et cela malgré la prévalence élevée trouvée chez les bovins au sein du même abattoir. D'autres études plus élargies chez les professionnels de la filière animale sont nécessaires à fin de mettre en évidence le degré de contamination de cette tranche de population exposée au risque.

Notre étude rétrospective réalisée à Médéa a montré qu'au cours de la dernière décennie, 884 cas de brucellose humaine ont été enregistrés (pourraient être plus), ce qui nous permet de conclure que malgré les programmes de contrôle entrepris, la brucellose humaine est

endémique dans cette région, nous permettant de faire un lien avec des animaux domestiques qui pourraient être fortement infectés.

La prévalence retrouvée dans la région de Médéa (6,15%) est très élevée comparée à celle notifiée par les services vétérinaires, qui ont publié une valeur de 0,76% en 2014. Le contrôle et l'éradication de la brucellose nécessitent l'identification des espèces de *Brucella* circulant dans une unité épidémiologique donnée et ce travail montre la variété des souches de *Brucella* circulant en Algérie.

En outre, l'isolement de *B. melitensis* biovar 3 chez les bovins dans notre étude, confirme que lorsque les bovins sont maintenus en étroite association avec des ovins ou des caprins, l'infection de ces animaux peut également être causée par cette espèce de *Brucella*. Enfin, le fait que les souches de *B. abortus* biovar 3 isolées dans ce travail appartiennent au sous-groupe 3b montre que les souches circulant en Algérie sont plus apparentées aux homologues européennes qu'aux africaines.

L'identification par la technique MLVA de 5 souches de *B. abortus* biovar 3 situant entre les souches européennes et africaines, nous incite à faire d'autres travaux dans ce sens à fin d'éclaircir d'avantage la variété des souches de *Brucella* dans le continent Africain.

Recommandations

Notre étude sur la brucellose animale et humaine sur Alger et Médéa, nous a permis d'acquérir certaines connaissances sur cette pathologie zoonotique majeure, ce qui nous permet d'avancer quelques recommandations non exhaustives et dont la prise en compte sera d'une utilité manifeste pour les décideurs, les professionnels des animaux, ainsi que pour les consommateurs d'une façon générale.

- Des campagnes de sensibilisation appropriées doivent être mises en route insistant sur les voies les plus importantes de contamination (ingestion de lait et les produits laitiers crus, contact direct avec les animaux, surtout lors de problèmes obstétricaux) ;
- L'identification des animaux et le contrôle de leurs mouvements sont nécessaires pour assurer un suivi régulier spatio-temporel ;
- Le niveau d'indemnisation des éleveurs doit être amélioré, il doit s'appliquer à tous les animaux (bovins, caprins et ovins), pour favoriser l'élimination rapide des animaux infectés.
- Des moyens matériels plus adéquats doivent être fournis aux vétérinaires de terrain.
- Le personnel du laboratoire doit être recyclé afin que les analyses puissent se faire au niveau du laboratoire de wilaya ;
- La gestion de l'élevage doit répondre aux normes admises ;
- L'amélioration des conditions des professionnels des abattoirs sur tous les niveaux (hygiène, instruction, sécurité sociale), ainsi que la rénovation des abattoirs pour limiter les risques de contamination des professionnels par les maladies zoonotiques professionnellement transmissibles.
- Réalisation d'autres études épidémiologiques et microbiologiques sur d'autres espèces animales, afin d'avoir une idée claire permettant d'instaurer une stratégie de lutte adéquate.

1. Abadia, G., Picu, C., 2005. Zoonoses d'origine professionnelle. EMC - Toxicol. 2, 163–177.
2. Acha, P.N., Szyfres, B., 2005. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: Volume I. Bacterioses and mycoses. PAHO Sci. Tech. Publ. No. 580 I, 378pp. doi:10.1590/S1135-57272005000300012
3. Aggad, H., Boukraa, L., 2006. Prevalence of bovine and human brucellosis in western Algeria: Comparison of screening tests. East. Mediterr. Heal. J. 12, 119–128.
4. Akakpo, A., Bornarel, P., 1987. Epidémiologie des brucelloses animales en Afrique tropicale: Enquêtes clinique, sérologique et bactériologique. Rev. Sci. Techn. Off. Int. Epiz 6, 981–1027.
5. Al Dahouk, S., Flèche, P. Le, Nöckler, K., Jacques, I., Grayon, M., Scholz, H.C., Tomaso, H., Vergnaud, G., Neubauer, H., 2007. Evaluation of Brucella MLVA typing for human brucellosis. J. Microbiol. Methods 69, 137–145. doi:10.1016/j.mimet.2006.12.015
6. Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H., Frangoulidis, D., 2003. Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. Clin. Lab. 49, 577–89.
7. Almuneef, M. a, Memish, Z. a, Balkhy, H.H., Alotaibi, B., Algoda, S., Abbas, M., Alsubaie, S., 2004. Importance of screening household members of acute brucellosis cases in endemic areas. Epidemiol. Infect. 132, 533–540. doi:10.1017/S0950268803001857
8. Alonso-Urmeneta, B., Marín, C., Aragón, V., Blasco, J.M., Díaz, R., Moriyón, I., 1998. Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5, 749–754.
9. Alton, G., Jones, L., Angus, R., Verger, J.M., 1988. Laboratory techniques in brucellosis, Second edi. ed. INRA Publications, Paris, France.
10. Alton, G.G., 1990. Brucella melitensis, 1887 TO 1987, in: Animal Brucellosis.
11. Ammar, K., 2000. Some epidemiological aspects of bovine, ovine and caprine brucellosis in Egypt. Suez canal Vet. Med. journal(SCVMJ) 3, 145–155.
12. Andriopoulos, P., Tsironi, M., Deftereos, S., Aessopos, A., Assimakopoulos, G., 2007. Acute brucellosis: presentation, diagnosis, and treatment of 144 cases. Int. J. Infect. Dis. 11, 52–57. doi:10.1016/j.ijid.2005.10.011
13. Arenas, G.N., Staskevich, A.S., Mayorga, L.S., Staskevich, a N. a S., Aballay, A., 2000. Intracellular Trafficking of Brucella abortus in J774 Macrophages Intracellular Trafficking of Brucella abortus in J774 Macrophages 68, 4255–4263. doi:10.1128/IAI.68.7.4255-4263.2000.Updated

14. Ariza, J., 1999. Brucellosis: an update The perspective from the Mediterranean basin. *Rev. Med. Microbiol.* 10, 125–135.
15. Asarta, A., 1989. Erradicación de la brucelosis en Navarra, in: *Microbiología, S.E. de (Ed.), XII Congreso Nacional de Microbiología, Sociedad Española de Microbiología. Gráficas San Juan, HUarte-Pamplona, Navarra, Spain, Pamplona*, pp. 371–375.
16. Beheshti, S., Rezaian, G., Azad, F., Faghiri, Z., Taheri, F., 2010. Seroprevalence of brucellosis and risk factors related to high risk occupational groups in Kazeroon, South of Iran. *Int. J. Occup. Environ. Med.* 1.
17. Benhabyles, N., Benkirane, A., Boudilmi, B., Benchoulâ, S., Bouayoun, H., 1992. *Epidémiologie de la brucellose humaine et animale au Maghreb.*, in: *Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries. Pudoc Scientific, CIHEAM, CEC, MINAG (Malta), FIS (Malta), Valleta, Malta*, 28-30 October 1991, p. 36.
18. Benkirane, A., 2001. Surveillance épidémiologique et prophylaxie de la brucellose des ruminants : l ' exemple de la région Afrique du Nord et Proche-Orient. *Test* 20, 757–767.
19. Bertu, W.J., Ducrotoy, M.J., Muñoz, P.M., Mick, V., Zúñiga-ripa, A., Bryssinckx, W., Kwaga, J.K.P., Kabir, J., Welburn, S.C., Moriyón, I., Ocholi, R.A., 2015. Phenotypic and genotypic characterization of *Brucella* strains isolated from autochthonous livestock reveals the dominance of *B . abortus* biovar 3a in Nigeria. *Vet. Microbiol.* 6–11. doi:10.1016/j.vetmic.2015.08.014
20. Bervas, C., Gutierrez, C., Lesterle, S., 2006. Point sur les risques liés à la présence de *Brucella* dans l'environnement. Rennes.
21. Blasco, J.M., 1997. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 31, 275–283. doi:10.1016/S0167-5877(96)01110-5
22. Blasco, J.M., Garin-Bastuji, B., Marin, C.M., Gerbier, G., Fanlo, J., Jiménez de Bagués, M.P., Cau, C., 1994. Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Rec.* 134, 415–420. doi:10.1136/vr.134.16.415
23. Blasco, J.M., Molina-Flores, B., 2011. Control and Eradication of *Brucella melitensis* Infection in Sheep and Goats. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 27, 95–104. doi:10.1016/j.cvfa.2010.10.003
24. Blasco, J.M., Moreno, E., Moriyón, I., 2017. Brucellosis vaccines and vaccine candidates, in: Metwally, S., Viljoen, G., Idrissi, E. (Eds.), *Veterinary Vaccines for Developing Countries. Rome*, pp. 1–66.
25. Blasco, J.M., Moreno, E., Moriyón, I., 2016. Brucellosis vaccines and vaccine candidates, in:

- Metwally, S., Viljoen, G.J., El Idrissi, A. (Eds.), *Veterinary Vaccines for Developing Countries*. FAO (Rome). Rome.
26. Boschioli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Charachon, S.M., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Lavigne, J.-P., Pierre, J.L., Ramuz, M., O'Callaghan, D., 2002. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.* 90, 341–348.
27. Boschioli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Liautard, J.P., Ramuz, M., O'Callaghan, D., Callaghan, D.O., 2001. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(3), 1544–1549. doi:10.1073/pnas.032514299
28. Bosilkovski, M., Krteva, L., Dimzova, M., Kondova, I., 2007. Brucellosis in 418 patients from the Balkan Peninsula: exposure-related differences in clinical manifestations, laboratory test results, and therapy outcome. *Int. J. Infect. Dis.* 11, 342–347. doi:10.1016/j.ijid.2006.10.002
29. Boukary, A.R., Saegerman, C., Abatih, E., Fretin, D., Bada, R.A., De Deken, R., Harouna, H.A., Yenikoye, A., Thys, E., 2013. Seroprevalence and potential risk factors for *Brucella* Spp. infection in traditional cattle, sheep and goats reared in urban, periurban and rural areas of Niger. *PLoS One* 8, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0083175
30. Breton, I., Burucoa, C., Grignon, B., Fauchere, J.L., Giraudon, B.B., 1995. Brucellose acquise au laboratoire. *Médecine Mal. Infect.* 25, 549–551.
31. Bricker, B.J., 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90, 435–446.
32. Bricker, B.J., Ewalt, D.R., MacMillan, P., Foster, G., Brew, S., 2000. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1258–62.
33. Bricker, B.J., Halling, S.M., 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR Assay for Differentiation of *Brucella abortus* Vaccine Strains S19 and RB51 33, 1640–1642.
34. Bricker, B.J., Halling, S.M., 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2660–2666.
35. Bricker, Ewalt, D.R., Halling, S.M., 2003a. variable number tandem repeats (VNTRs) 13.
36. Bricker, Ewalt, D.R., Olsen, S.C., Jensen, A.E., 2003b. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J. Vet. diagnostic Investig.* 15, 374–378. doi:10.1177/104063870301500413
37. Brugère-Picoux, J., 2004. *Maladies des moutons*, France Agr. ed.

38. Casao, M.A., Smits, H.L., Navarro, E., Solera, J., 2003. Clinical utility of a dipstick assay in patients with brucellosis: Correlation with the period of evolution of the disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 301–305. doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00519.x
39. Celli, J., Salcedo, S.P., Gorvel, J.-P., 2005. Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1673–8. doi:10.1073/pnas.0406873102
40. Çetin, E.S., Kaya, S., Demirci, M., Aridogan, B.C., 2007. Comparison of the BACTEC blood culture system versus conventional methods for culture of normally sterile body fluids. *Adv. Ther.* 24, 1271–1277. doi:10.1007/BF02877773
41. Chakroun, M., Bouzouaia, N., 2007. La brucellose, une zoonose toujours d'actualité. *Brucellosis: a topical zoonosis. Rev. Tunisienne d'Infectiologie* 1, 1–10.
42. Chantal, J., Bessière, M., Le Guenno, B., Magnaval, J., Dorchies, P., 1996. Serologic screening of certain zoonoses in the abattoir personnel in Djibouti.
43. Cherwonogrodzky, J.W., Dubray, G., Moreno, E., Mayer, H., 1990. Antigens of Brucella, in: Duncan, N. et (Ed.), *Animal Brucellosis*. pp. 19–64.
44. Ciftçi, C., Oztürk, F., Oztekin, A., Karaoğlu, H., Saba, R., Gültekin, M., Mamikoğlu, L., 2005. Comparison of the serological tests used for the laboratory diagnosis of brucellosis. *Mikrobiyol. Bul.* 39, 291–9.
45. Cloeckaert, Grayon, Grépinet, 2002. Identification of Brucella melitensis vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene. *Vaccine* 20, 2546–50.
46. Cognault, C., 2001. Etude du phénomène “brucellose atypique” dans le département de la Loire de 1995 à 2000.
47. Colmenero, J., Reguera, J., Cabrera, F., Cisneros, J., Orjuela, D., Fernández-Crehuet, J., 1990. Serology, clinical manifestations and treatment of brucellosis in different age groups. *Infection* 18, 152–6.
48. Colmenero Castillo, J., Cabrera Franquelo, F., Hernández Márquez, S., Reguera Iglesias, J., Pinedo Sánchez, A., Castillo Clavero, A., 1989. Socioeconomic effects of human brucellosis. *Rev. Clin. Esp.* 185, 459–63.
49. Corbel, M., 1997. Brucellosis : an Overview, in: 1st International Conference on Emerging Zoonoses. pp. 213–221.
50. Corbel, M.J., 2006. Brucellosis in Humans and Animals, WHO/FAO/WOAH. doi:10.4038/cmj.v52i2.1028
51. Corbel, M.J., 1985. Recent advances in the study of Brucella antigens and their cross reactions. *Vet. Bull.* 55, 927–942.

52. Crawford, R.P., Huber Jan, D., Adams, B., 1990. Epidemiology and Surveillance, in: Nielson, K., Robert, D.J. (Eds.), *Animal Brucellosis*. Boca Raton, Florida, pp. 131–151.
53. Cutler, S.J., 2005. Brucella: Molecular and Cellular Biology. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 443–444. doi:10.1093/jac/dki211
54. Dahouk, S. Al, Flèche, P. Le, Nöckler, K., Jacques, I., Grayon, M., Scholz, H.C., Tomaso, H., Vergnaud, G., Neubauer, H., 2007. Evaluation of Brucella MLVA typing for human brucellosis. *J. Microbiol. Methods* 69, 137–145.
55. Dao, S., Traore, M., Sangho, A., Dantoume, K., Oumar, A.A., Maiga, M., Bougoudogo, F., Project, S., 2009. Séroprévalence de la brucellose humaine à Mopti, Mali. *Rev. Tunisienne d'Infectiologie* 2, 24–26.
56. De Massis, F., Giovannini, A., Di Emidio, B., Ronchi, G.F., Tittarelli, M., Di Giannatale, E., Di Ventura, M., Nannini, D., Caporale, V., 2005. Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with Brucella abortus strain RB51. *Vet. Ital.* 41, 291–299.
57. De Miguel, M.J., Marín, C.M., Muñoz, P.M., Dieste, L., Grilló, M.J., Blasco, J.M., 2011. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main Brucella Species. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1458–1463. doi:10.1128/JCM.02301-10
58. De Santis, R., Ciammaruconi, A., Faggioni, G., Fillo, S., Gentile, B., Di Giannatale, E., Ancora, M., Lista, F., 2011. High throughput MLVA-16 typing for Brucella based on the microfluidics technology. *BMC Microbiol.* 11, 60. doi:10.1186/1471-2180-11-60
59. Delrue, R.M., Lestrade, P., Tibor, A., Letesson, J.J., De Bolle, X., 2004. Brucella pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 1–12. doi:10.1016/S0378-1097(03)00963-7
60. Diaz-Aparicio, E., Aragon, V., Marin, C., Alonso, B., Font, M., Moreno, E., Perez- Ortiz, S., Blasco, J.M., Diaz, R., Moriyon, I., 1993. Comparative analysis of Brucella serotype A and M and Yersinia enterocolitica O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3136–3141.
61. Diaz-Aparicio, E., Marin, C., Alonso-Urmeneta, B., Aragon, V., Perez-Ortiz, S., Pardo, M., Blasco, J.M., Diaz, R., Moriyon, I., 1994. Evaluation of serological tests for diagnosis of Brucella melitensis infection of goats. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1159–1165.
62. Díaz, R., Ariza, J., Alberola, I., Casanova, A., Rubio, M.F., 2006. Secondary serological response of patients with chronic hepatosplenic suppurative brucellosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 1190–1196. doi:10.1128/CVI.00086-06
63. Diaz, R., Casanova, A., Ariza, J., Moriyon, I., 2011. The rose Bengal test in human

- brucellosis: A neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, 1–7. doi:10.1371/journal.pntd.0000950
64. Diaz, R., Garatea, P., Jones, L.M., Moriyon, I., 1979. Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J. Clin. Microbiol.* 10, 37–41.
65. Diaz, R., Moriyon, I., 1989. Laboratory Techniques in the Diagnosis of Human Brucellosis, in: Young Edward J, C.M.J. (Ed.), *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. Boca Raton, Florida, pp. 73–83.
66. Díaz, R., Toyos, J., Salvo, M.D., Fernández-Lago, L., Alonso-Urmeneta, B., Moriyón, I., Dorronsoro, I., 1984. Studies on the polysaccharide B and native haptene of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* serotype 9. *Dev. Biol. Stand.* 56, 213–220.
67. Diaz, R., Toyos, J., Salvó, M.D., Pardo, M.L., 1981. A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. *Ann. Rech. Vet.* 12, 35–39.
68. Dohoo, I.R., Wright, P.F., Ruckerbauer, G.M., Samagh, B.S., Robertson, F.J., Forbes, L.B., 1986. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Can. J. Vet. Res.* 50, 485–493.
69. Dubray, G., 1972. Etude ultra structurale des bactéries des bactéries de colonies lisses (S) et rugueuses (R) du genre *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur. Paris*, in: *The Prokaryotes: Vol. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*.
70. Ducrotoy, M., Bertu, W.J., Matope, G., Cadmus, S., Conde-Álvarez, R., Gusi, A.M., Welburn, S., Ocholi, R., Blasco, J.M., Moriyón, I., 2017. Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control. *Acta Trop.* 165, 179–193. doi:10.1016/j.actatropica.2015.10.023
71. Ducrotoy, M.J., Conde-Álvarez, R., Blasco, J.M., Moriyón, I., 2016. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 171, 81–102. doi:10.1016/j.vetimm.2016.02.002
72. Edward, Young, 1995. *Brucella* species (Brucellosis), in: *Microbes*.
73. El-Ansary, E., Mohammed, B., Hamad, A., Karom, A., 2001. Brucellosis among animals and human contacts in eastern Sudan. *Saudi J. Med.* 22, 577–9.
74. el Idrissi, a H., Benkirane, a, el Maadoudi, M., Bouslikhane, M., Berrada, J., Zerouali, a, 2001. Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. *Rev. Sci. Tech.* 20, 741–7. doi:10.20506/rst.20.3.1305

75. Enright, F.M., 1990. The Pathogenesis and Pathobiology of Brucella Infection in Domestic Animals, in: Nielson Klaus, D.J.R. (Ed.), Animal Brucellosis. Boca Raton, Florida, pp. 301–334.
76. Espinosa, B.J., Chacaltana, J., Mulder, M., Franco, M.P., Blazes, D.L., Gilman, R.H., Smits, H.L., Hall, E.R., 2009. Short report: Comparison of culture techniques at different stages of brucellosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 80, 625–627.
77. Ewalt, D., Payeur, J., Martin, B., Cummins, D., Miller, W., 1994. Characteristics of a Brucella species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Vet. Diagnostic Investig. 6, 448–52.
78. Ewalt, D.R., Bricker, B.J., 2000. Validation of the Abbreviated Brucella AMOS PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation of Brucella abortus Field Strain Isolates and the Vaccine Strains , 19 and RB51 38, 3085–3086.
79. Ewalt, Bricker, 2003. Identification and Differentiation of Brucella Abortus Field and Vaccine Strains by BaSS-PCR. Methods Mol. Biol. 216, 97–108.
80. FAO/OMS, 1986. Expert committees on Brucellosis. Genève (Suisse).
81. FAO/WHO, 1986. Joint food and agriculture organization of the united nations/world health organization expert committee on brucellosis. Technical Report Series 740, Sixth Report. Geneva, Switzerland.
82. Farrell, I., 1974. The development of a new selective medium for the isolation of Brucella abortus from contaminated sources. Res. Vet. Sci. 16, 280–6.
83. Fensterbank, R., 1986. Brucellosis in cattle , sheep and goats : diagnosis , control and vaccination. Rev. Sci. Tech. 5, 605–618.
84. Fernandes, D.M., Jiang, X., Jung, J.H., Baldwin, C.L., Baldwin, C.L., Winter, A.J., Ho, M., Cheers, C., Montaraz, J.A., Winter, A.J., Winter, A.J., Duncan, J.R., Santisteban, C.G., Douglas, J.T., Adams, L.G., Araya, L.N., Winter, A.J., Araya, L.N., Elzer, P.H., Rowe, G.E., Enright, F.M., Winter, A.J., Pavlov, H., Hogarth, M., McKenzie, I.F.C., Cheers, C., Mielke, M.E.A., Jiang, X., Baldwin, C.L., Stevens, M.G., Pugh, G.W., Tabatabai, L.B., Fernandes, D.M., Baldwin, C.L., Khan, Y., Cheers, C., Fernandes, D.M., Benson, R., Baldwin, C.L., Scott, P., Pearce, E., Cheever, A.W., Coffman, R.L., Sher, A., Kaye, P.M., Curry, A.J., Blackwell, J.M., Andrew, S.M., Titus, J.A., Dunn, P.L., North, R.L., Mossman, T.R., Fong, T.A.T., Zaitseva, M.B., Golding, H., Betts, M., Yamauchi, A., Bloom, E.T., Butler, L.E., Stevan, L., Golding, B., Tying, S.K., Lefkowitz, S.S., Svetic, A., Jian, Y.C., Lu, P., Finkelman, F.D., Gause, W.C., 1996. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. FEMS Immunol. Med.

- Microbiol. 16, 193–203. doi:10.1111/j.1574-695x.1996.tb00136.x
85. Fontaine, M., Cadoré, J.-L., 1995. Vade-mecum du vétérinaire.
86. Forestier, C., Moreno, E., Pizarro-Cerda, J., Gorvel, J.P., 1999. Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an in vitro and in vivo study. *J. Immunol.* 162, 6784–91.
87. Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I., Cloeckert, A., 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2688–2693. doi:10.1099/ijss.0.65269-0
88. Franco, M.P., Mulder, M., Gilman, R.H., Smits, H.L., 2007. Human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 775–786. doi:10.1016/S1473-3099(07)70286-4
89. Freney, J., RENAUD, F., LECLERCQ, R., RIEGEL, P., 2007. Précis de bactériologie clinique, 2ème édit. ed.
90. Ganière, J.P., 2005. La brucellose animale, in: *Polycopié Des Unités de Maladies Contagieuses Des Ecoles Vétérinaires Françaises*. Mériel (Lyon), p. 45.
91. García-Yoldi, D., Le Fleche, P., De Miguel, M.J., Muñoz, P.M., Blasco, J.M., Cvetnic, Z., Marín, C.M., Vergnaud, G., López-Goñi, I., 2007. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella* suis isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 4070–4072. doi:10.1128/JCM.01096-07
92. Garcia-Yoldi, D., Marin, C.M., Miguel, M.J. de, Munoz, P.M., Vizmanos, J.L., Lopez-Goni, I., 2006. Multiplex PCR Assay for the Identification and Differentiation of all *Brucella* Species and the Vaccine Strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin. Chem.* 52, 778–779. doi:10.1373/clinchem.2006.066316
93. Garin-Bastuji, B., 1993. Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultésLe cas des sérologies atypiques en brucellose bovine. *Le point vétérinaire* 25, 23–32.
94. Garin-Bastuji, B., Dufour, B., 1995. Acquis de la recherche sur les réactions sérologiques non spécifiques en brucellose, in: Dufour, B. (Ed.), *Colloque National Du 11 Janvier 1995*. Paris.
95. Garrido-Abellan, F., Duran-Ferrer, M., MacMillon, A., Minas, A., Nicoletti, P., Vecchi, G., 2009. Brucellosis in Sheep and Goats.
96. George, F.A., 1999. Human brucellosis: a classical infectious disease with persistent diagnostic challenges. *Clin. Lab. Sci.* 12, 207–212.
97. Godfroid, J., Al, S., Pappas, G., Roth, F., Matope, G., Muma, J., Marcotty, T., Pfeiffer, D., Skjerve, E., 2013. Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases A “ One Health ” surveillance and control of brucellosis in developing countries : Moving away from improvisation. "Comparative Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 36, 241–248.

doi:10.1016/j.cimid.2012.09.001

98. Godfroid, J., CLOECKAERT, A., LIAUTARD, J.-P., KOHLER, S., FRETIN, D., WALRAVENS, K., GARIN-BASTUJI, B., LETESSON, J.-J., 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* 36, 313–326. doi:10.1051/vetres
99. Goldstein, J., Hoffman, T., Frasc, C., Lizzio, E.F., Beining, P.R., Hochstein, D., Young Lim Lee, Angus, R.D., Golding, B., 1992. Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infect. Immun.* 60, 1385–1389.
100. Gopaul, K.K., Koylass, M.S., Smith, C.J., Whatmore, A.M., 2008. Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiol.* 8, 86. doi:10.1186/1471-2180-8-86
101. Grammont-Cupillard, M., Berthet-Badetti, L., Dellamonica, P., 1996. Brucellosis from sniffing bacteriological cultures. *Lancet* 348, 1733–1734.
102. Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.-P., Dornand, J., 2000. In Vitro *Brucella suis* Infection Prevents the Programmed Cell Death of Human Monocytic Cells. *Infect. Immun.* 68, 342–351. doi:10.1128/IAI.68.1.342-351.2000.Updated
103. Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckaert, A., Garin, J., Gorvel, J.-P., Moriyón, I., Moreno, E., López-Goñi, I., 2002. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 12375–12380. doi:10.1073/pnas.192439399
104. Hamdi-Chérif, M., Hamouda, R., A. t, Touabti, A., Sedjal, R., Kharchi, R., A.Zellagui, Kaouane, R., Laala, A., Lecheheb, A., Mahnane, A., Laouamri, S., 1999. La brucellose dans les hauts plateaux sétifiens et les hautes steppes de M'sila, Relevé épidémiologique mensuel.
105. Hamdy, M.E.R., Amin, a. S., 2002. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Vet. J.* 163, 299–305. doi:10.1053/tvjl.2001.0681
106. Hasanjani Roushan, M.R., Mohrez, M., Smailnejad Gangi, S.M., Soleimani Amiri, M.J., Hajiahmadi, M., 2004. Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, Northern Iran. *Epidemiol. Infect.* 132, 1109–1114. doi:10.1017/S0950268804002833

107. Hasibi, M., Jafari, S., Mortazavi, H., Asadollahi, M., Djavid, G.E., 2013. Determination of the accuracy and optimal cut-off point for ELISA test in diagnosis of human brucellosis in Iran. *Acta Med. Iran.* 51, 687–692.
108. Hinić, V., Brodard, I., Thomann, A., Cvetnić, Ž., Makaya, P.V., Frey, J., Abril, C., 2008. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J. Microbiol. Methods* 75, 375–378.
109. I.N.S.P, 2011. Situation épidémiologique provisoire de l'année 2011, Relevés Epidémiologiques Mensuels.
110. INSP, 2009. Institut National de la Santé Populaire.
111. Jones, L.M., Berman, D.T., Moreno, E., Deyoe, B.L., Gilsdorf, M.J., Huber, J.D., Nicoletti, P., 1980. Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 12, 753–760.
112. Kebede, T., Ejeta, G., Ameni, G., 2008. Seroprevalence of bovine brucellosis in smallholder farms in central Ethiopia (Wuchale-Jida district). *Rev. Med. Vet. (Toulouse)*. 159, 3–9.
113. Kerem, E., Diav, O., Navon, P., Branski, D., 1994. Pleural fluid pulmonary brucellosis Response to ketamine in status asthmaticus resistant to maximal 89–90.
114. Ko, J., Splitter, G. a, 2003. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis : Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis : Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Develop. *Clin Microbiol Rev* 16, 65–78. doi:10.1128/CMR.16.1.65
115. Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E., Gorvel, J.P., 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 60–66. doi:10.1016/j.mib.2004.12.003
116. Le Flèche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoel, F., Nöckler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L. a, Vergnaud, G., 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 6, 9. doi:10.1186/1471-2180-6-9
117. Lefèvre, P.C., BLANCOU, J., CHERMETTE, R., 2003. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail - Europe et régions chaudes.
118. Letesson, J.J., Tibor, A., van Eynde, G., Wansard, V., Weynants, V., Denoel, P., Saman, E., 1997. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent

- assay. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4, 556–64.
119. López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C.M., De Miguel, M.J., Muñoz, P.M., Blasco, J.M., Jacques, I., Grayon, M., Cloeckaert, a., Ferreira, a. C., Cardoso, R., Corrêa De Sá, M.I., Walravens, K., Albert, D., Garin-Bastuji, B., 2008. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. J. Clin. Microbiol. 46, 3484–3487. doi:10.1128/JCM.00837-08
120. López-Goñi, I., Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Moriyón, I., Moreno, E., 2002. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. Vet. Microbiol. 90, 329–339.
121. Lord, V.R., Cherwonogrodzky, J.W., 1992. Evaluation of polysaccharide, lipopolysaccharide, and B-glucan antigens in gel immunodiffusion tests for brucellosis in cattle. Am. J. Vet. Res. 53.
122. Lounes, N., Cherfa, M.-A., Le Carrou, G., Bouyoucef, A., Jay, M., Garin-Bastuji, B., Mick, V., 2014. Human Brucellosis in Maghreb: Existence of a Lineage Related to Socio-Historical Connections with Europe. PLoS One 9, e115319. doi:10.1371/journal.pone.0115319
123. Lucero, N.E., Escobar, G.I., Ayala, S.M., Paulo, P.S., Nielsen, K., 2003. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. J. Med. Microbiol. 52, 883–887. doi:10.1099/jmm.0.05217-0
124. MacMillan, A., 1990. Conventional Serological Tests, in: Nielson, Klaus, D.J.R. (Eds.), Animal Brucellosis. Boca Raton, Florida, pp. 153–197.
125. Macmillan, Cockrem, 1985. Reduction of non-specific reactions to the *Brucella abortus* serum agglutination test by the addition of EDTA. Rsearche Vet. Sci. 38, 288–291.
126. Mantur, B.G., Biradar, M.S., Bidri, R.C., Mulimani, M.S., Veerappa, K., Kariholu, P., Patil, S.B., Mangalgi, S.S., 2006. Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 Years’ experience in an endemic area. J. Med. Microbiol. 55, 897–903. doi:10.1099/jmm.0.46097-0
127. Mantur, B.G., Mangalgi, S.S., 2004. Evaluation of Conventional Castaneda and Lysis Centrifugation Blood Culture Techniques for Diagnosis of Human Brucellosis. J Clin Microbiol 42, 4327–4328. doi:10.1128/JCM.42.9.4327
128. Marín, C.M., Alabart, J.L., Blasco, J.M., 1996. Effect of Antibiotics Contained in Two *Brucella* Selective Media On Growth of *Brucella Abortus*, *B-Melitensis*, and *B-Ovis*. J. Clin. Microbiol. 34, 426–428.
129. Marín, C.M., Moreno, E., Moriyón, I., Díaz, R., Blasco, J.M., 1999. Performance of

- Competitive and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, Gel Immunoprecipitation with Native Hapten Polysaccharide, and Standard Serological Tests in Diagnosis of Sheep Brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 269–272.
130. Martín, M.S., Guinea, E.L., Carrero, G.P., Visedo, O.R., García, C.S., Calvo, del O.T., Reverte, C.D., 1992. Diagnosis of brucellosis in an endemic area. Evaluation of routine diagnostic tests. *Med. Clin. (Barc)*. 98, 481–5.
131. Mathew, C., Stokstad, M., Johansen, T.B., Klevar, S., Mdegela, R.H., Mwamengele, G., Michel, P., Escobar, L., Fretin, D., Godfroid, J., 2015. First isolation , identification , phenotypic and genotypic characterization of *Brucella abortus* biovar 3 from dairy cattle in Tanzania. *BMC Vet. Res.* 1–9. doi:10.1186/s12917-015-0476-8
132. Matope, G., Bhebhe, E., Muma, J.B., Skjerve, E., Djønné, B., 2009. Characterization of some *Brucella* species from Zimbabwe by biochemical profiling and AMOS-PCR. *BMC Res. Notes* 2, 261. doi:10.1186/1756-0500-2-261
133. Maurin, M., 2005. La brucellose à l’aube du 21^e siècle. *Médecine Mal. Infect.* 35, 6–16.
134. Memish, Z.A., Almuneef, M., Mah, M.W., Qassem, L.A., Osoba, A.O., 2002. Comparison of the *Brucella* Standard Agglutination Test with the ELISA IgG and IgM in patients with *Brucella* bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44, 129–132. doi:10.1016/S0732-8893(02)00426-1
135. Meneses, A., Epaulard, O., Maurin, M., Gressin, R., Pavese, P., Brion, J.-P., Garin-Bastuji, B., Stahl, J.-P., 2009. Réactivation bactériémique d’une brucellose 70 ans après la primo-infection. *Médecine Mal. Infect.* 40, 238–240.
136. Meskoud-taibi, M., Benzadi, O., 2009. Méthodologie de prélèvement Bilan du programme de dépistage des maladies contagieuses.
137. Michaux-charachon, S., Bourg, G., Callaghan, D.O., Ramuz, M., Bourg, G., Jumas-bilak, E., Guigue-talet, P., Allardet-servent, A., Callaghan, D.O., Ramuz, M., 1997. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *Genome Structure and Phylogeny in the Genus Brucella* 179, 3244–3249.
138. Mohammed, F.U., Ibrahim, S., Ajogi, I., Olaniyi, B.J.O., 2011. Prevalence of Bovine Brucellosis and Risk Factors Assessment in Cattle Herds in Jigawa State. *ISRN Vet. Sci.* 2011, 1–4. doi:10.5402/2011/132897
139. Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., Mayer, H., 1990. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J. Bacteriol.* 172, 3569–3576.

140. Morgan, W., MacKinnon, D., Lawson, J., Cullen, G., 1969. The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet. Rec.* 85, 636–641.
141. Moriyon, I., Grillo, M., Monreal, D., Gonzalez, D., Marin, C., Lopez-Goni, I., Mainar-Jaime, R., Moreno, E., Blasco, J., 2004. Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.* 35, 1–38. doi:10.1051/vetres
142. Muñoz, P.M., Marín, C.M., Monreal, D., González, D., Garin-Bastuji, B., Díaz, R., Mainar-Jaime, R.C., Moriyón, I., Blasco, J.M., 2005. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 141–151. doi:10.1128/CDLI.12.1.141-151.2005
143. Navarro, E., Escribano, J., Fernandez, J.A., Solera, J., 2002. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *Fems Immunol. Med. Microbiol.* 34, 147–151. doi:10.1016/S0928-8244(02)00370-X
144. Nicoletti, P., 1980. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24, 69–98.
145. Nicoletti, P., 1969. Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 30, 1811–6.
146. Nielsen, K., Duncan, J.R., 1990. *Animal Brucellosis*. Nepean, Ontario.
147. Nielsen, K., Wright, P., Kelly, W., JCherwonogrodzky, J., 1988. A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 18, 331–47.
148. Nielsen, K.H., 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.* 90, 447–459.
149. O’Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., Ramuz, M., 1999. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Biol.* 33, 1210–20.
150. Ocampo-Sosa, A.A., Aguero-Balbin, J., Garcia-Lobo, J.M., 2005. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet. Microbiol.* 110, 41–51. doi:10.1016/j.vetmic.2005.06.007
151. Oie, 2016. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. Melitensis* and *B. Suis*), in: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*.
152. Oie, 2009a. Bovine Brucellosis. *OIE Terr. Man.* 2009 1–35.
153. Oie, 2009b. Caprine and ovine brucellosis (excluding *Brucella ovis*). *OIE Terr. Man.*

- 2009 1–10.
154. Olabode, H.O.K., Adah, B., Nafarnda, W.D., Aworh, M.K.F., Bello, R.H., 2012. Sero-prevalence of brucella abortus antibodies in slaughtered cattle and meat by-product handlers in Ilorin abattior , Kwara state – Nigeria. *Prime J. Microbiol. Res.* 2, 109–113.
 155. Oliveira, S., Splitter, G., 1995. CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular Brucella abortus infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Wiley Online Libr. Eur. J. Immunol.* 25, 2551–7.
 156. Olsen, S.C., 2000. Immune Responses and Efficacy After Administration of a Commercial Brucella abortus Strain RB51 Vaccine to Cattle. *Vet. Ther.* 1, 183–191.
 157. Orduña, A., Almaraz, A., Prado, A., Gutierrez, M.P., Garcia-Pascual, A., Dueñas, A., Cuervo, M., Abad, R., Hernández, B., Lorenzo, B., Bratos, M.A., Torres, A.R., 2000a. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4000–4005.
 158. Orduña, A., Almaraz, A., Prado, A., Gutierrez, M.P., Garcia-Pascual, A., Dueñas, A., Cuervo, M., Abad, R., Hernández, B., Lorenzo, B., Bratos, M. a., Torres, a. R., 2000b. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4000–4005.
 159. Palmer, M., Cheville, N., Jensen, A., 1996. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate Brucella abortus strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Vet. Pathol.* 33, 682–91.
 160. Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., Tsianos, E., 2005. Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* 352, 2325–36.
 161. Pilet, C., 1987. *Bactériologie médicale et vétérinaire: systématique bactérienne*, 9th ed.
 162. Porte, F., Liautard, J., Kohler, S., 1999. Early Acidification of Phagosomes Containing Brucella suis Is Essential for Intracellular Survival in Murine Macrophages Early Acidification of Phagosomes Containing Brucella suis Is Essential for Intracellular Survival in Murine Macrophages. *Infect. Immun.* 67, 4041–4047.
 163. Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-bettache, S., Liautard, J., 2003. Role of the Brucella suis Lipopolysaccharide O Antigen in Phagosomal Genesis and in Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion in Murine Macrophages. *Infect. Immun.* 71, 1481–1490. doi:10.1128/IAI.71.3.1481
 164. Pouillot, R., Garin-Bastuji, B., Gerbier, G., Coche, Y., Cau, C., Dufour, B., Moutou, F., 1997. The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions

- in bovine brucellosis. *Vet. Res.* 28, 365–374.
165. Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D., Willey, J.M., Sherwood, L.M., J.Woolverton, C., 2010. *Microbiologie*.
166. Rahman, M.S., Faruk, M.O., Her, M., Kim, J.Y., Kang, S.I., Jung, S.C., 2011. Prevalence of brucellosis in ruminants in Bangladesh. *Vet. Med. (Praha)*. 56, 379–385.
167. Refai, M., 2002. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet. Microbiol.* 90, 81–110.
168. Roop, R.M., Preston-Moore, D., Bagchi, T., Schurig, G.G., 1987. Rapid identification of smooth *Brucella* species with a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 25, 2090–2093.
169. Roushan, M.R.H., Amiri, M.J.S., Laly, A., Mostafazadeh, A., Bijani, A., 2010. Follow-up standard agglutination and 2-mercaptoethanol tests in 175 clinically cured cases of human brucellosis. *Int. J. Infect. Dis.* 14, e250–e253. doi:10.1016/j.ijid.2009.05.008
170. Roux, J., 1989. *Brucella*, in: L, L.M., M, V. (Eds.), *Bactériologie Médicale*. Flammarion, Paris, pp. 651–668.
171. Ruiz-Mesa, J.D., Sánchez-Gonzalez, J., Reguera, J.M., Martín, L., Lopez-Palmero, S., Colmenero, J.D., 2005. Rose Bengal test: Diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 221–225. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.01063.x
172. Saegerman, C., Vo, T., De Waele, L., Gilson, D., Bastin, A., Dubray, G., Flanagan, P., Limet, J., Letesson, J., Godfroid, J., 1999. Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *Vet. Res.* 145, 214–8.
173. Samartino, L., Enright, F., 1992. Interaction of bovine chorioallantoic membrane explants with three strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 53, 359–63.
174. Samartino, L.E., Fortb, M., Gregoret, R., Schurig, G.G., 2000. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. *Prev. Vet. Med.* 45.
175. Santis, R. De, Ancora, M., Massis, F. De, Pittiglio, V., Fillo, S., Lista, F., 2013. Molecular Strain Typing of *Brucella abortus* Isolates from Italy by Two VNTR Allele Sizing Technologies. *Mol. Biotechnol.* 55, 101–110. doi:10.1007/s12033-013-9659-3
176. Schurig, G., Sriranganathan, N., Corbel, M., 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90, :479-96.
177. Scotts, J.C., Koylass, M.S., Stubberfield, M.R., Whatmore, A.M., 2007. Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7331–7337. doi:10.1128/AEM.00976-07

178. Seleem, M.N., Boyle, S.M., Sriranganathan, N., 2010. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet. Microbiol.* 140, 392–8. doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.021
179. Seleem, M.N., Boyle, S.M., Sriranganathan, N., 2008. Brucella: A pathogen without classic virulence genes. *Vet. Microbiol.* 129, 1–14.
180. Serra, J., Vinas, M., 2004. Laboratory diagnosis of brucellosis in a rural endemic area in northeastern Spain. *Int. Microbiol.* 7, 53–58.
181. Skendros, P., Boura, P., 2013. Immunity to brucellosis. *Rev. Sci. Tech.* 32, 137–47.
182. Smits, H., Kadri, S., 2005. Brucellosis in India: a deceptive infectious disease. *Indian J. Med. Res.* 122, 375–84.
183. Smits, H.L., Abdoel, T.H., Solera, J., Clavijo, E., Diaz, R., H.L., S., T.H., A., J., S., E., C., 2003. Immunochromatographic Brucella-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 1141–1146. doi:10.1128/CDLI.10.6.1141
184. Sohn, A.H., Probert, W.S., Glaser, C.A., Gupta, N., Bollen, A.W., Wong, J.D., Grace, E.M., McDonald, W.C., 2003. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 485–488. doi:10.3201/eid0904.020576
185. Solera, J., 2000. Treatment of human brucellosis. *J. Med. Liban.* 48, 255–63.
186. Solis Garcia del Pozo, J., Ortuno, S.L., Navarro, E., Solera, J., 2014. Detection of IgM Antibrucella Antibody in the Absence of IgGs: A Challenge for the Clinical Interpretation of Brucella Serology. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8. doi:10.1371/journal.pntd.0003390
187. Stevens, M.G., Hennager, S.G., Olsen, S.C., Cheville, N.F., 1994. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1065–1066.
188. Stevens, M.G., Olsen, S.C., Jr, G.W.P., Brees, D., Stevens, M.G., Olsen, S.C., Pugh, G.W., Brees, D., 1995. Comparison of immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51 . *Comparison of Immune Responses and Resistance to Brucellosis in Mice Vaccinated with Brucella abortus* 19 or RB51 63, 264–270.
189. Swai, E., Schoonman, L., 2009. Human brucellosis: seroprevalence and risk factors related to high risk occupational groups in Tanga Municipality, Tanzania. *Zoonoses Public Health* 56, 183–7.
190. Tabet-Derraz, N., Bestaoui, S., 2012. Epidémiologie et clinique de la brucellose humaine sur trois décennies en zone endémique, in: 13 Èmes Journées Nationales d'Infectiologie.

191. Tolomeo, M., Di Carlo, P., Abbadessa, V., Titone, L., Miceli, S., Barbusca, E., Cannizzo, G., Mancuso, S., Arista, S., Scarlata, F., 2003. Monocyte and Lymphocyte Apoptosis Resistance in Acute and Chronic Brucellosis and Its Possible Implications in Clinical Management. *Clin. Infect. Dis.* 36, 1533–1538. doi:10.1086/375223
192. Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Bénet, J.J., Ellis, P., Moutou, F., Louzä, A., 1996. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures, *Médecine et Maladies Infectieuses*. doi:10.1016/S0399-077X(96)80098-9
193. Troy, S.B., Rickman, L.S., Davis, C.E., 2005. Brucellosis in San Diego. *Medicine (Baltimore)*. 84, 174–187. doi:10.1097/01.md.0000165659.20988.25
194. Ugalde, J.E., Comerci, D.J., Leguizamón, M.S., Ugalde, R.A., 2003. Evaluation of *Brucella abortus* Phosphoglucosyltransferase (pgm) Mutant as a New Live Rough-Phenotype Vaccine. *Infect. Immun.* 71, 6264–6269. doi:10.1128/IAI.71.11.6264-6269.2003
195. Uza, F., Samartino, L., Schurig, G., Carrasco, A., Nielsen, K., Cabrera, R., Taddeo, H., 2000. Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. *Vet. Res. Commun.* 24, 143–51.
196. Verger, J., 1985. *B. melitensis* infection in cattle. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 32.
197. Verger, J.M., Garin-Bastuji, B., Grayon, M., Mahé, A.M., 1989. La brucellose bovine à *Brucella melitensis* en France.
198. Verger, J.M., Grayon, M., 1984. Caractéristiques de 273 souches de *Brucella abortus* d'origine Africaine. *Dev. Biol. Stand.* 56.
199. Wang, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Bai, L., Zhao, Y., Liu, C., Ma, A., Yu, H., 2014. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of human brucellosis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 13, 31. doi:10.1186/s12941-014-0031-7
200. Wendell, H.H., Robert, E.M., 1952. COMPARISON OF THE COOMBS TEST WITH OTHER METHODS FOR BRUCELLA AGGLUTININS IN HUMAN SERUM. *J. Clin. Invest.* 96–106.
201. Whatmore, A.M., Koylass, M.S., Muchowski, J., Edwards-Smallbone, J., Gopaul, K.K., Perrett, L.L., 2016. Extended multilocus sequence analysis to describe the global population structure of the genus *Brucella*: Phylogeography and relationship to biovars. *Front. Microbiol.* 7, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.02049
202. Whatmore, A.M., Perrett, L.L., MacMillan, A.P., 2007. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.* 7, 34. doi:10.1186/1471-2180-7-34
203. Whatmore, A.M., Shankster, S.J., Perrett, L.L., Murphy, T.J., Brew, S.D., Thirlwall,

- R.E., Cutler, S.J., Macmillan, A.P., 2006. Identification and Characterization of Variable-Number Tandem-Repeat Markers for Typing of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1982–1993. doi:10.1128/JCM.02039-05
204. Yanagi, M., Yamasato, K., 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* 107, 115–120.
205. Yetkin, M.A., Bulut, C., Erdinc, F.S., Oral, B., Tulek, N., 2006. Evaluation of the clinical presentations in neurobrucellosis. *Int. J. Infect. Dis.* 10, 446–52. doi:10.1016/j.ijid.2006.05.007
206. Yohannes, M., Gill, J., Ghatak, S., Singh, D., Tolosa, T., 2012. Comparative evaluation of the Rose Bengal plate test, standard tube agglutination test and complement fixation test for the diagnosis of human brucellosis. *Rev. Sci. Tech.* 31, 979–84.
207. Zhan, Y., Liu, Z., Cheers, C., 1996. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infect. Immun.* 64, 2782–2786.

Annexes

Annexe 1 : résultats d'analyse sérologique des sérums de bovins prélevés au niveau de l'abattoir de Rouiba (Alger).

Nombre	RBT (Espagne)	DDG-NH immunoprécipitation				Test de fixation du complément	ELISA indirect		
		[Ag]= 1mg/ml		[Ag]= 5mg/ml			1/200 (%)	1/400 (%)	1/800 (%)
		LPS	NH	LPS	NH				
2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	81,36	74,41	66,89
89	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	101,11	118,16	153,6
126	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	1/64	48,3	37,66	26,52
182	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	77	69,49	60,65
207	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	93,19	94,81	100,95
208	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	65,8	63,43	63,56
210	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	1/4	26,44	19,01	14,81
219	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	92,44	89,97	94,19
220	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	1/256 ++	97,95	99,58	121,16
221	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	97,35	108,82	128,05
224	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	94,79	94,81	42,14
225	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256 ++	87,62	85,46	72,3
226	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256 ++	101,38	110,44	138,4
227	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/16	79,71	77,33	80,9
228	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	102,46	107,33	95,95
229	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	93,53	96,11	102,77
230	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256 ++	102,17	86,58	77,74
231	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256 ++	101,62	111,5	143,34
232	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	101,15	94,82	82,1
234	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	79,04	58,83	42,14
235	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/256	91,69	71,48	64,94
302	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1/8	18,25	13,19	13,12
385	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1/128	91,69	75,75	58,4
386	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	1/128	97,81	95,5	93,15

Annexe 2 : résultats d'analyse sérologique des sérums des ovins prélevés au niveau des abattoirs de Rouiba et El-Harrach (Alger).

Numéro	RBT (Espagne)	DDG-NH immunoprécipitation				Complément Fixation	iELISA (%OD)		
		[Ag]= 1mg/ml		[Ag]= 5mg/ml			1/200	1/400	1/800
		LPS	NH	LPS	NH				
1	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
2	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
3	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
4	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
5	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
6	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
7	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
8	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
9	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		6,56	5,67	7,39
11	(-)					/	/	/	/
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		5,93	5,45	6,65
13	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
14	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
15	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		12,6	5,93	6,54
17	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
18	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
19	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
20	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
21	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
22	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
23	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
24	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
25	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
26	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/

27	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
28	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
29	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		7,7	6,92	7,9
31	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
32	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
33	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
34	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
35	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
36	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
37	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
38	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
39	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
40	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
41	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
42	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
43	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
44	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
45	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
46	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
47	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
48	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
49	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
50	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
51	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
52	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
53	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
54	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
55	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
56	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
57	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
58	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		5,69	5,09	7,19
59	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/

60	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
61	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
62	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		6,3	5,93	6,44
63	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
64	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
65	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
66	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
67	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
68	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
69	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		6,65	5,48	7,39
70	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
71	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
72	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
73	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
74	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
75	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
76	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
77	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
78	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
79	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
80	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
81	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
82	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
83	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
84	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
85	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
86	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
87	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
88	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
89	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
90	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
91	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
92	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/

93	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
94	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
95	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
96	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
97	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
98	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
99	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
100	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
101	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
102	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
103	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
104	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
105	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
106	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
107	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
108	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
109	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
110	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
111	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
112	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
113	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
114	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
115	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
116	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
117	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
118	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
119	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
120	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
121	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
122	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
123	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
124	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		8,75	7,88	8,4
125	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/

126	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
127	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
128	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1/4	13,69	10,04	8,31
129	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	1/16	13,51	7,46	8,52
130	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
131	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		No more serum	No more serum	No more serum
132	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
133	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
134	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
135	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
136	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
137	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
138	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		No more serum	No more serum	No more serum
139	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
140	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
141	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
142	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
143	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
144	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
145	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
146	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
147	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
148	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
149	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
150	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
151	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
152	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
153	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
154	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
155	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
156	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
157	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
158	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/

159	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
160	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
161	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
162	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
163	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
164	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
165	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
166	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
167	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
168	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
169	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
170	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
171	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
172	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
173	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
174	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
175	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
176	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
177	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
178	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
179	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
180	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
181	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
182	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
183	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
184	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
185	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
186	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
187	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
188	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
189	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
190	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
191	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/

192	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
193	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
194	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
195	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
196	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
197	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
198	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
199	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
200	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
201	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
202	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/
203	(-)	/	/	/	/	/	/	/	/

Fiche de renseignements pour les ouvriers de l'abattoir de Rouiba

1-Nom.....Prénom.....Age.....

2-Profession.....

3-A quand remontent vos débuts professionnels ?

Date :.....

Lieu :

4-De qu'elle région proviennent les ovins qui débarquent à l'abattoir ?

5-Qu'elle est la tranche d'âge des ovins la plus abattus ?

☐ 6 mois à 1an

☐ De 1an à 5ans

☐ Supérieur à 5ans

6-Avez-vous remarqué la présence de boucle verte au niveau de l'oreille chez les ovins ?

☐ Oui ☐ Non

7-Que signifie cette boucle verte à l'oreille ?

☐ Malade

☐ Vacciné, contre quoi

☐ Autres

8- Connaissez-vous la brucellose ? : ☐ Oui ☐ Non

Si oui : expliquez.....

9-Consommez-vous le lait et les produits laitiers crus ? ☐ Oui ☐ Non

10- est ce que la brucellose peut se transmettre par :

☐ Lait cru ☐ lait caillé ☐ petit lait ☐ fromage frais

11-Prenez-vous des mesures de précautions avant l'abattage des animaux ?

☐ gants ☐ blouse ☐ botte ☐ aucun

12-Lavez-vous les mains à la fin des manipulations ? : ☐ Oui ☐ Non

Si oui par : ☐ Eau seule ☐ eau savonneuse ☐ L'eau de javèle

13-Après abattage, lavez-vous la salle d'abattage ? ☐ Oui ☐ Non

Si Oui, par quel moyen ?

☐ Eau seul ☐ L'eau de javèle ☐ Autres :.....

14-Avez-vous présentés les symptômes suivant

Fièvre + Sueur : ☐ Oui ☐ Non

15-Avez-vous consulté un médecin suite à ces symptômes : ☐ Oui ☐ Non

16-Si oui, quel type d'examen vous-avez fait :

Sanguin ☐

Radio téléthorax ☐

Autres ☐

Précisez :.....

Fiche de renseignements pour les inspecteurs vétérinaires de l'abattoir de Rouiba

1-Nom.....Prénom.....Age.....

2-Profession.....

3-A quand remontent vos débuts professionnels

Date :

Lieu :

4-Connaissez-vous les zoonoses majeures : Oui ☐ Non ☐5-Portez-vous des mesures de sécurité face à la brucellose : Oui ☐ Non ☐6-Portez-vous des gants en manipulant les animaux et les carcasses : Oui ☐ Non ☐7-prenez-vous des précautions particulières lors de manipulation des animaux présentés pour l'abattage
sanitaire : Oui ☐ Non ☐8-Est-ce que vous vous êtes blessés par un couteau lors de l'inspection *post-mortem* : Oui ☐ Non ☐9-Désinfectez-vous les mains à la fin des manipulations : Oui ☐ Non ☐10-Consommez-vous le lait cru et les produits laitiers crus : Oui ☐ Non ☐

11-Avez-vous présenté les symptômes suivants :

Fièvre + Sueur : Oui ☐ Non ☐12-Si oui, ancien ☐ récent ☐13-Avez-vous été contaminé par la brucellose : Oui ☐ Non ☐14-Avez-vous déjà contracté une maladie zoonotique : Oui ☐ Non ☐

Annexe 5 : résultats d'analyse sérologique des sérums des professionnels de l'abattoir de Rouiba (Alger).

Numéro	Age (ans)	Profession	RBT (Espagne)	SAT	Brucellacapt	Coombs test
1	26	Maquignon	(-)	< 20	< 20	< 20
2	27	Traitant d'abats	(-)	< 20	< 20	< 20
3	44	Sacrificateur	(-)	< 20	< 20	< 20
4	51	Sacrificateur	(-)	< 20	< 20	< 20
5	29	Boucher	(-)	< 20	< 20	< 20
6	23	Manœuvre	(-)	< 20	< 20	< 20
7	50	Sacrificateur	(-)	< 20	< 20	< 20
8	33	Sacrificateur	(-)	< 20	< 20	< 20
9	42	Traitant d'abats	(-)	< 20	< 20	< 20
10	40	Traitant d'abats	(-)	< 20	< 20	< 20
11	52	Gérant	(-)	< 20	< 20	< 20
12	25	Gérant	(-)	± 1/20	< 20	< 20
13	38	Maquignon	(-)	< 20	< 20	< 20
14	24	Boucher	(-)	< 20	< 20	< 20
15	43	Frigoriste	(-)	< 20	< 20	< 20
16	58	Traitant d'abats	(-)	< 20	< 20	< 20
17	28	Frigoriste	(-)	< 20	< 20	± 1/120
18	21	Manœuvre	(-)	< 20	< 20	< 20
19	49	Sacrificateur	(-)	< 20	< 20	< 20
20	44	Maquignon	(-)	< 20	< 20	< 20
21	33	Boucher	(-)	< 20	< 20	< 20
22	29	Sacrificateur	(-)	< 20	< 20	< 20
23	22	Sacrificateur	(-)	< 20	< 20	(1/40)
24	39	Maquignon	(-)	< 20	(1/40)	< 20
25	31	Frigoriste	(-)	< 20	< 20	< 20
26	48	Traitant d'abats	(-)	± 1/20	(1/40)	1/160
27	32	Sacrificateur	(-)	< 20	< 20	< 20
28	50	Maquignon	(-)	< 20	< 20	(1/40)
29	30	Maquignon	(-)	± 1/20	< 20	(1/40)
30	20	Traitant d'abats	(-)	< 20	< 20	< 20
31	26	Frigoriste	(-)	< 20	< 20	< 20
32	42	Maquignon	(-)	< 20	< 20	< 20
33	26	Frigoriste	(-)	< 20	± 1/160	(1/80)
34	55	Sacrificateur	(-)	< 20	< 20	< 20
35	33	Traitant d'abats	(-)	< 20	< 20	< 20
36	32	Frigoriste	(-)	< 20	< 20	< 20
37	37	Traitant d'abats	(-)	< 20	< 20	< 20
38	31	Sacrificateur	(-)	< 20	< 20	< 20
39	31	Vétérinaire	(-)	< 20	< 20	< 20
40	42	Vétérinaire	(-)	< 20	< 20	< 20
41	42	Vétérinaire	(-)	± 1/20	± 1/80	< 20
42	48	Vétérinaire	(-)	< 20	< 20	< 20

Fiche d'élevage

1- Date :.....

2- Wilaya :..... Commune :.....

3- Numéro (code) de l'élevage :.....

4- Nom de l'éleveur :.....

5- Elevage :

Bovins ☐Caprins ☐Ovins ☐

6- Type de l'élevage

Libre ☐Semi-entravé ☐Entravé ☐

7- Mélangez-vous vos animaux avec d'autres animaux lors du pâturage ?

Oui ☐Non ☐

8- Avez-vous des problèmes d'infertilité chez les mâles ?

Orchite ☐Epididymite ☐

9- Avez-vous des problèmes d'avortements chez les femelles ?

Oui ☐Non ☐

10 - Si oui, sont-ils répétitifs ?

Oui ☐Non ☐

11- Isolez-vous les femelles lors de la mise bas ?

Oui ☐Non ☐

12- Désinfectez-vous le lieu de la mise bas ?

Oui ☐Non ☐

13- Où achetez-vous vos animaux ?

.....

14- Où vendez-vous vos animaux ?

Marchés à bestiaux ☐

Eleveurs de la même région ☐

Abattoirs ☐

15- Connaissez-vous la brucellose ?

Oui ☐

Non ☐

16- Savez-vous que la brucellose touche :

Bovins ☐

Ovins ☐

Caprins ☐

17- Que faites-vous avec les animaux atteints par la brucellose ?

Isolement ☐

Abattage ☐

Vente ☐

18- Gardez-vous les femelles nées des mères infectées par la brucellose ?

Oui ☐

Non ☐

19- Est-ce que vos animaux sont vaccinés contre la brucellose?

Oui ☐

Non ☐

20- Si oui, quand remonte la dernière campagne de vaccination?

.....

21- Que faites-vous avec la bouse ?

.....

22- Avez-vous des chiens ?

Oui ☐

Non ☐

23- Vos chiens mangent le placenta et le fœtus avorté ?

Oui ☐

Non ☐

Nous vous remercions pour votre aimable collaboration

Fiche de prélèvement

1- Date :.....

2- Wilaya :..... Commune :.....

3- Numéro (code) de l'élevage :.....

4- Numéro de prélèvement :.....

5- Type d'animal prélevé

Bovin ☐ Caprin ☐

6- Si bovin, identifié ?

Oui ☐ Non ☐

7- Si oui, numéro d'identification :

.....

8- Age :.....

9- Race :.....

10- L'animal a-t-il été récemment introduit dans l'élevage ?

Oui ☐ Non ☐

11- Gestation

Oui ☐ Non ☐

12- L'animal a-t-il déjà avorté ?

Oui ☐ Non ☐

Coloration de Stamp

Les frottis faites sur des lames nettoyées et dégraissées, sont séchés et fixés légèrement à la flamme d'un bec Bunsen.

En tant qu'agent colorant, nous utilisons une solution commerciale de fuchsine phénolique basique de Ziehl, étant donné que les préparations commerciales sont plus stables que celles préparées au laboratoire (habituellement préparées avec 1 g de fuchsine basique dissoute dans 10 ml d'éthanol absolu auquel 90 ml de phénol à 5% sont ajoutés). Cette solution commerciale a été diluée dans du PBS à 4 parties du colorant et 5 parties du PBS.

Nous inondons les frottis avec la solution de colorant dans du PBS, que nous avons préalablement filtrée sur un papier filtre conventionnel (ceci est très important pour obtenir des préparations propres et transparentes) et laissez pendant dix minutes. La dilution du colorant doit être préparée et filtrée juste au moment de la coloration, en éliminant la dilution en excès, qui ne doit pas être réutilisée.

- Laver avec de l'eau distillée.
- Décolorer pendant 10 secondes avec une solution d'acide acétique à 0,05% dans de l'eau distillée.
- Laver à nouveau avec de l'eau distillée.
- Nous appliquons le colorant de contraste pendant 1 à 2 minutes (dans notre cas, nous utilisons une solution de malachite à 0,8% dans de l'eau distillée).
- Laver ensuite à l'eau distillée, laisser sécher et observer au microscope avec l'objectif d'immersion.

Avec cette coloration, les Brucelles ont une forme caractéristique de cocoïde ou de coccobacillaire et sont colorées en rouge sur un fond vert.



The characterization of *Brucella* strains isolated from cattle in Algeria reveals the existence of a *B. abortus* lineage distinct from European and Sub-Saharan Africa strains



Mammar Khames^{a,b}, Virginie Mick^c, M. Jesús de Miguel^d, Guillaume Girault^c, Raquel Conde-Álvarez^e, Djamel Khelef^b, Mustapha Oumouna^a, Ignacio Moriyón^e, Pilar M. Muñoz^{d,*,1}, Amaia Zúñiga-Ripa^{e,*,1}

^a Department of Biology, University of Medea, Medea 26000, Algeria

^b National Veterinary High School, Algiers, Algeria

^c Paris-Est University/ANSES, EU/OIE/FAO & National Reference Laboratory for Brucellosis, Animal Health Laboratory, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort Cedex, France

^d Unidad de Producción y Sanidad Animal, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain

^e Instituto de Salud Tropical y Departamento de Microbiología y Parasitología – IDISNA, Universidad de Navarra, Edificio de Investigación, c/Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Brucellosis
Cattle
Brucella
Algeria
Africa
MLVA
AMOS-ERY PCR

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonosis caused by bacteria of the genus *Brucella* that causes important economic losses and human suffering worldwide. Brucellosis control requires an understanding of the *Brucella* species circulating in livestock and humans and, although prevalent in African countries of the Mediterranean basin, data for this area are mostly restricted to isolates obtained from humans and small ruminants. Here, we report the characterization of twenty-four *Brucella* strains isolated from Algerian cattle. Bruce-ladder multiplex PCR and conventional biotyping showed that Algerian cattle are infected mostly by *B. abortus* biovar 3, and to less extent by *B. abortus* biovar 1 and *B. melitensis* biovar 3. Extended AMOS-ERY PCR showed that all Algerian *B. abortus* biovar 3 strains were of the subgroup 3b. Although by multi locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) most isolates were closer to the European counterparts, five strains displayed characteristics distinct from the European isolates and those of countries across the Sahara, including three repetitions of marker Bruce55. These five strains, plus an earlier isolate from an Algerian human patient, may represent a lineage close to clades previously described in Africa. These data provide the basis for additional molecular epidemiology studies in northern Africa and indicate that further bacteriological and molecular investigations are necessary for a complete understanding of the epidemiology of cattle brucellosis in countries north and south of the Sahara.

1. Introduction

Bacteria of the genus *Brucella* cause brucellosis, a zoonosis that affects a variety of vertebrates and causes a grave and debilitating disease in humans. Eradicated from domestic ruminants in some industrialized countries, brucellosis is endemic in livestock in many areas of the world, where it represents a substantial source of economic losses and human suffering (McDermott et al., 2013). Up to now, twelve nominal *Brucella* species have been described (<http://www.bacterio.net/allnamesac.html>), among which *B. abortus* and *B. melitensis* preferentially infect cattle and small ruminants, respectively. Despite this

typical host range, *B. melitensis* is also a source of cattle infections in mixed breeding systems (Godfroid et al., 2013) and less frequently some *B. suis* biovars can also infect cattle (Alton et al., 1988; Corbel, 1997; Ewalt et al., 1997; Musser et al., 2013; Szulowski et al., 2013; Tae et al., 2012), which makes necessary *Brucella* species identification for a complete understanding of the epidemiology of the disease in these animals. However, because of the existence of immunodominant epitopes common to *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*, the *Brucella* species infecting a given individual, herd or flock, cannot be identified by serological testing (Ducrottoy et al., 2016). Moreover, most laboratories cannot carry out a direct identification of species-specific DNA

* Corresponding authors.

E-mail addresses: pmmunoz@cita-aragon.es (P.M. Muñoz), azuniga@unav.es (A. Zúñiga-Ripa).

¹ Shared last authorship.

sequences in animal tissues or fluids, and the vast majority of these methods have not been validated for specificity and sensitivity. Therefore, bacteriological isolation and typing are currently necessary for epidemiological surveys under most circumstances. Phenotypic methods for species identification and further division into biovars were developed decades ago (Alton et al., 1988). However, these methodologies use a limited number of characters, pose reproducibility problems and require specialized laboratories. Thus, they have been surpassed by the analysis of DNA obtained from strains previously isolated from milk, vaginal swabs or necropsy samples. Methods like multiplex Bruce-ladder PCR for species identification (López-Goñi et al., 2008) and multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for in depth epidemiological studies have gained wide acceptance (Al-Dahouk et al., 2007; Alton et al., 1988; Bertu et al., 2015; Corbel, 1997; Ducrotoy et al., 2017; Ewalt et al., 1997; Ferreira et al., 2012; García-Yoldi et al., 2007; Jiang et al., 2011; Le Fleche et al., 2006; Maquart et al., 2009; Mick et al., 2014; Musser et al., 2013; Szulowski et al., 2013; Tae et al., 2012; Tian et al., 2017; Whatmore et al., 2016). Not surprisingly MLVA has provided data with phylogeographic implications and revealed inconsistencies within the classical biovars (Le Fleche et al., 2006; Whatmore et al., 2016).

Mostly based on serological evidence, brucellosis has been reported throughout much of Africa (Ducrotoy et al., 2017; Hegazy et al., 2011; Lounes et al., 2014; McDermott et al., 2013). Although brucellosis is known to be endemic in Mediterranean Africa, bacteriological data are scarce (Aggad and Boukraa, 2006; Benhabyles et al., 1992; Gabli et al., 2015; Lounes et al., 2014; Verger and Grayon, 1984; Whatmore et al., 2016) and seldom supported by DNA analyses. For the Maghreb (western North Africa), Lounes et al. (2014) presented the results of a MLVA of 90 *B. melitensis* strains of human origin, but to the best of our knowledge there are no DNA molecular analyses of *B. abortus* isolates obtained in this area. Here, we present the characterization and MLVA carried out on 24 Algerian strains isolated from cattle plus one human isolate. Taken together with the molecular data of Lounes et al. (2014) on *B. melitensis*, the results provide the basis for a better understanding of the epidemiology of the brucellosis in Mediterranean Africa.

2. Methods

2.1. Study site/area

The study was conducted in 2015 in farms and slaughterhouses of the Algeria Center region (Medea and El-Azizia), an agropastoral area located in the heart of the Tellian Atlas, a transit area between the Tell and the Sahara, and between the Highlands of eastern and western Algeria. Investigated cattle include imported breeds (Montbeliarde, Flekveih, Holstein, Brune des Alpes or Frisonne) and local breeds as well as crossbred animals (Magpie Black or Red Magpie).

2.2. Animal samples

Blood (serum) and mammary and retropharyngeal lymph nodes were collected from 225 cows in Medea city and El-Azizia slaughterhouses. In addition, blood sera and milk were obtained from 295 cattle (261 females and 34 males) in dairy farms. Lymph nodes were collected in sterile plastic bags, sealed and transported to the laboratory in ice-boxes. Milk and necropsy samples were preserved at -20°C . Rose Bengal and complement fixation tests were conducted following OIE guidelines (Alton et al., 1988; OIE, 2016). In addition, positive sera of Medea and El-Azizia were confirmed by the double gel diffusion immunoprecipitation test with *B. melitensis* native hapten (NH)-rich lipopolysaccharide (LPS) preparations in hypertonic gels (OIE, 2016), as a positive result in this test has been shown to correlate with a positive culture (Jones et al., 1980).

2.3. Bacterial culture

Milk samples ($n = 8$) and lymph nodes ($n = 30$) of all seropositive cattle ($n = 32$) were cultured on CITA medium (de Miguel et al., 2011). Lymph nodes were degreased and surface sterilized by brief immersion on ethanol and gentle burning. Then, they were suspended in the minimal possible amount of sterile saline, homogenized, and at least 0.5 ml of each homogenate inoculated per plate. Milk was plated directly on the same media (0.5 ml/plate; one plate for each quarter), a procedure that results in the same sensitivity as the classical centrifugation method (Alton et al., 1988) and avoids the biohazards inherent to aerosols (J.M. Blasco, personal communication). All plates were incubated aerobically under a 5–10% CO_2 atmosphere at 37°C and examined daily for suspicious colonies during the next 3–7 days. Colonies containing Gram-negative, oxidase positive coccobacilli were subcultured on Blood Agar Base N°2 supplemented with 5% sterile calf serum, and pure cultures were stored in skim milk at -80°C .

2.4. Conventional species and biovar identification

All suspicious isolates were tested for oxidase and urease activity and CO_2 requirement, and then for phage sensitivity (Tb, Wb, Iz and R/C), acriflavine agglutination, crystal violet exclusion, agglutination with anti-A and anti-M sera and sensitivity to thionin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), basic fuchsin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and safranin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Alton et al., 1988; OIE, 2016). *B. abortus* strains S19, 2308, 544 and Tulya, and *B. melitensis* strains 16 M and Ether (all from the collection kept at Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria [CITA]) were used as controls.

2.5. Molecular typing

Genomic DNA was extracted using The PowerMicrobial[®] Maxi DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Species identification was confirmed by Bruce-ladder multiplex PCR (8 target genes) (López-Goñi et al., 2008), and the enhanced AMOS-ERY PCR, which discriminates two different haplotypes (3a and 3b) within *B. abortus* biovar 3 was subsequently carried out (Ocampo-Sosa et al., 2005). MLVA genotyping was performed using the 16-primer-pair PCR assay described elsewhere (Al-Dahouk et al., 2007; Le Fleche et al., 2006) and the DNA fragment sizes obtained were converted to repeat unit (U) numbers using the corresponding formula for each locus. Cluster analysis of MLVA data was performed with the Bionumerics 7.6.1 software (Applied Maths, Belgium) using the UPGMA (Unweighted Pair Group Method Algorithm) algorithm or a minimum spanning tree (MST) with categorical distance matrices. The biovar 1 reference strain *B. melitensis* 16 M was included as outgroup for molecular analysis. The Algerian MLVA pattern (MLVA-11 and MLVA-16) investigated in this study, including the reference strain *B. abortus* biovar 3 Tulya, were compared with 115 MLVA genotypes from Nigeria, Kenya, Sudan, France and Spain previously published and/or available at CITA and ANSES collections and the *Brucella* 2012 database (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>) hosted by Paris Sud University (Orsay, France).

3. Results

A total of 32 ($6.15 \pm 2\%$) sera were found positive when 520 cattle from Medea were analyzed by RBT and DGD-NH immunoprecipitation, and samples of these seropositive animals were cultured for brucellae. Two milk samples from two different farms (strains AB0114 and AB0115) and 22 retropharyngeal and/or mammary lymph nodes (Table 1) yielded colonies of Gram-negative coccobacilli that were oxidase and urease positive. As expected, some animals yielded bacteria in more than one organ/source (Table 1). Thus, the 24 isolates corresponded to 18 infected animals. All isolates were smooth by the crystal

Table 1
Summary of bacteriological results.

Location ^a	Sample ^b	Strain code ^c	Species and biovar (bv)	Subtype (AMOS-ERY PCR)	Bruce55 repetitions (MLVA)
Medea (f)	Milk	AB0114	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	3
Medea (f)	Milk	AB0115	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	3
Medea city (s)	Mammary	AB0338	<i>B. abortus</i> bv 1	–	–
Medea city (s)	Mammary	AB0339	<i>B. abortus</i> bv 1	–	–
El-Azizia (s)	Retropharyngeal	AB0122	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (s)	Mammary	AB0123	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (s)	Mammary	AB0124	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	3
El-Azizia (s)	Mammary	AB0125	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (s)	Mammary	AB0126	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (s)	Mammary	AB0127	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (s)	Mammary/Retropharyngeal	AB0116/AB0117	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (s)	Mammary/Retropharyngeal	AB0129/AB0130	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (s)	Mammary/Retropharyngeal	AB0118/AB0119	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (s)	Mammary	AB0128	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1
El-Azizia (s)	Mammary/Retropharyngeal	AB0120/AB0121	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	3
El-Azizia (s)	Mammary/Retropharyngeal	AB0336/AB0337	<i>B. abortus</i> bv 1	–	–
El-Azizia (s)	Mammary/Retropharyngeal	AZB240/AZB241	<i>B. melitensis</i> bv 3	–	–
El-Azizia (s)	Mammary	AB0131	<i>B. abortus</i> bv 3	3b	1

^a (f) farm, (s) slaughterhouse.
^b Collected samples for bacteriological purposes include milk (from farms) and mammary and/or retropharyngeal lymph nodes (from farms and slaughterhouses).
^c See also Supplemental Figs. S4 and S5 .

violet dye exclusion and/or the acriflavine agglutination tests and, consistent with these results, all were resistant to the rough-specific bacteriophage R/C. Twenty-two isolates were lysed by phages Tb, Wb and Iz, and 2 were resistant to phages Tb and Wb but lysed by phage Iz, patterns that are typical of smooth *B. abortus* and *B. melitensis*, respectively. Species classification was confirmed by Bruce-ladder multiplex PCR (Supplemental Fig. S1).

As expected, the 2 *B. melitensis* isolates (AZB240 and AZB241) did not require CO₂ for growth. Both agglutinated with anti-A and anti-M sera and were resistant to thionine at 20 µg/ml, to basic fuchsin at 20 µg/ml and to safranin at 100 µg/m. Accordingly, they were classified as *B. melitensis* biovar 3. Among the *B. abortus* isolates, 4 (AB0336 to AB0339) belonged to biovar 1 (CO₂-dependent, sensitive to thionine and resistant to basic fuchsin at 20 µg/ml, and safranin at 100 µg/ml), and 18 to biovar 3 (CO₂-dependent on primary isolation and resistant to thionin and basic fuchsin at 20 µg/ml and safranin at 100 µg/ml). This phenotypic discrimination between biovar 1 and biovar 3 strains was in concordance with the profiles obtained with the enhanced AMOS-ERY PCR. All the *B. abortus* biovar 3 strains yielded an enhanced AMOS-ERY PCR profile that was different from that of the biovar 3 Tulya reference strain (biovar 3a) and similar to that of the Spanish biovar 3 (biovar 3b) strains (Table 1 and Supplemental Fig. S2).

The MLVA-16 assay (16 loci) showed that the isolates from the same animal (Table 1) were indistinguishable by this method and clustered together. As regards to the *B. abortus* biovar 3 strains, MLVA-11 allowed clustering the 89 *B. abortus* biovar 3 included in the analysis, covering the 18 Algerian strains investigated in this study, into three distinct lineages. Remarkably, 6 Algerian strains (5 from this study [AB0114, AB0115, AB0120, AB0121, AB0124] plus one *B. abortus* of human origin taken from the data base [AB0078]) were in a group distinct from the 3a non-Mediterranean Africa strains (Nigeria, Kenya, Sudan and Uganda for Tulya) and the 3b European (Spanish and French) strains (Fig. 1 and Supplemental Fig. S3), showing the existence of a different genotype within biovar 3b (see below). The existence of three biovar 3 lineages, including this third type, was confirmed by the MLVA16 (Supplemental Fig. S4), and closer examination showed that while the Algerian isolates in the larger biovar 3 cluster presented only one repeat unit (1 U) for Bruce55, the third group of Algerian strains (AB0114, AB0115, AB0120, AB0121, AB0124 and AB0078) harbored 3 U of this marker.

Concerning the 4 *B. abortus* biovar 1 isolates, they were grouped together with strains of Morocco, France, Italy, Portugal, Germany and

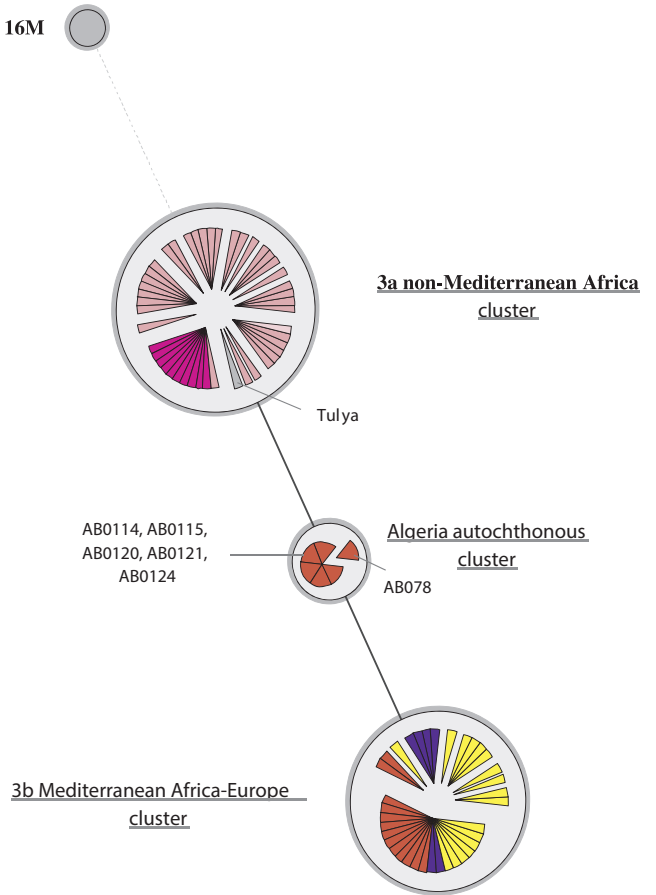


Fig. 1. MST of MLVA11 genotypes of 89 worldwide *B. abortus* biovar 3 isolates, including Tulya. The MST was constructed with a categorical coefficient using *B. melitensis* bv 1 16 M as outgroup. Size of circles reflects the number of isolates with a particular MLVA genotype. Width of the line reflects the genetic distance between the genotypes (heavy short lines connect SLVs, thin longer lines connect DLVs). Each country is assigned a different colour. Blue: France; Fuchsia: Kenya; Grey: reference strains; Light pink: Sudan; Pink: Nigeria; Red: Algeria; Yellow: Spain (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.) .

Zimbabwe (Supplemental Fig. S5). Also, although isolated from cattle, the 2 *B. melitensis* biovar 3 bovine isolates (AZB240 and AZB241) clustered together but interspersed among other *B. melitensis* strains isolated from human cases in several African Mediterranean countries (Supplemental Fig. S6), all of them belonging to the autochthonous Maghreb lineage described previously (Lounes et al., 2014).

4. Discussion

Despite solid and longstanding serological and clinical evidence of the presence of brucellosis in sheep and goats and consequently in humans in Algeria and other Maghreb countries (Benhabyles et al., 1992; Lounes et al., 2014), data about bovine brucellosis in this area are rather meager and seldom supported by bacteriological evidence (Verger and Grayon, 1984). To the best of our knowledge, this is the first study conducted to clarify the *Brucella* spp. predominant in cattle in Algeria, information critically necessary when the possibility of *B. melitensis* infections acquired from the abundant small ruminant local population is considered (Corbel, 1997; Godfroid et al., 2013; Verger, 1985). Although the results indicate the dominance of the classical biovar 3 of *B. abortus* as well as the presence of *B. melitensis* biovar 3 MLVA shows a more complex picture.

Concerning *B. abortus*, several works have suggested that Mediterranean and Sub-Saharan strains may represent different lineages. Verger and Grayon (1985) investigated 273 strains of African origin isolated from 1976 to 1983 that included 12 Moroccan strains, the others being from Senegal, Togo, Guinea Bissau, Rwanda and Niger. Even though their study was based on classical biotyping, these authors pointed out that the *B. abortus* biovar 1 and 3 strains from Morocco had been isolated from “Pied Noir” cattle and were similar to those isolated in Europe but different from those of the other African countries represented in the collection. Recent molecular analyses have confirmed this insight on the heterogeneity of African *B. abortus* strains and the existence of differences between the European and Maghreb strains on one hand and those of Sub-Saharan countries on the other (reviewed in Bertu et al., 2015; Ducrotoy et al., 2017; see also Mathew et al., 2015; Matope et al., 2009; Whatmore et al., 2016). Indeed, most *B. abortus* biovar 3 strains characterized in the present work also show a MLVA pattern closer to the Spanish and French strains, which bear the characteristics of the biovar 3b identified by Ocampo-Sosa and coworkers as a subgroup within biovar 3 (Ocampo-Sosa et al., 2005). However, there were exceptions. A subgroup of 6 strains, including a human isolate, represented a distinct lineage, and the repetition of Bruce55 shows that, contrary to what was suspected (Bertu et al., 2015), Bruce55 by itself is not a marker for the biovar 3a grouping. Presently, it is difficult to conclude whether these results reflect gaps in the capacity of the MLVA methods to discriminate a few local strains or a real connection of these strains with those of countries across the Sahara (Whatmore et al., 2016). However, taking into account the repeated validation of the MLVA methodology, we favor the second conclusion. Further studies will be necessary to compare these strains with the African genotypes described previously as Clade C1 or A using an extended BruMLSA21 (Whatmore et al., 2016). The connection of the *B. abortus* biovar 3b strains in the main cluster and the *B. abortus* biovar 1 strains with those of Spain and Morocco is easier to interpret taking into account the socio-economical and commercial links existing among Mediterranean countries. Similarly, the presence of *B. melitensis* in cattle is not unexpected and confirms that where cattle are kept in close association with sheep or goats, the former are at risk of being infected by *B. melitensis* (Corbel, 1997; Godfroid et al., 2013; Verger, 1985).

5. Conclusions

This study shows that Algerian cattle are infected mostly by *B. abortus* biovar 1 and 3 strains closer to the European lineages than to

the Sub-Saharan strains, and that *B. melitensis* biovar 3 is also present in these animals. However, a few cattle strains display distinct characteristics and may represent a lineage close to Sub Saharan strains. While the data provide the bases for further studies, they also indicate that additional bacteriological and molecular studies are necessary for a complete understanding of the epidemiology of cattle brucellosis in Algeria.

Conflicts of interest

The authors declare not to have conflicts of interest.

Authorship

Conceived the study M.K., M.O., I.M.; isolated the bacteria, M.K.; performed classical biotyping and Bruce-ladder PCR, M.K., M.J.M.; performed MLVA assays G.G., P.M.M.; performed clustering analysis: P.M.M., A.Z.-R., V.M.; supervised the laboratory work A.Z.-R., R.C.-A., P.M.M., V.M.; wrote the paper, A.Z.-R., I.M and P.M.M. All authors participated in the presentation and discussion of results.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to Alberto Delgado-López, Sara Serrano, María Uriarte, Ludivine Perrot, Thomas Vuilmet and Maryne Jay for excellent technical assistance and to the veterinarians of Medea slaughterhouses for providing the samples. Research at the Department of Microbiology and Parasitology of the University of Navarra is supported by The Institute for Tropical Health and by MINECO (grant AGL2014-58795-CA). Research at CITA-Spain and ANSES-France was supported by INIA and project Bru-Epidia 291815-FP7/ERANET/ANIHWA. Work at CITA-Spain was also sustained by Grants from MINECO (AGL2014-58795-CA) and Aragon Government (Consolidated Group A14).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.10.008>.

References

- Aggad, H., Boukraa, L., 2006. Prevalence of bovine and human brucellosis in western Algeria: comparison of screening tests. *East. Mediterr. Health J.* 12, 119–128.
- Al-Dahouk, S., Le Fleche, P., Nockler, K., Jacques, I., Grayon, M., Scholz, H.C., Tomaso, H., Vergnaud, G., Neubauer, H., 2007. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J. Microbiol. Methods* 69, 137–145.
- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M., 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris, France.
- Benhabyles, N., Benkirane, A., Boudilmi, B., Benchoulâ, S., Bouayoun, H., 1992. Épidémiologie de la brucellose humaine et animale au Maghreb. In: Presented at the Prevention of brucellosis in the Mediterranean countries: proceedings of the international seminar organized by CIHEAM, CEC, MINAG (Malta), FIS (Malta). Valletta, Malta, 28–30 October 1991. Pudoc Scientific Publishers, p. 36.
- Bertu, W.J., Ducrotoy, M.J., Muñoz, P.M., Mick, V., Zúñiga-Ripa, A., Bryssinckx, W., Kwaga, J.K.P., Kabir, J., Welburn, S.C., Moriyón, I., Ocholi, R.A., 2015. Phenotypic and genotypic characterization of *Brucella* strains isolated from autochthonous livestock reveals the dominance of *B. abortus* biovar 3a in Nigeria. *Vet. Microbiol.* 180, 103–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.014>.
- Corbel, M.J., 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 213–221.
- de Miguel, M.J., Marín, C.M., Muñoz, P.M., Dieste-Pérez, L., Grilló, M.J., Blasco, J.M., 2011. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1458–1463.
- Ducrotoy, M.J., Conde-Álvarez, R., Blasco, J.M., Moriyón, I., 2016. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17, 81–102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.002>.
- Ducrotoy, M., Bertu, W.J., Matope, G., Cadmus, S., Conde-Álvarez, R., Gusi, A.M., Welburn, S., Ocholi, R., Blasco, J.M., Moriyón, I., 2017. Brucellosis in Sub-Saharan Africa: current challenges for management, diagnosis and control. *Acta Trop.* 165, 179–193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.023>.
- Ewalt, D.R., Payeur, J.B., Rhyhan, J.C., Geer, P.L., 1997. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 417–420.

- Ferreira, A.C., Chambel, L., Tenreiro, T., Cardoso, R., Flor, L., Dias, I.T., Pacheco, T., Garin-Bastuji, B., Le Fleche, P., Vergnaud, G., Tenreiro, R., Correa de Sa, M.I., 2012. MLVA16 Typing of Portuguese human and animal *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* isolates. *PLoS One* 7, e42514.
- Gabli, A., Agabou, A., Gabli, Z., 2015. Brucellosis in nomadic pastoralists and their goats in two provinces of the eastern Algerian high plateaus. *Trop. Anim. Health Prod.* 47 (6), 1043–1048. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-015-0825-4>.
- García-Yoldi, D., Le Fleche, P., de Miguel, M.J., Muñoz, P.M., Blasco, J.M., Cvetnic, Z., Marín, C.M., Vergnaud, G., López-Góñi, I., 2007. Comparison of Multiple-locus variable-number tandem-repeat with other PCR-based methods for typing *Brucella suis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 4070–4072.
- Godfroid, J., Bastuji, B.G., Saegerman, C., 2013. Brucellosis in terrestrial wildlife. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epi.* 32, 27–42.
- Hegazy, Y.M., Molina-Flores, B., Shafik, H., Ridler, A.L., Guitian, F.J., 2011. Ruminant brucellosis in upper Egypt (2005–2008). *Prev. Vet. Med.* 101, 173–181.
- Jiang, H., Fan, M., Chen, J., Mi, J., Yu, R., Zhao, H., Piao, D., Ke, C., Deng, X., Tian, G., Cui, B., 2011. MLVA genotyping of Chinese human *Brucella melitensis* biovar 1, 2 and 3 isolates. *BMC Microbiol.* 11, 256.
- Jones, L.M., Berman, D.T., Moreno, E., Deyoe, B.L., Gilsdorf, M.J., Huber, J.D., Nicoletti, P., 1980. Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 12, 753–760.
- López-Góñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C.M., de Miguel, M.J., Muñoz, P.M., Blasco, J.M., Jacques, I., Grayon, M., Cloeckeaert, A., Ferreira, A.C., Cardoso, R., Correa de Sa, M.I., Walravens, K., Albert, D.B., Garin-Bastuji, B., 2008. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3484–3487.
- Le Fleche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al-Dahouk, S., Bouchon, P., Denoeud, F., Nockler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L.A., Vergnaud, G., 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 6, 1–14.
- Lounes, N., Cherfa, M.-A., Le Carrou, G., Bouyoucef, A., Jay, M., Garin-Bastuji, B., Mick, V., 2014. Human brucellosis in Maghreb: existence of a lineage related to socio-historical connections with Europe. *PLoS One* 9, e115319. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115319>.
- Maquart, M., Le Fleche, P., Foster, G., Tryland, M., Ramisse, F., Djonje, B., Al-Dahouk, S., Jacques, I., Neubauer, H., Walravens, K., Godfroid, J., Cloeckeaert, A., Vergnaud, G., 2009. MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. *BMC Microbiol.* 9, 145.
- Mathew, C., Stokstad, M., Johansen, T.B., Klevar, S., Mdegela, R.H., Mwamengele, G., Michel, P., Escobar, L., Fretin, D., Godfroid, J., 2015. First isolation, identification, phenotypic and genotypic characterization of *Brucella abortus* biovar 3 from dairy cattle in Tanzania. *BMC Vet. Res.* 11, 156. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0476-8>.
- Matope, G., Bhebhe, E., Muma, J.B., Skjerve, E., Djonje, B., 2009. Characterization of some *Brucella* species from Zimbabwe by biochemical profiling and AMOS-PCR. *BMC Res. Notes* 2, 261.
- McDermott, J.J., Grace, D., Zinsstag, J., 2013. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epi.* 32, 249–261.
- Mick, V., Le Carrou, G., Corde, Y., Game, Y., Jay, M., Garin-Bastuji, B., 2014. *Brucella melitensis* in France: persistence in wildlife and probable spillover from alpine Ibex to domestic animals. *PLoS One* 9, e94168.
- Musser, J.M.B., Schwartz, A.L., Srinath, I., Waldrup, K.A., 2013. Use of serology and bacterial culture to determine prevalence of *Brucella* spp. in feral swine (*Sus scrofa*) in proximity to a beef cattle herd positive for *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *J. Wildl. Dis.* 49, 215–220.
- OIE, 2016. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris, pp. 1–44.
- Ocampo-Sosa, A.A., Agüero, J., García-Lobo, J.M., 2005. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet. Microbiol.* 110, 41–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.06.007>.
- Szulowski, K., Iwaniak, W., Weiner, M., Zlotnicka, J., 2013. *Brucella suis* biovar 2 isolations from cattle in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med: AAEM* 20, 672–675.
- Tae, H., Shallom, S., Settlege, R., Hawkins, G.N., Adams, G.L., Garner, H.R., 2012. Complete genome sequence of *Brucella suis* VBI22, isolated from bovine milk. *J. Bacteriol.* 194, 910.
- Tian, G.-Z., Cui, B.-Y., Piao, D.-R., Zhao, H.-Y., Li, L.-Y., Liu, X., Xiao, P., Zhao, Z.-Z., Xu, L.-Q., Jiang, H., Li, Z.-J., 2017. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis of Chinese *Brucella* strains isolated from 1953 to 2013. *Infect. Dis. Poverty* 6, 89. <http://dx.doi.org/10.1186/s40249-017-0296-0>.
- Verger, J.M., Grayon, M., 1984. Caractéristiques de 273 souches de *Brucella abortus* d'origine africaine. *Develop. Biol. Stand.* 56, 63–71.
- Verger, J.M., 1985. *B. melitensis* infection in cattle. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science* 32.
- Whatmore, A.M., Koylass, M.S., Muchowski, J., Edwards-Smallbone, J., Gopaul, K.K., Perrett, L.L., 2016. Extended multilocus sequence analysis to describe the global population structure of the genus *Brucella*: phylogeography and relationship to biovars. *Front. Microbiol.* 7, 137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.07.001>.

M. Khames^{1,2,3}, A. Zúñiga-Ripa³, F. Yekkour^{1,2}, K. Benachour¹, S. Pérez-Gómez⁴, D. Khelef², R. Conde-Alvarez³, M. Oumouna¹, I.Moriyón³

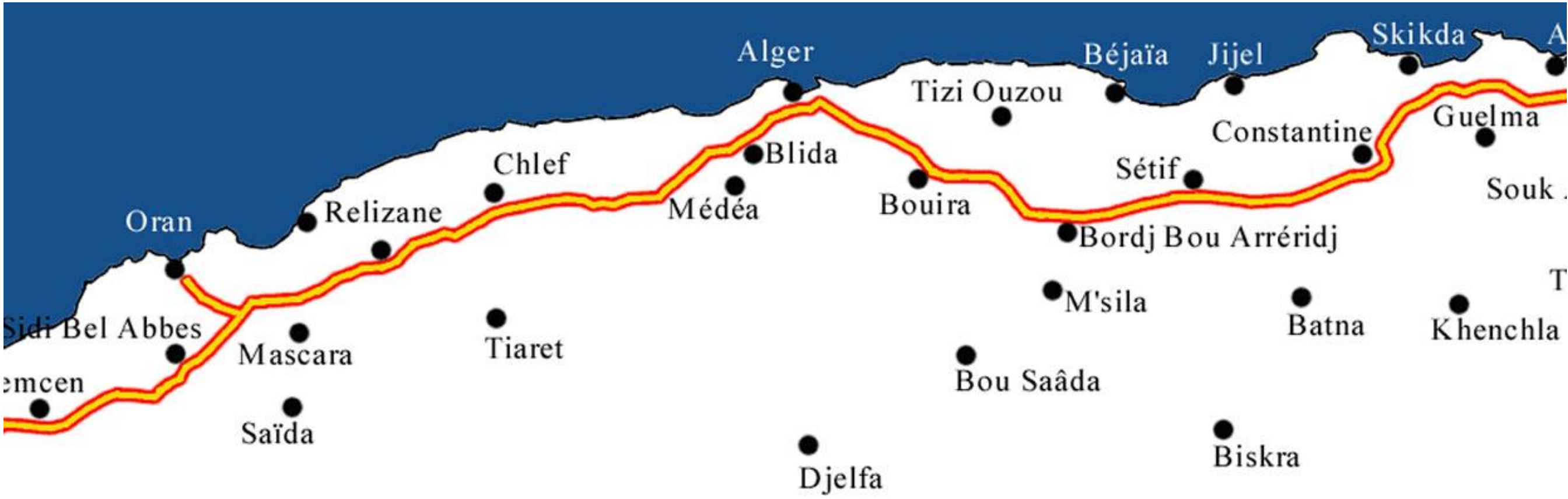
¹Department of Biology, University of Medea, Medea, Algeria

²National Veterinary High School, Algiers, Algeria

³Institute of Tropical Health and Department of Microbiology and Parasitology, University of Navarra, Pamplona, Spain

⁴Laboratorio de Calidad Agroalimentaria, Pamplona, Spain

Brucellosis is a worldwide widespread zoonosis caused by bacteria of the genus *Brucella*. Despite eradication programs, the disease remains endemic in many regions of the World, with predominance in the Mediterranean Basin, Middle East, Africa, Western Asia, Central and South America. The World Health Organization (WHO) estimates that the infection causes more than 500,000 human infections per year worldwide, although the real incidence might be higher. Even after more than a century of extensive research, brucellosis results in substantial economic losses, human morbidity and perpetuates poverty worldwide. Algeria is a country representative of the conditions of the Northern African countries of the Mediterranean basin. Since under most circumstances human brucellosis is the best indicator of the animal disease, the high number of human brucellosis cases reported in recent years (819 human cases in the first four months of 2016) is indicative of the impact of this zoonosis in Algeria. The aim of this work was: (i) to obtain additional data on the status of brucellosis in Algeria, (ii) to compare some serological tests under the conditions of resource-limited laboratories and (iii) to isolate and characterize *Brucella* strains from cattle.



Serological survey in Algiers

Material and methods. A total of 402 bovine and 203 ovine sera from two slaughterhouses in Algiers were examined by the Rose Bengal test (RBT), complement fixation test (CFT), hypertonic double gel diffusion with a smooth lipopolysaccharide and native hapten extract (DDG-NH) and iELISA with smooth lipopolysaccharide and IgG-specific protein G-peroxidase conjugate.

Results. Twenty four (5.97%) bovine sera samples were positive by RBT. Of these, 23 were positive by CFT and DDG (5.72%) and 16 by iELISA (3.98%). By CFT, 18 had titers equal or higher 1/256; 2, 1/128; 1, 1/64; 1, 1/16 and 1, 1/4. The serum that was negative by DDG was also negative in the iELISA but positive in RBT and CFT. Concerning the epidemiological factors, Table 1 summarizes the results according to sex, age, breed, identification status and pregnancy.

Concerning the ovine sera, two (0.98%) were positive by mRBT. By CFT, one had a titer of 1/4 and the other one a titer of 1/16. This last serum was found positive by DDG-NH.

Table 1. Results of serological tests according to sex, age, breed and identification status in cattle from Algiers slaughterhouses.

			Number of positive results (%) in the indicated tests			
N° of animals			RBT	CFT	DDG-NH	iELISA
Sex	Female	264	23 (8.71%)	22 (8.33%)	22 (8.33%)	16 (6.06%)
	Male	138	1 (0.72%)	1 (0.72%)	1 (0.72%)	0 (0.00%)
Age (females)	< 2 years	1	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
	>5years	263	23 (8.74%)	22 (8.36%)	22 (8.36%)	16 (6.08%)
Breed	Local	33	1 (3.03%)	1 (3.03%)	1 (3.03%)	1 (3.03%)
	Cross-breed	344	22 (6.39%)	21 (6.10%)	21 (6.10%)	14 (4.07%)
Identification status	Montbeliarde	25	1 (4.00%)	1 (4.00%)	1 (4.00%)	1 (4.00%)
	Yes	46	10 (21.73%)	10 (21.73%)	10 (21.73%)	8 (17.39%)
	No	305	10 (3.27%)	10 (3.27%)	10 (3.27%)	6 (1.96%)
Pregnancy (females)	Ear tag removed	51	4 (7.84%)	3 (5.88%)	3 (5.88%)	2 (3.92%)
	Pregnant	21	3 (14.28%)	2 (9.52%)	2 (9.52%)	2 (9.52%)
	No-pregnant	235	20 (8.51%)	20 (8.51%)	20 (8.51%)	14 (5.95%)

Conclusions. The results of this survey confirm: (i) the importance of cattle brucellosis in Algeria and (ii) that a combination of RBT and DDG can be implemented instead of the more sophisticated CFT and iELISA to determine the apparent prevalence. As RBT and DDG are robust and technically simple, they should be useful in laboratories with basic equipment and where manpower is not limiting. Including bacteriological methods are urgent to clarify the epidemiology of brucellosis in Algeria (see Serological and bacteriological study in Medea). Finally, the study highlights a significant absence of proper implementation of general measures (identification and tagging, control of animal movements) that are necessary for successful brucellosis control.

Discussion. This study shows that cattle brucellosis is a major problem in Algeria. Moreover, since the presence of *B. melitensis* in cattle is of particular concern for Public Health, more bacteriological studies are necessary. It is also important to mention that studies in areas with dominance of ovine breeding are necessary. Finally, for serological studies the results show that, in the absence of vaccination, simple tests like RBT and native hapten immunoprecipitation are not outperformed by complement fixation or iELISA.

Serological and bacteriological study in Medea

Material and methods. Blood and lymph nodes (retropharyngeal and mammary) were taken from 225 cattle in two slaughterhouses (Medea city and El-Azizia). For sera analysis, the RBT was used as screening test and DDG-NH immunoprecipitation as confirmatory test. The selective medium CITA was used for *Brucella* isolation from lymph nodes and conventional typing and the Bruce-ladder PCR allowed species identification. Further analysis by enhanced AMOS-ERY PCR was used to identify the sub-group.

Results. The analysis of 225 bovine sera obtained from slaughterhouses revealed 24 (10.66%) seropositive cattle. Concerning the epidemiological factors, Table 2 summarizes the results according to age, breed and pregnancy.

Table 2. Results of serological tests according to age, breed and pregnancy in cattle from Medea slaughterhouses.

		N° of animals	Positive animals (%)	p (Chi2)
Age	2-5 years	110	17 (15.45)	<0.05
	≥ 5 years	115	7 (6.08)	
Breed	Local	7	2 (28.57)	>0.05
	Cross-breed	181	20 (11.05)	
Pregnancy (females)	Imported	37	2 (5.40)	>0.05
	Yes	36	4 (11.11)	
	No	189	20 (10.60)	

The medium CITA allowed the isolation of 24 *Brucella* strains and the Bruce-ladder PCR identified 22 isolates as *B. abortus* and 2 as *B. melitensis* (Figure 1A). Conventional typing allowed the identification of 18 *B. abortus* biovar 3, 4 *B. abortus* biovar 1 and 2 *B. melitensis* biovar 3 (data not shown). AMOS-ERY PCR showed that all *B. abortus* biovar 3 belonged to the 3b sub-biovar (Figure 1B).

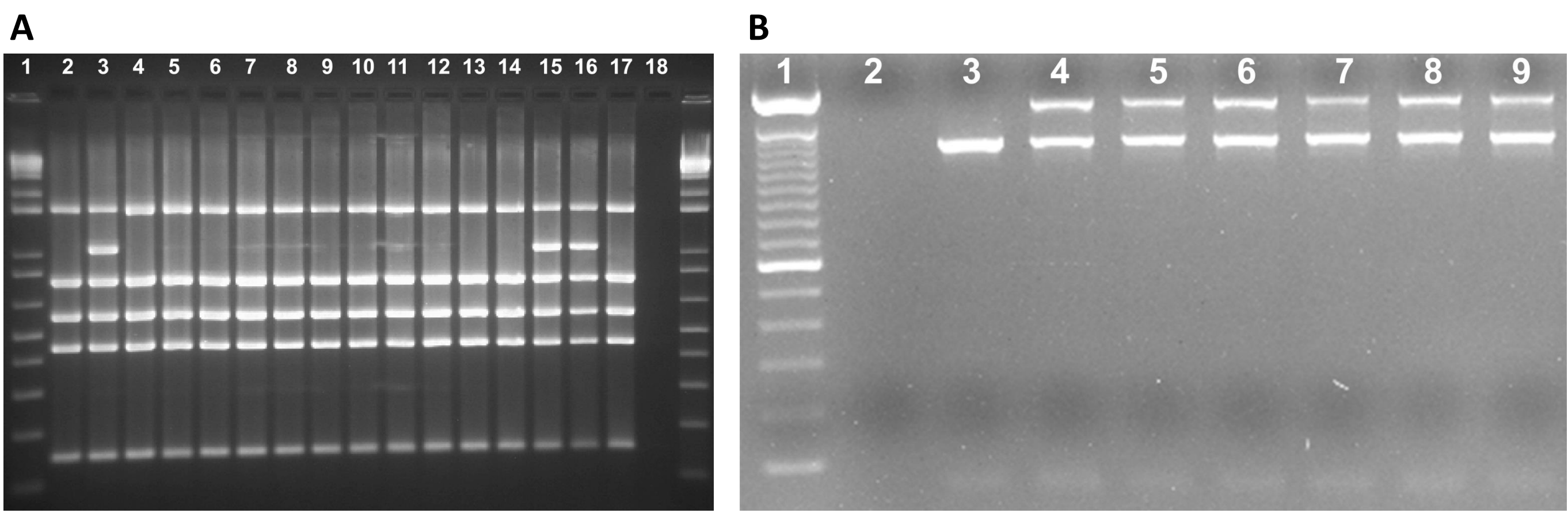


Figure 1. Panel A: Bruce-ladder PCR (1) 1Kb plus DNA ladder, (2) reference strain *B. abortus* 544, (3) reference strain *B. melitensis* 16M; (4-14, 17) *B. abortus* from Algeria, (15, 16) *B. melitensis* from Algeria, (18) negative control, (19) 1Kb plus DNA ladder. Panel B: Enhanced AMOS-ERY PCR (1) 1Kb plus DNA ladder, (2) negative control, (3) *B. abortus* Tulya (biovar 3a), (4) *B. abortus* biovar 3b, (5-9) *B. abortus* from Algeria (showing 3b genotype).

Conclusions. The prevalence found in this study (6.15%) is very high comparing to that notified by veterinary services, which published a value of 0.76% in 2014. This high incidence could be explained by the insufficient control measures in Algeria. Control and eradication of brucellosis requires definition of the *Brucella* species circulating in a given epidemiological unit and this work shows the variety of *Brucella* strains circulating in Algeria. In addition, the isolation of *B. melitensis* biovar 3 from cattle in our study, confirms that where cattle are kept in close association with sheep or goats, infection of these animals can also be caused by this *Brucella* species. Finally, the fact that the *B. abortus* biovar 3 strains isolated in this work belong to the sub-group 3b shows that the strains circulating in Algeria are more related to European than to African counterparts.

Mammar Khames^{1,2,*}, El-aid Kaaboub³, Karine Oumouna-Benachour¹, Ignacio Moriyon⁴, Mustapha Oumouna¹
¹Department of Biology, School of Sciences, University of Medea, Medea, Algeria
²Veterinary Higher School, Algiers, Algeria
³Veterinary Institute of Blida, Blida, Algeria
⁴Université de Navarre, Espagne
* Corresponding author: drmammar@hotmail.fr

Brucellosis is considered to be the most common bacterial zoonosis in the world, with more than half a million new cases estimated each year. The World Health Organization (WHO) estimates that the infection causes more than 500,000 human infections per year worldwide, although the real incidence might be higher. Despite control/eradication programs, brucellosis, a major worldwide zoonosis due to the *Brucella* genus, is endemic in Northern Africa and remains a major public health problem in Algeria, where human brucellosis is ranked second in notifiable zoonotic diseases. Indeed, the high number of human brucellosis cases reported in recent years (819 human cases in the first four months of 2016) is indicative of the impact of this zoonosis in Algeria. The aim of this study is to summarize official data, regarding human brucellosis incidence in Medea, from 2004 to 2014, with the purpose to provide appropriate insights concerning the epidemiological situation of human brucellosis in this area.

I. Material and methods.

To collect data on human brucellosis cases recorded during the last ten years in the 64 municipalities of the department of Medea; We contacted the Directorate of Health and Population (Direction de la Santé Publique, DSP), who provided us with the necessary data. The epidemiological data of human brucellosis cases (age; Sex; geographical origin), were also recorded.

II. Results.

1. Evolution of human brucellosis in Médéa

The evolution of human brucellosis incidence (number of annual cases) is shown in Table 1. Figure 1 illustrates the evolution of the incidence rate over the past decade.

Table 1. Evolution of the reported incidence of human brucellosis in Médéa from 2004 to 2014.

Years	Population	Number of reported cases	Incidence / 10 ⁵
2004	896810	72	8,03
2005	908563	104	11,45
2006	911041	252	27,66
2007	924706	109	11,79
2008	814940	71	7,79
2009	735421	56	6,15
2010	849418	79	5,82
2011	866406	54	6,23
2012	883735	31	3,40
2013	901412	24	2,63
2014	919440	32	3,48
Total	/	884	/

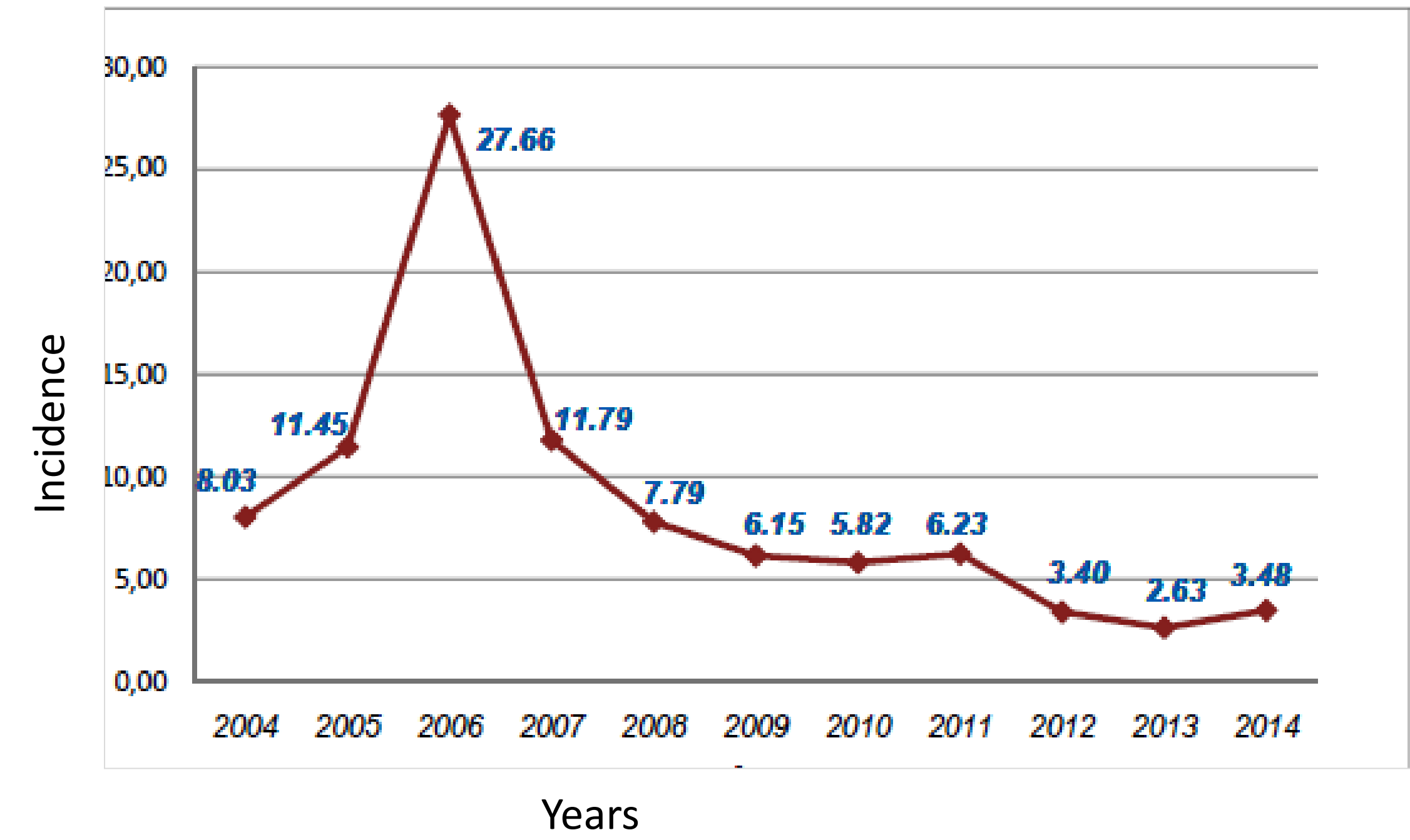


Figure 1. Evolution of human brucellosis incidence rate in Médéa from 2004 to 2014.

Human brucellosis cases reported during ten years study period, increased from 72 cases in 2004 to a peak of 256 cases in 2006. Thereafter, a remarkable decrease between 2007 and 2013 was observed, followed by a slight increase in 2014 with 32 cases .

2. Human brucellosis according to age

The age groups proposed are represented as follows: 0-1 year, 2-4 years, 5-9 years, 10-14 years, 15-19 years, 20-44 years, 45-65 and > 60 years (figure 2).

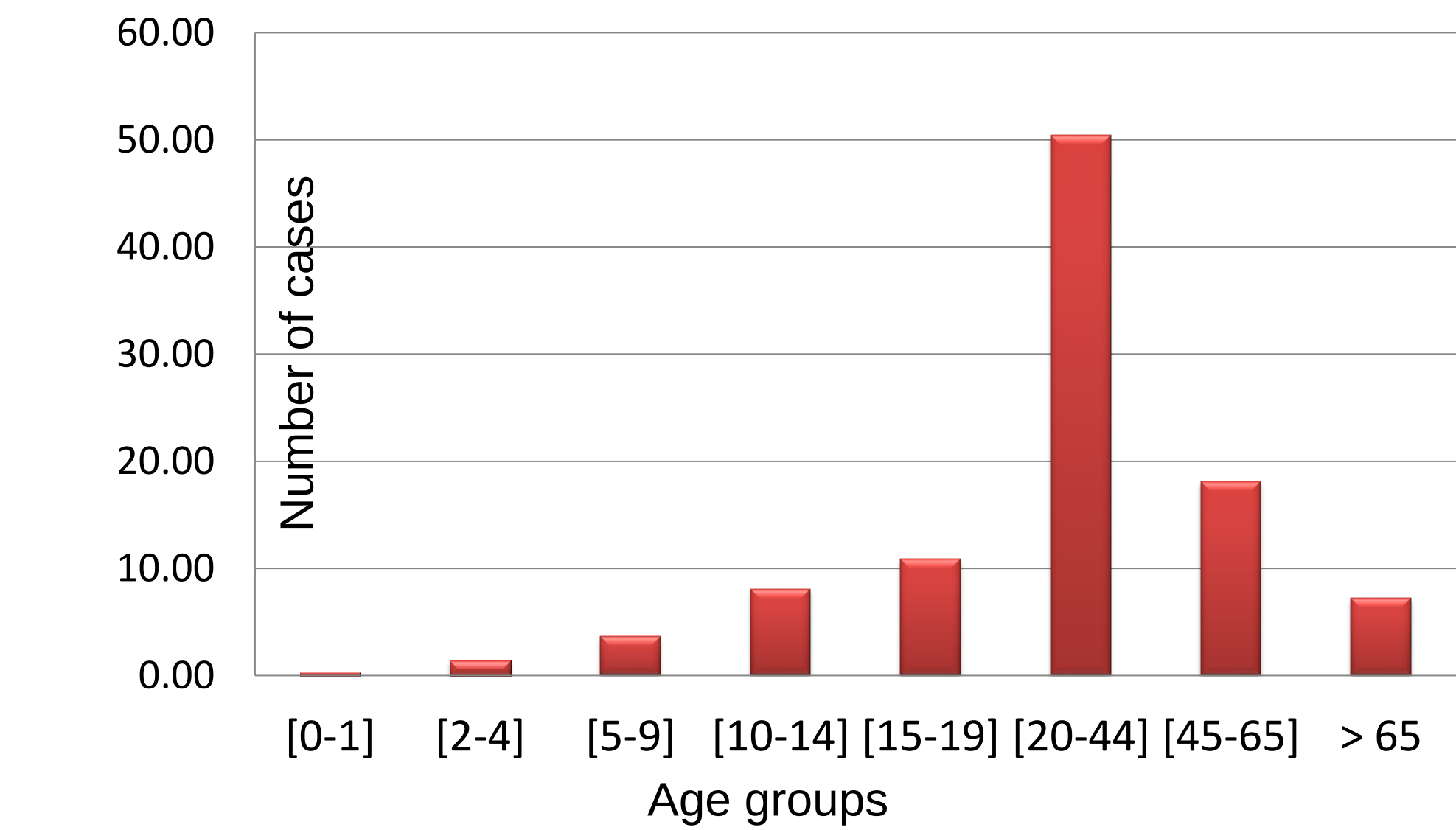


Figure 2. Human brucellosis cases according to different age groups from 2004 to 2014.

Brucellosis affects all age groups with different percentages, this can be confirmed by our results (Figure 2). The most affected age group is 20-44 years old with 357 cases followed by the 45-65 years old (128 cases). A total of 38 brucellosis cases were recorded in children of less than 10 years old.

2. Human brucellosis according to gender

Out of the 884 recorded, table 2 shows that the majority of cases are males, with a sex ratio of 1.53.

Table 2. Human brucellosis cases according to gender from 2004 to 2014.

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Total	%
Male	36	62	150	67	43	40	48	39	18	13	19	535	60,52
Female	36	42	102	42	28	16	31	15	13	11	13	349	39,48
Total	72	104	252	109	71	56	79	54	31	24	32	884	100

3. Human brucellosis according to season

Figure 3 reports human brucellosis cases recorded monthly during 10 years (from 2004 to 2014).

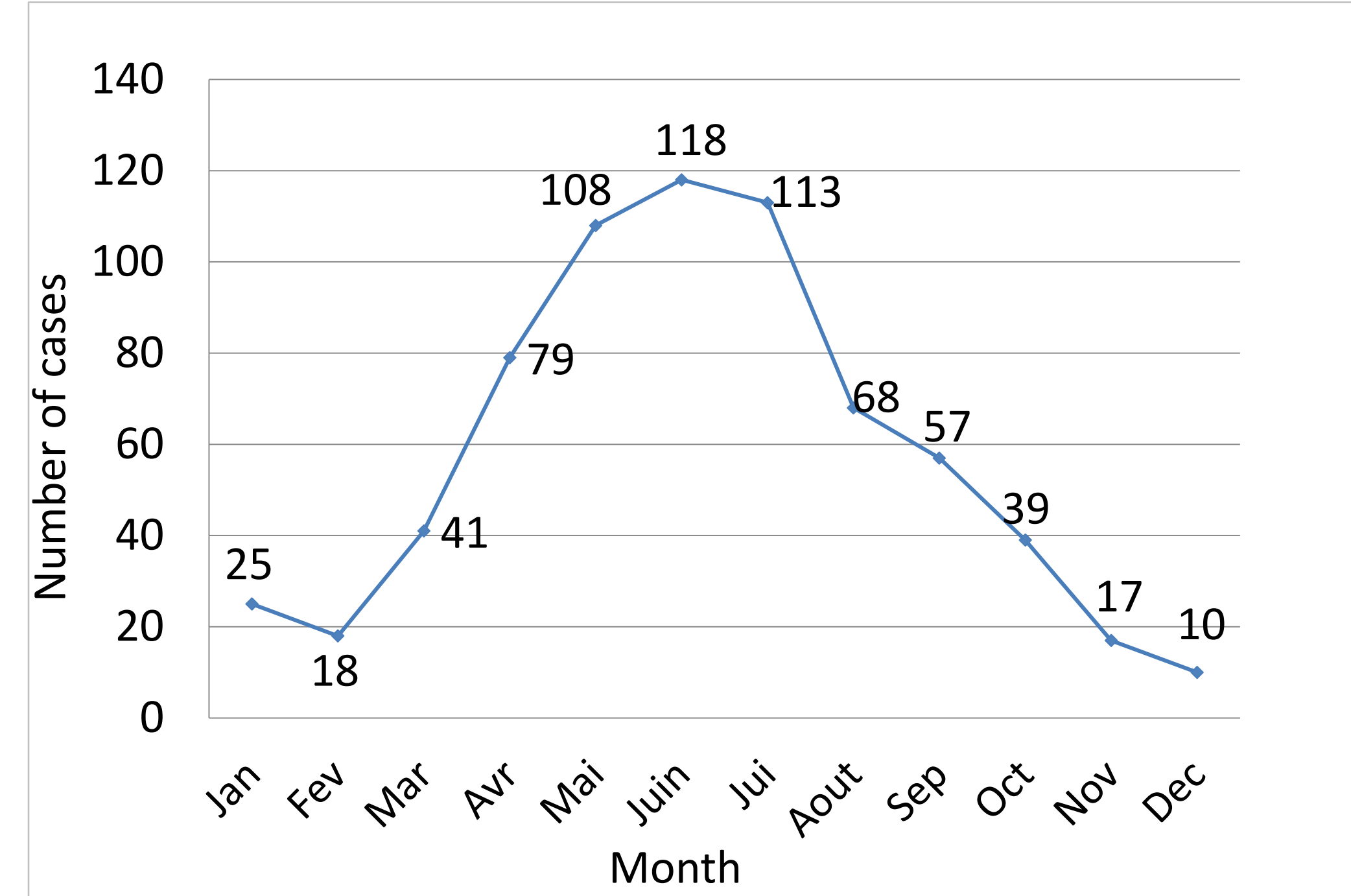


Figure 3. Human brucellosis cases recorded monthly from 2004 to 2014

Variations in cases of human brucellosis according to the season reported in Figure 3, show a peak in June with 118 cases out of a total of 681, while the lowest number was recorded in December with 10 cases.

III. Discussion

A remarkable drop in the number of human brucellosis cases, from 2006 was observed. This sudden and continuous regression could be the result of the implementation in 2006 of a vaccination program of small ruminants by Rev1. The age group of 20-44 years old, was the most affected by brucellosis, this category mainly encompassed individuals working as breeders, butchers, slaughterhouse workers and veterinarians; whom could be contaminated directly or indirectly by consumption of unpasteurized dairy products considered as the main sources of infection by brucellosis.

In our study, males were found more contaminated than females, this could be explained by the fact that most agricultural professionals are males. During 10 years, the most human brucellosis cases were recorded in June, this would coincide with periods of parturition and / or abortion in livestock, thus increase the risk of contamination of humans directly or by consuming infected milk during the warm period.

Conclusion

Our retrospective study carried out in Medea showed that during the last decade, 884 human brucellosis cases were recorded (could be more), which allows us to conclude that despite the control programs undertaken , human brucellosis is endemic in this area, allowing us to make a link with domestic animals that could be strongly infected.

Acknowledgements. Research supported by “School of Sciences, University of Medea, Algeria”. Thanks to DSA of Medea (Algeria) for providing data.