

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement
Supérieur et la Recherche Scientifique
École Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de
Magister en Sciences Vétérinaires

Option : *Immunologie animale*

Thème :

***La brucellose ovine dans la région Sud-Ouest de
Sétif : étude séroépidémiologique et évaluation de
deux tests sérologiques (le Rose Bengale et le
Wright)***

Présenté par : *Mr SAMARI Housseem*

Les membres du jury :

	Nom &Prénom	Grade	Institution
Président	KHELEF Djamel	Professeur	ENSV
Promoteur	HAFSI Fella	Maître de conférences A	ENSV
Co-Promoteur	GHALMI Farida	Professeur	ENSV
Examineur 1	BOUKHORS Karima T	Professeur	ENSV
Examineur 2	AÏT OUDHIA Khatima	Professeur	ENSV

Année Universitaire : 2016/2017

Remerciements

Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné la force et la volonté d'achever ce mémoire et je lui rends grâce.

Je remercie très sincèrement le **Dr. HAFSI Fella** pour avoir acceptée de m'encadrer, pour son aide, sa disponibilité et ses conseils. Elle m'a permis d'accomplir ce travail, de dépasser ce dont je me pensais capable. Par son exigence et par sa rigueur, elle m'a initiée et formée au métier de la recherche et m'en a donnée le goût, même si tout n'a pas toujours été facile. Je voudrais lui adresser ma plus profonde reconnaissance et lui dire toute mon admiration pour ses valeurs tant humaines que professionnelles.

Je tiens aussi à adresser mes vifs remerciements au **Pr. GHALMI Farida**, et la prie de trouver, ici, l'expression de ma reconnaissance et ma sympathie, pour l'assistance et le dévouement sans faille dont elle a toujours fait preuve à mon égard et qui m'ont permis d'élaborer le présent mémoire.

Je remercie également le **Pr. KHELEF Djamel**, pour avoir accepté d'être le président de mon jury, ainsi que pour ses remarques et suggestions.

Ma reconnaissance va également au **Pr. AÏTOUDHIA Khatima** pour avoir accepté de juger ce travail et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée.

Toute ma gratitude va également au **Pr. BOUKHORS Karima Thamina**, pour avoir accepté de prendre sur son temps et faire partie de ce jury

Je remercie les docteurs **MESSAÏ CHAFIK REDHA** et **MENADI Salah, IBTISSAM** (technicienne de laboratoire des analyses médicales CHU Sétif) et **SAADI Ahmed Rachid**, qui m'ont permis de réaliser la partie expérimentale de mon mémoire.

Enfin, un remerciement particulier au **Dr. DRIF Djamel Laoud** et à mon cousin **BETTICHE Mohamed** qui m'ont accueilli pendant les temps dur de l'échantillonnage.

Dédicaces

*Au nom de Dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce
duquel j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à :*

*Mes chers parents pour leur soutien chaque jour, leurs précieux conseils
et leur amour.*

Ma grande mère Elyakoute.

Mes frères et sœurs.

Mes très chères tantes pour leurs encouragements permanents

Mon très très cher cousin Hamoudi.

*Ma future femme qui m'accompagnait toujours dans mes rêves.
Que Dieu nous rassemble dans les plus brefs délais.*

Mes très chers amis Akram, Houssam, Dhiyaeddine, Chellali,

Mouhamed, Amine, Soufiane, Laamri.

A mes collègues de Post-graduation.

Mes binômes en 5^{ème} année Hocine et Saïd

Mes amis de l'ENSV

*A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce
travail.*

HOUSSEM

Résumé :

La brucellose est une zoonose majeure qui se caractérise par l'avortement et la baisse de la fertilité chez de nombreuses espèces.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la région Sud-Ouest de la wilaya de Sétif comprenant deux communes. Nos prélèvements ont été effectués en septembre et octobre 2016.

Notre étude a porté sur les caractéristiques du test de Wright par rapport à l'épreuve au Rose Bengale considéré comme Gold standard avec une évaluation de la séroprévalence et l'analyse de quelques facteurs de risque de la brucellose ovine. Elle a porté sur un échantillon de 129 prélèvements ovins provenant de 15 élevages de la région étudiée.

Les résultats globaux obtenus, montrent une concordance faible entre les deux techniques ($k=0,37$) avec une valeur du test Mc Nemar égale à 0.42 et une exactitude de 91.47%. Le test de Wright ($Se= 40\%$ et $Sp= 89,4\%$) est donc moins sensible même s'il reste aussi spécifique que l'épreuve du Rose Bengale.

Le test de Wright s'avère avoir une VPP faible ($VPP= 33.33\%$), mais une VPN élevée ($VPN= 91.89\%$). Ces résultats s'expliquent par l'existence d'un nombre important de faux positifs. Une séroprévalence d'élevage de 33.3 % et de 66.6%, et une séroprévalence individuelle apparente de 11.62% et 13.95% ont été constatées respectivement par l'épreuve au Rose Bengale et le test de Wright.

Cette prévalence varie en fonction de certains facteurs de risque tel que la région, le sexe, l'âge, la gestation, la présence d'avortement et au type d'élevage (mixte et non mixte).

Mots clés : Brucellose, ovine, Séroprévalence, Rose Bengale, Wright, sensibilité et spécificité.

Abstract :

The Brucellosis is a zoonosis characterized by abortion and decreased fertility in many animal species. In our study, we were interested in the south-west region of the wilaya of Setif comprising two communes. Our samples were collected in September and October 2016.

Our study was focused on the characteristics of the Wright -test against the Rose Bengal test considered as standard Gold with the assessment of seroprevalence and analysis of some risk factors of ovine brucellosis. this study was focused in the collect of 129 sheep samples from 15 farms in the study area. The overall results obtained show a low agreement between the two techniques of diagnostic ($k = 0.37$) with a McNemar test value equal to 0.42 and an accuracy of 91.47%. The Wright -test ($Se = 40\%$ and $Sp = 89.4\%$) is therefore less sensitive although, it remains as specific as the Rose Bengal test.

The Wright test is found to have a low VPP ($VPP = 33.33\%$), but a high VPN ($VPN = 91.89\%$). These results are explained by the existence of a large number of false positives. A farms seroprevalence of 33.3% and 66.6%, and apparent individual seroprevalence of 11.62% and 13.95% were observed respectively by the test Rose Bengal and the Wright test.

This prevalence varies according to certain risk factors such as region, sex, age, gestation, presence of abortion and type of livestock (mixed and non-mixed).

Key words : Brucellosis, ovine, seroprevalence, Rose Bengale, Wright, sensitivity and specificity.

المخلص

الحمى المالطية هي مرض حيواني المنشأ تتميز بالإجهاض وانخفاض الخصوبة في كثير من أنواع الحيوانات في دراستنا، اهتمنا بالمنطقة الجنوب الشرقية من ولاية سطيف. وتم أخذ العينات خلال شهري سبتمبر وأكتوبر سنة 2016 ركزت دراستنا على خصائص اختبار رايت مقارنة باختبار روز البنغال حيث يعتبر كمرجع وفقا للمعايير مع تقييم مدى انتشار المرض وتحليل بعض عوامل الخطر للحمى المالطية. حيث اخذنا 129 عينة من الأغنام في 15 مزرعة داخل منطقة الدراسة تظهر النتائج الإجمالية الناتجة عن اتفاق ضعيف بين الطريقتين ($k = 0.37$) مع قيمة اختبار ام سي نيمار مساوية ل 0.42 والدقة بقيمة 91.47%. وجدنا ان اختبار رايت هو أقل حساسية بالنسبة الى اختبار روز بنغال مع انه ذو خاصية عالية ($Se = 40\%$ و $Sp = 89.4\%$)

وأوضح اختبار رايت ان القيمة التنبؤية الإيجابية منخفضة لكن القيمة التنبؤية السلبية كانت مرتفعة ($VPN= 91.89\%$ و $VPP= 33.33\%$) بسبب وجود عدد كبير من الايجابيات الكاذبة

وكان معدل الانتشار المصلي الفردي واضح بالنسبة الى اختبار روز بنغال واختبار رايت ب 11.62% و 13.95% أما الانتشار المصلي للمزرعة كان بقيمة 33.3% و 66.6% على التوالي بالنسبة للاختبارين

هذا الانتشار يختلف باختلاف عوامل خطر معينة مثل المنطقة والجنس، والعمر، والحمل، والإجهاض، ووجود عدة انواع من المزارع مختلطة وغير مختلطة

كلمات البحث : الحمى المالطية والأغنام والانتشار المصلي، روز البنغال، رايت، حساسية وخصوصية

Liste des abréviations

2-MET :	2-mercaptoéthanol.
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AHG :	Anti-Globuline Humaine.
ARN :	Acide ribonucléique.
BBA :	Bordj Bou Arerridj.
BCG :	Bacillus Calmette-Guérin.
BCSP31 :	<i>Brucella</i> Cell Surface Protein
BFR :	Bacterioferritine.
CD :	Cluster Deffirentiation
CHU :	Centre Hospitalier Universitaire.
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité.
CTLA-4 :	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4.
DC :	Cellules Dendritiques.
DSV :	Direction des Services Vétérinaires.
EAT :	Epreuve à l'antigène tamponné.
EDTA :	Ethylenediaminetetraacetic acid.
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbant assay.
FAO:	Food and Agriculture Organization of the United Nations.
FC:	Fixation du complément.
FN :	Faux Négatif.
FP :	Faux Positif.
FPA:	Fluorescence Polarization Assay.
GM-CSF :	Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating Factors.
IC :	Intervalle de Confiance.
IFN-γ :	Interféron gamma.
Ig A :	Immunoglobuline A.
Ig E :	Immunoglobuline E.
Ig G :	Immunoglobuline G.
Ig M :	Immunoglobuline M.
IL :	Interleukine.
JAK :	Janus kinase.
K :	kappa de cohen.

kDa:	kilodalton.
LB:	Lymphocytes B.
LPS:	Lipopolysaccharide.
LPS-R:	Lipopolysaccharide rough.
LPS-S:	Lipopolysaccharide smooth.
LT:	Lymphocytes T.
MCP-1:	Macrophage Chemoattractant protein 1.
MIP-1:	Macrophage Inflammatory protein 1.
MRT:	Milk ring test.
MyD88:	Myeloid Differentiation primary response gene 88.
NK :	Naturel Killer.
NLR :	NOD-like receptor.
OIE. :	Office International des Épizooties.
Omp :	Outer Membrane Protein.
OMS. :	Organisation Mondiale de la Santé.
O-PS :	O-polysaccharide.
OVF :	Office Vétérinaire Fédéral.
PAMPs :	Pathogen-Associated Molecular Patterns.
PCR :	Polymérase Chain Reaction.
Per :	gene de la pérosamine synthétase.
pH :	potentiel hydrogène.
PPC :	Pentoses Phosphates.
PRR :	Pattern-Recognition Receptors.
RB :	Rose Bengal.
Rev1:	souche vaccinale de <i>B. melitensis</i> biovar 1.
RNI :	Réactifs Intermédiaires Nitrogènes.
ROI :	Réactifs Intermédiaires d'Oxygène.
S19:	Strain 19 vaccine.
SAT :	slow agglutination tube.
SAW :	Séroagglutination Lente de Wright.
Se :	Sensibilité.
SOD :	Superoxyde Dismutase.
Sp :	Spécificité.
T4SS :	Système de Sécrétion de Type IV.

TCR :	T cells receptor.
Th :	Lymphocytes T helper.
TLR :	Toll Like Receptor.
TNF-α :	Facteur De Nécrose Tumorale Alpha.
UFC :	Unité Formant Colonies.
URSS :	Union des Républiques Socialistes Soviétiques.
VN :	Vrai Négatif.
VP :	Vrai Positif.
VPN :	Valeur Prédictive Négative.
VPP :	Valeur Prédictive Positive.

Liste des figures

Figure 1 : Principales espèces de <i>Brucella</i> et hôtes de prédilection	4
Figure 2 : Morphologie des brucelles (coccobacilles en coloration de GRAM)	6
Figure 3 : Placenta d'ovin infecté par des brucelles (Coloration de Stamp)	6
Figure 4 : prévalence de la brucellose des petits ruminants domestiques	8
Figure 5: Représentation schématisque de l'invasion de <i>Brucella</i> dans le tube digestif	13
Figure 6 : Représentation schématisque de la multiplication des bactéries pathogènes, en liaison avec le développement temporel de la réponse immunitaire	19
Figure 7 : Les mécanismes clés dans différentes cellules du système immunitaire inné et adaptatif après infection par <i>B. abortus</i>	20
Figure 8: Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) ou Test Rose Bengale	25
Figure 9 : Exemples de détection positive chez le bovin (encolure) par le test cutané	28
Figure 10: Résultat du test d'agglutination lente (SAT) et des tests ELISA effectués à différents moments après l'infection	29
Figure 11: carte géographique de la wilaya de Sétif.	41
Figure 12: Réactif du Rose Bengale (photo personnelle).	44
Figure 13 : Résultats de l'agglutination sur lame obtenus par le test du Rose Bengale (photo personnelle)	45
Figure 14: Incubation des tubes dans 37°C pendant 24h (photo personnelle).	46
Figure 15 : résultats de l'agglutination sur lame obtenue par le test qualitatif de Wright (photo personnelle)	47
Figure 16 : résultats de l'agglutination sur tube obtenue par le test de Wright (photo personnelle)	47
Figure 17: Séroprévalence individuelle apparente par le test Rose Bengale.	50
Figure 18: Séroprévalence individuelle apparente par le test de Wright.	51
Figure 19: séroprévalence des élevages	52
Figure 20 : séroprévalence en fonction du type d'élevage.	53
Figure 21 : séroprévalence en fonction de la commune et du test sérologique	54
Figure 22 : séroprévalence en fonction du sexe et des deux tests.	55
Figure 23 : séroprévalence en fonction de l'âge.	56
Figure 24 : séroprévalence en fonction des avortements et du test sérologique.	58
Figure 25 : séroprévalence en fonction de la gestation et du test sérologique.	59

Liste des tableaux

Tableau 1 : présentation des différentes espèces de <i>brucella</i> , leurs biovars, leur répartition géographique, leur hôte préférentiel et leur pathogénicité pour l'homme	5
Tableau 2: Sensibilité et spécificité des tests indirects pour le diagnostic de la brucellose	29
Tableau 3: description des élevages étudiés	42
Tableau 4 : comparaison du test de Wright avec le Rose Bengale pris comme test de référence.	49
Tableau 5 : séroprévalence individuelle apparente vis-à-vis de <i>Brucella abortus</i> par deux tests sérologiques	50
Tableau 6 : séroprévalence des élevages	51
Tableau 7 : séroprévalence en fonction du type d'élevage par le test du Rose Bengale	53
Tableau 8 : séroprévalence en fonction du type d'élevage par le test de Wright:	53
Tableau 9 : variation de la séropositivité en fonction de la commune par le test de Rose Bengale	54
Tableau 10 : variation de la séropositivité en fonction de la commune par le test de Wright	54
Tableau 11 : variation de séropositivité de la brucellose ovine en fonction de sexe par le test de Rose Bengale	55
Tableau 12 : variation de séropositivité de la brucellose ovine en fonction de sexe par le test de Wright	55
Tableau 13 : variation de séropositivité de brucellose ovine selon l'âge des animaux étudiés par le test du Rose Bengale	56
Tableau 14 : variation de séropositivité de brucellose ovine selon l'âge des animaux étudiés par le test de Wright	56
Tableau 15 : Variation de la séropositivité de la brucellose selon la présence d'avortement par le test du Rose Bengale.	57
Tableau 16 : Variation de la séropositivité de la brucellose selon la présence d'avortement par le test de Wright	57
Tableau 17 : variation de la séropositivité selon la gestation des femelles par le test du Rose Bengale	58
Tableau 18 : variation de la séropositivité selon la gestation des femelles par le test de Wright	58

Sommaire

I.	Introduction	1
Partie bibliographique		
II.	Définition et Historique	2
1.	Définition	2
2.	Historique	2
III.	Agent pathogène	3
1.	Caractères bactériologiques	5
1.1.	Morphologiques	5
1.2.	Biochimiques	6
2.	Caractères antigénique	6
IV.	Epidémiologie	7
1.	Prévalence	8
2.	Mode de transmission	8
3.	Importance	
V.	Les signes cliniques	9
VI.	La pathogénie moléculaire	10
1.	Les facteurs de virulence classiques	10
1.1.	L'enveloppe	10
1.2.	Le β -1,2-glucans cycliques	11
1.3.	Système de Sécrétion	11
1.4.	Le système BvrR/BvrS	11
1.5.	L'acquisition de métal	11
1.6.	Métabolisme du sucre et transporteur	12
1.7.	ADN/ARN	12
VII.	La réponse immunitaire	13
1.	L'immunité innée	13
1.1.	Cellules	13
1. 2.	Cytokines, chimiokines et PRR / PAMP	15
2.	L'immunité adaptative	16
2.1.	Réponse à médiation cellulaire	16
2.1.1.	Cellules	16
1.1.1.	Cytokines	17
2.2.	Réponse à médiation humorale	18

3. Mécanismes d'échappement	20
VII. Diagnostic	21
1. Diagnostic direct	22
1.1. Bactériologique	22
1.2. Moléculaire	23
2. Diagnostic indirect	23
2.1. Immunologique	23
2.1.1. Test sérologique	24
2.1.1.1. Test d'agglutination lente ou agglutination lente de Wright (SAT ou SAW)	24
2.1.1.2 Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) = Test Rose Bengale	24
2.1.1.3. Test de fixation du complément	25
2.1.1.4. Test ELISA	25
2.1.1.5. Test de polarisation de fluorescence.	26
2.1.1.6. Le test anti-globuline humaine (AHG) ou le test de Coombs	26
2.1.1.6. Test de 2-mercaptoéthanol (2-MET)	26
2.1.1.7. Immunochromatographie en flux latéral	27
2.1.2. Les tests de lait.	27
2.1.2.1. Test de l'anneau de lait.	27
2.1.2.2. ELISA et le test de polarisation de fluorescence.	28
3. Test cellulaire = Test cutané	28
VIII. Traitement	29
1. Chez l'homme	29
2. Chez l'animal	30
IX. Vaccination	30
1. Les vaccins et leur utilisation dans les programmes de lutte contre la brucellose et d'éradication	30
2. Chez les bovins	31
2.1. Le vaccin S19	31
2.2. Souche vaccinale RB51	33
2.3. Le vaccin 45/20	34
2.4. Le vaccin SR82	35
2.5. La vaccination avec des gènes recombinants, des protéines, des vecteurs et des mutants recombinants de B. abortus	35

2.5.1. Les vaccins ADN	35
2.5.2. Les vaccins sous-unités	36
2.5.3. Les vaccins vecteurs	37
2.5.4. Mutants recombinants B. abortus	38
3. Chez les petits ruminants	
Partie expérimentale	
I. Objectif de l'étude	40
II. Matériel et méthode	40
1. Région d'étude	40
2. Animaux et élevages étudiés	41
3. Echantillonnage	42
4. Réalisation des prélèvements	42
5. Analyse au laboratoire	43
5.1. Epreuve au rose Bengale	43
5.2. Epreuve agglutination sur lame et en tube (test de Wright)	45
6. Analyse statistique	48
III. Résultat	48
1. Comparaison entre les différentes méthodes sérologiques pour la recherche des anticorps spécifiques de Brucella abortus	48
2. Étude de la séroprévalence vis-à-vis de l'infection par Brucella abortus	50
2.1. Séroprévalence individuelle apparente	50
2.2. Séroprévalence des élevages	50
3. Étude des facteurs de risque liés à la présence de Brucella abortus	52
IV. Discussion	59
1. Comparaison entre les deux tests	62
2. Séroprévalence individuelle et au niveau du troupeau	62
3. Les facteurs de risques	65
Conclusion et recommandations	68

Références

Annexes

Introduction

Introduction :

La brucellose est une maladie zoonotique reconnue dans le monde entier pour son sérieux danger pour la santé publique et sa signification économique (Matyas et Fujikura, 1984). Il s'agit d'une maladie bactérienne causée par des organismes du genre *Brucella*. Cette maladie provoque de la fièvre ondulante et de la stérilité chez l'homme. Chez les bovins, elle provoque l'avortement, l'infertilité et une perte ou une diminution subséquente de la production laitière. Elle affecte également un large éventail d'animaux hôtes comprenant les moutons, les chèvres, les porcs, les chevaux, les volailles... (Weidman, 1991, Radostitis et al ; 1994). Même si de nombreux pays se déclarent indemnes de *Brucella*, la maladie demeure répandue dans de nombreuses régions du monde (Madkour et Gargani, 1989; Mikolich et Boye, 1990). Selon l'OMS, environ 4 millions de cas de brucellose humaine se produisent chaque année (Comité FAO / OMS d'experts de la Brucellose, 2016).

La brucellose est habituellement diagnostiquée au laboratoire au moyen d'une culture sanguine ou d'une démonstration d'un niveau élevé d'anticorps. Puisque les hémocultures peuvent prendre des semaines et sont souvent infructueuses, un diagnostic positif dépend généralement des données cliniques, sérologiques et épidémiologiques (Mac Donald et al ; 1967, Mohammed et al ; 1999).

Les épreuves utilisées pour le diagnostic de la brucellose sont nombreuses : le test immunoenzymatique (ELISA), le test standard d'agglutination des tubes (STAT), la PCR, le test de fixation du complément (CFT), le test de la globuline antihumaine, le test d'hémolyse indirecte et le transfert de Western (Thakar et al ; 2002).

Différentes techniques sérologiques de diagnostic ont été proposées, le Rose Bengale est une méthode rapide et économique. Il est d'exécution facile sur le terrain avec une réponse plus précoce et plus durable que le test de Wright et la fixation de complément.

La technique de Wright est une méthode de réalisation facile, peu onéreuse qui offre des données qualitatives et quantitatives avec un manque de sensibilité et de spécificité par rapport au Rose Bengale et à la Fixation de Complément.

Dans ce travail, le test du Rose Bengale et le test de Wright ont été utilisés pour étudier la séroprévalence de *Brucella abortus* chez les ovins dans la région Sud-Ouest de Sétif.

Les résultats de ces tests ont permis par ailleurs, d'analyser différents facteurs susceptibles d'influencer la séropositivité vis-à-vis de *Brucella abortus*.

Enfin, l'objectif du présent travail a été aussi de décrire et de comparer les performances de ces deux tests diagnostiques et de proposer une stratégie diagnostique.

Partie

Bibliographique

II. Définition et Historique :

1. Définition :

La brucellose est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à de nombreuses espèces animales et à l'homme, due à des bactéries du genre *Brucella*. Sa répartition géographique est mondiale et de multiples espèces (ruminants, suidés, carnivores, rongeurs...) peuvent être infectées naturellement. La brucellose est aussi appelée fièvre ondulante, fièvre de Malte, fièvre de Gibraltar, fièvre méditerranéenne (chez l'Homme) ; avortement contagieux, fièvre abortive, avortement infectieux, avortement épizootique (animaux), maladie de Bang (bovins), épididymite contagieuse du bélier (ovins) (Acha ; 2005).

2. Historique : Selon Madkour en 1989.

Le nom de la brucellose a été proposé par Alice Evans, un biologiste américain, en 1918, remplacé par «la fièvre de Malte», comme on fait couramment à l'époque. Selon Hughes (1897), la maladie avait été décrite par Hippocrate. Une description précise de la maladie a été faite en 1861 par Marston, qui était un chirurgien assistant dans l'armée britannique à Malte.

En 1887 que Bruce, médecin militaire à Malte, isole dans la rate de 4 soldats britannique décédés d'une « fièvre de Malte » l'agent responsable de la maladie. Il la nommera *micrococcus melitensis*. En 1897, au Danemark, Bang extrait de l'estomac d'avortons bovins le 'bacille de l'avortement épizootique de la vache', qu'il nomma *Bacillus abortus bovis*.

Le bacille de Bang a été cultivé au Danemark, dès 1895 par Bang, vétérinaire danois, à partir de produits d'avortements (fœtus, cotylédons) dans des élevages bovins présentant des avortements à répétition (enzootie). Cette bactérie fut, donc, dénommée "*Bacillus abortus*" (Philippon et Garin-Bastuji ; 2005).

La même année, Wright décrit une approche diagnostique par la mise en évidence d'agglutinines sériques (séroagglutination lente en tube) *Micrococcus melitensis*.

En 1905, Zammit et Horrocks mettent en évidence la présence de la bactérie dans le lait de chèvres apparemment saines et établissent ainsi le rôle de ces animaux en tant que source de contagion.

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

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

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

- Le bacille isolé par Traum est individualisé sous le nom *Brucella suis* par Huddelson en 1929.

- En 1953, en Nouvelle Zélande et en Australie, Buddle et Boyes identifient *Brucella ovis* comme la responsable des épидidymites des béliers.
- Stoenner et Lackman isolent *Brucella neotomae* chez le néotome aux Etats-Unis.
- Crmichael et Bruner découvrent que *Brucella canis* est responsable d'avortement contagieux dans l'espèce canine.
- Enfin en 1994, ont été rapportées plusieurs espèces marines (*Brucella cetaceae*, *Brucella pinnipediae*), (Philipon et Garin-Bastuji ; 2005).

En Algérie la brucellose remonte au 19^{ème} siècle. En effet, les premières descriptions de la maladie ont été faites par Cochez en 1895, qui soupçonna l'existence de cette maladie à Alger, puis en 1899 par Legrain dans la vallée de la Soummam (Benhabyles ; 1992). Au début du 20^{ème} siècle, elle fut reconnue par Brault, d'après les symptômes cliniques, puis démontrée 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 leurs 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 (Sergent ; 1908). En 1940, Mignot affirma que l'existence de cette maladie dans le Hoggar n'aurait pu avoir pour mode d'introduction que les caravanes maliennes (Khettab et al ; 2010)

III. Agent pathogène :

Les bactéries responsables de la brucellose sont des coccobacilles intracellulaires facultatifs, classés dans le genre *Brucella*. Ce genre est un groupe bactérien rassemblant six espèces : *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* et *B. canis*. Une nouvelle espèce *Brucella maris* ou *Brucella delphini*, a été découverte récemment chez les dauphins (Krauss 2003).

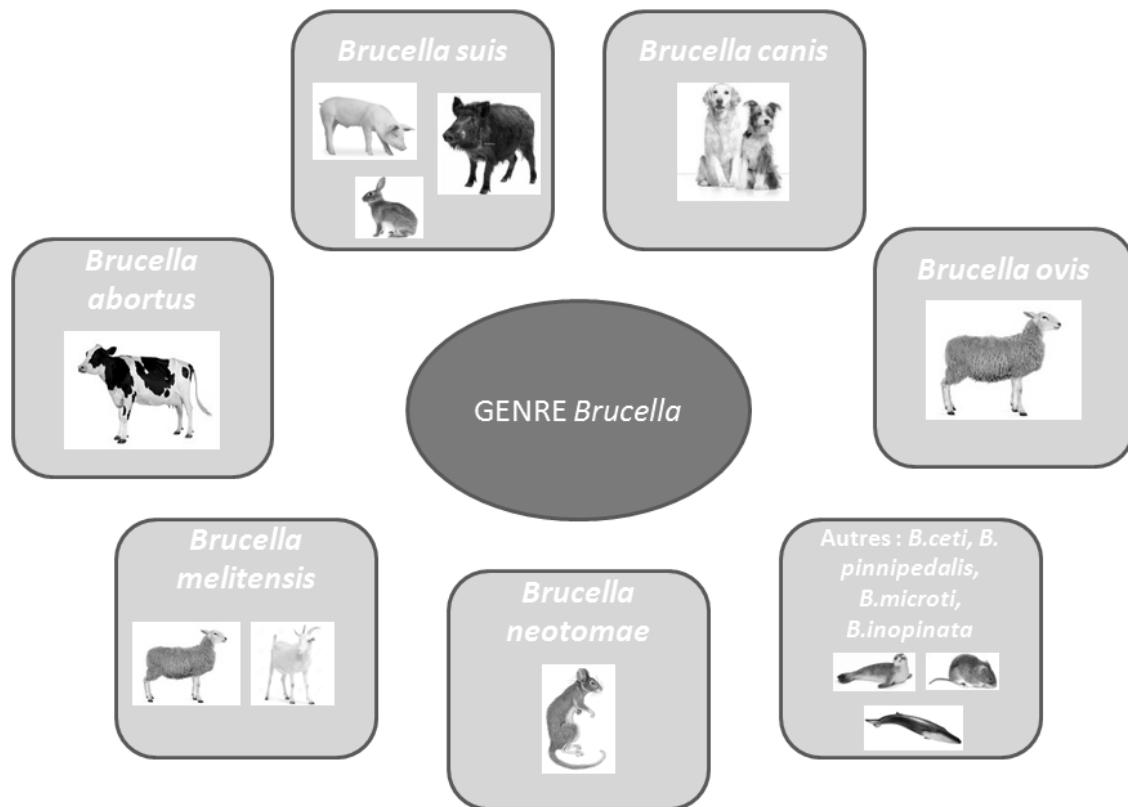


Figure 1 : Principales espèces de *Brucella* et hôtes de prédilection (Freycon ; 2015)

Chaque espèce de *Brucella* infecte préférentiellement un hôte donné, ainsi *B. melitensis* est typiquement l'agent de la brucellose ovine et caprine. Cependant, *B. abortus* et *B. suis* ont été isolés assez fréquemment des petits ruminants et, pareillement, *B. melitensis* a été retrouvé chez d'autres espèces domestiques, notamment les bovins et *B. neotomae* (chez le néotoma du désert) (Corbel et Brinley-Morgan, 1984). Au sein de certaines de ces espèces, différents biovars ont été identifiés : *B. abortus* regroupe ainsi sept biovars (1-6 ; 9), *B. suis* en regroupe cinq (1-5), tandis que trois différents biovars ont été mis en évidence pour *B. melitensis* (1-5). Chaque biovar possède sa propre répartition géographique et sa pathogénicité pour l'homme (tableau 1).

Tableau 1 : présentation des différentes espèces de *brucella*, leurs biovars, leur répartition géographique, leur hôte préférentiel et leur pathogénicité pour l'homme (Maurin ; 2005)

ESPECE	BIOVAR	REPARTITION GEOGRAPHIQUE PRINCIPALE	HOTE PREFERENTIEL	PATHOGENICITE POUR L'HOMME
<i>B. abortus</i>	1 à 6 et 9	Mondiale	Bovins, ongulés sauvages	Modérée
<i>B. melitensis</i>	1 à 3	Bassin méditerranéen, Moyen Orient	Ovins, caprins, ongulés sauvages	Forte
<i>B. suis</i>	1 et 3	Amérique, Asie, Océanie	Suidés	Forte
	2	Europe centrale et occidentale	Suidés et lièvres	Faible
	4	Amérique du nord, Russie	Rennes	Modérée
	5	Russie	Rongeurs sauvages	Forte
<i>B. canis</i>		Mondiale	Chiens	Faible
<i>B. ovis</i>		Bassin méditerranéen	Ovins	Nulle
<i>B. neotomae</i>		Etats-Unis (Utah)	Rats du désert	Non connue
<i>B. ceti</i>			Cétacés (dauphins)	Non connue
<i>B. pinnipediae</i>			Pinnipèdes (phoques, otaries)	Non connue
<i>B. microti</i>		Europe	Rongeurs, Renards	Non connue
<i>B. inopinata</i>		Inconnu	Inconnu (isolée chez l'homme)	Non connue

1. Caractères bactériologiques :

1.1.Morphologiques :

Ce sont de petits coccobacilles à Gram négatif, mesurant 0,6 à 1,5 µm de long et de 0,5 à 0,7 µm de diamètre, non capsulés, non sporulés. A l'état frais, ils sont animés de forts mouvements colloïdaux pouvant conduire à détecter une fausse mobilité. Une caractéristique tinctoriale liée à l'acidorésistance de la paroi peut être révélée par certaines techniques colorimétriques (Stamp, par exemple) permettant un diagnostic bactérioscopique en médecine vétérinaire (Philippon et Garin-Bastuji ; 2005).

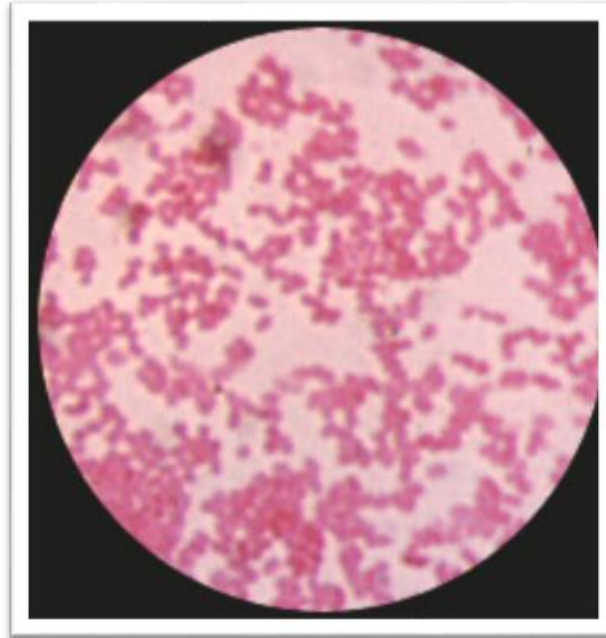


Figure 2 : Morphologie des brucelles (coccobacilles en coloration de GRAM, d'après Philippon et Garin-Bastuji ; 2005)

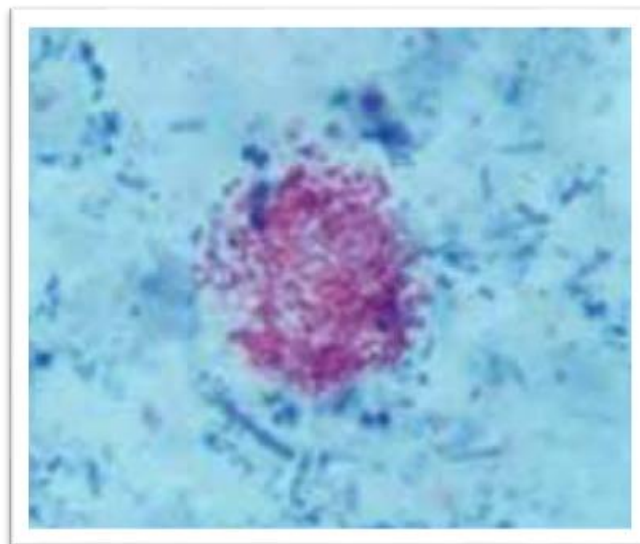


Figure 3 : Placenta d'ovine infecté par des brucelles (Coloration de Stamp), d'après Philippon et Garin-Bastuji ; 2005

1.2.Biochimiques :

Les *Brucella* sont des bactéries nutritionnellement exigeantes de culture lente, principalement aérobies strictes à métabolisme respiratoire strict, et possèdent généralement une oxydase (Maurin ; 2005). Elle est résistante dans le milieu extérieur, elle survit 35 jours sur un pâturage ombragé, et jusqu'à 8 mois dans le lisier. Ces bactéries sont cependant sensibles à la chaleur en milieu liquide, d'où l'efficacité de la pasteurisation ou d'une ébullition de courte durée (Philippon, Garin-Bastuji ; 2005).

2. Caractères antigénique :

Le lipopolysaccharide (LPS), l'antigène le plus immunogène est caractérisé par une variation de phase avec les phénotypes suivants: lisse ou "smooth" (S-LPS) et rugueux ou "rough" (R-LPS). Le S-LPS est retrouvé à l'état sauvage chez la plupart des espèces et biovars. Le LPS de toutes les *Brucella* en phase S possède des antigènes A et M inégalement répartis selon les espèces. L'antigène A domine chez *B. abortus*, l'antigène M chez *B. melitensis* et existe en proportion égale chez *B. suis*. Ceci explique pourquoi les *Brucella* en phase S agglutinent toutes avec un sérum anti-*Brucella* obtenu à partir de *B. melitensis*, *B. abortus* ou *B. suis*. Les *Brucella* en phase R, *B. canis* et *B. ovis* n'ont pas d'antigène A et M mais possèdent l'antigène R. Des sérums anti-R permettent l'agglutination de ces espèces.

Les chaînes latérales polysaccharidiques (antigène « O ») du S-LPS sont constituées d'un homopolymère comprenant environ 100 résidus de 4-formamido-4,6-didéoxy-D-mannopyranosyl, support principal des réactions croisées entre *Brucella* spp; *Yersinia enterocolitica* sérovar O:9, *Francisella tularensis*, ou encore *Vibrio cholerae* O:1. L'immunogénicité des protéines membranaires, périplasmiques ou cytoplasmiques est inférieure à celle du LPS (Philipon, Garin-Bastuji ; 2005).

Des antigènes alternatifs ont été évalués et représentent des candidats sérieux pour le diagnostic de la brucellose ou l'élaboration de vaccins. Parmi ces antigènes, on retrouve les protéines cytoplasmiques p17, p15, et p39 (Letesson et al; 1997), la protéine périplasmique BP26 (Cloeckaert et al; 2001 ; Seco-Mediavilla et al; 2003), les protéines ribosomales L7/L12 (Bachrach et al; 1994) et une protéine cytoplasmique de 18 kDa (Goldbaum et al; 1993). Cependant, aucun de ces antigènes n'égale l'immunogénicité dominante du LPS, cible des tests de diagnostics classiques qui présentent donc toujours de meilleures performances pour le moment.

Les antigènes intracellulaires incluent des variétés de protéines, glycoprotéines et polysaccharides. Ces derniers peuvent inclure le polysaccharide B et l'haptène natif présent dans certaines souches et qui ont été utilisées dans le test de diffusion radial. La fraction de polypeptide de faible poids moléculaire de l'antigène intracellulaire joue un rôle important dans le déclenchement de la réaction d'hypersensibilité retardée dans le test intradermique (Madkour ; 1989).

IV. Épidémiologie :

La brucellose c'est une maladie zoonotique commune à de nombreuses régions du monde, elle est particulièrement fréquente dans les pays méditerranéens, Moyen-Orient, péninsule Arabique, l'Amérique Centrale et du Sud, l'Asie et l'Afrique. Il y a seulement 17 pays dans le monde qui sont officiellement indemnes de la brucellose, mais on découvre quand même des cas chez les voyageurs des pays endémiques. Les zones d'endémie de la maladie affectent les deux sexes et tous les groupes d'âges (Madkour ; 2001).

1. Prévalence :

La répartition géographique varie beaucoup selon les *Brucella*. La brucellose des bovins (*B. abortus*), à faible prévalence, est même considérée comme éradiquée dans nombre de pays européens, en Australie, en Nouvelle-Zélande et dans certaines régions des Etats- Unis. Sa prévalence est par contre variable a élevée en Afrique, en Amérique latine, en Russie et en Asie. *B. melitensis* existe principalement dans le Bassin méditerranéen, au Mexique, en Argentine, au Pérou et dans le Sud des Etats-Unis. *B. suis* biotype 2 a pu être mis en évidence en Suisse, chez les sangliers et sporadiquement chez les lièvres. *B. suis*, biotypes 1 et 3, sont très répandus aux Etats-Unis et en Amérique latine. *Brucella canis* apparaît principalement aux Etats- Unis; des cas isolés ont été observés au Mexique, au Brésil, au Pérou, en Tunisie, en Allemagne, et en Tchéquie. La Suisse est officiellement reconnue indemne de brucelloses bovine, ovine, caprine et porcine (OVF ; 2005).

En Algérie la séroprévalence de la brucellose est bien plus élevée chez les caprins que chez les bovins, (Lounes ; 2007).

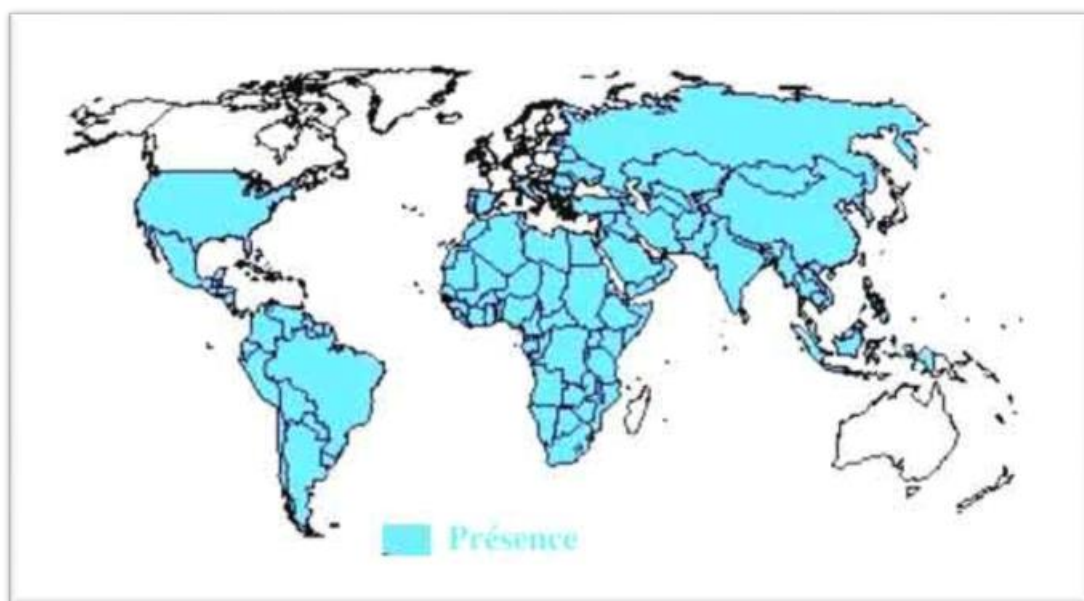


Figure 4 : prévalence de la brucellose des petits ruminants domestiques d’après Philippon, Garin-Bastuji ; 2005.

2. Mode de transmission :

Chez l’homme : les moyens de transmissions de la brucellose comprennent : transmission par l’infection à partir d’un environnement contaminé, exposition professionnelle résultant généralement d’un contact direct avec des animaux infectés et transmission d’origine alimentaire (lait...), (Michael et Corbel ; 2006).

Chez l’animal : La transmission entre animaux peut être directe, de manière horizontale et verticale, ou indirecte à partir de l’environnement.

Lorsqu'il n'y a pas d'avortement, la contamination verticale peut se faire *in utero* ou lors du passage du nouveau-né dans la filière pelvienne. La contamination peut aussi se faire par ingestion du colostrum et du lait contaminé (Diaz Aparicio ; 2013). En général, l'animal jeune se débarrasse de la bactérie. Cependant, chez certains veaux nés de mères infectées, l'infection peut persister mais sans déclencher de réponse sérologique, qui n'apparaîtra alors que chez les femelles lors de leur première gestation (Gagnière et al; 2010).

La transmission horizontale peut être directe par contact entre individus sains et individus infectés excréteurs, lors d'une cohabitation ou de la reproduction. Elle peut être indirecte par l'intermédiaires des bâtiments, des pâtures, du matériel, de l'aliment ou encore de l'eau, contaminés par des matières virulentes (Gagnière et al; 2010).

3. Importance :

Depuis l'isolement de l'agent causal, la brucellose sous toutes ces formes, bovine, ovine, caprine, porcine, canine et humaine a mobilisé dans le monde de nombreuses équipes de recherche pour tenter de réduire son impact socio-économique considérable sur la production animale et le développement rural (Verger ; 1993)

V. Les signes cliniques :

Chez l'homme : la brucellose chez l'homme est principalement une maladie du système réticulo-endothélial. Une légère lymphadénopathie, splénomégalie et hépatomégalie peuvent être détectées. L'apparition des signes se produit en 2 à 3 semaines d'exposition. Les signes cliniques ne sont pas spécifiques et comprennent la fièvre et des frissons alternant avec des sueurs nocturnes, fatigue, douleurs musculaires et articulaires et maux de dos. La dépression et l'insomnie sont fréquentes (Richard ; 2004)

La brucellose pose un risque réel d'avortement lors de la grossesse, *Brucella* peut infecter le tissu chorio-amniotique durant la gestation, et la brucellose peut provoquer un avortement, une naissance prématurée et une infection intra-utérine avec mortalité fœtale (Pappas, et al ; 2005).

Chez l'animal : La brucellose est une maladie sub-aigüe ou chronique qui peut affecter de nombreuses espèces animales (bovins, moutons, chèvres et porcs). La phase initiale après l'infection n'est souvent pas apparente. Chez les adultes, l'infection localisée dans le système reproducteur produit typiquement une placentite suivie par l'avortement généralement au cours du dernier tiers de la gestation ou une naissance prématurée avec rétention placentaire chez la femelle et épididymite et orchite chez le male (Michael ; 2006), une baisse de la production laitière et des stérilités chez la femelle. La période primaire de l'infection se traduit différemment selon le sexe et le stade physiologique. Les symptômes vont traduire la localisation de la multiplication bactérienne, comme les arthrites et les orchites, par exemple *B. melitensis* provoque chez les petits

ruminants des problèmes de reproduction avec des avortements ou la naissance de petits, chétifs (Garin-Bastuji et al; 1998).

Chez les petits ruminants, des mammites apparaissent avec la formation de nodules inflammatoires de la taille d'une noix ainsi que la production de grumeaux dans le lait. Chez la chèvre, l'excrétion mammaire des *Brucella* est souvent irrégulière mais intense (Gagnière et al; 2010).

Chez le mâle, *B. melitensis* peut provoquer des altérations épидидymo-testiculaires parfois palpables de type granulomateux ou nécrotique touchant parfois les vésicules séminales et la prostate, mais le plus souvent l'infection est inapparente (Gagnière et al; 2010 ; Garin-Bastuji ; 2003).

La persistance de la bactérie dans les articulations provoque la formation d'hygromas ou d'arthrites chroniques (Gagnière et al ; 2010).

VI. La pathogénie moléculaire :

Il est possible de distinguer dans l'évolution brucellique deux périodes : Primaire et Secondaire.

- **Période Primaire :** Cette période suit la contamination de l'hôte réceptif, elle peut passer inaperçue (infection inapparente), ou se traduit par des symptômes variés qui caractérisent cliniquement la brucellose aigue. Exp : Avortement. Elle évolue en trois étapes : Etape de multiplication loco-régionale, étape de dissémination et étape de localisation.
- **Période Secondaire :** Cette période est associée à un état de résistance de l'hôte plus ou moins prononcé, lié au développement de l'immunité. Deux possibilités sont observées : La guérison ou la persistance des *Brucella*.

La pathogénie du *Brucella* repose principalement sur sa capacité à survivre et à se multiplier dans les cellules hôtes (Moreno et Moriyon ; 2002). Des modèles cellulaires de l'infection en utilisant des lignées de cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles ont été développés (Liautard et al ; 1996, Pizarro-Cerda et al; 1998). Une fois dans l'un de ces types de cellules, *Brucella* se réplique dans un compartiment lié aux membranes, isolée de la voie endocytaire destructrice classique (Pizarro-Cerda et al; 1998, Celli et al; 2003).

1. Les facteurs de virulence classiques :

1.1. L'enveloppe :

Contact initial entre *Brucella* et la cellule hôte se produit évidemment entre la surface cellulaire bactérienne et la membrane cytoplasmique. Le grand nombre de mutants atténués avec un défaut structurel dans leur lipopolysaccharide (LPS) confirme l'importance de la membrane externe de *Brucella* dans la virulence. Récemment, le LPS O-polysaccharide (O-PS) a été montré être impliqué dans l'inhibition de la phagocytose, la protection contre la destruction des bactéries à

l'intérieur du phagolysosome, et l'inhibition de l'apoptose de la cellule hôte (Fernandez-Prada et al; 2003).

Porte et al; en 2003 suggèrent également que l'O-PS pourrait interagir avec des radeaux lipidiques pendant l'invasion des cellules contribuant à la déviation de phagosomes contenant de *Brucella* de la voie lysosomique (Naroeni et Porte ; 2002). L'O-PS est la première molécule clairement montrée d'être impliquée dans l'entrée de *Brucella* intracellulaire (Moreno, et Moriyon ; 2002).

1.2. Le β -1,2-glucans cycliques :

Les β -1,2-glucans cycliques sont des composés périplasmiques jouent un rôle important dans l'osmorégulation (Bohin, 2000). Chez *Brucella*, des mutants du gène *cgs* codant pour la synthèse de ce composé sont fortement atténués de par leur incapacité à inhiber la fusion phagolysosomiale. Les β -1,2-glucans cycliques sont nécessaires à la déviation du trafic intracellulaire. Ces composés sont sécrétés par *Brucella* et empêchent la maturation des phagosomes en interférant avec les radeaux lipidiques. Les β -1,2-glucans cycliques pourraient donc interférer avec le trafic des phagosomes (Arellano-Reynoso et al; 2005). (Figure 5).

1.3. Système de Sécrétion :

En plus de LPS, le système de sécrétion de type IV (T4SS) de *Brucella* codée par l'opéron *virB* est un facteur de virulence majeur. Le T4SS fournit des macromolécules entre les bactéries et les cellules eucaryotes, traversant les frontières par un mécanisme cellulaire, contact dépendant (Ding ; Atmakuri ; et Christie ; 2003). Le T4SS de *Brucella* est impliqué dans le recrutement des radeaux lipidiques pour l'entrée de *Brucella* en macrophages (Watarai et al; 2002) et est nécessaire pour que le *Brucella* atteigne sa niche appropriée et se réplique dans les cellules hôtes (Delrue ; et al; 2001, O'Callaghan ; et al; 1999, Comerchi et al; 2001). (Figure 5).

1.4. Le système *BvrR/BvrS* :

Le système à deux composants *BvrR/BvrS* est impliqué dans l'internalisation de *Brucella* dans les phagocytes professionnels et non-professionnels (Sola-Landa et al ; 1998). Ce système de régulation est impliqué dans la maintenance de l'homéostasie de la membrane externe de *Brucella* (Lamontagne et al ; 2007 ; Manterola et al; 2005). La synthèse de plusieurs protéines de membrane externe est affectée dans un mutant de ce système de transduction du signal, tout comme la structure du LPS. Un tel mutant est incapable de pénétrer dans les cellules hôtes (Guzman-Verri et al; 2002). (Figure 5).

1.5. L'acquisition de métal :

Les ions métalliques sont connus pour jouer au moins deux fonctions principales dans la virulence bactérienne. Ils signalent les bactéries quant à leur localisation cellulaire et sont nécessaires en tant

que co-facteurs pour une grande variété d'enzymes. Pour ces raisons, les bactéries doivent réguler étroitement les taux intracellulaires d'ions métalliques. Mg^{2+} , Zn^{2+} et Fe^{3+} sont des transporteurs impliqués dans la virulence, suggérant que ces ions sont essentiels pour l'homéostasie de *Brucella*. Le rôle du métabolisme du fer dans la virulence de *Brucella* est encore mal compris (Bellaire et al; 2003). Cependant, la souche vaccinale Rev1 a été montrée par la protéomique pour avoir une expression altérée des protéines associées à l'utilisation du fer (Eschenbrenner, et al; 2002).

1.6. Métabolisme du sucre et transporteur :

Le maltose, le ribose, l'arabinose, le galactose, le glucose, le glycérol, l'érythritol et rhizopine (inositol), sont des voies de dégradation qui semblent essentielles pour la survie intracellulaire de *Brucella*. Les gènes codant pour des systèmes de transport du sucre ont été rompus en huit, en accord avec la niche répliquative qui contient plusieurs sources de carbone. Cinq mutants pourraient être changés dans leur cycle des pentoses phosphates (ppc) (mutants: cbbE, pgi, rbsK, araG, rbsA), parce que *Brucella* manque de phosphofructokinase, une enzyme essentielle à la glycolyse (Essenberg, et al; 2002). La voie de ppc est cruciale pour la dégradation des sucres dans *Brucella*. Cette voie fournit également le ribose pour la synthèse d'acide nucléique, et il a été démontré que la capacité à produire de novo des purines et des pyrimidines est essentielle pour la répllication intracellulaire de *Brucella* (Köhler, et al; 2002, Crawford, et al; 1996).

1.7. ADN/ARN :

Les systèmes de réparation d'ADN sont susceptibles de jouer un rôle important dans la persistance intracellulaire, peut-être en empêchant l'altération de l'ADN qui pourrait être induites par des réactifs intermédiaires de l'oxygène. Les mutants affectant l'ARN hélicase ou les activités de l'ADN gyrase suggèrent que *Brucella* pourrait également utiliser d'autres stratégies pour réguler les gènes de virulence. Par exemple, tldD code pour un modulateur de l'ADN gyrase et la modification de topologie de l'ADN provoquées par l'ADN gyrase sont connus pour affecter la régulation transcriptionnelle des gènes de virulence chez certaines espèces bactériennes (Scarlato ; Arico et Rappuoli ; 1993).

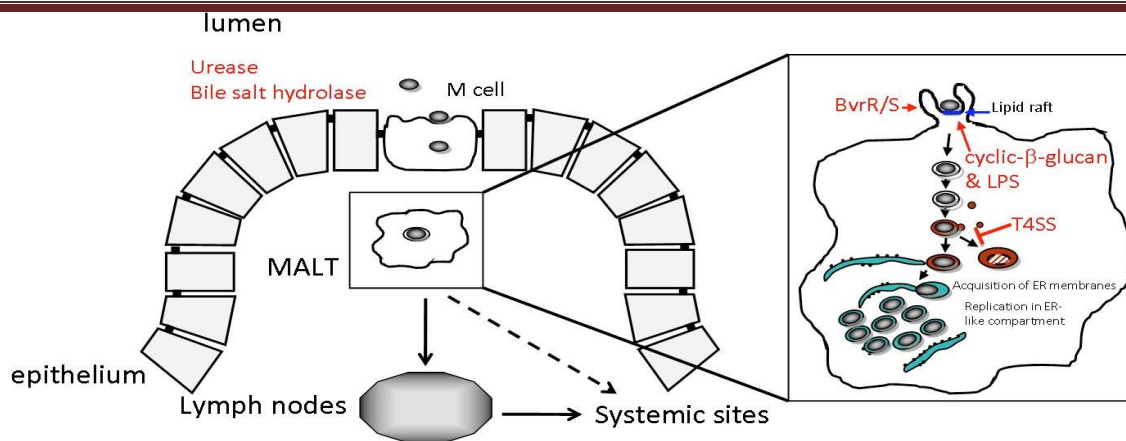


Figure 5: Représentation schématique de l'invasion de *Brucella* dans le tube digestif d'après Mariana, et al; en 2010.

VII. la réponse immunitaire :

1. L'immunité innée :

Dans le cas de la brucellose ainsi que dans d'autres maladies, le système immunitaire inné servira de première ligne de défense de l'hôte, responsable de la prévention de la réplication, de la réduction du nombre initial et de la destruction du microorganisme. En plus de créer des conditions pour la génération d'une réponse immunitaire adaptative efficace. Cette première ligne de défense comprend la phagocytose des agents pathogènes par des cellules telles que les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques (DC), la mort par les cellules tueuses naturelles (NK), la sécrétion de cytokines et de chimiokines, la reconnaissance de molécules typiques d'un microbe PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) par les récepteurs de reconnaissance PRR (pattern-recognition receptors), et l'activation du système du complément (Diacovich, et al; 2010)

1.1 Cellules :

Les macrophages, les DC, ainsi que les cellules NK et les neutrophiles sont les premières cellules à réagir contre l'infection (Golding, et al; 2001). Les cellules NK sont activées par *B. abortus* ou leurs fractions antigéniques (Fernandes, et al ; 1995) et sont considérées comme importantes dans l'activation des cellules LB et, par conséquent, dans la production d'anticorps (Gao, et al; 2011). Les neutrophiles sont les phagocytes de courte durée les plus nombreux et les plus importants dans la réponse immunitaire innée, mais en cas d'infection par *B. abortus*, après la phagocytose, les neutrophiles ne sont pas stimulés pour induire un niveau efficace de dégranulation. Des études ont démontré que les neutrophiles semblent ne pas jouer un rôle significatif dans la clairance de *B. abortus* chez les souris infectées (Barquero-Calvo, et al; 2007). Au contraire, plus tard dans l'infection des souris, pendant la phase chronique (après 15 jours de l'infection), *B. abortus* est tué plus efficacement en présence de neutrophiles. Il a été suggéré que les neutrophiles limitent et

régulent l'activation de la réponse immunitaire adaptative contre l'infection intracellulaire de *B. abortus*, principalement à travers une diminution de l'activation des lymphocytes T (Barquero-Calvo, et al; 2013). De plus, une réponse cohérente avec un profil d'activation, une augmentation de l'expression de CD35, CD11b et IL-8 et une diminution de CD62, ont été observées chez les neutrophiles humains et associées à une pathogenèse de la brucellose, contribuant à une lésion tissulaire localisée et à une inflammation (Zwerdling, et al; 2009). Par conséquent, l'activation des neutrophiles semble ne pas être associée à une immunité protectrice contre *B. abortus*, mais plutôt, elle semble se réduire aux lésions tissulaires et à la régulation à la baisse de la réponse immunitaire adaptative (figure 7).

Contrairement à l'implication secondaire des neutrophiles et des cellules NK, les macrophages jouent un rôle central dans l'infection par *B. abortus*. Dans les premiers stades de l'infection chez la souris, avant le développement d'une réponse immunitaire adaptative par l'hôte, les macrophages permettent la réplication et la survie des *brucella*, où les phases ultérieures sont les principales cellules responsables de l'élimination de *B. abortus* (Barquero-Calvo, et al; 2007). En outre, dans ces premiers stades de l'infection chez la souris, *B. abortus* induire l'expression de faibles niveaux de cytokines pro-inflammatoires et de hauts niveaux de cytokines anti-inflammatoires (Xavier, et al; 2013, Rittig, et al; 2003). Dans les stades ultérieurs, après l'établissement des mécanismes antimicrobiens par l'immunité adaptative, les macrophages activés sont la principale source d'élimination de *B. abortus* chez les souris infectées (Zhan, et al ; 1993). L'activité bactéricide des macrophages de souris activés est principalement due à des réactifs intermédiaires nitrogènes (RNI) et à des réactifs intermédiaires d'oxygène (ROI), qui sont induits par l'interféron gamma (IFN- γ) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), cette activité est augmentée en présence de fer (Baldwin, et al; 1993). (Figure 7).

Les cellules dendritiques forment un lien clé entre les systèmes innés et les systèmes immunitaires adaptatifs. *B. abortus* diminue la maturation de DC en inhibant la voie de signalisation du récepteur de type toll 2 (TLR2) (Salcedo, et al; 2008). La maturation et l'activation des DC avec la sécrétion de cytokine après l'infection par *B. abortus* semblent dépendre de caspase-2 et TLR6, Caspase-2 joue différents rôles au cours des infections de souches rugueuses et lisses, étant critique pour la maturation des DC et la production de cytokines, où comme dans l'infection par les souches lisses, il favorise la dissémination bactérienne par l'induction de la mort cellulaire. Le TLR6 est requis par les DC pour induire le TNF- α et IL-12 (Li, et al; 2012, Almeida, et al; 2013). (Figure 7).

1. 2. Cytokines, chimiokines et PRR / PAMP:

Au cours de l'infection bactérienne, l'activité antimicrobienne des macrophages est modulée par la production séquentielle de cytokines, dont certaines sont sécrétées par les macrophages eux-

mêmes (TNF- α et IL-12), et d'autres produits par des cellules voisines (IFN- γ). Le TNF- α est l'une des premières cytokines libérées suite à l'infection par *B. abortus* des macrophages, et sa production résulte de l'interaction directe entre *Brucella* et les macrophages. Des preuves expérimentales montrent que les macrophages humains activés par TNF- α inhibent la réplication de *Brucella spp* in vitro (Caron, et al; 1994) et que le TNF- α et l'IL-12 sont directement impliqués dans la résistance à la brucellose chez la souris (Zhan, et al; 1996). En outre, la libération de TNF- α est augmentée par la phagocytose des bactéries opsonisées, ce qui indique que le récepteur Fc γ régule l'expression de TNF- α de manière positive (Caron, et al; 1994). Le faible d'induction de TNF- α avec l'absence de toxicité des cellules hôte favorise l'établissement d'une niche de réplication de *Brucella* dans les macrophages.

En effet, la reconnaissance des PAMP par les récepteurs de reconnaissance de formes (PRRs) est l'une des premières lignes de défense de l'hôte. Les récepteurs Toll-like (TLR), le plus tôt et mieux caractérisés PRR (Kawai, et al 2011) ont été impliqués dans la résistance à l'infection à *B. abortus* et l'induction de cytokines pro-inflammatoires (Barquero-Calvo, et al; 2007, Surendran, et al; 2012, Giambartolomei, et al; 2004, Huang, et al; 2005). L'activation de PRR par les PAMP de *B. abortus*, en tant que LPS, lipoprotéines et ADN, conduisent à la production de cytokines proinflammatoires et sont nécessaires pour une clairance efficace des bactéries (Campos, et al; 2004). Intéressant, la signalisation liée à TLR4 interagissant avec Janus kinase 2 (TLR4-JAK2) est également impliquée dans l'internalisation de *B. abortus* par les macrophages (Lee, et al; 2013). Contrairement à TLR2 et TLR4, le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88), une molécule adaptateur de tous les TLR sauf TLR3, est critique pour la clairance efficace de *B. abortus* (Zaitseva, et al; 2001). De même, TLR9 est nécessaire pour le contrôle de l'infection par *B. abortus* et partiellement responsable par l'induction d'IL-12p40 et de TNF- α (Surendran, et al; 2012, Zaitseva, et al; 2001). Au-delà des cytokines, les macrophages infectés, les DC et autres cellules hôtes infectées produisent également des chimiokines, des peptides chemoattractants et des protéines qui induisent la chimiotaxie dirigée dans les cellules réceptives voisines, ce qui déclenche une réponse inflammatoire et joue un rôle important dans la défense de l'hôte. Les monocytes infectés par *B. abortus* sont également capables d'exprimer plusieurs chimiokines CXC (GRO- α , IL-8) et CC (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES), mais *Brucella* rugueux induit des quantités plus élevées que *Brucella* lisse (Rittig, et al; 2003).

2. L'immunité adaptative :

2.1. Réponse à médiation cellulaire :

La réponse immunitaire à médiation cellulaire souhaitable contre des infections intracellulaires, telle que la brucellose, est caractérisée par une prédominance de la réponse des cellules auxiliaire

(Th1) qui comprend l'IFN- γ , produit par les lymphocytes T avec le récepteur TCR (CD4 + ou CD8 +), l'anticorps IgG2 produit par les cellules B et les lymphocytes cytotoxiques TCD8 + (Baldwin, et al; 2006). D'autre part, la réponse de type Th2, caractérisée par la sécrétion de quantités importantes d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10 par des lymphocytes TCD4+, qui stimulent une réponse immunitaire médiatisée par la sécrétion d'anticorps (IgG1 et IgE) et l'éosinophilie, n'est pas efficace pour surmonter les infections intracellulaires (O'Shea, et al; 2010).

2.1.1. Cellules :

Les antigènes de *B. abortus* accèdent aux deux principaux complexes majeur d'histocompatibilité (CMH), I et II, pour la présentation de l'antigène aux lymphocytes TCD8+ et TCD4+, respectivement (Escola, et al; 1994). Les cellules CD4 + exercent la plupart de leurs fonctions auxiliaires en sécrétant des cytokines, qui agissent sur la modulation de la réponse d'autres cellules ou produisent une action autocrine (O'Shea, et al; 2010). L'IFN- γ est la cytokine principale produite par les lymphocytes TCD4 + dans la brucellose et s'est avérée cruciale pour la résistance à l'infection (Zhan et al ; 1993).

Un des mécanismes par lesquels le microorganisme dirige la réponse des souris est en modifiant l'expression de molécules co-stimulatrices sur les lymphocytes T, diminuant la CD28 et augmentant B7.2. Etant donné que B7.2 (CD86) évoque la libération de cytokines Th2, CD28 fournit des signaux potentiellement stimulants et CTLA-4 (CD152) régularise la réponse immunitaire, l'augmentation de B7.2 accompagnée de la diminution de CD28 sur les lymphocytes T favorise l'interaction de B7.2 sur les cellules antigéniques présentant CTLA-4 sur les cellules T, inhibant la réponse Th2 (Agranovich, et al; 1999). (Figure 7).

Initialement, on considère que l'immunité effective contre la brucellose est exclusivement provoquée par les lymphocytes T CD4 + sécrétant l'IFN- γ , mais aujourd'hui, la résistance à l'infection est attribuée à l'action coordonnée de deux grandes sous-populations de lymphocytes T CD4 + et CD8 + (Zhan et al ; 1993). (Figure 7).

Néanmoins, la fonction effectrice la plus importante des lymphocytes T CD8 + spécifiques à l'antigène de *B. abortus* est la destruction des cellules hôtes infectées. Les cellules T cytotoxiques tuent les cellules hôtes infectées par une activité cytolytique médiée par le perforine et le granzyme ou par une interaction de Fas-Fas ligant (Baldwin, et al; 2006). Outre les lymphocytes T CD8 +, les lymphocytes T CD4 + murins ont également démontré un potentiel cytotoxique après infection in vivo par *B. abortus*. Cette population a exprimé des taux élevés de granzyme B, de l'IFN- γ et ont également montré une capacité cytolytique spécifique contre les macrophages murins infectés (Martirosyan, et al; 2013). Les lymphocytes CD8 + sont critiques pour la résistance à la brucellose (Oliveira, et al; 1995), et couplés aux lymphocytes T CD4 +, induisent la mort des cellules

infectées (Wyckoff, et al; 2007). Tous ces résultats indiquent que l'immunité acquise à l'infection par *B. abortus* est due à l'action coopérative des sous-ensembles de lymphocytes T CD4 + et CD8 +, principalement médiée par deux fonctions effectrices : la sécrétion de l'IFN- γ et la cytotoxicité. Autre sous-ensemble de lymphocyte T, Les LT $\gamma\delta$ réagissent rapidement à l'infection par *B. abortus* lors de la co-culture avec des macrophages autologues via l'IFN- γ . Dans les premiers stades de l'infection, murine les LT $\gamma\delta$ régulent à la hausse IL-8, MIP-1 α (CCL3), l'expression d'ARNm de GM-CSF, d'IL-1 β , d'IL-17 et de CD25. Alors qu'à des moments ultérieurs, les mêmes cellules ont une expression accrue de granzyme B, RANTES et l'ARNm de l'IFN- γ (Skyberg, et al; 2011). Par conséquent, il est probable que les LT $\gamma\delta$ jouent un rôle important en tant que cellules effectrices et des médiateurs immunitaires après l'infection par *B. abortus*, mais sa participation à l'immunité acquise est encore inconnue (Elaine, et al; 2015).

2.1.2. Cytokines :

IFN- γ Confère une protection contre la brucellose grâce à l'activation des cellules du système immunitaire inné telles que les macrophages pour devenir plus efficaces dans la destruction et l'inhibition de la présence de pathogènes intracellulaires (Jiang, et al; 1993). Ce mécanisme est particulièrement important si l'on considère que l'établissement de maladies chroniques est lié à la survie des bactéries. L'activité bactéricide des macrophages et la sécrétion d'IFN- γ par des cellules T ont été montrées être chez des souris principalement dépendantes de IL-12, mais pas de TNF- α produit par les macrophages (Brandao, et al; 2012). Ces résultats suggèrent que l'IL-12 contribue à la résistance à la brucellose chez la souris, principalement par l'intermédiaire d'une voie dépendante de l'IFN- γ , tandis que la TNF- α agit éventuellement via une action directe sur les cellules effecteur, ne participant que dans la réponse innée (Zhan, et al; 1998). En d'autres termes, *B. abortus* induit la sécrétion d'IL-12 par les macrophages et dirige donc la réponse immunitaire, par différenciation de cellules naïves Th0 en cellules effectrices et mémoire Th1. En outre, l'IL-2 a également montré être induite dans les cellules infectées et étant liée à la résistance à la brucellose, probablement en raison de son rôle essentiel de promoteur de la prolifération des cellules T et la différenciation en cellules effectrices (Jiang, et al; 1993). (Figure 7).

D'autre part, IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, est sécrétée en réponse à *B. abortus* et est responsable de la régulation à la baisse de la fonction effectrice des macrophages et de la production de l'IFN- γ (Xavier, et al; 2013, Oliveira, et al; 1995). L'IL-10 produite par les macrophages et principalement par les lymphocytes T CD4 + dans les premiers stades de l'infection par *B. abortus* semble favoriser la réplication intracellulaire des bactéries, augmentant l'infection persistante due à la régulation vers le bas des cytokines pro-inflammatoires (Xavier, et

al; 2013). Cet équilibre complexe entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires doit être compris en tenant compte de l'interaction complexe entre l'hôte et le pathogène.

2.2. Réponse à médiation humorale :

En ce qui concerne la brucellose, la contribution exacte de l'immunité humorale dans la résistance n'est pas bien établie. La chaîne latérale du LPS-O (OPS) semble être l'antigène immunodominant des souches lisses de *B.abortus*, car une plus grande proportion de la réponse anticorps dans les infections humaines et animales, ainsi qu'après des immunisations avec des vaccins lisses, est dirigée contre l'antigène OPS (Diaz, et al; 1968). Les molécules usuelles comme le LPS activent les lymphocytes B de manière indépendante de LT. Cependant, le LPS de *B. abortus* est capable de se lier aux molécules du CMH de classe II dans les lymphocytes B, ce qui suggère qu'ils sont éventuellement présentés aux lymphocytes T (Forestier, et al; 1999). Il est donc tentant de spéculer que la forte réponse humorale à l'OPS, qui cause les principaux problèmes liés au diagnostic sérologique de la brucellose bovine, peut être liée à la participation de cellules T helper en réponse aux cellules LB contre cet antigène. Cependant, il est important de prendre en compte que le rôle crucial dans le dépassement de l'infection par *B. abortus* joue par l'immunité cellulaire. L'immunité humorale joue probablement un rôle secondaire, comme cela est observé dans d'autres infections intracellulaires. En outre, étant donné que les souches brutes ont montré une plus forte induction de la réponse immunitaire et une production de cytokine pro-inflammatoire que les souches lisses (Li, et al; 2012, Surendran, et al; 2012). Le transfert passif d'anticorps monoclonaux anti-OPS dans des souris entraîne une réduction significative du nombre de bactéries viables récupérées à partir de la rate et du foie, suite à la provocation avec un virus de *B. abortus* virulent de type sauvage (Cloeckaert, et al; 1991). De même, les anticorps dirigés contre l'épitope lipopolysaccharide-A (LPS-A), les protéines membranaires externes (OMPs) et les antigènes de surface polysaccharidiques ont également réduit les comptes spléniques bactériens post-provocation (Cloeckaert, et al; 1991). Toutes ces données confirment que les anticorps OPS peuvent jouer un rôle dans la défense de l'hôte.

D'autre part, les composantes d'immunité humorale peuvent également contribuer à l'établissement d'une infection chronique. Une étude récente a démontré que les IgM et les *B. abortus* opsonisés par le complément infectaient les cellules B murines et établissaient une niche intracellulaire (Goenka, et al; 2012). Après l'entrée dans des conditions d'opsonisation, les bactéries induisent l'activation des cellules B et ne peuvent donc pas se répliquer, mais favorisent une niche pour une infection chronique.

Les données indiquent une possible participation de l'immunité humorale adaptative à la résistance à l'infection au moins chez la souris, en particulier contre les souches lisses. Cependant, la réponse

anticorps déclenchée par *B. abortus* semble être secondaire dans la résolution de l'infection et peut même contribuer à l'établissement d'une infection chronique. L'hypothèse du dessin sur l'implication de l'immunité humorale chez d'autres hôtes de *B. abortus*, comme les humains et les bovins, est très difficile. Ce genre de spéculation mérite un soutien expérimental (Elaine, et al; 2015).

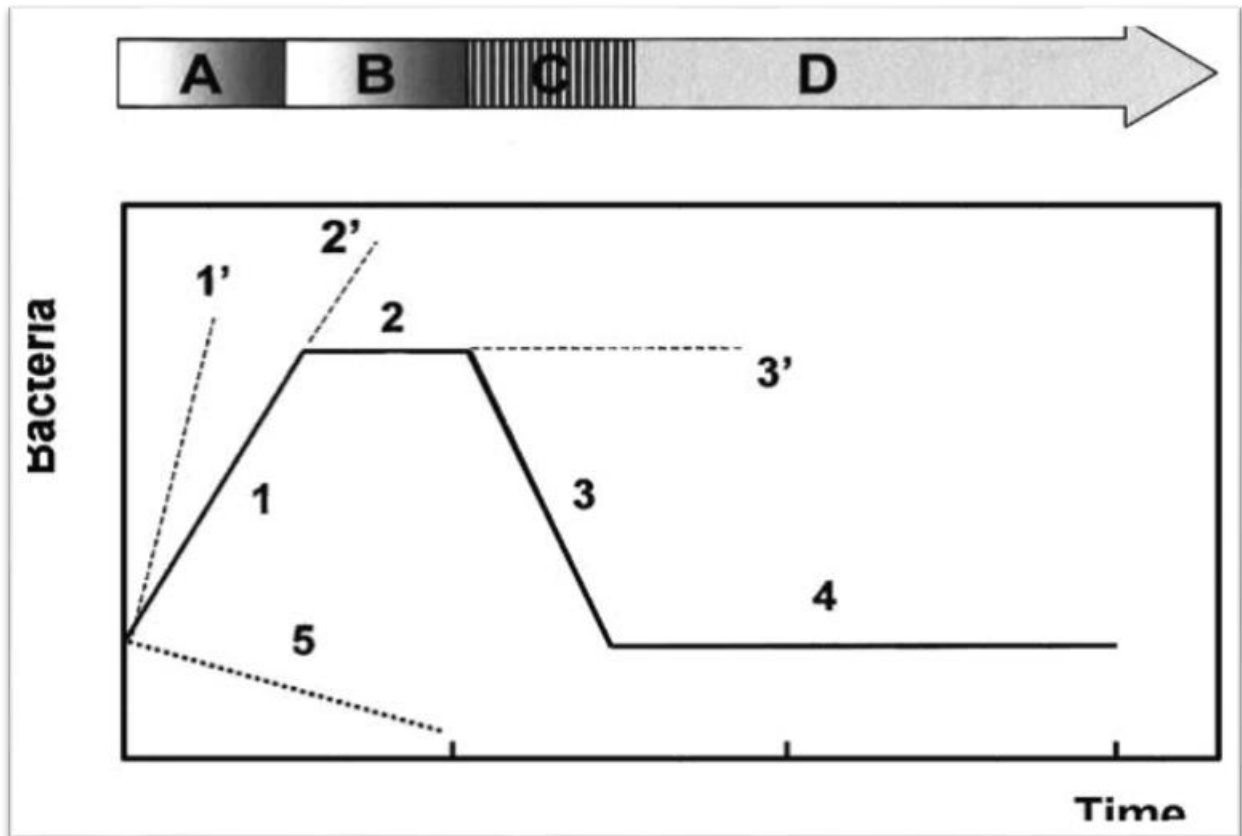


Figure 6 : Représentation schématique de la multiplication des bactéries pathogènes, en liaison avec le développement temporel de la réponse immunitaire d'après Jacques Dornand et al; en 2002 : Après l'infection, les bactéries non pathogènes sont éliminées (5) par la réponse innée immédiate (A). Pendant ce temps, les bactéries pathogènes résistent à la réponse innée immédiate (A) et se multiplient (1). Sans une réponse immunitaire innée suffisante, les bactéries se multiplieront plus rapidement (1'). La réponse immunitaire innée secondaire (B) ralentit la multiplication (2). Sans réponse immunitaire secondaire innée efficace, l'hôte meurt (2'). Lorsque la réponse immunitaire spécifique (C) est initiée, le nombre de bactéries diminue (3), alors que sans cette réponse (D), les bactéries infectent l'hôte à un niveau très élevé (3'). Avec une réponse immunitaire spécifique inefficace, les bactéries restent à un niveau bas (4).

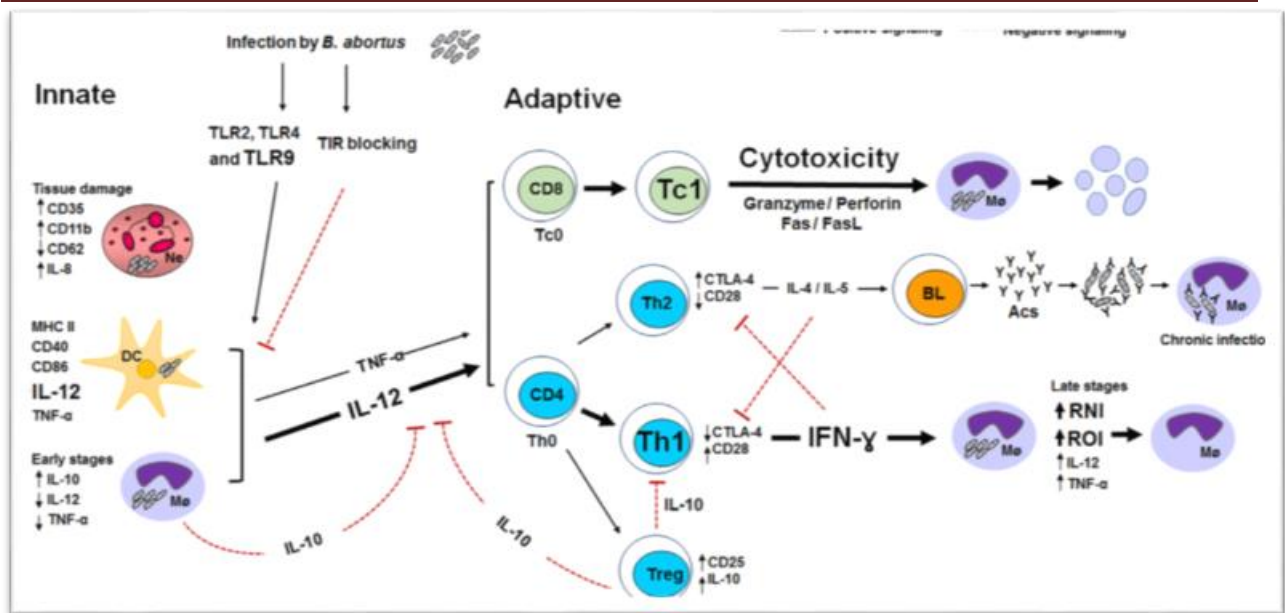


Figure 7 : Les mécanismes clés dans différentes cellules du système immunitaire inné et adaptatif après infection par *B. abortus* d'après Elaine, et al; 2015.

3. Mécanismes d'échappements :

Pendant l'infection, il est crucial pour l'hôte d'être capable de détecter rapidement les agents pathogènes envahissants, pour induire la réponse immunitaire initiale nécessaire au contrôle de la maladie. Par conséquent, l'hôte a développé des mécanismes pour reconnaître la présence de bactéries dans les tissus grâce à un système de surveillance immunitaire innée, qui est capable de distinguer les PAMPs à travers les récepteurs de reconnaissance des pathogènes. Ces récepteurs peuvent être trouvés dans les membranes cellulaires (TLR) ou dans le cytosol (récepteurs NOD-like, NLRs) et ont la capacité de détecter des produits considérés comme uniques aux bactéries comme le LPS, les acides lipoteichoïques, les lipoprotéines et la flagelline (Hoebe, et al; 2004). Conduisant à l'activation de la réponse pro-inflammatoire initiale. En tant que un agent pathogène chronique, *Brucella* a développé des mécanismes passifs et actifs pour échapper à la détection par les TLRs et les NLRs afin de persister et de provoquer une infection de longue durée.

Plusieurs caractéristiques de son LPS limitent la détection immunitaire innée de *Brucella spp*, la modification du lipide A de son LPS permet à *Brucella spp* d'éviter la détection par TLR4. Alors que la plupart des pathogènes bactériens, tels que les Enterobacteriaceae, possèdent une fraction lipidique A contenant des résidus d'acides gras courts (C12-C16), le lipide A de *Brucella* contient une plus longue fraction (C28), ce qui se traduit par une réduction considérable de l'agoniste TLR4 et des propriétés endotoxiques (Lapaque, et al; 2006). Une caractéristique supplémentaire du LPS de *B. abortus* qui limite la reconnaissance par TLR4 est le profil de glycosylation de son constituant oligosaccharidique de noyau, qui empêche la liaison au co-récepteur TLR4 MD-2. Le

fragment antigène O du LPS est une cible pour le dépôt du complément dans de nombreux pathogènes (Joiner, et al; 1989). Cependant, une autre caractéristique anti-inflammatoire du LPS de *Brucella* est sa résistance au dépôt du composant de complément C3 (Barquero-Calvo, et al; 2007, Hoffmann, et al; 1983), qui empêche la génération des anaphylatoxines C3a et C5a qui se synergisent avec les TLR dans l'induction de cytokines pro-inflammatoires (Wilson, et al; 2001, Zhang, et al; 2007).

L'induction de cytokines pro-inflammatoires. Fait intéressant, la flagelline de *Brucella* est capable d'éviter la détection de TLR5, car elle manque d'un domaine qui est essentiel pour sa reconnaissance par ce récepteur (Andersen-Nissen, et al; 2005).

En plus de TLR4, TLR2 et TLR9 ont également été impliqués dans la détection l'infection de *Brucella* (Sveti'c, et al; 1993, Copin, et al; 2007). Par conséquent, comme une autre stratégie pour éviter la reconnaissance immunitaire, le génome de *Brucella* code pour une protéine qui contient un récepteur Toll-interleukin-1 (TIR), nommé Btp1 / BtpA dans *B. abortus* et TcpB dans *B. melitensis* (Salcedo, et al; 2008, Cirl, et al; 2008). BtpA / TcpB agit en dégradant MyD88, ce qui est requis pour TLR2 et TLR4 mais pas de signalisation de TLR9 (Salcedo, et al; 2008, Sengupta, et al; 2010). En conséquence, BtpA / TcpB est capable d'inhiber la maturation des cellules dendritiques et la production de cytokines pro-inflammatoires, ce qui contribue à la persistance à long terme de *Brucella*. Récemment, une deuxième protéine effectrice contenant TIR de *Brucella* a été décrite, appelée BtpB (Salcedo, et al; 2013). On pense également que BtpB, qui semble avoir une activité antagoniste plus forte pour la signalisation de TLR que BtpA, interfère avec la transduction de signal dépendante de Myd88, bien que son rôle dans la modulation des réponses inflammatoires induites par *Brucella* et la persistance bactérienne ne soit pas encore clair (Mariana, et al; 2015).

VII. Diagnostic :

Le diagnostic est un ensemble de moyens permettant de confirmer l'origine d'une infection.

Ces moyens sont variés et se traduisent soit par un diagnostic direct, soit par un diagnostic indirect.

Le diagnostic direct met en évidence la bactérie ou ses constituants, basé sur la culture et l'isolement, parfois sur milieu sélectif, permettant l'identification du pathogène. La durée d'incubation, la culture en aérobie ou en anaérobie, l'aspect des colonies, la présence d'hémolyse et l'antibiogramme sont ainsi pris en compte pour cette identification. Les méthodes de biologie moléculaire font partie des techniques de diagnostic direct. L'amplification génique ou le séquençage de gène sont de plus en plus utilisés dans les laboratoires. Des technologies plus récentes comme les puces à ADN, permettant de caractériser simultanément différentes bactéries dans un même échantillon présentent également un grand intérêt.

Le diagnostic indirect évalue la réponse de l'organisme à l'infection par la mise en évidence des anticorps spécifiques. Les anticorps sont recherchés, le plus souvent, dans le sang circulant après prise de sang. La spécificité des tests sérologiques est relative du fait de l'existence de réactions croisées avec d'autres bactéries ; la sensibilité varie selon le type de technique utilisée. Le sérodiagnostic est souvent un diagnostic de suspicion (Bounaadja ; 2010).

1. Diagnostic direct :

1.1. Bactériologique :

La recherche de *Brucella* n'est pas courante dans la pratique quotidienne, d'une part, cette bactérie pousse plus lentement que nombre de bactéries responsables d'infections urinaires, respiratoires ou septicémiques. D'autre part, les *Brucella* font partie des classes biologiques 3, donc potentiellement dangereuses (Philippon, Garin-Bastuji ; 2005).

Pour le diagnostic définitif de la brucellose, le choix des échantillons dépend des signes cliniques observés. Dans le cas de la brucellose cliniques, des échantillons valides comprennent fœtus avortés (estomac, la rate, et du poumon), les membranes fœtales, les sécrétions vaginales, le colostrum, le lait, le sperme, et le liquide recueillie d'arthrite ou hygroma. A l'abattage, afin de confirmer les cas suspects de brucellose aiguë ou chronique, les tissus préférés sont les nœuds lymphatiques génitaux et oropharyngés, la rate et la glande mammaire et des ganglions lymphatiques associés (Alton ; 1988), mais la recherche de *Brucella* se fait essentiellement à partir du sang du patient (hémoculture), (Bounaadja ; 2010). Pour l'isolement de *Brucella spp*, le moyen le plus couramment utilisé est le milieu Farrell, qui contient des antibiotiques capables d'inhiber la croissance d'autres bactéries présentes dans des échantillons cliniques. Les milieux commerciaux actuels conviennent comme ceux d'hémoculture contenant, par ailleurs, du CO₂ nécessaire pour l'isolement de certains biovars de *B. abortus* (type sauvage 1-4), tandis que d'autres, comme *B. abortus* (biovars de type sauvage 5, 6, 9), *B. abortus* S19 souche vaccinale, *B. melitensis* et *B. suis*, n'en ont pas besoin de CO₂ (Alton ; 1988).

D'autres milieux peuvent être ensemencés telle une gélose Columbia au sang frais ou enrichie en sérum. Il convient d'incuber à 37°C et sous CO₂, au moins 15 jours (Philippon, Garin-Bastuji ; 2005). Pour les échantillons liquides (lait ou sang), la sensibilité est accrue par l'utilisation d'un milieu à deux phases, comme le milieu Castaneda (bactériologiste mexicain), décrit à l'origine pour être utilisé avec des cultures de sang humain. La croissance peut apparaître au bout de 2-3 jours, mais les cultures sont généralement considérées comme négatives après 2-3 semaines d'incubation (Alton ; 1988). L'identification de *Brucella spp* est basée sur la morphologie, la coloration et le profil métabolique (catalase, oxydase et l'uréase) (Alton ; 1988, Corbel ; 2005)

Les colonies sont translucides, rondes à bords réguliers, Ces bactéries sont aérobies strictes, catalase +, oxydase +, NO₃ + et uréase + (Philipon et Garin-Bastuji ; 2005).

1.2. Moléculaire :

Le diagnostic moléculaire le plus utilisé est la PCR. Depuis quelques années, l'utilisation de la technique de PCR en temps réel dans le diagnostic de la brucellose se multiplie (Newby et al; 2003 ; Al Dahouk et al; 2004 ; Probert et al; 2004).

En 1990, Fekete et collaborateurs mettent au point le premier diagnostic direct par PCR pour la détection du genre *Brucella*, basé sur le gène *omp43* de *B. abortus* S19 (Fekete et al; 1990). Les auteurs démontrent que le test est spécifique de toutes les espèces et biovars de *Brucella* testés, et sensible en détectant moins de cent bactéries ; par conséquent, les chercheurs se sont intéressés au gène de l'ARNr 16S.

Depuis, de nombreux auteurs ont continué à utiliser le gène *bcsp31* comme cible pour la détection de *Brucella*, (Matar et al; 1996, Queipo-Ortuño et al; 1997; Debeaumont et al; 2005).

En 2004, une PCR en temps réel basée sur un autre gène conservé, le gène *per* codant la pérosamine synthétase impliquée dans la biosynthèse du LPS (Cloeckaert et al; 2000). Le test se révèle spécifique sur le panel de 174 bactéries non *Brucella* testées (Bogdanovich et al; 2004). Parmi les bactéries testées, se trouvaient des bactéries possédant le gène *per* telles que *E. hermanni*, *E. coli* O:157, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio. cholerae* O:1, et *Yersinia enterocolitica* O:9.

La PCR en temps réel, qui a l'avantage de présenter une meilleure spécificité qu'une PCR conventionnelle grâce à l'utilisation d'une sonde, est maintenant très utilisée pour la détection du genre *Brucella* (Bogdanovich et al; 2004). La plupart des analyses par PCR sont encore basées sur le gène *bcsp31* malgré son manque de spécificité, considérant que les infections à *O. anthropi* sont rares et facilement distinguables de la brucellose (Bricker, 2002 ; Debeaumont et al; 2005; Queipo-Ortuño et al; 2005; Probert et al; 2004).

Lors du diagnostic de la brucellose animale, le choix des tissus pour l'utilisation de la PCR est plus varié. Ainsi, des PCR ont été décrites à partir de différents échantillons : de sang, de lait (Romero et al; 1995) de sécrétion nasale, de rate, de sperme, de ganglions lymphatiques (O'Leary et al; 2006) et de fœtus avorté. La difficulté majeure provient de la présence possible d'inhibiteurs de PCR et/ou d'une quantité trop importante d'ADN pouvant interférer sur la PCR selon l'origine des échantillons (Bounaadja ; 2010).

2. Diagnostic indirect :

2.1. Immunologique :

Des anticorps anti-*Brucella* peuvent être trouvés dans les sérums, les exsudats utérins et vaginaux, le lait ou le plasma de sperme d'animaux infectés ou exposés. Il existe une gamme considérable

d'anticorps connus contre *Brucella*: en particulier IgM, IgG1, IgG2 et IgA. Ceux-ci ne sont pas produits dans toutes les infections à *Brucella*, et certaines infections latentes ne sont associées à aucun titre d'anticorps.

En outre, les titres observés des anticorps présents semblent varier significativement avec les espèces et les biovars, et entre les individus infectés. C'est un défi pour l'analyse sérologique des animaux exposés à *Brucella* que de distinguer les animaux infectés et non infectés et, par conséquent, un grand nombre de méthodes ont été développées pour quantifier tous les isotypes pertinents. Il ya des avantages et des limites à chacun d'eux dans l'utilisation pratique (Gibbs, et Bercovich ; 2011). Les anticorps détectés sont alors pour la plupart, spécifiques d'épitopes portés par le LPS-S, et en partie par le LPS-R et certaines protéines membranaires (Bounaadja ; 2010).

2.1.1. Test sérologique :

Les résultats sérologiques faussement positifs causés par *Yersinia enterocolitica* O: 9 peuvent affecter jusqu'à 15% des troupeaux bovins dans les régions exemptes de brucellose, ce qui entraîne des coûts supplémentaires considérables pour les programmes de surveillance (Muñoz et al; 2005). Des résultats faussement négatifs ont également été observés dans le diagnostic sérologique de la brucellose. Ils surviennent principalement en raison du fait que la réponse des anticorps dépend du stade de l'infection lors de la collecte des échantillons (Carpenter ; 1975).

2.1.1.1. Test d'agglutination lente ou agglutination lente de Wright (SAT ou SAW) :

Le principe de ce test est de détecter les anticorps agglutinine principalement de l'isotype IgM dirigé contre *Brucella spp.* A une concentration optimale d'antigène et d'anticorps, de grands complexes antigène-anticorps se forment et se précipitent au fond du tube. Cette réaction est lente car, contrairement aux tests d'agglutination rapide, elle nécessite une incubation d'une nuit à 37 ° C. Le manque relatif de spécificité et de sensibilité de ce test a souvent été présenté comme un inconvénient majeur. Néanmoins, il s'agit d'un test standardisé et extrêmement robuste qui a montré de bons résultats et s'est avéré efficace dans plusieurs pays officiellement déclarés indemnes de la brucellose (Merzaal, et al; 2002). La spécificité de ce test est augmentée en traitant le sérum avec un agent chélatant tel que l'EDTA, ce qui réduit les réactions croisées dues à l'IgM (Alton ; 1988). Bien que ce test ne soit plus recommandé par l'OIE pour le diagnostic de la brucellose bovine (Office International des Epizooties; 2009.), il est encore largement utilisé dans le diagnostic de la brucellose humaine (Alton ; 1988).

2.1.1.2 Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) = Test Rose Bengale

Tests d'antigènes de *Brucella* tamponnés. Les tests de Rose Bengal (RB) et d'agglutination sur plaque tampon (BA) sont les tests bien connus de l'antigène *Brucella* tamponné. Ces tests sont des

tests d'agglutination rapides de 4 minutes réalisés sur une plaque de verre à l'aide d'un antigène tampon acide (pH $3,65 \pm 0,05$). Ces tests ont été introduits dans de nombreux pays comme le test de dépistage standard car il est très simple et pensé pour être plus sensible que le SAT. L'OIE considère ces tests comme des "tests prescrits pour le commerce" (Office International des Epizooties; 2009).

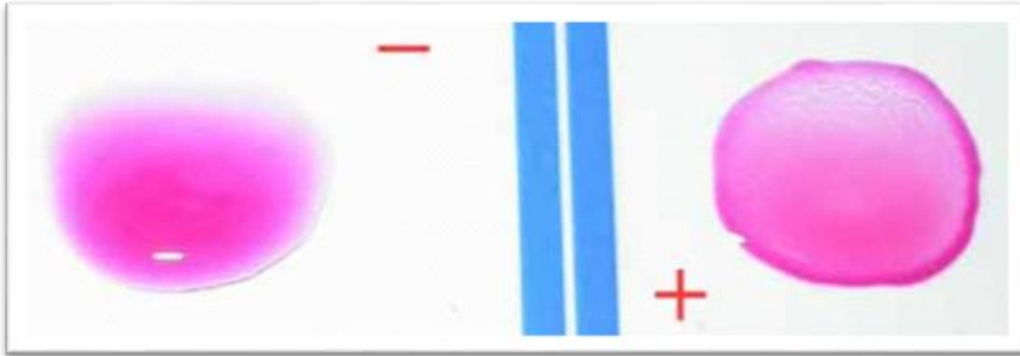


Figure 8: Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) ou Test Rose Bengale d'après Philipon, Garin-Bastuji ; 2005.

2.1.1.3. Test de fixation du complément :

Le Test de Fixation du Complément (FC) permet la détection d'anticorps anti-*Brucella* capables d'activer le complément. Les immunoglobulines bovines (Ig) qui peuvent activer le complément bovin sont l'IgG et l'IgM. Selon certaines études, ce test n'est pas très sensible mais présente une excellente spécificité (merzaal, et al; 2002, Given, et al; 2003). Étant donné que le test est difficile à normaliser, il est progressivement remplacé par ELISA (Office International des Epizooties; 2009). Ce test est un "test prescrit pour le commerce" par l'OIE (Office International des Epizooties; 2009).

2.1.1.4. Test ELISA :

Les tests ELISA sont divisés en deux catégories, ELISA indirecte (iELISA) et ELISA compétitif (cELISA). La plupart des iELISA utilisent du LPS lisse purifié comme antigène, mais il existe une grande variation dans le conjugué Ig anti-bovine utilisé (Saegerman, et al; 2004). La plupart des iELISA détectent principalement des IgG ou des sous-classes d'IgG. Leur qualité principale est leur haute sensibilité, mais ils sont également plus vulnérables aux réactions non spécifiques, notamment celles liées à l'infection par *Yersinia enterocolitica* sérovar O9. Ces réactions croisées observées dans iELISA ont motivé le développement de cELISA. La chaîne O du LPS lisse de *Brucella* contient des épitopes spécifiques qui ne sont pas partagés avec le LPS de YO9. Par conséquent, en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes spécifiques du LPS *Brucella*, le développement de cELISA plus spécifiques a été possible. Ces tests sont plus

spécifiques, mais moins sensibles que les iELISA (Nielsen, et al; 1995, weynants, et al; 1996). L'OIE considère ces tests comme des "tests prescrits pour le commerce" (Office International des Epizooties; 2009).

2.1.1.5. Test de polarisation de fluorescence.

Le dosage de polarisation de fluorescence (FPA) est basé sur un principe physique: la rapidité avec laquelle une molécule tourne dans un milieu liquide est en corrélation avec sa masse. Les molécules de petite taille tournent plus vite et dépolarisent plus un faisceau lumineux polarisé, tandis que les molécules plus grandes tournent plus lentement et, par conséquent, dépolarisent moins la lumière. FPA mesure le degré de dépolarisation dans les unités de milli-polarisation (mP). Au cours de ce test, les échantillons de sérum sont incubés avec un antigène spécifique de *Brucella* marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine. En présence d'anticorps contre *Brucella spp*, de grands complexes fluorescents sont formés.

Dans les échantillons négatifs, l'antigène reste non complexé. Ces petites molécules tournent plus rapidement et provoquent donc une dépolarisation plus importante de la lumière que les échantillons positifs pour *Brucella spp*. (Jacques Godfroid et al; 2010)

Ce test peut être facilement automatisé et est très rapide, car après le mélange de l'antigène marqué et du sérum la lecture est presque instantanée. La sensibilité au test semble légèrement inférieure à celle des iELISA (mcGiven, et al; 2003). La spécificité varie entre 98,8 et 99,0% (Greiner, et al; 2009). Ce test est déjà utilisé dans les programmes de contrôle et de certification de la brucellose en Amérique du Nord et en Europe. L'OIE considère ce test comme un "test prescrit pour le commerce" (Office International des Epizooties; 2009).

2.1.1.6. Le test anti-globuline humaine (AHG) ou le test de Coombs :

Le test AHG a été développé pour surmonter l'effet prozone qui affecte SAT et d'autres tests d'agglutination. Il donne des résultats positifs lorsque SAT est négative. C'est parce qu'il mesure IgG. Pour cette raison, il est considéré comme un meilleur test de brucellose à long terme ou chronique. Cependant, il ne donne pas de résultats précis dans tous les cas de la brucellose chronique à plus long terme (Barrett & Rickard ; 1953).

2.1.1.6. Test de 2-mercaptoéthanol (2-MET):

2-MET est un test de confirmation, et il s'agit d'une légère modification du SAT, ce qui facilite le diagnostic d'infections passées ou chroniques. Puisqu'il élimine les anticorps IgM non persistants sensibles au phénol physiologique qui autrement interféreraient dans le processus d'agglutination. Ce test est effectué de la même manière que (SAT), sauf que le diluant salin contient 0,05 M -2-mercaptoéthanol, c'est-à-dire (14 ul pour 1000 ml de solution saline phénolique) et utilisé pour

détecter une infection humaine. Par conséquent, l'agglutination dans ce test est indicative de la présence continue d'IgG et de la probabilité de poursuite de l'infection. La persistance des titres d'anticorps agglutinants IgM chez les patients hospitalisés sans infection active confère une évaluation sérologique (Diaz et al; 1976).

2.1.1.7. Immunochromatographie en flux latéral :

Ce test a été développé pour la brucellose humaine et ensuite adapté à la brucellose animale (Abdoel, et al; 2008). Il utilise un dispositif chromatographique composé d'un tampon d'échantillon, d'un tampon conjugué et d'une bande de détection de nitrocellulose poreuse, le tout dans un boîtier en plastique. De petites quantités de sérum (ou de sang) et de tampon de développement sont placées sur le tampon de l'échantillon, qui délivre le mélange au tampon conjugué. Ce dernier contient un conjugué IgG anti-ruminant d'or colloïdal dans une matrice sèche qui, lorsqu'il est dissous, permet au conjugué de réagir avec l'IgG dans l'échantillon. Le liquide s'écoule dans la bande de détection où une ligne transversale de S-LPS adsorbé capture les complexes contenant de l'IgG anti-S-LPS produisant une ligne de couleur rouge d'or colloïdal. Les complexes dépourvus d'IgG spécifiques migrent encore pour être capturés dans une seconde ligne par des anticorps anti-IgG. Il en résulte une seconde ligne rouge indiquant que l'analyse a fonctionné correctement (Abdoel et al; 2008). Cette technique est très simple et a l'avantage d'être utilisée comme un test de pensée à la fois avec le sérum et le sang. Cependant, la préparation du kit nécessite un équipement sophistiqué et les méthodes de normalisation n'ont pas été rendues publiques.

2.1.2. Les tests de lait :

Ces tests sont prescrits par l'OIE comme des tests à utiliser dans les programmes de contrôle et d'éradication, mais non à des fins commerciales (Office International des Epizooties; 2009).

2.1.2.1. Test de l'anneau de lait.

Le test consiste à mélanger l'antigène de cellule entière *Brucella* coloré avec du lait. En présence d'anticorps anti-*Brucella*, des complexes antigène-anticorps se forment et migrent vers la couche de crème, formant un anneau pourpre sur la surface. En l'absence de complexes antigène-anticorps, la crème reste incolore. Ce test n'est pas considéré comme sensible mais ce manque de sensibilité est compensé par le fait que le test peut être répété, généralement mensuel, en raison de son coût très faible. Ce test est prescrit par l'OIE pour être utilisé uniquement avec du lait de vache (Office International des Epizooties; 2009).

2.1.2.2. ELISA et le test de polarisation de fluorescence.

Ces deux tests, discutés ci-dessus dans le contexte d'échantillons de sérum, peuvent également être appliqués à des échantillons de lait pour détecter des animaux infectés. Ces tests sont moins sensibles lorsqu'on les applique au lait qu'à des échantillons de sérum. En effet, avant leur utilisation sur le lait en citerne, qui peut provenir de centaines de vaches, leur sensibilité doit d'abord être vérifiée sur des pools d'échantillons (Nielsen, et Gall ; 2001, Ielsen ; 2002). Cette sensibilité inférieure dans le cas du lait de cuve peut souvent être compensée en augmentant la fréquence d'essai. Ces tests sont prescrits par l'OIE pour l'analyse du lait des bovins et des petits ruminants (Office International des Epizooties; 2009).

3. Test cellulaire = Test cutané :

Le test cutané est un test allergique qui détecte la réponse immunitaire cellulaire spécifique induite par l'infection à *Brucella spp.* L'injection de brucellergène, extrait protéique d'une souche rugueuse de *Brucella spp.*, est suivie d'une réponse inflammatoire locale chez un animal sensibilisé. Cette réaction d'hypersensibilité retardée est mesurée par l'augmentation de l'épaisseur de la peau au site d'inoculation. Ce test est très efficace pour distinguer les cas de brucellose vraie et les réactions sérologiques faussement positives. Le test cutané est très spécifique, mais sa faible sensibilité en fait un bon test pour les troupeaux, mais pas pour la certification individuelle. Il ne peut pas discriminer entre l'infection et la vaccination (Saegerman, et al; 1999). Ce test est prescrit comme test alternatif par l'OIE (Office International des Epizooties; 2009).



Figure 9 : Exemples de détection positive chez le bovin (encolure) par le test cutané d'après Philipon, Garin-Bastuji ; 2005.

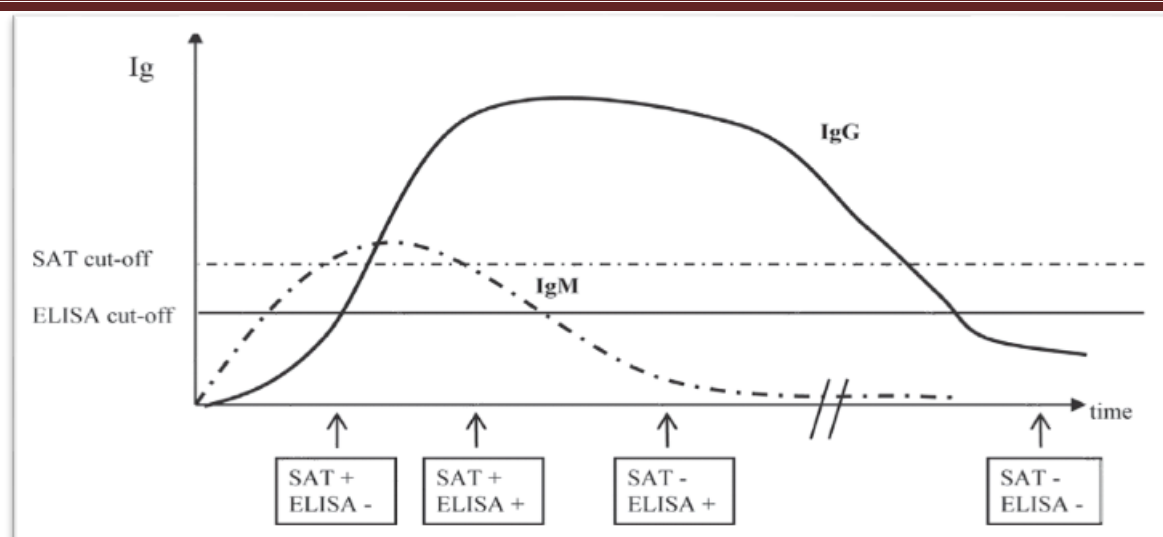


Figure 10 : Résultat du test d'agglutination lente (SAT) et des tests ELISA effectués à différents moments après l'infection (Jacques Godfroid et al ; 2010).

Tableau 3 : Sensibilité et spécificité des tests indirects pour le diagnostic de la brucellose d'après Jacques Godfroid et al ; 2010 :

Test	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Tests sérologique		
SAT/SAW	81.5	98.5
CFT	90-91.8	99.7-99.9
BAT	87	97.8
iELISA	97.2	97.1-99.8
cELISA	95.2	99.7
FPA	96.6	99.1
Tests de lait		
MRT	88.5	77.4
FPA	76.9	100
iELISA	98.6	99.0
Test cellulaire		
Test cutané	78-93	99.8

Abréviations: SAT : Slow agglutination test; SAW : Slow agglutination of Wright; MAT : Micro agglutination Test; CFT : Complement fixation test; BAT : Buffered *Brucella* antigen test; iELISA : indirect ELISA; cELISA : competitive ELISA; FPA: Fluorescence polarization assay; MRT : Milk ring test.

VIII. Traitement :

1. Chez l'homme :

Le traitement efficace de l'infection par *Brucella* nécessite des antibiotiques qui peuvent pénétrer intracellulairement, sont disponibles pour une thérapie prolongée pour prévenir la rechute, et sont bactéricides pour traiter l'infection du système nerveux central et l'endocardite. Il existe encore beaucoup de discussions sur le régime antibiotique, mais la combinaison de la doxycycline par voie orale pendant 45 jours ou 8 semaines plus la gentamicine intramusculaire pendant 5 à 7 jours

est tout aussi efficace que la thérapie traditionnelle en utilisant la doxycycline pendant 45 jours plus la streptomycine pendant 14 jours (Roushan, et al; 2010). L'Organisation Mondiale de la Santé recommande la doxycycline plus la rifampine par voie orale pendant 6 semaines. Ce schéma est moins efficace pour les cas de spondylarthrite. La monothérapie avec les fluoroquinolones a été décevante, et si ces agents sont utilisés, ils doivent toujours être combinés avec un autre agent actif. Des études récentes in vitro ont démontré une activité et une synergie significatives de la tigécycline avec la gentamicine et la rifampine; Ces observations doivent être étayées par des essais cliniques.

2. Chez l'animal :

Chez les animaux, le traitement peut être infructueux même après l'administration prolongée d'antibiotiques. Par conséquent, l'euthanasie et l'abattage sont souvent utilisés comme moyen de lutte contre la brucellose. Les animaux peuvent encore être infectieux à d'autres animaux (et humains) malgré le traitement, et ceci devrait être considéré avant de tenter le traitement d'un chien de compagnie. La stérilisation de chiens infectés est parfois effectuée pour obtenir un contrôle de l'infection (Kahn, et Line ; 2005), Aucun traitement économiquement supportable n'étant réellement efficace, le traitement des brucelloses bovine, ovine et caprine est formellement interdit par la réglementation (Garin-Bastuji, 2003). Tout animal atteint par la brucellose doit être abattu.

IX. Vaccination :

En raison de l'importance pour la santé publique de la brucellose et des dommages qu'elle cause à l'industrie du bétail, beaucoup d'efforts ont été déployés pour contrôler et éradiquer la maladie chez les bovins. Le développement d'un vaccin efficace contre la brucellose et l'éradication a été un défi pour les scientifiques depuis de nombreuses années. Malgré d'énormes progrès et le développement de vaccins (S19 et RB51), la recherche de vaccins améliorés n'a jamais de fin. Bien que les vaccins disponibles soient efficaces pour lutter contre la brucellose, ils présentent de nombreux inconvénients, tels que l'interférence avec les tests de diagnostic, la pathogénicité chez l'homme, le risque d'avortement chez les animaux gravides, entre autres (Elaine Dorneles et al; 2015)

1. Les vaccins et leur utilisation dans les programmes de lutte contre la brucellose et d'éradication :

Selon Schurig et al; 1995 et Ko et Splitter ; 2003, un vaccin idéal contre la brucellose devrait posséder les caractéristiques suivantes:

- être vivant et capable de fournir une forte réponse immunitaire de type T auxiliaire (Th1);

- ne pas induire d'anticorps qui interfèrent avec les tests sérologiques utilisés pour le diagnostic des animaux infectés, quelle que soit la voie, la dose d'administration, l'âge ou le sexe des animaux;
- être atténués et ne pas provoquer de maladie ou d'infection persistante chez les animaux immunisés ni être pathogènes pour l'homme;
- être en mesure d'induire une protection forte et durable contre l'infection systémique et utérine, en plus de prévenir l'avortement (même chez les femmes enceintes inoculées avec une seule dose);
- ne conduisent pas à une séroconversion lors de la revaccination;
- être stables et ne pas inverser la virulence in vivo ni in vitro;
- être peu coûteux, facile à produire et à administrer.

Seuls quelques vaccins ont été utilisés massivement dans la vaccination du bétail contre la brucellose, S19, RB51, 45/20 et SR82, étant S19 et RB51 les vaccins les plus largement utilisés (Olsen, et al; 2005). Cependant, de nombreux vaccins ont été mis au point, y compris l'ADN, la sous-unité, le *Brucella* recombinant et les vaccins à vecteur recombinant. Tous sont évalués principalement dans le modèle de souris (Oliveira, et al; 1996, Jain, et al; 2013), et à quelques exceptions près, la majorité de ces nouveaux vaccins, n'ont pas été testés dans le bétail ou n'étaient pas protecteurs dans le bétail et l'espèce cible (Elaine Dorneles et al; 2015).

2. Chez les bovins :

2.1. Le vaccin S19 :

La souche 19 est un vaccin vivant atténué et le premier vaccin à être largement utilisé pour la lutte contre la brucellose bovine (Manthei ; 1959). Aux États-Unis, ce vaccin a été utilisé pendant plus de cinq décennies à partir de 1941 et est toujours utilisé dans plusieurs autres pays (Olsen, et al; 2005).

Ses principales caractéristiques sont une faible pathogénicité stable, une immunogénicité relativement élevée et une antigénicité modérée (Mingle ; 1949). La souche 19 est un biovar 1 lisse et atténué de *B. abortus* qui induit une réponse d'anticorps qui ne peut pas être distinguée de la réponse d'anticorps induite par l'infection avec des souches de champ (Olsen SC et al; 2005, Jones, et Hooper ; 1979). La chaîne latérale O du lipopolysaccharide (LPS) est un antigène immunodominant auquel sont dirigées la majorité des anticorps résultant de l'immunisation S19 ou de l'infection naturelle (Meyer, et Nelson ; 1969). Les titres d'anticorps résiduels augmentent avec l'âge auquel l'animal a été vacciné (Nicoletti, et al; 1990), et pour remédier à ce problème, la vaccination est habituellement effectuée sur les jeunes femelles entre trois et huit mois. Cependant,

la vaccination de ce groupe d'âge ne semble pas différer significativement dans l'immunité induite (Manthei ; 1959). La restriction sur l'âge de la vaccination, en raison de l'interférence dans le diagnostic de la brucellose, est le principal inconvénient de la vaccination avec S19. Cela a grandement contribué à leur remplacement par la souche vaccinale RB51, qui n'a pas ce problème (Elaine Dorneles et al; 2015).

Un autre inconvénient de la vaccination S19 inclut le fait que dans certaines circonstances S19 peut provoquer l'avortement chez les femelles gestantes (Corner, et al ; 1981). Après la vaccination du bétail avec une, deux ou trois doses avant l'âge de reproduction, (McDiarmid ; 1959), la souche S19 a été récupérée dans 10% des échantillons de lait et 1,5% des échantillons des cas d'avortement. Chez les mâles, la vaccination par le S19 entraîne habituellement des titres d'anticorps persistants, une infection testiculaire et donc l'infertilité (Lambert ; 1963). En outre, la vaccination des animaux infectés par S19 ne guérissent pas et le cours normal de la maladie n'est pas modifié (Manthei ; 1959, Jones, et Hooper ; 1979).

D'autre part, la durée de l'immunité induite par S19 chez les bovins vaccinés s'est révélée assez longue, atteignant presque toute la durée de vie productive de l'animal. L'immunité chez les bovins vaccinés entre 6 et 8 mois ne diminue pas de la première à la cinquième gestation (Manthei ; 1959, McDiarmid ; 1959). Dans des conditions de terrain, 82 à 95% des bovins vaccinés ont montré une protection complète contre l'infection par des souches virulentes (Jones, Hooper ; 1979). Cependant, il a également été démontré que l'efficacité du vaccin diminue proportionnellement avec une dose croissante d'exposition bactérienne (Manthei ; 1959, McDiarmid ; 1959).

En ce qui concerne la réponse immunitaire déclenchée par la vaccination S19, la plupart de nos connaissances proviennent d'études de souris, qui ont montré une forte réponse immunitaire Th1 avec production d'IFN- γ et de niveaux élevés de CD4 + et la réponse des cellules T CD8 + (Yu, et al; 2007).

2.2. Souche vaccinale RB51 :

La souche RB51 est une souche rugueuse résistante à la rifampicine, qui présente un manque d'expression des chaînes latérales LPS O (OPS), la souche vaccinale RB51 a été développée en 1982 par le groupe du Prof. Gerhardt Schurig et est dérivée d'une souche 2308 de *B. abortus biovar 1* (souche virulente) (Schurig ; 1991). La protection contre l'avortement et l'infection induite par la vaccination RB51 chez les bovins a été suffisamment démontrée dans des conditions expérimentales (Poester ; 2006, Olsen ; 1999, Cheville ; 1993, Olsen ; 2000, Cheville ; 1996). En outre, l'utilisation de RB51 est très efficace dans les conditions de troupeaux en pâturage, quelque soit la prévalence de la brucellose (Lord ; 1998, Dorneles, et al; 2014).

La littérature montre que les animaux vaccinés avec RB51 à trois, cinq et sept mois sont protégés contre l'infection et l'avortement (Cheville, et al; 1996), ainsi que les génisses vaccinées à l'âge de 10 ou 24 mois, après l'infection avec le *B. abortus* 2308 (Poester, et al; 2006, Cheville, et al; 1993). Néanmoins, il a été suggéré que dans des circonstances expérimentales, la vaccination avec S19 est légèrement plus efficace que RB51 (non significative) (Olsen, et al; 2005, Cheville et al; 1996). Après la vaccination, la RB51 est habituellement éliminée du nodule lymphatique cervical superficiel dans les 6 à 10 semaines (Cheville, et al; 1996). La RB51 est considérée comme plus atténuée que S19, sur la base des résultats de la clairance et de l'examen histologique des tissus infectés d'animaux vaccinés.

En raison du phénotype rugueux, RB51 n'induit pas la production d'anticorps anti-OPS chez les animaux immunisés, en surmontant les problèmes sérologiques observés après la vaccination de S19 (Olsen, et al; 1999, Schurig, et al; 1991, Olsen, et al; 2000). En conséquence, les bovins vaccinés avec RB51 peuvent être facilement et précisément différenciés des animaux naturellement infectés, ce qui permet d'utiliser simultanément les politiques de test d'abattage et de vaccination. La vaccination par RB51 n'induit pas d'anticorps détectables par les tests sérologiques de routine du diagnostic de la brucellose, même après la vaccination par le S19 et les amplificateurs RB51 multiples ou l'utilisation de la dose complète de RB51 ($3,4 \times 10^{10}$ UFC) (Olsen ; 1999 et 2000). Cependant, les anticorps spécifiques de RB51 peuvent être détectés par dosage par ELISA en utilisant des antigènes RB51 tués (Nielsen ; 2004), jusqu'à environ 12 semaines après la vaccination, le pic se produisant quatre semaines après la vaccination ou la revaccination avec des titres décroissants après dix semaines (Olsen ; 2000). De façon intéressante, les bovins vaccinés avec S19 présentent des titres plus élevés contre les antigènes RB51 dans l'ELISA que les animaux vaccinés avec RB51, probablement en raison de la persistance de S19, ce qui peut conduire à des niveaux élevés d'anticorps croisés contre les antigènes RB51 (Elaine Dorneles et al; 2015).

Jusqu'à présent, aucune expérience n'a évalué la durée de l'immunité, mais Olsen et Stoffregen en 2005 suggèrent qu'une vaccination de rappel est nécessaire entre 4 et 5 ans pour maintenir des niveaux élevés de protection après la vaccination RB51. De plus, la revaccination du RB51 a été recommandée six mois et un an après la vaccination de la vache dans le nord du Mexique (Luna-Martinez et al; 2002). Néanmoins, les résultats de la réponse blastogène des lymphocytes T CD4 + et T CD8 + et la production d'IFN- γ et d'IL-4 par les sous-groupes de lymphocytes six mois après la revaccination de RB51 indiquent qu'il n'y avait pas d'augmentation ou d'amélioration de la réponse immunologique résultant de la revaccination de RB51 des bovins adultes (Dorneles et al; 2014). Même si, la revaccination RB51 peut encore être considérée comme un outil pour

augmenter l'immunité de troupeau, puisque tous les animaux ne sont pas complètement protégés après l'immunisation primaire (Jones et Hooper ; 1979). En outre, il a été démontré que RB51 induit une forte réponse immunitaire cellulaire Th1 avec production de cellules cytotoxiques spécifiques d'IFN- γ et de T CD8 +, mais pas d'IL-4 après la vaccination de souris (He et al; 2001).

2.3. Le vaccin 45/20 :

Ce vaccin est préparé avec une souche 45/20 de *B. abortus biovar 1* tuée par la chaleur associée à un adjuvant huileux (McEwen et Samuel ; 1955). Le 45/20 est un *B. abortus* brut, dérivé de la souche lisse 45/0 après 20 passages à travers des cobayes (McEwen ; 1940). Cette bactérine a été utilisée dans certains pays de l'Union Européenne pour le contrôle de *B. abortus* en remplacement du S19, afin d'éliminer les problèmes liés à l'induction d'anticorps interférant dans le diagnostic de routine de l'infection (Nicoletti et al; 1990). Cependant, les données d'efficacité expérimentale et de réponse immunologique sont contradictoires et montrent surtout la supériorité de la vaccination avec S19 (Woodard et Jasman ; 1983). En outre, son utilisation présente certains inconvénients tels que l'utilisation d'un adjuvant huileux, le besoin de vaccination répétée et la réversion pour lisser la souche lorsqu'il est utilisé comme vaccin vivant (Nicoletti et al; 1990, McEwen ; 1940). En outre, certaines études ont également indiqué que le 45/20 n'est pas complètement exempt de la chaîne O-LPS (Schurig et al; 1984), ce vaccin peut donc induire des anticorps détectables par des tests sérologiques de routine utilisés dans le diagnostic de la brucellose bovine. La variabilité de la protection déclarée, associée à des effets sérologiques imprévisibles et à l'apparition de réactions au site d'injection du vaccin chez certains animaux a conduit à l'interruption de l'utilisation du vaccin 45/20 (Elaine Dorneles et al; 2015).

2.4. Le vaccin SR82 :

La souche SR82 est un vaccin vivant atténué de *B. abortus biovar 6* utilisé depuis 1974 par l'ancienne Union des Républiques Socialistes Soviétiques (URSS) pour la lutte contre la brucellose bovine (Ivanov et al; 2011). Ce vaccin agglutine dans les anti-sérums rugueux et lisses, mais n'induit pas de réponse positive dans les tests d'agglutination de la brucellose. De plus, SR82 a induit un niveau de protection similaire à S19, après mise en cause avec *B. abortus* virulent, et il s'est avéré efficace dans des conditions de pâturage (Ivanov et al; 2011, Salmakov et al; 2010). Actuellement, la souche SR82 est encore massivement utilisée dans la Fédération de Russie, l'Azerbaïdjan, le Tadjikistan et d'autres pays de la région (Ivanov et al; 2011).

2.5. La vaccination avec des gènes recombinants, des protéines, des vecteurs et des mutants recombinants de *B. abortus* :

Classiquement et historiquement, les vaccins utilisés dans le contrôle de la brucellose bovine sont des vaccins vivants atténués produits à partir de souches spontanément atténuées ou sélectionnées au hasard. Néanmoins, les nombreuses avancées en génomique, en protéomique, en technologie de l'ADN recombinant et même en vaccinologie ont permis d'explorer d'autres outils pour le développement de vaccins plus sûrs, sans inconvénients observés dans les vaccins classiques. Dans ce contexte, plusieurs études visaient à développer, à tester l'efficacité ou à évaluer les réponses immunologiques des vaccins génétiquement manipulés de *B. abortus* (gènes recombinants, protéines, vecteurs et souches de *B. abortus* modifiées) ont été réalisées essentiellement chez la souris. Cependant, à quelques exceptions près, la majorité de ces vaccins recombinants n'ont pas été testés ou n'ont pas protégé les bovins, leurs espèces cibles. De plus, il est important de tenir compte du fait que les vaccins recombinants, en particulier les vaccins non vivants, présentent des limites quant à la viabilité économique, du fait du besoin de doses multiples et à la nécessité d'une combinaison d'antigènes (Elaine Dorneles et al; 2015).

2.5.1. Les vaccins ADN :

Les vaccins à ADN offrent la possibilité d'induire à la fois des réponses cellulaires et humorales, l'expression des antigènes est prolongée, ils ont une meilleure stabilité et ne nécessitent pas de réfrigération en stockage. Par conséquent, plusieurs antigènes ont été explorés pour leur valeur en tant que vaccins ADN contre l'infection de *B. abortus*, fournissant divers niveaux de protection. Les vaccins ADN codant pour la protéine ribosomale L7 / L12, la luminase synthase (BLS), P39 (une protéine de liaison périplasmique putative), Omp16 (protéine de membrane externe) et BAB1_0278 ont démontré conférer une protection contre l'infection de *B. abortus* chez la souris (Al-Mariri, et al ; 2001, Velikovsky, et al; 2002, Luo, et al; 2006). De plus, le vaccin Cu / Zn superoxyde dismutase (Cu-Zn SOD) induit un niveau de protection similaire à celui induit par RB51 (Onate, et al; 2003). En revanche, l'ADN plasmidique portant les gènes BAB1_0263 et bacterioferritin (BFR) n'a pas induit de niveau significatif de protection contre l'infection avec *B. abortus* virulent chez la souris.

Les vaccins à ADN combinés ont également démontré leur capacité à mieux relever les nouveaux défis. Les vaccins ADN de gènes codant pour un antigène de *Brucella* immuno-dominant (BCSP31) et des antigènes de *Brucella* prometteurs (SOD et L7 / L12) ont fourni une protection significativement meilleure que S19 chez la souris. Ce vaccin à ADN combiné a également provoqué une réponse cytotoxique significativement plus élevée (cellules T CD8 + produisant du granzyme B) par rapport aux souris vaccinées par S19 (Yu, et al; 2007). De même, le vaccin d'ADN de fusion bivalent codant pour les gènes L7 / L12 et Omp16 s'est avéré également efficace

et capable d'induire une forte réponse proliférative de lymphocytes T et d'induire une grande quantité de cellules T productrices d'IFN- γ (Luo, et al; 2006).

Le vaccin d'ADN contenant six gènes codant pour les antigènes immunodominants de *M. bovis* et *B. abortus* a induit une protection comparable à S19 et supérieure au vaccin *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) chez le bétail, ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'un vaccin hautement prometteur pour les deux maladies. Le vaccin combiné d'ADN contenant des gènes de *M. tuberculosis* et de *B. abortus* avec un système adjuvant d'IL-12 a montré que, outre le niveau élevé de protection, l'IL-12 agit comme un adjuvant pour renforcer l'immunité protectrice contre *M. tuberculosis* et *B. abortus* chez les souris (Yu, et al; 2007).

2.5.2. Les vaccins sous-unités :

De nombreux antigènes testés comme des vaccins à ADN ont également été évalués comme antigènes potentiels pour les vaccins sous-unitaires (protéine ribosomale L7 / L12, P39, BLS, Omp16, Cu / Zn SOD) (Al-Mariri, et al; 2001, Velikovsky, et al; 2003, Pasquevich, et al; 2009, Singha, et al; 2011). Les protéines membranaires externes (OMP) de *B. abortus*, les antigènes immunogènes potentiels, ont été largement explorées sous la forme de sous-vaccins (Pasquevich, et al; 2009, Pasquevich, et al; 2011, Lim, et al; 2012, Goel, et al; 2013). Les Omp16 et Omp19 recombinants, non recombinés et le liposome Omp25 recombinant encapsulé ont donné une protection comparable à celle de S19 chez les souris vaccinées suite à l'infection (Pasquevich, et al; 2009, Pasquevich, et al; 2011, Goel, et al; 2013). En outre, le vaccin sous-unité Omp28 a augmenté la résistance contre l'infection avec *B. abortus* virulent, mais à un niveau inférieur à celui des vaccins vivants atténués (Lim, et al; 2012).

De même, des protéines flagellaires ont été criblées à la recherche d'un sous-groupe vaccin antigène candidat. Cinq gènes flagellaires, bien que *Brucella spp* sont non mobiles (BAB1_0260 (FlgJ), BAB2_0122 (FliN), BAB2_0150, BAB2_1086, BAB2_1093) ont été évalués pour leur capacité à induire des réponses humorales et à médiation cellulaire et à protéger les souris contre l'infection par *B. abortus* (Li, et al; 2012). Parmi ceux-ci, FlgJ et FliN se sont révélés être des antigènes protecteurs qui produisaient des réponses humorales et médiées par des cellules chez la souris (Elaine Dorneles et al; 2015).

De plus, les protéines recombinantes d'autres gènes associés à la pathogénèse éprouvée ou supposée tels que L7 / 12, BLS, rSurA et rDnaK induisent différents niveaux d'immunité protectrice et de réponse immunitaire cellulaire chez la souris contre la brucellose (Velikovsky CA et al; 2003, Delpino MV et al; 2007). Alors que la dihydrolipoamide succinyltransférase (rE2o) et la cysteine synthase A (rCysK) a fourni une protection partielle contre *B. abortus* et induit principalement de réponse immunitaire de type Th2 (Verma, et al; 2012, Jain, et al; 2013). De

plus, CobB, AsnC et P39 induisent une immunité protectrice similaire à Cu / Zn SOD et S19, qui est marquée par les deux types de réponse immunitaires humorale et cellulaire. De plus, la protéine recombinante Cu / Zn SOD (liposomes encapsulés) confère une résistance chez la souris, augmentée, lors de la co-immunisation avec l'IL-18 recombinante. En revanche, les vaccins BAB1_0560, BAB1_1108, BAB2_0059 (VirB10), BAB2_0191, BAB2_0423 (GntR) et BRF n'ont pas induit de réponse immunitaire protectrice (Al-Mariri, et al; 2001, Fu, et al; 2012).

L'utilisation potentielle de vaccins sous-unitaires de *B. abortus* dans des conditions de terrain est très limitée, bien que certains résultats encourageants aient été démontrés. L'exigence de boosters multiples, d'adjuvants et la combinaison de plusieurs antigènes rend trop coûteux pour le bétail. De plus, il est important de considérer que la réponse observée chez la souris peut ne pas refléter la protection obtenue chez les hôtes naturels après la vaccination. En outre, pour générer une forte réponse immunitaire protectrice qui peut limiter l'infection naturelle à partir d'une combinaison de quelques protéines de l'agent pathogène est un défi difficile et complexe (Elaine Dorneles et al; 2015).

2.5.3. Les vaccins vecteurs :

Dans une autre version, des gènes codant pour des antigènes de *B. abortus* immunodominants peuvent être introduits dans des virus atténués ou des bactéries qui servent de vaccins vecteurs. Les gènes de *B. abortus* ont été exprimés avec succès dans des virus (virus de la forêt de *Semliki* et virus *Vaccinia*) et des bactéries (*Escherichia coli*, *Ochrobactrum anthropi*, *Lactococcus lactis*, *Salmonella enterica subsp enterica serovar Typhimurium* et *B. abortus*) (Vemulapalli, et al; 2000, He, et al; 2002, Cabrera, et al; 2009, Zhao, et al; 2009, Saez, et al; 2012). *Escherichia coli*, *O. anthropi* (plus des motifs CpG non méthylés) et *Lactococcus lactis* exprimant l'antigène SOD de Cu / Zn de *B. abortus* ont pu induire une réponse immunitaire Th 1 et protéger les souris après l'infection avec *B. abortus* virulent (He, et al; 2002, Andrews, et al; 2006, Saez, et al; 2012).

De même, le vecteur viral de *Semliki Forest* portant l'ARN codant pour le facteur 3 d'initiation de la traduction de *Brucella* (IF3) a montré un niveau significatif de protection contre une infection avec *B. abortus* 2308 chez la souris (Cabrera, et al; 2009). La protéine L7 / L12 transportée par *Salmonella. enterica serovar typhimurium* mais pas par le virus *Vaccinia* confère une efficacité protectrice et une immunogénicité (Baloglu, et al; 2005, Zhao, et al; 2009). En outre, le virus de la vaccine portant l'OMP de 18 kDa de *B. abortus* ne pouvait pas protéger les souris contre une infection avec la souche virulente *B. abortus* 2308 (Vemulapalli, et al; 2000).

L'expression d'antigènes de *B. abortus* sur des vecteurs viraux ou bactériens est une alternative supérieure aux vaccins à ADN et aux sous-unités, car elle imite étroitement l'infection naturelle, permettant la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte et la multiplication du nombre initial

de copies antigéniques. Cependant, bien que n'ayant pas certains inconvénients observés dans des vaccins non vivants, comme l'utilisation de doses multiples, le besoin en adjuvant et le coût élevé (Elaine Dorneles et al; 2015).

2.5.4. Mutants recombinants de *B. abortus* :

Un autre axe de recherche pour de nouveaux vaccins protégeant contre l'infection par *B. abortus* a été la construction de mutants RB51 recombinants, qui conservent le phénotype rugueux et l'atténuation mais ont des caractéristiques améliorées telles que l'immunogénicité et la protection contre l'infection (Vemulapalli, et al; 2000 et 2004). Par conséquent, certaines études ont montré que la complémentation de RB51 avec un gène *wboA* fonctionnel (RB51WboA), qui conduit à l'expression de la chaîne O-LPS dans son cytoplasme, ou la surexpression de la protéine SOD Cu / Zn (RB51SOD) entraîne une amélioration significative de l'efficacité du vaccin contre l'infection par *B. abortus* virulent chez la souris (Vemulapalli, et al; 2000).

En outre, la combinaison de ces deux gènes dans une seule souche RB51 (RB51SOD / *wboA*) a également augmenté de manière significative la capacité protectrice de ce vaccin recombinant RB51 chez la souris et n'a pas modifié ses caractéristiques positives (Vemulapalli, et al; 2000). Néanmoins, cette souche RB51-recombinante n'était pas aussi efficace que la souche RB51 parentale dans la vaccination de la vache et du veau après l'infection avec la souche 2308 (Olsen, et al; 2009).

3. Chez les petits ruminants :

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). En outre, d'autres mutants bruts défectueux dans la synthèse du noyau et de l'O-polysaccharide induisent des anticorps réagissant dans le I-ELISA avec S-LPS et sont moins efficaces que le vaccin Rev.1 contre l'infection par *B. melitensis* chez le mouton (Barrio, et al; 2009). Le vaccin Rev.1 est utilisé en suspension congelée de 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 dans la conjonctive, il produit une protection similaire sans induire une réponse anticorps persistante, facilitant ainsi l'application de programmes

d'éradication combinés à la vaccination (Díaz-Aparicio, et al; 1994 Marin, 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 endémiques, 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 l'avortement et l'excrétion dans le lait lorsque les animaux sont vaccinés pendant la gestation, soit avec une dose complète, soit avec une dose réduite. Ces effets secondaires sont considérablement réduits lorsque les animaux adultes sont vaccinés (dose complète) avant l'accouplement ou pendant le dernier mois de gestation. Par conséquent, lorsque la vaccination de masse est le seul moyen de contrôler la maladie, une campagne de vaccination doit être recommandée en utilisant la dose standard de Rev.1 administrée par la voie conjonctivale lorsque les femelles ne sont pas gestantes ou pendant la fin de la gestation et la saison de pré-élevage (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 combinée. 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 ; 2009).

Partie

Expérimentale

I. Objectif de l'étude :

L'objectif de notre étude est de mettre en évidence l'infection par *Brucella abortus* en utilisant deux tests sérologiques : le Rose Bengale et le test de Wright.

Nos objectifs sont : la comparaison des performances des deux méthodes, afin d'utiliser la plus sensible pour étudier la séroprévalence vis-à-vis de *Brucella abortus* et l'étude des facteurs de risque liés à la présence de cette bactérie dans les troupeaux ovins au sein de deux communes de la région sud-ouest de la wilaya de Sétif.

II. Matériel et méthodes :

1. Région d'étude :

La présente étude a été menée dans différents élevages ovins de la région Sud-Ouest de la wilaya de Sétif, communes **Aïn Oulmène** et **Ouled Tebben**.

• **Aïn Oulmène :**

Aïn Oulmene est une commune située dans la zone réglementée entre 35° et 54° de latitude nord et entre 5° et 17° à l'est avec une altitude de 950 m, ferme les hautes plaines fertiles du sud de Sétif et est adossée, par l'Ouest, aux monts du Hodna. Son relief est en général plat dans sa partie Est, alors que sa partie Ouest est occupée par de petites montagnes dont la plus élevée est le djebel Osmane qui culmine à 1 100 mètres.

Délimitée au Nord par les communes de Kasr El Abtal et Guellal, à l'Est Bir Hadada, à l'Ouest Ouled Si H'med et au sud Aïn Azal et Salah Bay.

La commune compte 73 831 habitants sur un territoire de 530 km², au dernier recensement de 2008.

• **Ouled Tebben :**

C'est une commune située à 16 km à l'Ouest de la route nationale N° 28 et à 69 km au Sud-Ouest de la wilaya de Sétif, à 65 km au Sud-Est de Bordj Bou Arreridj, à 79 km à l'Est de M'Sila, et à 273 km au Sud-Est d'Alger.

C'est une zone au relief plat entouré par un cercle de montagnes dont la plus élevée est le djebel Guedil.

Située dans la zone réglementée entre 35° et 47° de latitude nord et entre 2° et 5° à l'Est avec une attitude de 1030 m. Délimitée au :

- Nord par les deux communes de Ouled Si H'med (Sétif) et de Ouled Brahem (B.B.A)
- Sud par les deux communes D'hahna et Barhoum (M'sila)
- Est par la commune de Rasfa (sétif)
- Ouest par la commune de Taglait (B.B.A)

C'est un village de moins de 25 000 habitants sur un territoire de 107 km².

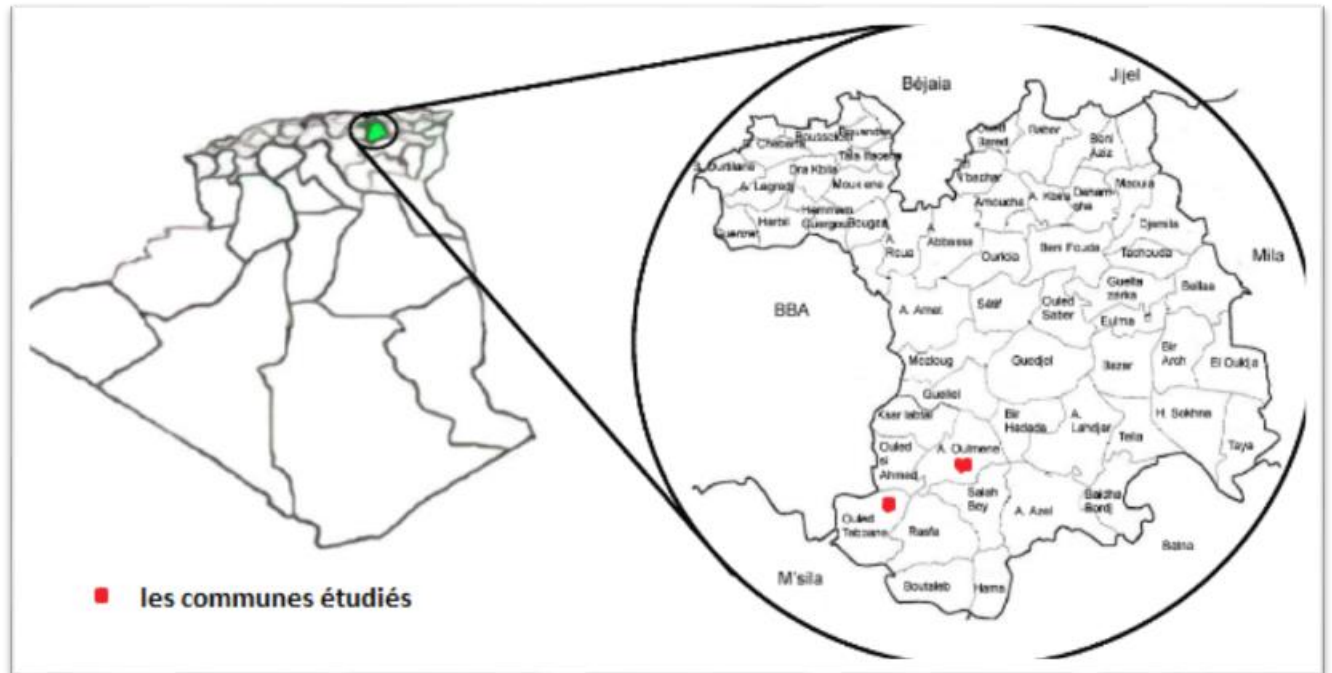


Figure 11: carte géographique de la wilaya de Sétif.

2- Animaux et élevages étudiés :

Au total, 129 prélèvements de sérums ovins ont été réalisés à partir de 15 élevages différents dans les deux communes étudiées. Un total de 50 mâles et 79 femelles, de différents âges (entre 3 mois et 7 ans). La majorité des élevages sont mixtes (présence d'autres espèces animales : bovin, caprin ...). Certaines de ces exploitations (4) présentent des antécédents d'avortement, et aucun cas d'orchite ou polyarthrites n'ont été signalés chez les mâles étudiés.

Ces élevages ne sont ni dépistés pour la recherche de la brucellose, ni vaccinés contre cette maladie et les éleveurs ne désinfectent pas les locaux.

Tableau 3: description des élevages étudiés :

	Ain Ouelmen	Ouled Tebben	Total
Nombre d'ovins prélevés	76	53	129
Nombre d'élevages prélevés	7	8	15
Nombre de mâles	31	19	50
Nombre de femelles	45	34	79

3- Plan d'échantillonnage :

Notre étude a été menée du mois de septembre au mois d'octobre 2016.

Comme dans la plupart des situations où une enquête est menée, il n'est pas possible d'échantillonner la population totale, la plupart des enquêtes reposent sur un échantillon prélevé représentatif de la population étudiée. La taille de l'échantillon est sélectionné au hasard en raison de :

- La majorité des cheptels ovins sont vaccinés contre la brucellose ;
- La commune de Ouled Tebben est une zone montagneuse ;
- La disponibilité des vétérinaires praticiens pour l'aide.

4- Réalisation des prélèvements :**✓ Matériels utilisés :**

- Tubes vacutainer MD (sous vide) + portoir de tubes ;
- Aiguilles + porte aiguille ;
- Marqueur pour identifier les tubes ;
- Micropipette + les embouts ;
- Eppendorfs.

✓ Fiche de renseignement :

La fiche de renseignements est une fiche de commémoratifs qui accompagne obligatoirement chaque prélèvement. Elle contient des informations individuelles sur les animaux prélevés ainsi que les élevages d'où proviennent les prélèvements (voir annexe 1).

✓ Technique de prélèvement :

Environ 4 ml de sang veineux ont été obtenus chez les animaux étudiés. Après identification de chaque animal par un numéro sur les tubes vacutainers, la fiche de renseignements a fourni les informations nécessaires, les tubes sont déposés pendant une nuit à une température de 4°C pour la constitution du sérum après la coagulation.

Les sérums étaient ensuite séparés du caillot par micropipette dans des eppendorfs et le numéro d'identification du tube est recopié sur les eppendorfs par un stylo permanent. Ils ont ensuite été stockés à -20 ° C jusqu'à ce qu'ils soient utilisés pour les tests sérologiques.

5. Analyses de laboratoire :

Ces tests ont été réalisés au laboratoire des analyses médicales du CHU de Sétif.

5.1. Epreuve au Rose Bengale :

A. Matériel :

- Micropipettes automatiques ;
- Cônes plastique à usage unique (jaune) ;
- Plaque blanche en plastique ;
- Baguette fine (plastique) ;
- Minuteur ou chronomètre ;

B. Réactifs :

- Sérums à tester ;
- Sérum(s) de contrôle témoin(s) positif(s) et négatif(s) (spinreact®) ;
- Antigène coloré au Rose Bengale (antigène constitué d'une suspension phénolée à 0,5% de *Brucella abortus* biovar1, souche 99, inactivée, colorée au Rose Bengale et tamponnée à pH=3,65 ± 0,05).



Figure 12: Réactif du Rose Bengale (photo personnelle).

C. technique de réalisation :

✓ *Technique qualitative :*

- Effectuer l'épreuve sur des sérums purs et non chauffés ;
- Laisser 30 minutes avant l'emploi et à température ambiante, les sérums à examiner et la quantité d'antigène nécessaire pour les examens (agiter doucement l'antigène de manière à obtenir une suspension homogène) ;
- Déposer sur la plaque côte à côte le même volume, de sérum pur et d'antigène (50µl de sérum + une goutte d'antigène);
- Mélanger rapidement le sérum et l'antigène ;
- Agiter la plaque pendant 4 minutes.

✓ *Témoins :*

Faire pour chaque série de plaques :

- Un sérum témoin positif.
- Un sérum témoin négatif.

✓ *La Lecture :*

- Faire la lecture immédiatement, après 04 min d'agitation de la plaque, sous un bon éclairage et à l'œil nu ;
- Ne pas tenir compte des agglutinats qui apparaissent après 4 minutes.

✓ *Interprétation des résultats :*

- Absence d'agglutinats = NEGATIF.
- Présence d'agglutinats (même très fins) = POSITIF.

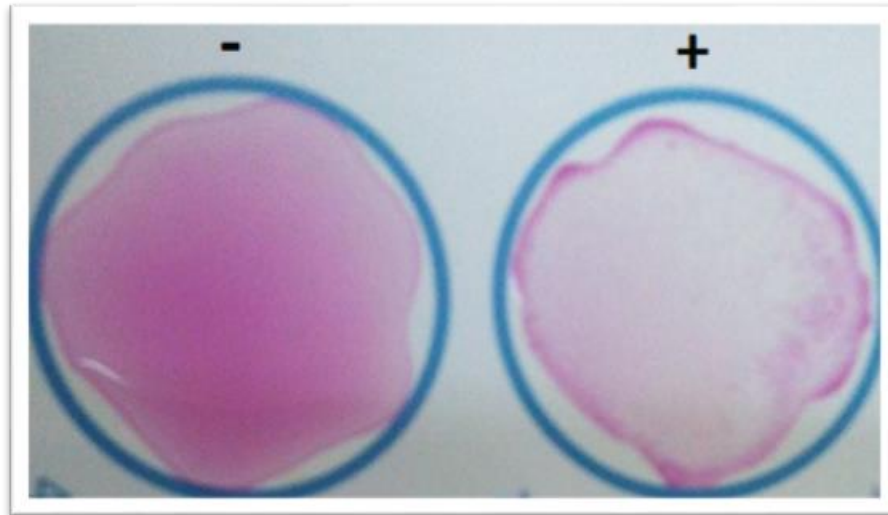


Figure 13 : Résultats de l'agglutination sur lame obtenus par le test du Rose Bengale (photo personnelle)

5.2. Épreuve de l'agglutination sur lame et en tube (test de Wright) :

A. Matériel :

- Micropipettes automatiques ;
- Cônes plastique à usage unique (jaune) ;
- Plaque blanche en plastique ;
- Baguette fine en plastique ;
- Minuteur ou chronomètre ;
- Solution tampon (NaCl 9g/L) ;
- Autoclave.

B. Réactifs :

- Sérums à tester;
- Sérum(s) de contrôle témoin(s) positif(s) et négatif(s) (spinreact®) ;
- Antigène (antigène constituée d'une suspension de *Brucella abortus*, somatique, en tampon de glycine à pH=8,2).

C. technique de réalisation :

✓ Agglutination sur lame (qualitatif) :

- Effectuer l'épreuve sur des sérums purs et non chauffés ;

- Laisser 30 minutes avant l'emploi à température ambiante, les sérums à analyser et la quantité d'antigène nécessaire pour les examens (agiter doucement l'antigène de manière à obtenir une suspension homogène) ;
- Déposer sur la plaque côte à côte le même volume, de sérum pur et d'antigène. 50µl de sérum + une goutte d'antigène ;
- Mélanger rapidement le sérum et l'antigène ;
- Agiter la plaque pendant 1 minute.

✓ **Agglutination en tube (semi-quantitative):**

- Préparation d'une série de tubes pour la dilution des sérums positifs comme suit :

Dilution	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	...
Échantillon (ul)	100	--	--	--	--	--	--
NaCl 9g/L (ml)	1.9	1	1	1	1	1	...
	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml



- Préparation de 2 tubes supplémentaires pour les témoins positifs et négatifs : 0.1 ml témoin + 0.9 ml NaCl 9g/L ;
- Ajouter une goutte de l'antigène (50 ul) dans chaque tube ;
- Agitation et incubation à 37 ° pendant 24h.



Figure 14: Incubation des tubes dans 37°C pendant 24h (photo personnelle).

D. Lecture :

- Agglutination sur lame : Examen macroscopique des lames pour vérifier la présence d'agglutination juste après avoir stoppé l'agitation et comparer les résultats avec les sérums témoins
- Agglutination sur tube : Examen macroscopique du modèle d'agglutination et comparaison des résultats avec ceux obtenus dans les tubes témoins. Le témoin positif doit présenter une agglutination partielle ou complète. Le témoin négatif ne doit montrer aucun type d'agglutination. Le titre de l'échantillon est défini comme étant la dilution la plus élevée montrée par le résultat positif.

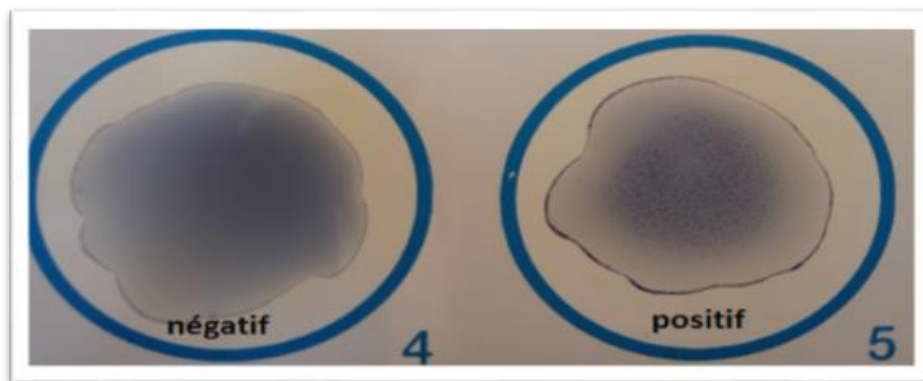


Figure 15 : résultats de l'agglutination sur lame obtenue par le test qualitatif de Wright (photo personnelle)

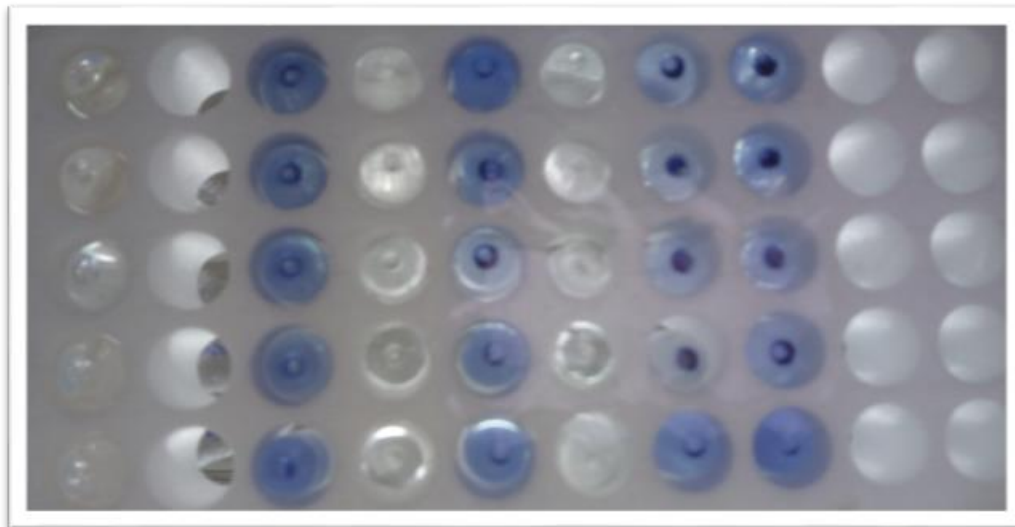


Figure 16 : résultats de l'agglutination sur tube obtenue par le test de Wright (photo personnelle).

6. Analyses statistiques :

1. La comparaison des deux méthodes avec le calcul de la spécificité, la sensibilité, l'exactitude, la valeur prédictive positive, et la valeur prédictive négative ont été réalisées grâce à l'utilisation des formules appropriées.
2. Le test de Mc Nemar et du Kappa de Cohen ont été réalisées grâce à l'utilisation du logiciel SPSS version 19.

- **Le kappa de cohen (k)** est un coefficient destiné à mesurer l'accord entre deux variables qualitatives ayant les mêmes modalités. Classiquement, il est utilisé afin de mesurer le degré de concordance entre les stades attribués par deux juges. Il peut également être appliqué afin de mesurer un accord intra-observateur. Il a été calculé et évalué comme décrit auparavant. Le coefficient k est toujours compris entre -1 et 1 (accord maximal). Habituellement, on utilise le « barème » suivant pour interpréter la valeur k obtenue :

- ✓ < 0 Grand désaccord
- ✓ 0.00 – 0.20 Accord très faible
- ✓ 0.21 – 0.40 Accord faible
- ✓ 0.41 – 0.60 Accord moyen
- ✓ 0.61 – 0.80 Accord satisfaisant
- ✓ 0.81 – 1.00 Accord excellent

- **Le test de Mc Nemar** est appliqué aux séries appariées. Si la valeur est supérieure à 3,84 les deux tests sont considérés comme significativement différents et inversement avec un risque d'erreur de 5%. Le test a été considéré comme significativement différent du test de référence lorsque la valeur de Mc Nemar est supérieure à 3,84 ($p < 0,05$).

3. L'analyse de différents facteurs de risque a été réalisée par le test Chi-2 ou dans certains cas en utilisant le test de Fisher exact. Les différences observées ont été considérées comme significatives quand la valeur de P était inférieure à 0,05.

III. Résultats :

1. Comparaison entre les deux méthodes sérologiques pour la recherche des anticorps spécifiques de *Brucella abortus* :

Les performances du test de Wright ont été évaluées en prenant comme test de référence le Rose Bengale «gold standard» (selon l'OIE, voir annexe 2).

La confrontation des résultats entre le test à évaluer et le test de référence est en général présentée dans un tableau de contingence.

Les résultats croisés entre le Rose Bengale et le test de Wright sur les 129 sérums des ovins ont donné 102 ovins vrais négatifs, 9 faux négatifs, 6 sont de vrais positifs et 12 de faux positifs (Tableau 4).

Tableau 4 : comparaison du test de Wright avec le Rose Bengale pris comme test de référence.

		Rose Bengale		
		Résultat positif animal malade	Résultat négatif animal sain	Total
test de Wright	Résultat positif	6 (a)	12 (b)	18
	Résultat négatif	9 (c)	102 (d)	111
Total		15	114	129

Nous avons calculé pour le test de Wright, la sensibilité, la spécificité, l'exactitude, la valeur prédictive positive, la valeur prédictive négative, le coefficient kappa de Cohen et le test de Mc Nemar par rapport au test Rose Bengale pris comme test de référence (annexe 3). Nous avons constaté que pour le test de Wright, la sensibilité était de 40%, la spécificité de 89.4%, l'exactitude de 91.47%, la valeur prédictive positive (33.33%) et la valeur prédictive négative (91.89%).

Il est à signaler que la sensibilité et la spécificité du test de référence (Rose Bengale) sont de 100% et de 98% respectivement,

Le test de Wright (Se = 40%), a montré une faible sensibilité comparé au test du Rose Bengale ce qui signifie que le test de Wright peut masquer de nombreux individus positifs.

Sa bonne spécificité signifie, que le risque de faux positifs avec ce test est mineur.

Le calcul de la concordance entre les deux méthodes par l'utilisation du test de Kappa de Cohen a montré un coefficient $k=0,37$ ce qui correspond à une faible concordance entre les deux méthodes. La valeur du test Mc Nemar obtenue est égale 0.42, ce qui est inférieur à 3,84 ($p>0,05$) donc les deux tests ne donnent pas significativement des résultats différents.

La valeur prédictive positive (VPP), montre que la probabilité qu'un ovin soit réellement infecté de la brucellose sachant, qu'il a fourni un résultat positif au test de Wright est faible (33.33%). Un résultat positif n'indique aucunement que l'ovin est infecté par la brucellose.

En revanche, la valeur prédictive négative (VPN) de ce test est élevée (91.89%). Un résultat négatif au test de Wright permettra d'exclure la brucellose avec confiance.

2. Étude de la séroprévalence vis-à-vis de l'infection par *Brucella abortus*:

2.1. Séroprévalence individuelle apparente :

Sur les 129 sérums ovins analysés par les deux méthodes sérologiques, le test du Rose Bengale a identifié 15 réactions positives alors que le test de Wright a pu identifier 18 ce qui représente une séroprévalence individuelle apparente de 11.62% (IC 95% 5,5-16,5) et 13.95% (IC 95% 7-18.9) respectivement. Le tableau 5 reprend les résultats de la séroprévalence individuelle vis-à-vis de l'infection par *Brucella abortus* par les deux tests sérologiques:

Tableau 5 : séroprévalence individuelle apparente vis-à-vis de *Brucella abortus* par deux tests sérologiques:

	Test du Rose Bengale	Test de Wright
Nombre d'animaux positifs	15	18
Prévalence totale	11.62% (5,5-16.5)	13.95% (7-18.9)
P(%) IC (95%)		

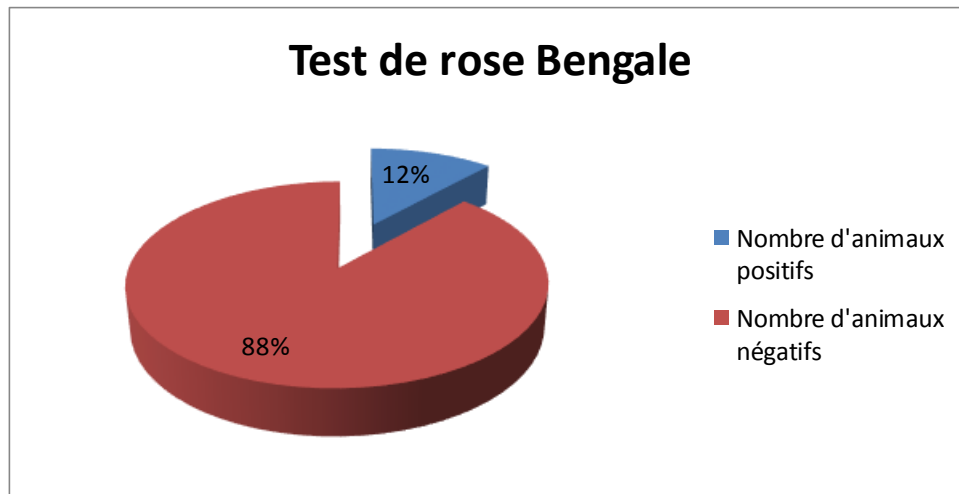


Figure 17: Séroprévalence individuelle apparente par le test Rose Bengale.

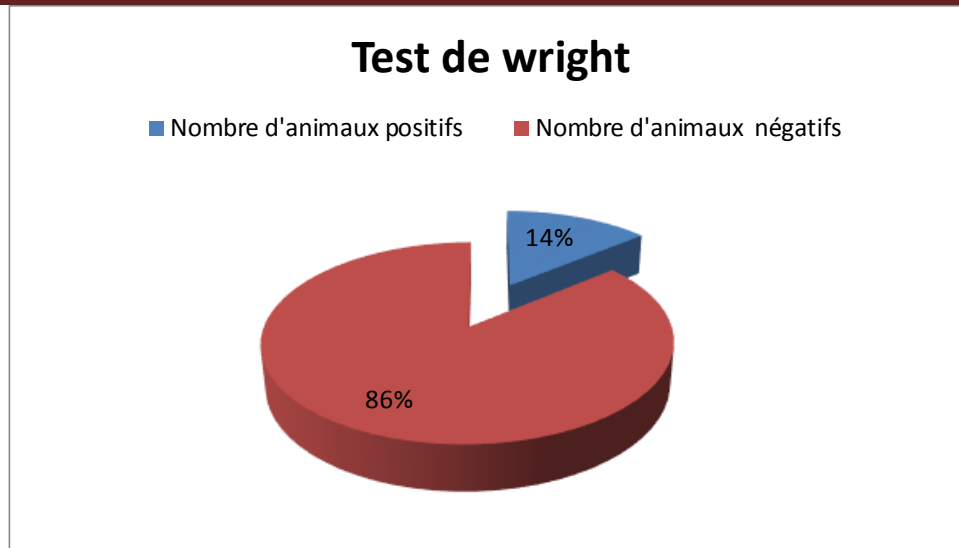


Figure 18: Séroprévalence individuelle apparente par le test de Wright.

La séroprévalence individuelle la plus élevée est obtenue par le test de Wright (13.95%).

2.2. Séroprévalence des élevages :

Un élevage est considéré comme infecté si au moins un individu est détecté positif au test de diagnostic. Au total, 15 élevages se sont révélés positifs, 7 élevages pour la commune d'Ain Ouelmen et 8 élevages dans la commune Ouled Tebben, les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 6 : séroprévalence des élevages :

	Test du Rose Bengale	Test de Wright
Positif	5	10
Négatif	10	5
séroprévalence P(%) IC (95%)	33.3 % (8-57,28)	66.6% (41,53-90,46)

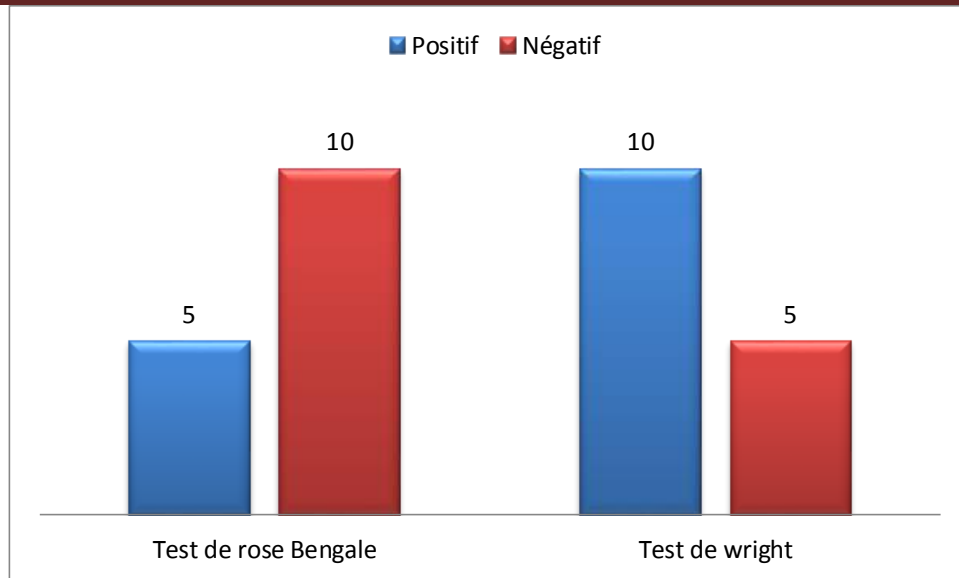


Figure 19: séroprévalence des élevages

Le test de Wright montre une plus forte séroprévalence (66.6%) comparé au test du Rose (33.3%) dans les 15 élevages étudiés.

3. Étude des facteurs de risque liés à la présence de *Brucella abortus*:

Cette étude, basée sur les résultats de l'étude de la séroprévalence, nous a permis d'identifier les facteurs de risque qui semblent augmenter le risque de la séropositivité vis-à-vis de *Brucella abortus*. Pour cela, certaines données individuelles ont été enregistrées pour tous les animaux de l'étude (voir annexe 1).

Type d'élevage :

Dans un premier temps, nous avons tenu à étudier l'effet de l'élevage : élevage mixte (composé de plusieurs espèces animales) et élevage non mixte (composé d'une seule espèce animale).

Sur les 15 élevages étudiés, 10 élevages étaient mixtes et 5 élevages non mixtes.

L'analyse statistique n'a montré aucune différence statistique ($p > 0,05$) entre les deux types d'élevages en utilisant les deux tests sérologiques, ce qui signifie que le type d'élevage n'est probablement pas un facteur prédisposant de dissémination de la brucellose ovine dans la région.

Tableau 7 : séroprévalence en fonction du type d'élevage par le test du Rose Bengale:

	Nombre total	Nombre positif	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
Élevage mixte	10	4	40% [9.6-70.4]	0.6
Élevage non mixte	5	1	20% [-15.155.1]	

Tableau 8 : séroprévalence en fonction du type d'élevage par le test de Wright:

	Nombre total	Nombre positif	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
Élevage mixte	10	7	70% [41.6- 98.4]	1
Élevage non mixte	5	3	60% [16.1- 100]	

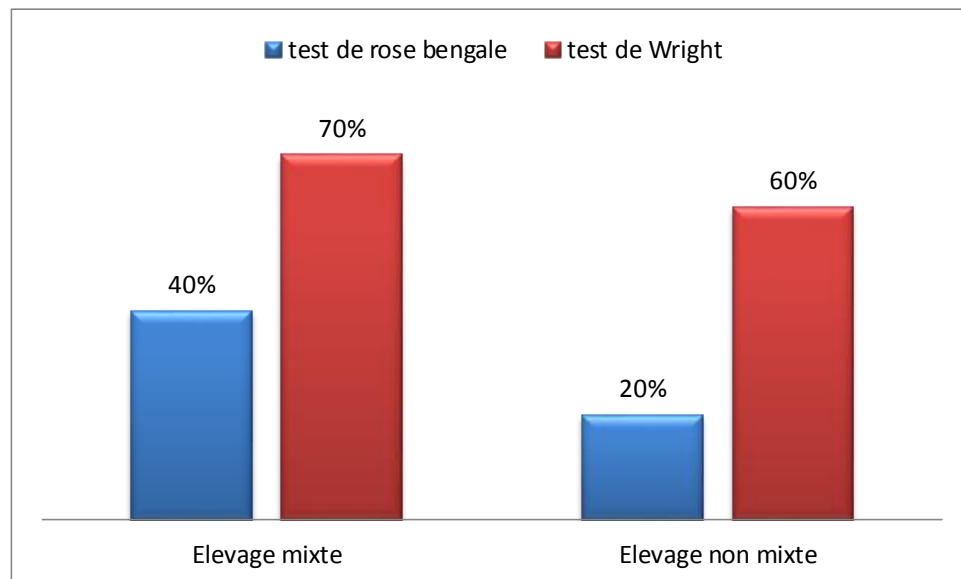


Figure 20 : séroprévalence en fonction du type d'élevage.

La commune :

Ensuite, nous nous sommes intéressés au facteur commune, 76 sérums provenaient de la commune de Ain Ouelmen et 53 sérums de la commune de Ouled Tebben (tableau 9 et 10).

La prévalence de la brucellose ovine en fonction de la région prélevée varie d'une commune à l'autre selon les deux différents tests utilisés. Dans la commune de Ain Ouelmen, les séroprévalences étaient de 10,53% et 13,16% par le test du Rose Bengale et le test de Wright

respectivement. Dans la commune de Ouled Tebben, une séroprévalence de 13,21% et 15,09% a été obtenue par les deux tests respectivement (figure 21).

Tableau 9 : variation de la séropositivité en fonction de la commune par le test du Rose Bengale:

	Nombre total	Nombre des positifs	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
Ain Ouelmen	76	8	10,53% [3.6- 17.4]	0.554
Ouled Tebben	53	7	13,21% [4.1- 22.3]	

Tableau 10 : variation de la séropositivité en fonction de la commune par le test de Wright

	Nombre total	Nombre des positifs	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
Ain Ouelmen	76	10	13,16% [5.6- 20.8]	0,751
Ouled Tebben	53	8	15,09% [5.5- 24.7]	

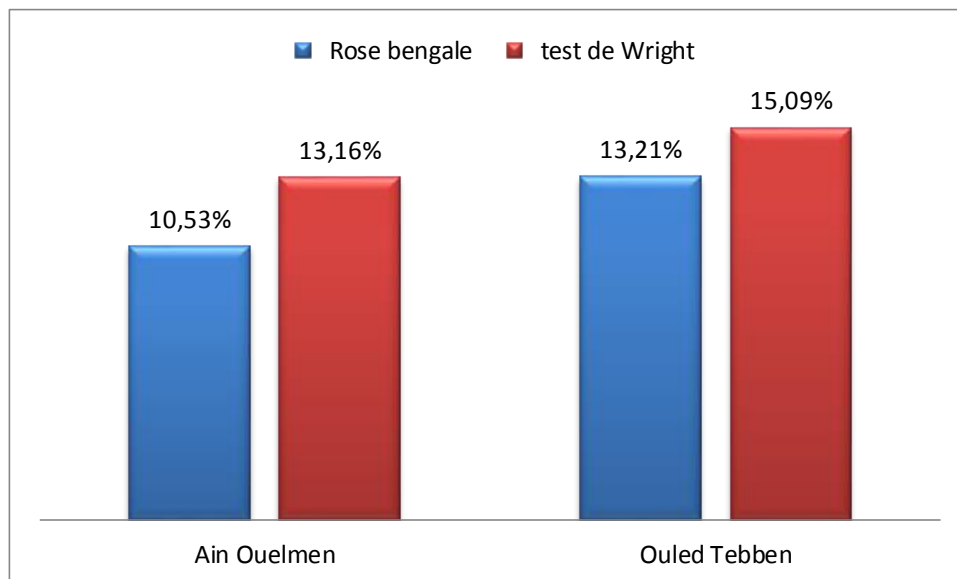


Figure 21 : séroprévalence en fonction de la commune et du test sérologique

Sexe :

Parmi les 129 animaux prélevés, 50 étaient des mâles et 79 étaient des femelles. Les tests sérologiques utilisés ont montré une séroprévalence plus élevée chez les femelles par les deux tests. Cette différence s'est révélée très significative avec le test de Wright (tableau 11 et 12). Ce constat peut signifier que les femelles sont plus à risque que les mâles.

Tableau 11 : variation de séropositivité de la brucellose ovine en fonction de sexe par le test du

Rose Bengale :

	Nombre total	Nombre des positifs	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
Male	50	4	8,00% [0.5-15.5]	0,306
Femelle	79	11	13,92% [6.3- 21.6]	

Tableau 12 : variation de séropositivité de la brucellose ovine en fonction de sexe par le test de

Wright:

	Nombre total	Nombre des positifs	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
Male	50	2	4,00% [-1.4- 9.4]	0.009
Femelle	79	16	20,25% [11.4- 29.1]	

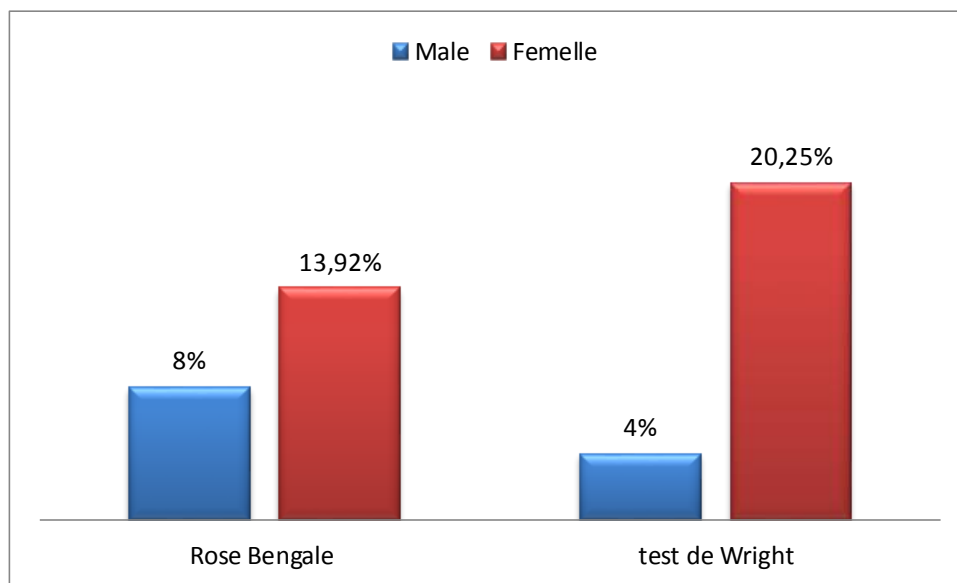


Figure 22 : séroprévalence en fonction du sexe et des deux tests.

Âge:

Pour étudier le facteur âge, nous avons utilisé la classification suivante : <24 mois, 24-36 mois, >36 mois, selon la répartition de Solorio-Rivera, et al en 2007 (tableau 13 et 14).

Parmi les 129 animaux participant à l'étude, 96 étaient âgés de moins de 24 mois, 20 avaient entre 24 et 36 mois et 13 avaient plus de 36 mois (tableau 13 et 14).

La séroprévalence la plus élevée est située dans la tranche d'âge des animaux de plus de 36 mois en utilisant le test du Rose Bengale. En revanche, le test de Wright a montré que les plus jeunes présentaient la plus faible séroprévalence vis-à-vis de *Brucella abortus* (tableau 13 et 14). Ces différences sont statistiquement significatives ($p < 0,05$). Les adultes semblent plus exposés que les jeunes.

Tableau 13 : variation de séropositivité de brucellose ovine selon l'âge des animaux étudiés par le test du Rose Bengale:

	Nombre total	Nombre des positifs	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
< 24 mois	96	7	7,29% [2.1-12.5]	0,017
[24 - 36] mois	20	4	20,00% [2.5-37.5]	
>36 mois	13	4	30,77% [5.7- 55.9]	

Tableau 14 : variation de séropositivité de brucellose ovine selon l'âge des animaux étudiés par le test de Wright:

	Nombre total	Nombre des positifs	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
< 24 mois	96	8	8,33% [2.8- 13.9]	0.006
[24 - 36] mois	20	6	30,00% [9.9- 50.1]	
>36 mois	13	4	30,77% [5.7- 55.9]	

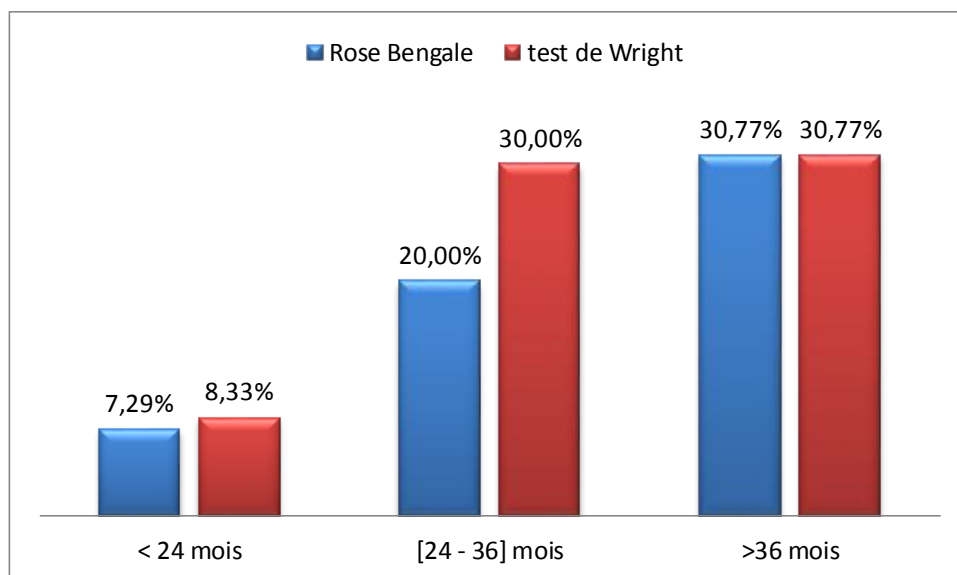


Figure 23 : séroprévalence en fonction de l'âge.

Présence d'avortement :

Parmi les 79 femelles participant à cette étude, 10 ont déjà avorté alors que 69 n'ont jamais avorté. La majorité des cas d'avortement observés se sont déroulés au 1^{er} tiers de la gestation (6 cas), et 3 cas au 2^{ème} tiers de la gestation et un seul cas dans le dernier tiers.

L'analyse statistique n'a montré aucune différence significative ($p > 0,03$) dans la séroprévalence entre les femelles ayant avorté et les femelles n'ayant jamais avorté (tableau 15 et 16) avec l'utilisation des deux tests sérologiques. Il semblerait donc qu'il n'existe pas d'association entre l'infection par *Brucella abortus* chez les brebis et les avortements.

Tableau 15 : Variation de la séropositivité de la brucellose selon la présence d'avortement par le test du Rose Bengale.

	Nombre total	Nombre des positifs	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
Avorté	10	2	20,00 % [-4.8-44.8]	0,623
Non avorté	69	9	13,04% [5.- 21]	

Tableau 16 : Variation de la séropositivité de la brucellose selon la présence d'avortement par le test de Wright:

	Nombre total	Nombre des positifs	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
Avorté	10	4	40,00% [9.6- 70.4]	0.199
Non avorté	69	12	17,39% [8.4- 26.3]	

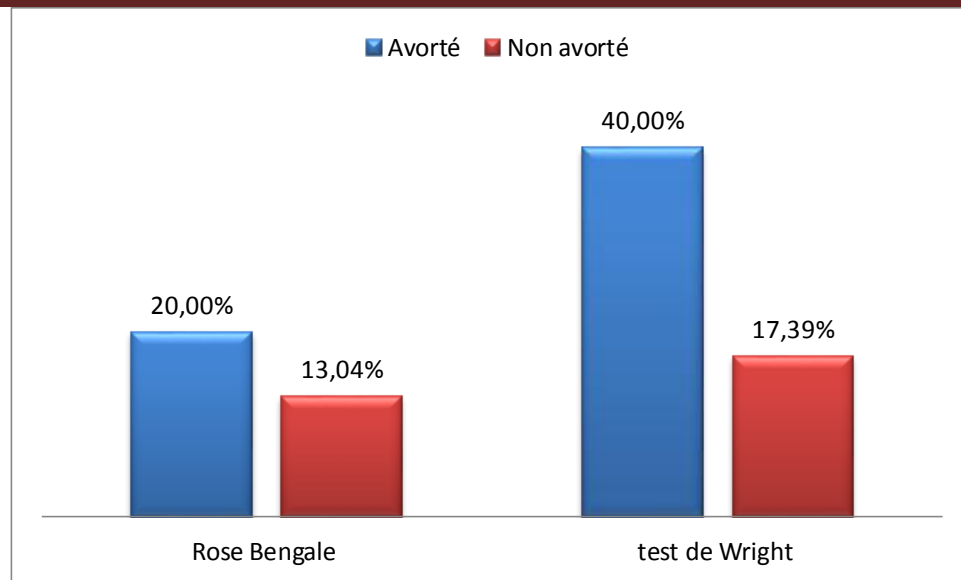


Figure 24 : séroprévalence en fonction des avortements et du test sérologique.

La gestation :

Parmi les 79 femelles prélevées, 22 étaient gestantes et 57 non gestantes (tableau 17 et 18). Les séroprévalences pour ces deux groupes obtenues par les deux tests sérologiques ne montrent aucune différence significative sur le plan statistique ($p > 0,05$), ce qui signifie que la gestation n'influe aucunement sur l'apparition de l'infection par *Brucella abortus* chez les brebis dans notre étude.

Tableau 17 : variation de la séropositivité selon la gestation des femelles par le test du Rose Bengale :

	Nombre total	Nombre des positifs	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
Gestante	22	1	4,55% [-4.2-13.3]	0.168
Non gestante	57	10	17,54% [7.7-27.4]	

Tableau 18 : variation de la séropositivité selon la gestation des femelles par le test de Wright:

	Nombre total	Nombre des positifs	Prévalence P(%) IC (95%)	Valeur P
Gestante	22	3	13,64% [-0.7- 28]	0,534
Non gestante	57	13	22,81% [11.9-33.7]	

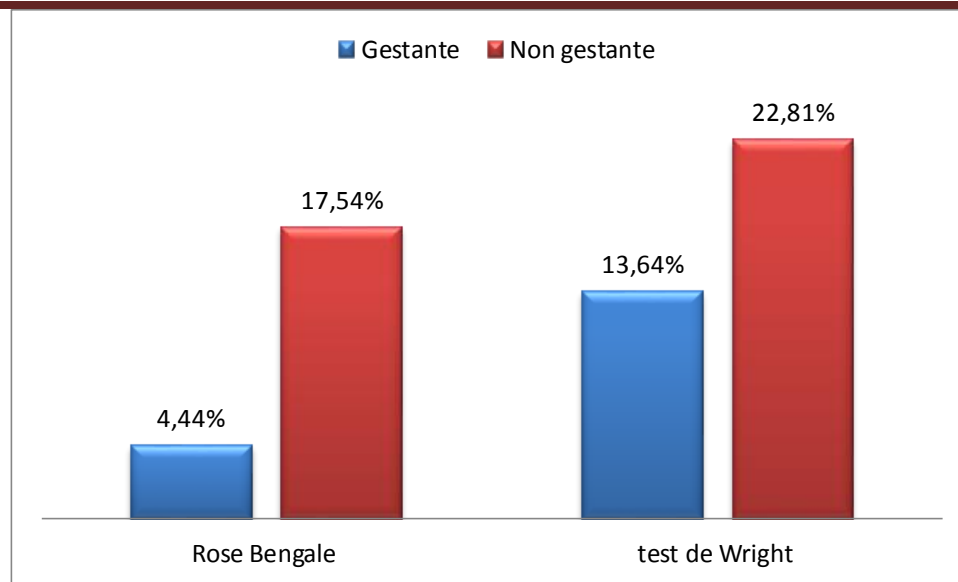


Figure 25 : séroprévalence en fonction de la gestation et du test sérologique.

IV. Discussion :

Notre étude sérologique s'est déroulée au sein du laboratoire des analyses médicales du CHU de Sétif, qui a bien voulu nous accueillir jusqu'à la fin de notre partie expérimentale.

Notre choix s'est porté sur la région Sud-ouest de la wilaya de Sétif et sur l'espèce ovine en raison du manque de données sur le sujet. En effet, notre étude fournit, pour la première fois, des informations sur les séroprévalences et les facteurs de risques susceptibles d'influencer sur les infections par *Brucella abortus* chez l'ovin dans la région.

L'étude réalisée est de type transversal, sur un effectif de 129 ovins dans une région qui en héberge environ 18650 ovins (DSV, Sétif ; 2016), ce qui correspond à un taux d'échantillonnage de 0.70%.

Même si les élevages ont pu être sélectionnés de manière aléatoire, il nous fallait l'accord des éleveurs pour prélever leurs ovins et certains n'ont pas souhaité participer à l'étude. Par conséquent, ceci a créé un certain biais de sélection.

Hormis ces quelques imperfections, inévitables pour toute enquête transversale, nous devons admettre que l'échantillon prélevé lors de cette étude est considéré comme représentatif de la population ovine de la région Sud-Ouest de Sétif.

La collecte des prélèvements sanguin s'est effectuée dans le respect des règles d'hygiène et de conservation de la chaîne du froid, tout au long de l'enquête, depuis la récolte jusqu'à l'acheminement au laboratoire.

Nous avons utilisé comme test de diagnostic, deux tests sérologiques le test du Rose Bengale et le test de Wright tous deux à base d'antigènes de *Brucella abortus* selon les instructions de l'OIE mais aussi selon les disponibilités des kits. Même si le test de fixation du complément est considéré comme étant le test le plus sensible et le plus spécifique, l'épreuve du Rose Bengale reste une méthode très largement utilisée en raison de sa simplicité d'exécution et de son faible coût.

Le protocole utilisé chez le bovin dans le cadre de l'utilisation des épreuves de Wright, la fixation du complément et le Rose Bengale est le même que celui utilisé chez les petits ruminants.

Selon les pays, la Fixation du complément est utilisée comme épreuve principale de dépistage (Chypre) ou comme épreuve complémentaire du Rose Bengale (France). Le test de Wright est encore largement utilisé en dépit du fait qu'il soit considéré comme un test faiblement sensible (Waghela et al ; 1980, Nicoletti ; 1982), en particulier, lors d'une brucellose chronique (Kolar ; 1984), même s'il est utilisé en solution de NaCl à 5% au lieu de 0,85% ou encore avec un antigène de *Brucella melitensis* (Alton ; 1970). Ces trois épreuves, utilisées seules ou simultanément, donnent de bons résultats au niveau du troupeau, mais ne permettent guère d'identifier individuellement plus de 70% des animaux infectés (Nicoletti ; 1982), ce qui explique les difficultés rencontrées dans le dépistage, et par conséquent l'éradication de la maladie.

Concernant le test au Rose Bengale, un large consensus sur l'utilisation de cette épreuve est observé. Ce consensus semble être justifié dans la mesure où le Rose Bengale est un test économique, simple et rapide, donnant peu de faux résultats négatifs ou positifs obligeant à la réalisation du test de fixation du complément de contrôle (ou test de Wright + Fixation de Complément) (Davies ; 1971). Les immunoglobulines responsables de la réaction sont les IgG1 (Corbel ; 1972) comme pour le test de Fixation du Complément, et parfois les IgM en fonction du mode de préparation de l'antigène, Ce test dépiste l'infection plus précocement que le test de Wright (Davies ; 1971).

Le test de Wright, ancêtre des épreuves sérologiques, est toujours largement utilisé. La preuve de son efficacité réside dans le fait que la majorité des pays déclarés indemnes actuellement, l'ont utilisé, associé parfois au test de fixation du complément ou au ring test. Le test de Wright met en évidence les anticorps des classes IgG2 et IgM (Levieux ; 1974). On lui reproche de dépister parfois tardivement les animaux récemment infectés et de ne pas bien détecter l'infection chronique, ou de ne la déceler que par des titres bas en anticorps difficiles à interpréter (Gaumont ; 1965, Nicoletti ; 1969). Cette insuffisance du test paraît particulièrement importante quand on connaît la chronicité habituelle de la maladie.

Des problèmes se posent cependant à propos de l'antigène utilisé dans le test du Rose Bengale. L'antigène actuel, préparé à partir de la souche *Brucella abortus* biovar 99 (A> M) semble mal détecter les anticorps d'infection à *Brucella* (M>A) (*B. abortus* biovar 5, *B. melitensis* biovar 1) (Corbel ; 1985).

Le test de Wright est de plus en plus délaissé depuis que le test Rose Bengale existe. Cela semble assez justifié puisque le test du Rose Bengale et la fixation du complément se sont révélés plus sensible et plus spécifique. Cependant, d'une façon curieuse, on observe un certain conservatisme pour l'épreuve de Wright, le plus souvent dans les pays qui ont terminé leur éradication après l'avoir employée régulièrement, mais associé à la fixation du complément et au Ring Test (Fensterbank ; 1986).

Les taux de séroprévalence calculés par le test du Wright dans cette étude, ne sont que des estimations approximatives. En effet, le test est considéré comme peu sensible pouvant ne pas détecter certains animaux infectés.

En effet, d'après les travaux de Garin-Bastuji en 2004, la spécificité du test Rose Bengale est estimée à au moins 99.95 % dans toute situation, alors que la sensibilité est estimée à 70-80% en moyenne et elle dépend exclusivement de la situation épidémiologique de la maladie. Le test du Rose Bengale s'est toutefois avéré plus sensible dans les pays où la maladie est contrôlée, car étant un test assez précoce, il détecte bien les nouveaux infectés (Garin-Bastuji ; 2004).

Une étude réalisée par Mac Millan en 2002, sur la validité du test Rose Bengale pour le dépistage de la brucellose chez les petits ruminants a montré que les antigènes utilisés, standardisés pour le dépistage de *Brucella abortus* chez les bovins, ne sont pas adaptés à la détection de *Brucella melitensis* chez les petits ruminants, et que la sensibilité de ce test est donc bien moindre chez ces derniers.

Les résultats sérologiques faussement positifs causés par *Yersinia enterocolitica* O: 9 peuvent affecter jusqu'à 15% des troupeaux bovins dans les régions exemptes de brucellose (Muñoz et al; 2005).

Des résultats faussement négatifs ont également été observés dans le diagnostic sérologique de la brucellose. Ils surviennent principalement en raison du fait que la réponse des anticorps dépend du stade de l'infection lors de la collecte des échantillons (Carpenter ; 1975).

1. Comparaison entre les deux tests :

Dans ce travail, les performances du test de Wright ont été évaluées par le calcul de la sensibilité, la spécificité, l'exactitude relative, le coefficient Kappa de Cohen et le test de Mc Nemar, par rapport au test du Rose Bengale pris comme test de référence. Globalement, le test du Wright a montré une bonne spécificité de 89,4%, une faible sensibilité de 40% et une exactitude de 91.47%, comparée au test du Rose Bengale.

Selon Gardner et al en 2000, cette faible sensibilité de test de Wright pourrait être attribuée aux facteurs biologiques (stade d'infection, altération des prélèvements) et au non-respect des principes de lecture.

Dans cette étude, le calcul de la concordance entre les deux méthodes par l'utilisation du test de Kappa de Cohen a montré une valeur de $k=0,37$ ce qui correspond à une faible concordance ce qui est à mettre en relation avec le fait que l'épreuve au Rose Bengale détecte principalement les anticorps de type IgG par rapport au test de Wright qui détecte plutôt les anticorps agglutinant de type IgM (Jiksa, 2003). Cette hypothèse a également été soutenue par d'autres travaux (Yilkal, 1998 ; Abay, 2000 ; Jiksa, 2003).

L'exactitude est supérieure à 90% ce qui signifie qu'une grande proportion des résultats sont exacts. Les résultats obtenus dans cette étude peuvent être comparés avec tous les résultats publiés qui rapportent également une faible sensibilité du test de Wright pour la détection de *Brucella abortus* chez des ovins comparés au test du Rose Bengale (Jiksa, 2003).

Le test de Wright s'avère avoir de VPP faible, mais de VPN élevée. Ces résultats s'expliquent par le nombre important de faux positifs engendré par ce test. Sibille en 2006, dans une étude épidémiologique sur la brucellose bovine a également trouvé que la VPP diminuait lorsque la prévalence est faible.

Le test de Wright a donné une bonne valeur de VPN= 91.89%. Ainsi, un animal, dont le test est négatif par le test de Wright, aura donc en réalité une probabilité proche de 92% de ne pas avoir réellement la brucellose. La valeur VPP= 33.33% étant faible, signifie qu'un animal montrant un résultat positif au test de Wright, aura en réalité une probabilité proche de 35% d'avoir réellement la brucellose.

2. Séroprévalence individuelle et au niveau du troupeau:

Au cours de notre étude nous avons obtenu une séroprévalence individuelle apparente de 11.62% (IC 95% (5,5-16.5)) par le test du Rose Bengale et de 13.95% (IC 95% 13.95% (7-18.9)) par le test

de Wright. La séroprévalence au niveau du troupeau a été de (66.6%) par le test de Wright, taux plus élevé que celui obtenu par le test du Rose Bengale (33.3%) dans les 15 élevages prélevés.

Si on compare nos résultats sur les séroprévalences, nous remarquons que dans la région Ouest en Algérie, Boudilmi et al en 1990, rapportent un taux d'infection de 2% dans les populations ovine et caprine, dans la même année Mehemeli retrouve un taux de 16.38% dans une enquête effectuée sur un foyer de brucellose ovine à Constantine.

D'autre part, dans l'Est algérien en 1987, les résultats du dépistage sérologique de la brucellose donnent un taux de 0,29% chez les ovins. Cette étude a été élargie à trois autres wilayas (Constantine, Sétif et Oum el Boughi) où le taux de prévalence était de 0% pour les deux wilayas Constantine et Sétif, cependant elle est de 1.58% à Oum el Boughi (Mehemli et Bendjazia ; 1990).

En 2009, Fordjen et collaborateurs ont réalisé une étude préliminaire sur la séroprévalence de la brucellose ovine dans la région limitrophe entre les wilayas de M'sila et Bouira, un taux de prévalence individuelle de 4% a été obtenu et un taux de 10.51% a été rapporté au niveau du troupeau.

Une enquête nationale menée par les services vétérinaires en 2000, chez les petits ruminants révèle un taux de 3,36% pour les ovins (Benbernou et al ; 2004). Ces taux sont plus faibles comparés au taux retrouvé dans cette étude.

Djadi et al en 2011 retrouvèrent une séroprévalence individuelle de 27.77% et 64.51% de prévalence dans les élevages de la région d'Alger, ces taux sont assez importants par rapport au taux retrouvé dans notre étude.

En Tunisie, l'année 1991 a connu l'une des plus grandes explosions de la brucellose chez les petits ruminants. Le premier foyer a été signalé à Gafsa, où la séropositivité a atteint 61% chez les chèvres et 30% chez les ovins. Les enquêtes réalisées en 1992 ont montré que les pourcentages de séropositivité étaient de 4% chez les ovins (Refai, et al ; 2002).

Au Maroc, la brucellose a été établie dans les provinces orientales le long des frontières algériennes. Une prévalence au niveau du troupeau a atteint 12% et une prévalence individuelle de 2,4% a été signalée chez les ovins (Benkirane ; 2004 et 2006).

En Égypte, Rafai en 1989 a rapporté une prévalence de 1.78% chez les ovins et Ibrahim en 1996 a testé des échantillons de sérums provenant de porcs, il a obtenu un taux de 29.2% par le test de Wright et 29% par le test du Rose Bengale, taux supérieurs à ceux montrés dans notre étude en utilisant les deux tests. Toujours en Égypte, Hamoda et Montasser en 1998 ont évalué différents tests sérologiques dans le diagnostic de la brucellose chez les ânes. Ils ont testé des sérums de 258

ânes récoltés dans des régions où la brucellose a été signalée chez les ruminants. Le test de Wright a été positif à 7,3%, le test du Rose Bengale à 10,2%, et le test cELISA à 7,3%. Des études menées dans le gouvernorat d'Assiut par Montasser et al en 1999, chez les équidés ont montré que le test de Wright était le plus sensible chez les équidés et a révélé une séroprévalence de 20,61%, 5,88% et 71,42% chez les ânes, les chevaux et les mulets, respectivement.

En Érythrée, Omer et al en 2000, ont prélevé des échantillons de 104 moutons testés pour les infections à *Brucella spp* par le test Rose Bengale. Dans les Basses-Terres orientales, une prévalence individuelle de 1,4% a été rapportée, taux beaucoup plus faible que celui obtenu dans notre étude.

En Libye, la brucellose était particulièrement répandue chez les troupeaux des petits ruminants, en particulier dans la zone des montagnes Ouest et la bande côtière Ouest. L'examen sérologique de la brucellose effectué par El Sanousi et Omer en 1985 sur des sérums recueillis auprès de 3753 vaches à Benghazi à l'aide des tests du Rose Bengale, de la fixation du complément et des tests de Wright a révélé une réactivité globale de 0,3%. Un total de 8607 animaux a été examiné pour la détection de la brucellose en utilisant le test de Wright ainsi que la fixation du complément. Le pourcentage de séropositivité était de 1,45% par le test de Wright et de 1,82% par la fixation de complément (Aboudaya, 1986). Gameel et al en 1993 ont testé des sérums de 967 chameaux des deux sexes pour la recherche des anticorps dirigés contre *Brucella* en utilisant le test du Rose Bengale, le test Wright et la fixation de complément. La prévalence globale des sérums positifs était de 4,1%.

En Somalie, une enquête sur la prévalence de la brucellose bovine a été réalisée pour la première fois par Wernery et al en 1979. Les sérums sanguins ont été testés par le test de Wright et la fixation du complément. Un taux moyen de prévalence de 9,5% a été trouvé par le test Wright. Ostanello et al en 1999 ont indiqué que, dans le nord de la Somalie, des sérums provenant d'ovins et de caprins exportés vers les pays du Golfe sont systématiquement contrôlés par les équipes vétérinaires locales pour détecter la présence de brucellose. Le test standard utilisé est le Rose Bengale et les animaux séropositifs ne sont pas exportés.

Au Soudan, El-Ansary et al en 2001 ont étudié la fréquence relative de la brucellose chez les animaux domestiques dans l'État de Kassala en 1999 et ont comparé les résultats d'études antérieures depuis 1908. L'enquête sérique pour *B. melitensis* et *B. abortus* a été effectuée sur des sérums d'animaux amenés pour l'abattage à l'abattoir de Kassala et sur les sérums de contacts professionnels d'animaux. Un total de 1038 sérums a été testé par le Rose Bengale. Les sérums positifs ont été confirmés par le test de Wright. 4% des sérums de caprins, 1% des sérums des ovins et 5% des sérums de bovins ont été jugés positifs. Sur les 64 sérums camelins testés, aucun n'était sérum

positif. Une autre étude menée par Osman¹ et Abdelgadir en 2012, a révélé que la prévalence globale de la Brucellose ovine dans l'Etat de Khartoum était de 0,74% par le Rose Bengale et le test de Wright. Tous les résultats du test cELISA ont été négatifs. Ces résultats sont plus faibles que ceux retrouvés dans notre étude.

Au Yémen, des sérums de 690 ovins ont fait l'objet d'un dépistage de la brucellose par le test du Rose Bengale et les positifs sont confirmés par la fixation du complément et le test de Wright qui montrent une prévalence de 0.4% (Hosie et al ; 1985).

3. Les facteurs de risques :

La connaissance des facteurs de risques susceptibles d'influencer positivement ou négativement la prévalence d'une maladie est nécessaire pour une bonne compréhension de son épidémiologie, ainsi que leurs implications en termes de stratégies de contrôle adaptées aux conditions locales.

Aucune différence significative n'a pu être démontrée entre la séropositivité vis-à-vis de *Brucella abortus* et le type d'élevage, même si la prévalence des élevages mixtes (40% par le test de Rose Bengale et 70% par le Wright) semble être supérieure comparée aux élevages non mixtes (20% par le Rose Bengale et 60% par le Wright). Ce constat peut signifier que le type d'élevage n'est pas un facteur prédisposant pour une infection brucellique chez les ovins.

Notre résultat semble s'opposer à celui de Lounes et al en 2007 qui montrent que l'élevage mixte est un facteur prédisposant de la brucellose.

Dechicha et al en 2003 rapportent à Blida, que 81,25% des élevages séropositifs, sont des élevages mixtes associant plusieurs espèces animales dans une même étable.

Philippon et al, 1972, Verger et al, 1989 en France, Abela en 1999 à Malte et Kabagamb et al, 2001 en Ouganda, rapportent que lorsque la prévalence de la brucellose est faible chez les bovins, elle est élevée chez les petits ruminants; les élevages mixtes constituent ainsi un risque pour les bovins. Même si *B. melitensis* infecte préférentiellement les caprins, elle se transmet très facilement aux bovins (Godfroid et al ; 2003, FAO/OMS ; 1971).

Si nous considérons le facteur région, nous remarquons que la séroprévalence de la brucellose ovine varie d'une commune à l'autre selon les deux tests utilisés. En effet, la commune de Ouled Tebben présente une séropositivité de 13,21% et 15,09% en fonction des tests, taux supérieurs à ceux obtenus dans la commune de Ain Ouelman (10,53% et 13,16% par les deux tests utilisés).

Dans une enquête menée dans la wilaya de M'Sila par Lounes et al en 2007, la prévalence du cheptel était de 3,43%, taux est plus faible comparé aux taux obtenus dans notre étude.

Benbernou et al en 2004 montrent une variation du taux d'infection d'un département à l'autre et d'une région à l'autre dans une enquête réalisée sur la brucellose chez les petits ruminants dans tout le territoire national.

Les deux tests utilisés dans cette étude montrent que les femelles sont plus affectées par la brucellose que les mâles, cela confirme les résultats obtenus par Lounes et al en 2007 dans la région centre du pays.

Toutefois, les analyses statistiques utilisées dans notre travail ne montrent pas un effet prédisposant du sexe par le test de Rose Bengale, par contre, l'effet est confirmé par le test de Wright.

Brisibe et al 1996 au Nigeria, Koutinhoun et al 2003 au Benin et Faye et al 2005 en Ouganda rapportent que l'infection est plus élevée chez les femelles que chez les mâles chez les espèces bovine, caprine et ovine. En revanche, Akakpo et al 1981 et 1984 au Togo et au Benin soutiennent que l'influence du sexe n'est pas nette, bien que les femelles accusent un taux d'infection légèrement plus élevé.

La littérature rapporte que les femelles, surtout gestantes, sont les plus sensibles. Les mâles sont également sensibles bien que certains chercheurs soutiennent qu'ils soient plus résistants à l'infection que les femelles (Acha, Szyfres ; 1989 et 2005). Aucune étude en conditions contrôlées n'a montré que les mâles soient plus résistants que les femelles, bien que cela ait été suggéré par Nicoletti (1980) (Godfroid, et al ; 2003).

Dans notre étude tous les mâles prélevés ne présentaient aucun signe d'orchite.

Chez les mâles, les orchites semblent être rares mais quand elles existent, elles sont retrouvées beaucoup plus chez l'espèce ovine, l'origine brucellique est moins évoquée que les autres, néanmoins elle est soupçonnée par 30,5% des vétérinaires interrogés. Ce qui nous mène à nous interroger quant à l'existence de l'épididymite contagieuse du bélier à *B. ovis* qui n'a pas été étudiée jusqu'à ce jour dans notre pays ; et qui a été retrouvée dans les pays voisins : en Italie par Gennero et al, 2005 et en France par Dolley et al en 1982.

Dans notre étude, les animaux âgés (adultes) se sont montrés plus exposés par l'infection à *B. abortus* que les jeunes ovins, l'âge jouerait-il un rôle dans l'exposition brucellique ? peut-on le considérer comme un facteur prédisposant de la brucellose ovine ?. Les mêmes résultats ont été obtenus par Lounes et al en 2007 dans la région centre du pays.

Ceci rejoint les observations de Koutinhoun et al 2003 au Benin, Akakpo et al en 1981, 1984, 1987 au Togo et au Benin, Faye et al, 2005 en Ouganda où les adultes étaient plus atteints que les jeunes. Ils soutiennent que plus l'animal vieillit, plus le risque est grand d'être contaminé, de le demeurer et

d'être contagieux et que donc la prévalence de la brucellose augmente en général avec l'âge. Plus l'animal vit longtemps dans un milieu infecté plus grand sont les risques qu'il a de s'infecter. La brucellose peut être considérée comme une maladie des adultes (Crespo Léon et al ; 2003).

La littérature explique que les jeunes animaux pré-pubères qui sont infectés par la brucellose ne sont pas détectés par les méthodes sérologiques car le taux d'anticorps est très faible et ne devient détectable qu'après la première gestation (Garin-Bastuji ; 2003). Ce qui peut expliquer le faible taux d'animaux jeunes détectés.

L'association entre l'âge et la séropositivité à *Brucella* provient probablement d'animaux plus âgés ayant eu une plus grande possibilité cumulative d'exposition à l'organisme que les animaux plus jeunes. Cependant, le manque d'anticorps sériques n'indique pas nécessairement une non-exposition à l'organisme, car il peut être difficile de détecter l'infection par des moyens sérologiques seuls, chez des troupeaux infectés depuis longtemps (Shuterland et Mackenzie ; 1983). Selon ces auteurs, les animaux avec une infection de longue durée restent sérologiquement négatifs à la suite du catabolisme des anticorps avec le temps.

En effet, si l'animal jeune impubère est bien réceptif, sa sensibilité à l'infection est nulle, la maladie n'étant jamais exprimée durant cette période. En revanche, la période post pubère, notamment chez l'animal gestant, est la période de sensibilité maximale (Garin-Bastuji ; 1993). Les jeunes mâles et femelles âgés de moins de six mois ne sont pas très sensibles et ne connaissent généralement qu'une infection passagère (Acha et Szyfres ; 1989 et 2005).

Plommet et al en 1973, explique que tout se passe comme si une forte stimulation antigénique dès la naissance, éventuellement entretenue par l'infection ou renforcée par un rappel antigénique, permettait à l'organisme de renforcer ses défenses cellulaires et se débarrasser de l'infection avant que le développement de la mamelle et du placenta, pendant la gestation, ne crée des conditions favorables pour le réveil d'une infection latente.

Enfin, si on prend en considération le problème d'avortement chez les animaux, on constate d'une façon surprenante que dans notre étude, les antécédents d'avortement dans l'élevage n'est pas un facteur de risque pour la propagation de la maladie.

Sfaksi et al en 1990 dans l'Est du pays démontrent dans deux enquêtes épidémiologiques, que la brucellose a une très faible prévalence par rapport aux autres causes d'avortements infectieux, et qu'elle ne pouvait être la cause principale des avortements contrairement aux autres régions du pays (Est et Sud).

En 1991, en Tunisie, une enquête menée chez les petits ruminants, où la séropositivité a atteint 61% chez les chèvres et 30% chez les ovins. Chez les troupeaux positifs, 15 à 20% des femelles ont avorté (Refai, et al ; 2002).

Benkirane et al en 1990 au Maroc rapportent les mêmes observations chez les ovins.

Des études faites en France, dans les années 80, démontrent que la brucellose n'est pas la première cause des avortements infectieux chez les petits ruminants (Sanchis ; 1982 ; Nicolas et Lamachère ; 1984).

Benbernou et al en 1990 rapportent un taux plus faible qui est de 0,85% chez les petits ruminants.

Al-Majali et al, 2005 et Al-Talafhah et al, 2003 en Jordanie, retrouvent des taux très élevés des avortements dans les élevages brucelliques. Darwish et Benkirane ; 2001 en Syrie, rapportent un taux entre 6,25 à 56% de séropositivité de la brucellose par rapport aux avortements.

Des études séro-épidémiologiques sur la brucellose chez les petits ruminants ayant des antécédents d'avortement dans la province de Kars en Turquie ont été réalisées par Aslantas et Babur (2000) 2,9% de 103 ovins étaient positifs.

La gestation est un facteur sensible pour la brucellose animale (Ganiere ; 2002), bien que dans nos résultats, nous n'avons pas trouvé de différence significative. Notre constat est appuyé par les résultats obtenus dans d'autres travaux publiés par Djadi et al en 2011 dans la région d'Alger.

Conclusion et recommandation

Conclusion et recommandations :

Le travail entrepris a permis de montrer que les tests de dépistage sérologiques sont des outils indispensables pour la prise de décisions sanitaires dans la lutte contre la brucellose. En effet, cette maladie revêt un enjeu particulier car les risques économiques et sanitaires sont énormes pour le cheptel ovin en Algérie. Les outils de dépistage et de diagnostic font partie intégrante de la lutte contre les maladies réglementées, autant dans une optique offensive que dans une optique défensive. L'estimation des risques d'erreur des tests et de leurs associations ont permis d'élaborer un programme de contrôle et d'éradication en zone de faible prévalence.

A l'instar de toutes les études menées dans ce sens, nous avons tenté de démontrer, tout au long de cette étude, la limite des performances de détectabilité du test de Wright dans le diagnostic de la brucellose ovine en faveur de l'épreuve du Rose Bengale.

En effet, la présente étude a révélé les insuffisances du test de Wright qui s'avère d'une faible sensibilité (40%) comparé au test du Rose Bengale, d'autre part ce test présente une spécificité élevée de 89,4%. La concordance entre les deux tests s'est révélée assez. L'analyse statistique réalisée par le test de Mc Nemar n'a pas montré des résultats significativement différents entre les deux tests.

Le test de Wright a donné une valeur prédictive négative de 91.89% et une valeur prédictive positive de 33.33%.

Dans notre étude, nous avons montré que les deux communes étudiées sont exposées à la maladie. La séropositivité individuelle apparente était de 11.62% par le test de Rose Bengale et 13.95% par le Wright.

Le type d'élevage, la provenance des animaux, les antécédents d'avortement et la gestation ne semblaient pas être des facteurs prédisposant à la brucellose d'après les résultats obtenus par les deux tests, mais la taille de l'échantillon dans notre étude limite la précision de nos résultats.

Le test de Wright a montré que le sexe est un facteur de risque ($P= 0.009$) pour cette maladie, les femelles sont les plus touchées et il ne l'est pas pour l'épreuve au Rose Bengale.

Tandis que, l'analyse par les deux tests de la séropositivité de différentes classes d'âges montre que les animaux âgés sont plus touchés par rapport aux jeunes. $P= 0,017$, $P= 0.006$ par le Rose Bengale et le test de Wright respectivement.

Le dépistage systématique des animaux pour la brucellose est très important car il permet de détecter les cas positifs aussitôt que possible afin de réduire le risque de contamination à d'autres

animaux du troupeau et de prendre les mesures appropriées à temps. Des tests de dépistage systématiques devraient être mis en place dans les établissements de santé, car le contact humain et animal est élevé.

En raison du caractère peu spécifique de l'aspect clinique et des possibilités de réactions croisées durant la pratique de la sérologie, le diagnostic individuel devrait être amélioré par :

- L'utilisation de techniques plus élaborées de diagnostic telles que le diagnostic biologique par l'isolement de la bactérie (hémoculture, PCR...).
- L'équipement de laboratoires habilités à cette fin.
- L'épreuve systématique à tout sérum positif à plusieurs tests afin de détecter d'éventuelles réactions croisées dues à d'autres bactéries.
- La généralisation de l'utilisation de techniques plus fiables avec des sensibilités et des spécificités plus élevées telle que, l'ELISA, la Fixation de Complément ...

Dans les exploitations infectées, les propriétaires doivent être avertis de la nécessité de faire bouillir le lait avant de le consommer, ainsi que de faire cuire et rôtir les viandes provenant d'animaux cliniquement et sérologiquement positifs.

Références

Les références

- Abay, B. Bovine brucellosis a seroepidemiological study in selected farms and ranches in southeastern Ethiopia. DVM Thesis, Faculty of Veterinary Medicine (FVM), Addis Ababa University (AAU), Debre zeit, Ethiopia. (2000).
- Abela, B., Epidemiology and control of brucellosis in ruminants from 1986 to 1996 in Malta. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 18, 3, (1999), 648-659.
- Aboudaya, M.A., An evaluation of diagnostic methods for bovine brucellosis in Libya. Int. J. Zoonoses., 13, (1986), 282–286.
- Acha, N. & Szyfres, B., Zoonoses et maladies transmissibles commune à l'homme et aux animaux, Volume I; bactérioses et mycoses, 3ème édition, O.I.E., Paris. (2005), 26-52.
- Acha, P.N, Szyfres, B., Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Volume I; bactérioses et mycoses, 3ème édition, Paris. Office international des epizooties, 2005, 378.
- Acha, P.N., Szyfres, B. Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, Deuxième édition. O.I.E., Paris, (1989), 14-38.
- AFSSA, Bulletin épidémiologique N°17, (trimestriel juin 2005) <http://www.afssa.fr/Ftp/Afssa/33675-33676.pdf>
- Agranovich I, Scott DE, Terle D, Lee K, Golding B. Down-regulation of Th2 responses by Brucella abortus, a strong Th1 stimulus, correlates with alterations in the B7.2-CD28 pathway. Infect Immun. 67, (1999), 4418–4426.
- Akakpo, A. J., Bornarel, P., d'Almeida, J. F. Avec la collaboration technique de Dieng, M. & Sene, M., Épidémiologie de la brucellose bovine en Afrique tropicale ; enquête sérologique en République Populaire du Benin, Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop, 37, 2, (1984), 133-137.
- Akakpo, A. J., Chantal, J., Bornarel, P. La brucellose bovine au Togo, Revue Méd. Vét., 132, 4, (1981), 269-278.
- Akakpo, A.J., Bonarel, P., Épidémiologie des brucelloses animales en Afrique tropicale: enquêtes cliniques, sérologiques et bactériologiques. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 6, (1987), 981-1027.
- Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H., The detection of Brucella spp. using PCR-ELISA and real-time PCR assays. Clin. Lab. 50, (2004), 387-94.
- Al Dahouk, S., Nöckler, K., Scholz, H.C., Pfeffer, M., Neubauer, H., Tomaso, H. Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of Brucella spp. Clin. Chem. Lab. Med. 45, (2007), 1464–1470.
- Aldomy, F.M., Abu-Ragheb, A., Country reports. Brucellosis Information Workshop, Ramallah, 1999. 19–20
- Al-Majali, A. M., "Seroepidemiology of caprine Brucellosis in Jordan". Small Ruminant Research, 58, (2005), 13–18.
- Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, Godfroid J, Walravens K, Letesson JJ., Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of Brucella spp. Infect Immun. 62, (2001), 64–70.
- Almeida LA, Macedo GC, Marinho FA, Gomes MT, Corsetti PP, Silva AM, et al. Toll-like receptor 6 plays an important role in host innate resistance to Brucella abortus infection in mice. Infection Immun. 16, 2013, 54–62.

- Al-Talafhah, A. H., Lafi, S. Q. & Al-Tarazi, Y., "Epidemiology of ovine brucellosis in Awassi sheep in Northern Jordan". Preventive Veterinary Medicine, Vol 60, Issue 4, (2003), 297-306.
- Alton G. G., Caprine brucellosis, FAO/WHO expert committee on brucellosis, Doc. BRUC/WP/707. (1970).
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM., Techniques for the brucellosis laboratory. 1st edition. Paris; Institut National de la Recherche Agronomique. 1988.
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. PNAS., 2005.92-102,47–52
- Andrews E, Salgado P, Folch H, Onate A. Vaccination with live Escherichia coli expressing Brucella abortus Cu/Zn superoxide-dismutase; II. Induction of specific CD8+ cytotoxic lymphocytes and sensitized CD4+ IFN-gamma-producing cell. Microbiol Immunol.50, 2006, 389–393.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A.E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyon, I., and Gorvel, J.P., Cyclic beta-1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival. Nat Immunol.(2005). 618-625.
- Aslantas, O., Babur, C., Seroepidemiologic studies on brucellosis and toxoplasmosis in sheep and cattle in Kars province. Etlik. Vet. Mikrobiyol. Dergisi.11, (2000), 47–55.
- Aydin, N., Bisping, W., Akay, O., Izgur, M., Kirpal, G., The occurrence of bovine brucellosis in Turkey and estimation of the immunizing effects of two vaccines. Berlin Munch. Tierarztl. Wochensh.101, (1988), 109–113.
- Baddour M. M, Diagnosis of Brucellosis in Humans: a Review, J Vet Adv,2(4), (2012), 149-156
- Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., Stoker, N.G., Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg. (1992).95, 271–275.
- Baldwin CL, Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria Brucella: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection. CritRev Immunol. 26, (2006), 40–42
- Baldwin CL, Jiang X, Fernandes DM. Macrophage control of Brucella abortus influence of cytokines and iron. Trends Microbiol .1, (1993), 99–104.
- Baloglu S, Boyle SM, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Schurig GG, Toth TE. Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either Listeria monocytogenes partial listeriolysin or Brucella abortus ribosomal L7/L12protein. Vet Microbiol.109, (2005), 11-17.
- Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, et al. Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. PLOS ONE, (2007). 15-18.
- Barquero-Calvo E, Martirosyan A, Ordóñez-Rueda D, Arce-Gorvel V, Alfaro-Alarcon A, Lepidi H. Neutrophils exert a suppressive effect on Th1 responses to intracellular pathogen Brucella abortus. PLoS Pathogens (2013). 12-20
- Barrett GM, Rickard AG., Chronic Brucellosis. Quart. J. Med.22(85), (1953), 23-42.
- Barrio M.B., Grilló M.J., Muñoz P.M., Jacques I., Gonzalez D., De Miguel M.J., Marín C.M., Barberán M., Letesson J.J., Gorvel J.P., Moriyón I., Blasco J.M. & Zygmunt M.S. Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less

- effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep Vaccine, 27, (2009), 1741–1749.
- Bellaire, B.H., Elzer, P.H., Hagius, S., Walker, J., Baldwin, C.L. and Roop II, R.M. Genetic organization and iron-responsive regulation of the *Brucella abortus* 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis operon, a cluster of genes required for wild-type virulence in pregnant cattle. Infect. Immun. 71, (2003), 1794-1803.
 - Benbernou, A., Ouadahi, F., Kassab, A. & Bouzoudja, F., "enquête brucellose chez les petits ruminants", Atelier maladies abortives des petits ruminants, 28 juin 2004-Alger.
 - Benhabyles, N., "La brucellose: donnees fondamentales", R.E.M., vol III, N°2, INSP, (1992).
 - Benkirane, A., "La brucellose des petits ruminants au Maghreb et au Moyen Orient: situation actuelle et perspectives", Atelier maladies abortives des petits ruminants, 28 juin 2004-Alger.
 - Benkirane, A., Jabli, N. & Rodalakis, A., "Fréquence d'avortement et séroprévalence des principales maladies infectieuses abortives avine dans la région de Rabat (Maroc)". Ann. Rech. Vét., 21, (1990), 267-273.
 - Blasco J.M. A review on the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. Prev. Vet. Med. 31, (1997), 275–283.
 - Bogdanovich, T., Skurnik, M., Lubeck, P.S., Ahrens, P., Hoorfar, J., Validated 5' Nuclease PCR Assay for rapid identification of the genus *Brucella*. J. Clin. Microbiol. 42, (2004), 2261–2263.
 - Bohin, J.P. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. FEMS Microbiol Lett 186, (2000), 11-19.
 - Boudilmi, B., Chalabi, N. & Mouaziz, A., "Brucellose animale et humaine dans l'ouest algérien. Quelques résultats bactériologiques et sérologiques", Séminaire sur les Brucelloses, Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.
 - Boukerrou, A., "Résultats préliminaires d'une enquête séro-épidémiologique sur la brucellose bovine en 1988, Séminaire sur les Brucelloses, Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.
 - Brandao AP, Oliveira FS, Carvalho NB, Vieira LQ, Azevedo V, Macedo GC. Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN-gamma knockout than IL-12/beta2-microglobulin double-deficient mice. Clin Develop Immunol (2012). 422–485
 - Bricker, B.J., PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet. Microbiol. 90, (2002), 435–446.
 - Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P.S., and Ugalde, R.A. *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. Infect Immun 69, (2001), 4528-4535.
 - Brisibe, F., Nawathe, D. R. & Bot C. J., "Sheep and goat brucellosis in Borno and Yobe states of arid northeastern Nigeria", Small Ruminant Research, Vol 20, Issue 1, (1996), 83-88.
 - Cabrera A, Saez D, Cespedes S, Andrews E, Onate A. Vaccination with recombinant Semliki Forest virus particles expressing translation initiation factor 3 of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. Immunobiology. (2009) 23-59

-
- Campos MA, Rosinha GM, Almeida IC, Salgueiro XS, Jarvis BW, SplitterGA, et al. Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infection Immun.*72, (2004),76–86.
 - Casañas MC, Queipo-Ortuño MI, Rodriguez-Torres A, Orduña A, Colmenero JD, Morata P. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (2001), 127-131.
 - Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. and Gorvel, J.P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*198, (2003), 545-556.
 - Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE, Stevens MG, Palmer MV, Florance AM. Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am J Vet Res.*57, (1996), 1153–1156.
 - Cheville NF, Stevens MG, Jensen AE, Tatum FM, Halling SM. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res*, 54, (1993), 1591–1597.
 - Ciril C, Wieser A, Yadav M, Duerr S, Schubert S, et al. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat. Med.*14, (2008), 399– 406.
 - Cloeckaert A, Grayon M, Verger JM, Letesson JJ, Godfroid F. Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp. *Res. Microbiol.*151(3), (2000), 209-216.
 - Cloeckaert, A., Grayon, M., Grepinet, O., An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*7, (2000), 835–839.
 - Comerici, D.J., Martinez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P. and Ugalde, R.A. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell. Microbiol.*3, (2001), 159-168.
 - Comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose, "cinquième rapport", OMS, Genève, (1971), 87.
 - Comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose, "sixième rapport", OMS, Genève, (1986), 145.
 - Coombs RR, Mourant AE, Race RR .A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. *Brit. J. Exp. Path.*26, (1945), 255-266.
 - Copin R, De Baetselier P, Carlier Y, Letesson JJ, Muraille E. MyD88-dependent activation of B220–CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *J. Immunol.*178, 51, (2007), 82–91
 - Corbel M.J. Comparison of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* antigens for the Rose Bengal Plate Test on sera from cattle infected with *Brucella abortus* biovar 5. *Vet. Rec.*,117, (1985), 385-386.
 - Corbel MJ, Banai M. Genus I. *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol. 2. New York: Springer; (2005). 370-386.
 - Corbel, M., & Brinley-Morgan, W. Genus *Brucella*. In W. Hensyl (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Baltimore, USA: Williams & Wilkins.(1984). 377-388).

- Corner LA, Alton GG. Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Res Vet Sci.*31, (1981), 342–344.
- Crawford, R.M., Van De Verg, L., Yuan, L., Hadfield, T.L., Warren, R.L., Drazek, E.S., Hough, H.H., Hammack, C., Sasala, K., Polsinelli, T., Thompson, J. and Hoover, D.L. Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.*(1996) 64, 2188-2192
- Crespo León, F., Rodriguez Ferri, E. F., Martinez Valdivia, E., "Brucellose ovine et caprine", In "Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail, Europe et régions chaudes", Tome 2, maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires (éd. Lefèvre, P.C., Blancou, J. & Chermette, R.), Edition Lavoisier, Paris, London, New York, (2003), 891-904.
- Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiébaud M, Dubray G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 81(3), (1996), 267-275.
- Da Costa, M., Guillou, J.P., Garin-Bastuji, B., Thiebaud, M., Dubray, G., Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J. Appl. Bacteriol.*81, (1996), 267–275.
- Darwish, M. & Benkirane, A., "Field investigations of brucellosis in cattle and small ruminants in Syria, 1990-1996". *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20, 3, (2001), 769-775.
- Debeaumont, C., Falconnet, P.A., Maurin, M., Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. *Eur.J. Clin. Microbiol. Infect.Dis.*24, 2005, 842–845.
- Dechicha, A., "Séroprévalence des agents abortifs dans les élevages bovins laitiers de la wilaya de Blida.", mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en sciences vétérinaires, Université Saad Dahleb- Blida, (2003).
- Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC, Cassataro J. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice.25, (2007), 6721–6729.
- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P. and Letesson, J.J. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell. Microbiol.*3, (2001), 487-497.
- Diacovich L, Gorvel JP. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Microbiol.* 8, (2010),117–28.
- Diaz Aparicio, E. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Revue Scientifique et technique de l'OIE.* (2013), 53-60.
- Diaz R, Jones LM, Leong D, Wilson JB. Surface antigens of smooth brucellae. *J. Bacteriol.*96, (1968), 893–901.
- Diaz, R., Poma M.E., Rivera, A Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. *Bulletin of the World Health Organization.*53, (1976),417-24.
- Díaz-Aparicio E., Marín C., Alonso B., Aragón V., Pérez S., Pardo M., Blasco J.M., Díaz R. & Moriyón I. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J. Clin. Microbiol.*32, (1994), 1159–1165.

- Dieng, M. & Sene, M., "Épidémiologie de la brucellose bovine en Afrique tropicale: enquête sérologique en République Populaire du Benin", *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.* (1984), 133-137.
- Djadi Z, Dakhli A, Lounes N: enquête préliminaire sur la séroprévalence de la brucellose ovine dans la wilaya d'Alege, ENSV, (2011).
- Dolley, Ph., Géal, M.F., Pellerin, J.L., Milon, A., De Bastard, F., Lautié, R., "L'épididymite contagieuse du bétail (infection à *Brucella. ovis*), Note2: Étude épidémiologique dans le département des Hautes-Pyrénées". *Revue Méd. Vét.*, 133, 4, (1982), 267-271.
- Dorneles EM, Santana JA, Alves TM, Pauletti RB, Mol JP, Heinemann MB, Lage AP. Genetic stability of *Brucella abortus* isolates from an outbreak by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA16) *BMC Microbiol.* 14, (2014).
- Dorneles EM, Teixeira-Carvalho A, Araujo MS, Lima GK, Martins-Filho OA, Sriranganathan N, Lage AP. T lymphocytes subsets and cytokine pattern induced by vaccination against bovine brucellosis employing S19 calfold vaccination and adult RB51 revaccination. *Vaccine.* 32, (2014).6034–6038.
- El Sanousi, S.M., Omer, E.E., Serological survey of brucellosis in Benghazi cow project (Libya). *Int. J. Zoonoses* 12, (1985), 207–210.
- Elaine M.S. Dorneles, Andréa Teixeira-Carvalho, Márcio S.S. Araújo, Nammalwar Sriranganathan, Andrey P. Lage. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination, *Vaccine* 33, (2015), 3659–3666.
- Elaine MS Dorneles, Nammalwar Sriranganathan, and Andrey P. Lage. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines, (2015), 199-776.
- El-Idrissi A.H., Benkirane A., El-Maadoudi M., Bouslikhane M., Berrada J. & Zerouali A. 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. Off. int. Epiz.* 20, (2001), 741–747.
- Eschenbrenner, M., Wagner, M.A., Horn, T.A., Kraycer, J.A., Mujer, C.V., Hagius, S., Elzer, P. and DelVecchio, V.G. Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev 1 and a virulent strain, 16M. *J. Bacteriol.* 184, (2002), 4962-4970.
- Essenberg, R.C., Seshadri, R., Nelson, K. and Paulsen, I. Sugar metabolism by *Brucellae*. *Vet. Microbiol.* 90, (2002), 249-261.
- Faye, B., Castel, V., Lesnoff, M., Rutabinda, D., & Dhalwa J., "Tuberculosis and brucellosis prevalence survey on dairy cattle in Mbarara milk basin (Uganda)", *Preventive Veterinary Medicine*, Vol 67, Issue 4, (2005), 267-281.
- Fekete A, Bantle JA, Halling SM and Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.* 69(2), (1990). 216-227.
- Fernandes, D. M., and C. L. Baldwin. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infect Immun*, (1995). 63.
- Fernandez-Prada, C.M., Zelazowska, E.B., Nikolich, M., Haddad, T.L., Roop II, R.M., Robertson, G.L. and Hoover, D.L. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect. Immun.* 71, (2003), 2110- 2119.

- Fordjen M, Guenane A, Lounes N., étude préliminaire sur la séroprévalence de la brucellose ovine dans la région limitrophe entre les wilayas de M'sila et de Bouira, ENSV. (2009)
- Forestier C, Moreno E, Méresse S, Phalipon A, Olive D, Sansonetti P, et al. Inter-action of *Brucella abortus* lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. *Infect Immun* .67, (1999), 4048–54.
- Freycon Pauline: Role Du Bouquetin Capra Ibex Dans L'epidemiologie De La Brucellose A *Brucella Melitensis* En Haute Savoie, (2015). 354-400
- Fu S, Xu J, Li X, Xie Y, Qiu Y, Du X, Yu S, Bai Y, Chen Y, Wang T, Wang Z, Yu Y, Peng G, Huang K, Huang L, Wang Y, Chen Z. Immunization of mice with recombinant protein CobB or AsnC confers protection against *Brucella abortus* infection, (2012). 89.
- Gagnière J.-P. et al. La brucellose animale, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises ; Merial (Lyon), (2010). 49.
- Gagnière J.-P. et al. La brucellose animale, Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises ; Merial (Lyon), (2010). 49.
- Gameel, S.E., Mohamed, S.O., Mustafa, A.A., Azwai, S.M. Prevalence of camel brucellosis in Libya. *Trop. Anim. Health Prod.* 25, (1993), 91–93.
- Gao N, Jennings P, Guo Y, Yuan D. Regulatory role of natural killer (NK) cells on antibody responses to *Brucella abortus*. *Innate Immun*, 17, (2011), 152–63.
- Gardner I.A, Stryhn H, Lind P, Et Collins M.T., Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal disease. *Preventive Veterinary Medicine*, 45,(2000), 107,122.
- Garin-Bastuji, B. & Delcueilierie, F., "Les brucelloses humaine et animale en France en l'an 2000. Situation épidémiologique Programmes de contrôle et d'éradication", *Méd. Mal. Infect.*, 31 Suppl. 2, (2001), 202-216.
- Garin-Bastuji, B. La brucellose Ovine et caprine. *Le point vétérinaire*. 235, (2003), 22-26.
- Garin-Bastuji, B., "Brucellose ovine et caprine, Épidémiologie - Diagnostic – Prophylaxie-Programmes de lutte et situation en Europe", *Atelier maladies abortives des petits ruminants*, 28 juin 2004-Alger.
- Garin-Bastuji, B., "Brucelloses bovine, ovine et caprine : contrôle et prévention", *Le Point Vétérinaire*, vol. 25, n° 152, (1993), 107-114.
- Garin-Bastuji, B., et al. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Veterinary Research*, 29, (1998), 255-274.
- Garin-Bastuji, B., La brucellose ovine et caprine, *Le point vétérinaire*, 235, (2003), 22-26.
- Gaumont R: Sur le manque de signification des reactions d'agglutination de faible titre en matière de brucellose. *Bull. Off. int. Epiz.*, 63,(1965), 1047-1054.
- Gennero, M.S., Grattarola, C., Zoppi, S., Gorla, M., Bergagna, S., Di Giannatale, E. & Dondo, A., "Diagnostic survey on contagious epididymitis of rams in Piedmont (Italy)", *Epidémiol. Et santé anim.*, 48, (2005), 93-95.
- Given JA, Tucker JD, Perrett LL, Stack JA, Brew SD, MacMillan AP. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *J Immunol Methods*. Medline, (2003), 171-278.
- Godfroid, J., Al-Mariri, A., Walravens, K. & Letesson, J.J., "Brucellose bovine", In "Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail, Europe et régions chaudes", Tome 2, maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires.

-
- Goel D, Rajendran V, Ghosh PC, Bhatnagar R. Cell mediated immune response after challenge in Omp25 liposome immunized mice contributes to protection against virulent *Brucella abortus* 544. *Vaccine*.31, (2013), 1231–1237.
 - Goenka R, Guirnalda PD, Black SJ, Baldwin CL. B lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J Infect Dis*.206, (2012), 91–98.
 - Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infection/Institut Pasteur* (2001);3:43–8.
 - Greiner M, Verloo D, de Massis F. Meta-analytical equivalence studies on diagnostic tests for bovine brucellosis allowing assessment of a test against a group of comparative tests.92, (2009), 373–381.
 - Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckert, A., Garin, J., Gorvel, J.P., Moriyon, I., Moreno, E., and Lopez-Goni, I. 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 U S A*.99, (2002), 12375–12380.
 - Hamoda, F.K., Montaser, A.M., Clinico-epizootiological study on brucellosis in donkeys. Beni-Suef. *Vet.Med. J*. 8, (1998).105–118.
 - He Y, Vemulapalli R, Schurig GG. Recombinant *Ochrobactrum anthropi* expressing *Brucella abortus* Cu, Zn superoxide dismutase protects mice against *B. abortus* infection only after switching of immune responses to Th1 type. *Infect Immun*.70, 5, (2002).2535–2543.
 - He Y, Vemulapalli R, Zeytun A, Schurig GG. Induction of specific cytotoxic lymphocytes in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Infect Immun*.69, (2001), 5502–5508.
 - Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol*. 58(6), (1992),2099–2101.
 - Herman, L., De Ridder, H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol*. 58, (1992), 2099–2101.
 - Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol*.5, (2004), 971–74.
 - Hoffmann EM, Houle JJ. Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Vet. Immunol. Immunopathol*.5, (1983), 65–76.
 - Hosie, B.D., Al-Bakri, O.M., Futter, R.J., Survey of brucellosis in goats and sheep in the Yemen Arab Republic: comparison of tests for *Brucella melitensis* infection in sheep. *Trop. Anim. Health Prod*.17, (1985), 93–99.
 - ielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol*.90, (2002), 447–459.
 - Ivanov AV, Salmakov KM, Olsen SC, Plumb GE. A live vaccine from *Brucella abortus* strain 82 for control of cattle brucellosis in the Russian Federation. *Anim Health Res Rev*.12, (2011), 113–121.
 - J Gibbs et Z Bercovich : *Infectious Diseases: Brucellosis*, Volume 2, (2011),768–774.
 - J.L. Solorio-Rivera, J.C. Segura-Correa, L.G. Sa´nchez-Gil : Seroprevalence of and risk factors for brucellosis of goats in herds of Michoacan, Mexico, *Preventive Veterinary Medicine* .82, (2007), 282–290.
 - Jacques Dornand, Antoine Gross, Virgine Lafont, Janny Liautard, Jane Oliaro, Jean-Pierre Liautard : The innate immune response against *Brucella* in humans, 2002,p383–394, 385.

- Jacques Godfroid, Klaus Nielsen, Claude Saegerman. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. 51, (2010), 296.
- Jain S, Afley P, Kumar S. Immunological responses to recombinant cysteine synthase A of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *World J Microbiol Biotechnol.* 29, 2013, 907–913.
- Jiksa Kassahun. Seroepidemiological Study of Brucellosis in Humans and Dairy Cattle in Addis Ababa. (2003)
- Joiner KA, Puentes SM, Warren KA, Scales RA, Judd RC. Complement binding on serum-sensitive and serum-resistant transformants of *Neisseria gonorrhoeae*: effect of presensitization with a non-bactericidal monoclonal antibody. *Microb. Pathog.* 6, 1989, 343–350.
- Jones FM, Hooper JA. *Brucella abortus* strain 19 calfhood vaccination review. *Southwest Vet.* 29, (1976), 219–225.
- Kabagambe, E.K.; Elzer, P.H.; Geaghan, J.P.; Opuda-Asibo, J., Scholl, D.T., Miller, J.E., "Risk factors for *Brucella* seropositivity in goat herds in eastern and western Uganda", *Preventive Veterinary Medicine*, 52, 2001, 91-108.
- Kahn CM, Line S, eds. *The Merck veterinary manual*. 9th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck; 2005.
- Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immun.* 34, 2011, 637–50.
- Kerr WR, McCaughey WJ, Coghlan JD, Payne DJ, Quaife RA, Robertson L, Farrell ID. Techniques and interpretations in the serological diagnosis of brucellosis. *J. Med. Microbiol.* 1, (1968), 181-193.
- Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M. and Liautard, J.P. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, (2002), 15711-15716.
- Kolar J. Diagnosis and control of brucellosis of small ruminants. *Prev. Vet. Med.*, 2, (1984), 215-225.
- Koutihouin, B., Youssao, A. K. I., Houehou, A. E. & Agbadje, P. M., "Prévalence de la brucellose bovine dans les élevages traditionnels encadrés par le Projet pour le Développement de l'Élevage (PDE) au Bénin", *Revue Méd. Vét.*, 154, 4, (2003), 271-276.
- Krauss, H., Weber, A., Appel, M., Enders, B., Isenberg, H.D., Schiefer, H.G., Slenczka, W., Von Graevenitz, A., Zahner, H. *Zoonoses. Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans*. 3rd edition. Canada: ASM Press, 2003, 456.
- Lambert G, Manthei CA, Deyoe BL. Studies on *Brucella abortus* infection in bulls. *Am J Vet Res.* 24, 1963, 1152–1157.
- Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., Tian, M., Kearney, P., Hamaidi, L., Chelsky, D., Moriyon, I., Moreno, E., and Paramithiotis, E. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res.* 6, (2007), 1519-1529.
- Lapaque N, Takeuchi O, Corrales F, Akira S, Moriyon I, et al. Differential inductions of TNF- α and I κ B by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell. Microbiol.* 8, 2006, 401–413.

- Lee JJ, Kim DH, Kim DG, Lee HJ, Min W, Rhee MH, et al. Toll-like receptor4-linked Janus kinase 2 signaling contributes to internalization of *Brucella abortus* by macrophages. *Infect Immun.*81, (2013), 2448–2458.
- Lefèvre, P.C., Blancou, J. & Chermettre, R.), Edition Lavoisier, Paris, London, New York. (2003), 867-868.
- Levieux D: Immunoglobulines bovines et brucellose. II. Activite des IgG1, IgG2 et IgM du serum dans les reactions d'agglutination, de Coombs, de fixation du complement et dans le test au Rose Bengale. *Ann. Rech. vét.*5, (1974), 343-353.
- Li X, He Y. Caspase-2-dependent dendritic cell death, maturation, and priming of T cells in response to *Brucella abortus* infection. *PLoS One*, (2012). 123-178
- Li X, Xu J, Xie Y, Qiu Y, Fu S, Yuan X, Ke Y, Yu S, Du X, Cui M, Chen Y, Wang T, Wang Z, Yu Y, Huang K, Huang L, Peng G, Chen Z, Wang Y., Vaccination with recombinant flagellar proteins FlgJ and FlhN induce protection against *Brucella abortus* 544 infection in BALB/c mice. *Vet Microbiol.*161. (2012).137–144
- Liautard, J.P., Gross, A., Dornand, J. and Koller, S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia* 12, (1996) .197-206
- Lim JJ, Kim DH, Lee JJ, Kim DG, Min W, Lee HJ, Rhee MH, Kim S. Protective effects of recombinant *Brucella abortus* Omp28 against infection with a virulent strain of *Brucella abortus* 544 in mice. *J Vet Sci.*13, (2012) 287–292.
- Lord VR, Schurig GG, Cherwonogrodzky JW, Marciano MJ, Melendez GE. Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. *Am J Vet Res.*59.(1998).1016–1020.
- Lotfi Bounaadja : Developpement D'une Pcr En Temps Reel Pour La Detection Des *Brucella* Et Relations Avec Le Genre *Ochrobactrum*, (2010).38.
- Lounes Nedjma: séroprévalence de la brucellose animale dans la région centre et impact sur la santé publique, memoire de magister, (2007)
- Luna-Martinez JE, Mejia-Teran C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet Microbiol.*90, (2002),19–30.
- Luo D, Ni B, Li P, Shi W, Zhang S, Han Y, Mao L, He Y, Wu Y, Wang X. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect Immun*, 74, (2006), 2734–2741.
- M. Mounir Madkour: Madkour's brucellosis 2^{ème} édition, 2001, 1-2.
- Manterola, L., Moriyon, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D.S., Koch, M.H., Howe, J., Brandenburg, K., and Lopez-Goni, I. The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J Bacteriol* 187,(2005), 5631-5639.
- Manthei CA, Summary of controlled research with strain 19, Proceedings 63rd Ann Meet US Livestock Sanitary Association. (1959). 56
- Mariana N. Xavier¹, Tatiane A. Paixão, Andréas B. den Hartigh², Renée M. Tsolis² and Renato L. Santos : Pathogenesis of *Brucella* spp. 4, (2010), 109-118.
- Mariana X. Byndloss and Renee M. Tsolis. *Brucella* Spp. Virulence Factors and Immunity. 2015.
- Marin C.M., Moreno E., Moriyon I., Diaz R. & Blasco J.M. Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis sheep brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6, (1999).269–272.

- Matar, G., Khneisser, I.A., Abdelnoor, A.M., Rapid laboratory diagnosis of human brucellosis by PCR analysis of target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1996, 477–478.
- Maurin, m. la brucellose à l'aube du 21ème siècle. *médecine et maladies infectieuses*.vol. 35, (2005), 6-16.
- McDiarmid A. The degree and duration of immunity in cattle resulting from vaccination with S. 19 *B. abortus* vaccine and its implication in the future control and eventual eradication of Brucellosis. *Vet Rec.* 69, 1957, 877–879.
- McEwen AD, Samuel JMD. *Brucella abortus*: heat stable protective antigen revealed by adjuvant and present in a rough variant strain 45/20: immunization experiments on guinea pigs. *Vet Rec.* 67, 1955, 546–548.
- McEwen AD. Experiments on contagious abortion. The immunity of cattle inoculated with vaccines of graded virulence. *Vet Rec.* 52, (1940), 815.
- Memish, Z: Brucellosis control in Saudi Arabia: prospects and challenges. *J. Chemother.* 13, 2001, 11–17.
- Meyer ME, Nelson CJ. Persistence of *Brucella abortus*, strain 19 infection in immunized cattle. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.* 73, 1969, 159–165.
- Mikolon, A.B., Gardner, I.A., Hernandez de Anda, J., Hietala, S.K. Risk factors for brucellosis seropositivity of goat herds in the Mexicali Valley of Baja California, Mexico. *Prev. Vet. Med.* 37, (1998), 185–195.
- Mingle CK, Manthei CA, Jasmin AM. The stability of reduced virulence exhibited by *Brucella abortus* strain 19. *J Am Vet Med Assoc.* 99, (1941), 203–205.
- Mmerzaal A, de Wit JJ, Dijkstra T, Bakker D, van Zijderveld FG. The Dutch *Brucella abortus* monitoring programme for cattle: the impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests. *Vet Q.* 24, 2002, 40-46.
- Mohamed Abdelhmeed Osman¹ and Atif Elamin Abdelgadir. Detection of Brucellosis in sheep intended for export and local slaughter in Khartoum State, Sudan, Vol. 6(39), 2012, 6805-6810.
- Montasser, A.M., Saleh, S., Ibrahim, S.I., El-Gibaly, S. Recent studies on brucellosis in domestic animals in Egypt. In: *Proceedings of the 5th Science Congress on Egyptian Society for Cattle Disease*, Assiut, November 1999.
- Moreno, E. and Moriyon, I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, (2002), 1-3.
- Mounir Madkour., Brucellosis. 1989 .1-11
- Naroeni, A. and Porte, F. Role of cholesterol and the ganglioside GM (1) in entry and short-term survival of *Brucella Suis* in murine macrophages. *Infect. Immun.* 70, (2002) .1640-1644.
- Navarro, E., Segura, J.C., Castano, M.J., Solera, J. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy followup in patients with brucellosis. *Clin. Infect. Dis.* 42, 2006, 1266–1273.
- Newby, D.T., Hadfield, T.L., Roberto, F.F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 59-exonuclease, and hybridization probe assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, (2003), 4753–4759.

- Nicolas, J.A. et Lamachère, M., "Les avortements infectieux des petits ruminants: leur diagnostic, les résultats obtenus par un laboratoire de terrain.", *Revue Méd. Vét.*, 135, 4, (1984), 211-215.
- Nicoletti P. Vaccination. In: Nielsen K, Duncan JR, editors. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press; 1990
- Nicoletti P: Further evaluations of serological test procedures used to diagnose brucellosis. *Am. J. vet. Res.*, 30, (1969), 1811-1816.
- Nicoletti P: Problems in the control of caprine brucellosis. *Proc. 3rd Int. Conf. Goat Prod. Dis.*, Tucson (USA). (1982). 433-434.
- Nielsen K, Gall D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *J Immunoassay Immunochem.* 22, 2001, 183-201.
- Nielsen K, Smith P, Yu W, Nicoletti P, Elzer P, Vigliocco A, Silva P, Bermudez R, Renteria T, Moreno F, Ruiz A, Massengill C, Muenks Q, Kenny K, Tollersrud T, Samartino L, Conde S, Draghi De Benitez G, Gall D, Perez B, Rojas X, Enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis: chimeric Protein A-Protein G as a common enzyme labeled detection reagent for sera for different animal species. *Vet Microbiol*, 101, (2004), 123–129.
- Nielsen KH, Kelly L, Gall D, Nicoletti P, Kelly W. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 46, (1995), 285-291.
- O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y. and Ramuz, M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.* 33, (1999), 1210-1220.
- O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 327, (2010), 1098–1102.
- Office International des Epizooties: manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris. 2009.
- Office Internationale des Epizooties (O.I.E.), Organisation mondiale de la santé animale, Archives de la publication annuelle, "Santé animale mondiale", (2005), http://www.oie.int/fr/info/fr_samarchives.htm
- OIE Terrestrial Manual: CAPRINE AND OVINE BRUCELLOSIS (excluding *Brucella ovis*), (2009). chapter 2.7.2.
- O'Leary S, Sheahan M, Sweeney T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res. Vet. Sci.* 81(2), (2006), 170-176.
- Oliveira SC, Harms JS, Banai M, Splitter GA. Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+ T cells from *Brucella*-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. *Cell Immunol.* 172, 1996, 262–268.
- Oliveira, S. C., and G. A. Splitter: 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. *Eur J Immunol.* 25, (1995), 2551-2557.

- Olsen SC, Boyle SM, Schurig GG, Sriranganathan NN. Immune responses and protection against experimental challenge after vaccination of bison with *Brucella abortus* strain RB51 or RB51 overexpressing superoxide dismutase and glycosyltransferase genes. *Clin Vaccine Immunol*, 16, (2009), 535–540.
- Olsen SC, Bricker B, Palmer MV, Jensen AE, Cheville NF. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Res Vet Sci*.66, (1999), 101–105.
- Olsen SC, Stoffregen WS. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev Vaccines*.4, 2005, 915–928.
- Olsen SC. Immune responses and efficacy after administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. *Vet Ther*.1, 2000, 183–191.
- Omer, M.K., Skjerve, E., Woldehiwet, Z., Holstad, G., Risk factors for *Brucella* spp. Infection In dairy cattle farms in Asmara, State of Eritrea. *Prev. Vet. Med.* 46, (2000). 257–265.
- Onate AA, Cespedes S, Cabrera A, Rivers R, Gonzalez A, Munoz C, Folch H, Andrews E. A DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun*.9, 2003, 4857–4861.
- Ostanello, F., Farina, L., Turilli, C., Serra, P., Cagnolati, V., Abdullahi, M., Scagliarini, A., Prosperi, S..Reliability of results of the Rose Bengal test performed for export control in northern Somalia. *Rev. Sci.Tech.* 18, (1999).660–666.
- OVF : Office Vétérinaire Fédérale, Brucelloses, 2005, 2.
- Par Michael J. Corbel :Brucellosis in Humans and AnimalsWorld Health Organization. (2006),14
- Pasquevich KA, Estein SM, Garcia Samartino C, Zwerdling A, Coria LM, Barrionuevo P, Fossati CA, Giambartolomei GH, Cassataro J. Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. *Infect Immun*.77, 2009, 436–445.
- Pasquevich KA, Ibanez AE, Coria LM, Garcia Samartino C, Estein SM, Zwerdling A, Barrionuevo P, Oliveira FS, Seither C, Warzecha H, Oliveira SC, Giambartolomei GH, Cassataro J. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PLoS One*. (2011),6.
- Philipon A, Garin-Bastuji B. Fiche bactériologique *Brucella*. In : Site du campus de microbiologie médicale [en ligne], Paris : Université Paris Descartes. (30 Aout 2005). [<http://www.microbes-edu.org/>] (consulter le 04/09/2016)
- Philippon, A., Renoux, G. & Plommet, M., "Brucellose bovine expérimentale, XIIInfection par «*Brucella. melitensis*»", *Ann. Rech.Vétér.*, 3 (I), (1972), 13-22.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola- Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 66, (1998) .5711-5724.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.L. and Gorvel, J.P. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun.* 66, (1998) .2387-2392

- Plommet, M., Fensterbank, R., Renouf, G., Gestin, J. & Philippon, A., "Brucellose bovine expérimentale, XII.- Persistance a l'âge adulte de l'infection congénitale de la génisse". Ann. Rech. Vétér., 4, 3, (1973), 419-435.
- Poester FP, Goncalves VS, Paixao TA, Santos RL, Olsen SC, Schurig GG, Lage AP. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. Vaccine.24, (2006), 5327–5334
- Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S. and Liautard, J.P. Role of the Brucella suis lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. Infect. Immun. 71, (2003), 1481-1490
- Probert WS, Schrader KN, Khuong NY Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of Brucella spp., B. abortus, and B. melitensis. J. Clin. Microbiol. 42, (2004), 1290–1293.
- Probert, W.S., Schrader, K.N., Khuong, N.Y., Bystrom, S.L., Graves, M.H., Real-time multiplex PCR assay for detection of Brucella spp., B. abortus, and B. melitensis. J. Clin. Microbiol. 42, 2004. 1290–1293.
- Queipo-Ortuno, M.I., Colmenero, J.D., Reguera, J.M., Garcia-Ordóñez, M.A., Pachon, M.E., Gonzalez, M., Morata, P. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. Clin. Microbiol. Infect. 11, (2005). 713–718.
- R. Fensterbank : Brucellose des bovins et des petits ruminants : diagnostic, prophylaxie et vaccination, Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 5 (3), 1986, 587-603.
- Refai, M., "Incidence and control of brucellosis in the Near East region". Veterinary Microbiology, Vol 90, Issues 1-4, 20, (2002), 81-110.
- Refai, M., Brucellosis in animals in Egypt and its control. Publ. WHO MZCC. 25, (1989), (1–3.)
- Richard L. Walker: brucella, veterinary microbiology , (2004), 23-87.
- Rijpens NP, Jannes G, Van Asbroeck M, Rossau R, Herman LM. Direct detection of Brucella spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. Appl. Environ. Microbiol. 62(5), (1996), 1683-1688.
- Rittig MG, Kaufmann A, Robins A, Shaw B, Sprenger H, Gernsma D, et al. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of Brucella induce different intra-cellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. J. Leukocyte Biol. 74, (2003), 1045–1055.
- Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., Lopez-Goni, I. Specific detection of Brucella DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 33, (1995), 615–617.
- Roushan MR, Amiri MJ, Janmohammadi N, et al. Comparison of the efficacy of gentamicin for 5 days plus doxycycline for 8 weeks versus streptomycin for 2 weeks plus doxycycline for 45 days in the treatment of human brucellosis: a randomized clinical trial. J Antimicrob Chemother. 65, (2010), 1028-1035.
- Saegerman C, De Waele L, Gilson D, Godfroid J, Thiange P, Michel P, et al. Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet Microbiol. 100, (2004), 91-105.
- Saegerman C, Vo TK, De Waele L, Gilson D, Bastin A, Dubray G, et al. Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. Vet Rec. 145, 1999, 214-218.

- Saez D, Fernandez P, Rivera A, Andrews E, Onate A. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine*.30, (2012), 1283–1290.
- Salcedo SP, Marchesini MI, Degos C, Terwagne M, Von Bargen K, et al. BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* (2013), 3-28.
- Salcedo SP, Marchesini MI, Lelouard H, Fugier E, Jolly G, Balor S, et al. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathogens*.4, (2008), 21.
- Salcedo SP, Marchesini MI, Lelouard H, Fugier E, Jolly G, et al. Cirl C, Wieser A, Yadav M, Duerr S, Schubert S, *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. Subversion of Toll-like receptor. *PLOS Pathog*.4, (2008), 21.
- Salmakov KM, Fomin AM, Plotnikova EM, Safina GM, Galimova GM, Salmakova AV, Ivanov AV, Panin AN, Sklyarov OD, Shumilov KV, Klimanov AI. Comparative study of the immunobiological properties of live brucellosis vaccines. *Vaccine* 28(Suppl 5). (2010), 35–40
- Sanchis, R., "Diagnostic direct des avortements infectieux des petits ruminants", *Revue Méd. Vét.*, 133, 5, (1982), 351-356.
- Scarlato, V., Arico, B. and Rappuoli, R. DNA topology affects transcriptional regulation of the pertussis toxin gene of *Bordetella pertussis* in *Escherichia coli* and in vitro. *J. Bacteriol.* 175,(1993), 4764-4771.
- Schurig GG, Hammerberg C, Finkler BR. Monoclonal antibodies to *Brucella* surface antigens associated with the smooth lipopolysaccharide complex. *Am J Vet Res.* 45, (1984), 967–971.
- Schurig GG, Roop RM, 2nd, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol.*28, 1991,171–188.
- Sengupta D, Koblansky A, Gaines J, Brown T, MAL. J. West AP, et al. Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, *Immunol.*184, 2010. 956–964.
- Sergeant, E., "La fièvre méditerranéenne en Algérie: note préliminaire". *Bull. Soc. Path. Exot.*, T.I, N°1, In "recherches expérimentales sur la pathologie algérienne (microbiologie-parasitologie) 1902-1909", (ed Sergeant, E.), (1908), 235-265.
- Sfaksi, A., Sayah, N., Grabsia, M. & Azzouz, R., "Enquête épidémiologique sur les avortements dus à la brucellose, chlamydiose et fièvre Q chez les petits ruminants", Séminaire sur les Brucelloses, Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.
- Shuaibi, A. Palestinian brucellosis control programme. Country reports. *Brucellosis Information Workshop*, Ramallah, 19–20 October 1999.
- Sibille C. M., Contribution à l'étude épidémiologique de la brucellose dans la province de l'Harkangai (Mongolie). Université Paul-Sabatier de Toulouse.(2006),– TOU 3 – 4124.0
- Singha H, Mallick AI, Jana C, Fatima N, Owais M, Chaudhuri P. Co-immunization with interleukin-18 enhances the protective efficacy of liposomes encapsulated recombinant Cu-Zn superoxide dismutase protein against *Brucella abortus*. *Vaccine*. 29, (2011), 4720–4727.

-
- Skyberg JA, Thornburg T, Rollins M, Huarte E, Jutila MA, Pascual DW. Murine and bovine gammadelta T cells enhance innate immunity against *Brucella abortus* infections. *PLoS One* 6, (2011), 219-278.
 - Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M.J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J.M., Gorvel, J.P., and Lopez-Goni, I. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* 29, (1998), 125-138.
 - Surendran N, Hiltbold EM, Heid B, Akira S, Standiford TJ, Sriranganathan N, et al. Role of TLRs in *Brucella* mediated murine DC activation in vitro and clearance of pulmonary infection in vivo. *Vaccine* 30, (2012), 1502–1512.
 - Sveti'c A, Jian YC, Lu P, Finkelman FD, Gause WC. *Brucella abortus* induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN-gamma in CD4+ T cells. *Int. Immunol.* 5, (1993), 877–883.
 - Tracy Hearne Vemulapalli: genetic and immunological analyses of a *brucella abortus* protein exhibiting lectin-like properties, 2000, 26.
 - Trant CG, Lacerda TL, Carvalho NB, Azevedo V, Rosinha GM, Salcedo SP, Gorvel JP, Oliveira SC. The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice. *Infect Immun.* 78, (2010), 2283–2291.
 - Velikovskiy CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, Bowden RA, Bruno L, Fossati CA, Spitz M. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 70, (2002), 2507–2511.
 - Velikovskiy CA, Goldbaum FA, Cassataro J, Estein S, Bowden RA, Bruno L, Fossati CA, Giambartolomei GH. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infect Immun.* 71, 2003, 5750–5755.
 - Vemulapalli R, Contreras A, Sanakkayala N, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. Enhanced efficacy of recombinant *Brucella abortus* RB51 vaccines against *B. melitensis* infection in mice. *Vet Microbiol.* 102, (2004), 237–245.
 - Vemulapalli R, Cravero S, Calvert CL, Toth TE, Sriranganathan N, Boyle SM, Rossetti OL, Schurig GG. Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7, (2000), 114–118.
 - Vemulapalli R, Cravero S, Calvert CL, Toth TE, Sriranganathan N, Boyle SM, Rossetti OL, Schurig GG. Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Clin Vaccine Immunol.* 7, (2000), 114–118.
 - Vemulapalli R, He Y, Buccolo LS, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig GG. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. *Infect Immun.* 68, 2000, 3927–3932.
 - Verger J.M , Editorial. *Point vet*, 25, 1993, 1-3
 - Verger, J.M., Garin-Bastuji, B., Grayon, M. & Mahé, A.M., "La brucellose bovine à *Brucella melitensis* en France", *Ann. Rech. Vét.*, 20, 1989, 93-102.

-
- Verma SK, Jain S, Kumar S. Immunogenicity and protective potential of a bacterially expressed recombinant dihydrolipoamide succinyltransferase (rE2o) of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *World J Microbiol Biotechnol.*28, (2012), 2487–2495.
 - Waghela S., Wandera J. G. & Wagner G. Comparison of four serological tests in diagnosis of caprine brucellosis. *Res. vet. Sci.*, 28, 1980, 168-171.
 - Wang Z, Niu J, Wang S, Lv Y, Wu Q. In vivo differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of wboA mutants from genetically different parent *Brucella* spp. *Clin Vaccine Immunol.*20, (2013), 174–180.
 - Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K. and Shirahata, T. Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol.* 4, (2002), 341-355
 - Wernery, U., Kerani, A.A., Viertel, P. Bovine brucellosis in the southern regions of the Somali Democratic Republic. *Trop. Anim. Health Prod.*11, (1979), 31–35.
 - Weynants V, Gilson D, Cloeckert A, Denoel PA, Tibor A, Thiange P, et al. Characterization of a monoclonal antibody specific for *Brucella* smooth lipopolysaccharide and development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to improve the serological diagnosis of brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol.*3,14, (1996), 309.
 - Wilson MM, Merrifield EVO Anti-globulin (Coombs) test in brucellosis. *Lancet*, 2, (1952), 913.
 - Wilson RP, Winter SE, Spees AM, Winter MG, Nishimori JH, et al. The Vi capsular polysaccharide prevents complement receptor 3-mediated clearance of *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infect.Immun.* 79, 37, (2011), 830
 - Woodard LF, Jasman RL. Comparative efficacy of an experimental S45/20 bacterin and a reduced dose of strain 19 vaccine against bovine brucellosis. *Am J Vet Res.* 44, 1983, 907–910.
 - Wyckoff 3rd JH, Potts RD. Killing of *Brucella* antigen-sensitized macrophages by T lymphocytes in bovine brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol.*120, 2007, 148–59.
 - Xavier MN, Winter MG, Spees AM, Nguyen K, Atluri VL, Silva TMA, et al. CD4(+) T Cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. *PLoS Pathogens* .9, (2013).
 - Xavier MN, Winter MG, Spees AM, Nguyen K, Atluri VL, Silva TMA, et al. CD4(+) T Cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. *PLoS Pathogens* 2013.
 - Yilkal, A. The epidemiology of bovine brucellosis in intra- and peri-urban dairy production systems in and around Addis Ababa. Freie University of Berlin, Faculty of Veterinary Medicine, Master's Thesis. (1998).
 - Yu DH, Hu XD, CAI H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. *DNA Cell Biol.*26, 2007, 435–443.
 - Yu DH, Li M, Hu XD, CAI H. A combined DNA vaccine enhances protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Brucella abortus* in the presence of an IL-12 expression vector. *Vaccine.*25, (2007), 6744–6754.
 - Zaitseva M, King LR, Manischewitz J, Dougan M, Stevan L, Golding H, et al. Human peripheral blood T cells, monocytes, and macrophages secrete macrophage inflammatory

- proteins 1alpha and 1beta following stimulation with heat-inactivated *Brucella abortus*. *Infect Immun*.26,69,2001,3817.
- Zhan Y, Cheers C. Control of IL-12 and IFN-gamma production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors. *J Immunol* .161, 1998, 1447–53.
 - Zhan Y, Cheers C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infection Immun* .61, (1993), 4899–901.
 - Zhan Y, Liu Z, Cheers C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infection Immun* .64, (1996), 2782–6.
 - Zhan Y, Yang J, Cheers C. Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus*-infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect Immun*.61, (1993), 2841–7
 - Zhang M, Han X, Liu H, Tian M, Ding C, Song J, Sun X, Liu Z, Yu S. Inactivation of the ABC transporter ATPase gene in *Brucella abortus* strain 2308 attenuated the virulence of the bacteria. *Vet Microbiol*.164, (2013), 322–329.
 - Zhang X, Kimura Y, Fang C, Zhou L, Sfyroera G, et al. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood*. 110, (2007), 228–36
 - Zhao Z, Li M, Luo D, Xing L, Wu S, Duan Y, Yang P, Wang X. Protection of mice from *Brucella* infection by immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing A L7/L12 and BLS fusion antigen of *Brucella*. *Vaccine*. 27, (2009), 5214–5219.
 - Zwerdling A, Delpino MV, Pasquevich KA, Barrionuevo P, Cassataro J, Garcia-Samartino C, et al. *Brucella abortus* activates human neutrophils. *Microbes Infect*.11, (2009), 689–697.

Annexes

Annexe 1

Questionnaire destiné aux éleveurs

Wilaya:

Région :

Commune:

Renseignements concernant l'animal prélevé:

Sexe: ☐ male ☐ femelle.

Age:.....

Gestation: ☐ oui ☐ non

Nombre de gestation:.....

Avortement: ☐ oui ☐ non

Avortement au cours du: ☐ premier tiers ☐ deuxième tiers ☐ troisième tiers.

Orchite: ☐ oui ☐ non

Renseignements concernant l'élevage prélevé:

Elevage N°:.....

Nombre d'effectif :

Mode d'élevage: ☐ intensif ☐ extensif

Présence d'autres espèces animales: ☐ bovine ☐ caprine ☐ canine ☐ aucune.

Introduction de nouveaux animaux: ☐ oui ☐ non

Pâturage commun: ☐ oui ☐ non

Vaccination: ☐ oui ☐ non.

Annexe 2

Sérums de référence internationaux approuvés par l'OIE :

La Commission des normes biologiques de l'OIE coordonne un programme pour la préparation, validation et la distribution de sérums de référence internationaux pour la détermination des anticorps concernant les maladies infectieuses des animaux. Les matériels de référence sont préparés par un laboratoire de référence de l'OIE conformément aux lignes directrices préconisées par la Commission en collaboration avec d'autres laboratoires. Ils sont désignés par l'OIE comme des matériels de référence primaire à être utilisés pour les épreuves diagnostiques décrites dans le *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres* de l'OIE. Le but de ce programme est d'avoir une approche uniforme en matière de diagnostic et d'encourager la reconnaissance mutuelle des résultats d'analyses pour le commerce international.

Tableau : Sérums de référence internationaux approuvés par l'OIE et actuellement disponibles (l'OIE ; 2017) :

L'agent pathogène	Epreuve	Fournisseur
<i>Brucella abortus</i>	Fixation du complément ; Epreuve d'agglutination; Epreuve à l'antigène tamponné pour <i>Brucella</i> ; Epreuve de polarisation de fluorescence ; Dosage immunoenzymatique indirect ou par compétition	Dr Adrian Whatmore Animal and Plant Health Agency New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, Royaume-Uni Tel: (+44-1932) 35.76.10 Fax: (+44-1932) 35.72.16 Adrian.Whatmore@apha.gsi.gov.uk

Annexe 3

		Test de référence		
		Résultat positif animal malade	Résultat négatif animal sain	Total
2^{ème} test	Résultat positif	a	b	
	Résultat négatif	c	d	
Total				

a : vrai positif, b : faux positif, c : faux négatif, d : vrai négatif.

N= le nombre total des échantillons

La sensibilité : $Se = \frac{a}{a+c}$

La spécificité : $Sp = \frac{d}{d+b}$

L'exactitude : $E = \frac{a+d}{N}$

La valeur prédictive positive : $VPP = \frac{a}{a+b}$

La valeur prédictive négative : $VPN = \frac{d}{d+c}$

Le coefficient kappa de Cohen : $k = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$

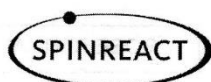
✓ **Po**= proportion d'accord observé = $\frac{a+d}{N}$

✓ **Pe**= proportion d'accord aléatoire = $\frac{1}{N * 2(a+c) * (a+b) + (d+c) * (c+d)}$

Le test de Mc Nemar : $\frac{(b-c)*2}{b+c}$

Annexe 4

La notice de test au Rose Bengale



ROSE BENGAL

Rose Bengal
 Slide agglutination

Qualitative determination of antibodies anti-Brucella IVD

Store at 2 - 8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD

The Rose Bengal is a slide agglutination test for the qualitative and semi-quantitative detection of antibodies anti-Brucella in human or animal serum. The stained bacterial suspension agglutinates when mixed with samples containing specific IgG or IgM antibodies present in the patient sample.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Brucella diagnostic may be assessed either by microorganism isolation in blood or stools, or by titration of specific antibodies in the patient serum. The reagent, because of its formulation in an acid buffer, is reactive with both IgG and IgM antibodies and very useful for the diagnosis of chronic individuals, which present a high level of IgG antibody, difficult to be detected by the reference tube method (Wright).

REAGENTS

Rose Bengal	<i>Brucella abortus</i> suspension, strain S99, in lactate buffer 1 mol/L, phenol 5 g/L, Rose Bengal, pH 3.6
White cap	
Control +	Animal serum, with an antibody anti- <i>Br. abortus</i> concentration ≥ 50 IU/mL. Preservative
Red cap	
Control -	Animal serum. Preservative
Blue cap	

CALIBRATION

The Rose Bengal sensitivity is calibrated against the 2^o International Preparation of anti-*Brucella abortus* from NIBS (UK) (WHO).

STORAGE AND STABILITY

All reagents are ready to use, and will remain stable until the expiration date printed on the label, when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not freeze: frozen reagents could change the functionality of the test.

Always keep vials in vertical position. If the position is changed, gently mix to dissolve aggregates that may be present.

Reagents deterioration: Presence of particles.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Mechanical rotator with adjustable speed at 80-100 r.p.m.
- Vortex mixer.
- Pippetes 50 μ L.

SAMPLES

Fresh serum. Stable 7 days at 2-8°C or 3 months at -20°C. Samples with presence of fibrin should be centrifuged before use. Do not use highly hemolized or lipemic samples.

PROCEDURE
Qualitative method

1. Allow the reagents and samples to reach room temperature. The sensitivity of the test may be reduced at low temperatures.
2. Place 50 μ L of the sample and one drop of each Positive and Negative controls into separate circles on the slide test.
3. Mix the R. Bengal reagent vigorously or on a vortex mixer before using and add one drop next to the sample to be tested.
4. Mix the drops with a stirrer, spreading them over the entire surface of the circle. Use different stirrers for each sample.
5. Place the slide on a mechanical rotator at 80-100 r.p.m. for 4 minutes. False positive results could appear if the test is read later than two minutes.

Semi-quantitative method

1. Make serial two fold dilutions of the sample in 9 g/L saline solution.
2. Proceed for each dilution as in the qualitative method.

READING AND INTERPRETATION

Examine macroscopically the presence or absence of visible agglutination immediately after removing the slide from the rotator. The presence of agglutination indicates an antibody anti-Brucella concentration equal or greater than 25 IU/mL.

The titer, in the semi-quantitative method, is defined as the highest dilution showing a positive result.

CALCULATIONS

The approximate antibody concentration in the patient sample is calculated as follows:

$$25 \times \text{anti-Brucella Titer} = \text{IU/mL}$$

QUALITY CONTROL

Positive and Negative controls are recommended to monitor the performance of the procedure, as well as a comparative pattern for a better result interpretation.

All result different from the negative control result, will be considered as a positive.

REFERENCE VALUES

Up to 25 IU/mL.

Each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. **Analytical sensitivity:** 25 (± 5) IU/mL, under the described assay conditions
2. **Prozone effect:** No prozone effect was detected up to 1000 IU/mL.
3. **Diagnostic sensitivity:** 100 %.
4. **Diagnostic specificity:** 98 %.

INTERFERENCES

Hemoglobin (10 g/L), lipemia (10 g/L) and rheumatoid factors (300 IU/mL), do not interfere. Bilirubin interferes at 2.5 mg/dL. Other substances may interfere⁵.

NOTES

Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

BIBLIOGRAPHY

1. Young E J. Clinical Infectious Diseases 1995; 21: 283-290.
2. Alton GC. Techniques for Brucellosis Laboratory INRA Paris, 1988.
3. Ariza J. Current Opinion in Infectious Diseases 1996; 9: 126-131.
4. Comité mixto FAO/OMS de expertos en Brucelosis. WLD Health Org Tech Rep Ser 1958; 148: 1-60.
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed. AACC Press, 1995

PACKAGING

Ref. 1200901 50 tests : 2.5 mL Rose Bengal
 : 1 mL Control +
 : 1 mL Control -
 : 8 x 6 disposable slides



La notice du test de Wright



BACTERIAL ANTIGENS

Antigènes Bactériens

Agglutination sur lame et en tube

Détermination qualitative d'anticorps fébriles IVD

Conserver à 2 - 8 °C.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les Antigènes bactériens sont une technique d'agglutination sur lame et en tube pour la détection et la semi-quantification d'anticorps anti-Salmonella, Brucella et Proteus dans le sérum humain. Les réactifs, des suspensions bactériennes colorées et standardisées, agglutinent en présence de l'anticorps homologue correspondant dans les échantillons testés.

SIGNIFICATION CLINIQUE

Le diagnostic de maladies fébriles peut s'effectuer soit par l'isolement du microorganisme dans le sang, l'urine ou les selles, soit par la démonstration du titrage d'anticorps spécifiques, somatiques (O) et flagellaires (H) dans le sérum du patient. La détermination de ces anticorps constitue la base de l'essai de Widal, qui établit que des niveaux élevés d'anticorps O et H supérieurs à 1/100 dans le sérum indiquent une infection par ces microorganismes.

RÉACTIFS

RÉACTIF	Antigène	Ref.	Présentation
Salmonella paratyphi AH	a flagellaire	1205011	5 mL
Salmonella paratyphi AO	1,2,12, somatique	1205021	
Salmonella paratyphi BO	b flagellaire	1205031	
Salmonella paratyphi CO	1,4,5,12 somatique	1205041	
Salmonella paratyphi CH	c flagellaire	1205051	
Salmonella paratyphi CO	6,7 somatique	1205061	
Salmonella typhi H	d flagellaire	1205071	
Salmonella typhi O	1,9,12 somatique	1205081	
Brucella abortus	somatique	1205091	
Brucella melitensis	somatique	1205097	
Proteus OX2	somatique	1205101	1 mL
Proteus OX19	somatique	1205111	
Proteus OXK	somatique	1205121	
Control +		1205201	4 x 100 test
Control -		1205211	
Kit Antigènes bactériens		1205006	8 x 100 test
		1205008	6 x 100 test
		1205010	

(*) Convient également à la détermination d'anticorps anti-Br. suis.

COMPOSITION DES RÉACTIFS

- Antigènes bactériens: suspension de Salmonelles, Brucellas et Proteus en tampon de glycine, pH 8.2. Conservateur.
- Témoins: sérum animal. Conservateur.

ÉTALONNAGE

Il n'existe pas de référence internationale pour la standardisation de la sensibilité de ces réactifs, c'est pourquoi on utilise un témoin interne constitué de sérum animal contenant des anticorps face à chacun des antigènes présentement cités, au titre avec des résultats commerciaux de qualité reconnue.

PRÉPARATION ET STABILITÉ

Antigènes bactériens: prêts à l'usage. Agiter doucement avant usage.

Témoins: prêts à l'usage.

Indicateurs de dégradation des réactifs: présence de particules et d'aggrégats. Tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage si les flacons sont conservés bien fermés à 2-8°C et si toute contamination est évitée lors de l'utilisation. Ne pas congeler.

MATÉRIEL ADDITIONNEL

- Agitateur tournant à vitesse variable 80-100 tr/min - Etuve à 37°C - Agitateur Vortex - Pipettes de 50 µL.

ÉCHANTILLONS

Sérum frais. Stable 8 jours à 2-8°C ou 3 mois à -20°C.

Les échantillons contenant des restes de fibrine doivent être centrifugés avant l'essai. Ne pas utiliser d'échantillons fortement hémolysés ou lipémiques.

PROCÉDURE À SUIVRE.

Méthode d'agglutination sur lame (qualitatif)

- Laisser reposer les réactifs et les échantillons à température ambiante. La sensibilité de l'essai se réduit à basses températures.
- Déposer 50 µL de l'échantillon à tester (remarque 1 et 2) et 1 goutte (50 µL) de chaque sérum dans des cercles séparés sur une lame.
- Mélanger le réactif vigoureusement ou avec l'agitateur vortex avant l'essai. Ajouter une goutte (50 µL) de l'antigène à proximité de l'échantillon à tester.
- Mélanger à l'aide d'un agitateur, en essayant d'étaler le mélange sur toute la surface interne du cercle.
- Placer la lame sur un agitateur tournant à 80-100 tr/min pendant 1 minute.
- Méthode d'agglutination sur lame (titrage)
 - A l'aide d'une micropipette, déposer 80, 40, 20, 10 et 5 µL d'échantillon non dilué en cercles séparés sur une lame.
 - Déposer une goutte (50 µL) de l'antigène dans chaque cercle à proximité de l'échantillon à tester.
 - Mélanger à l'aide d'un agitateur, en essayant d'étaler le mélange sur toute la surface interne du cercle.
 - Placer la lame sur un agitateur tournant à 80-100 tr/min pendant 1 minute.
- Méthode d'agglutination en tube (semi-quantification)
 - Préparer une série de tube comme suit:

Dilutions	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	...
Échantillon (µL)	100	1	1	1	1	1	...
CiNa 9 g/L (mL)	1,9	1	1	1	1	1	...
	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL écarter

- Préparer 2 tubes supplémentaires pour les témoins positif et négatif: 0,1 mL témoin + 0,9 mL CiNa 9 g/L.
- Ajouter une goutte (50 µL) d'antigène dans chaque tube.
- Agiter et incubar les tubes à 37°C pendant 24 h (remarque 3).
- Agiter et incubar les tubes à 37°C pendant 24 h (remarque 3).

LECTURE ET INTERPRÉTATION (remarque 4)

Méthode d'agglutination sur lame

Examiner de manière macroscopique la présence ou l'absence d'agglutination juste après avoir retiré l'échantillon de l'agitateur et comparer les résultats avec les sérums témoins.

Les résultats obtenus par la méthode de titrage sur lame sont approximativement équivalents à ceux pouvant être obtenus par la méthode d'agglutination en tube avec des dilutions de sérum de respectivement 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 et 1/320. Pour chaque résultat positif, il est conseillé de confirmer le titre par la méthode d'agglutination en tube.

Méthode d'agglutination en tube

Examiner de manière macroscopique le modèle d'agglutination (remarque 5) et comparer les résultats avec ceux obtenus dans les tubes témoins. Le témoin positif doit montrer une agglutination partielle ou complète. Le témoin négatif ne doit montrer aucun type d'agglutination. Un résultat est considéré positif en présence de tout niveau d'agglutination partielle ou complète, avec divers niveaux de clarification du surnageant. Le titre de l'échantillon est défini comme étant la dilution la plus élevée montrée par le résultat positif.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il est recommandé d'utiliser les témoins positif et négatif pour contrôler la fonctionnalité des réactifs, et en tant que modèle de comparaison pour l'interprétation des résultats. Tout résultat autre que le résultat qui donne le contrôle négatif est considéré comme positif.

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Indicateurs d'une infection récente: Salmonelles: titres $\geq 1/80$ (anticorps somatiques) et $\geq 1/60$ (anticorps flagellaires); Brucellas: titres $\geq 1/80$; Proteus: titres de OX19 $\geq 1/80$, OX2 $\geq 1/20$ et OXK $\geq 1/80$. Le niveau normal d'anticorps fébriles varie amplement en fonction des différents pays et communautés. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence.

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

Toutes les caractéristiques diagnostiques par les différents réactifs d'Antigènes bactériens sont consultables dans les Rapports techniques correspondants qui sont à la disposition de tout usager qui en fait la demande.

INTERFÉRENCES

Pas d'interférence avec la bilirubine (20 mg/dL), l'hémoglobine (10 g/L), les lipides (10 g/L), les facteurs rhumatoïdes (300 UI/mL).

LIMITES DE LA MÉTHODE

- Les infections récentes, l'immunosuppression, l'effet prozone (Brucellose) et la thérapie avec antibiotiques (somatiques) peuvent occasionner de fausses négativités.
- Des réactions croisées avec Brucella ont été décrites en cas d'infection ou de vaccination avec certaines souches *Vibrio cholerae*, *Pasteurella*, *Proteus OX19* et *Y. enterocolitica* (sérotype 9).
- Une proportion élevée d'individus normaux donne des résultats positifs avec les antigènes de Proteus, notamment avec le test d'agglutination sur lame. Un titre inférieur à 1/160 en tube ne doit pas être considéré comme significatif.

REMARQUES

- Dans les essais d'anticorps anti-Brucella, il est recommandé de réduire l'échantillon à 20 µL pour éviter l'effet prozone.
- Dans certaines zones géographiques, où la prévalence de maladies fébriles est élevée, il est recommandé d'effectuer l'échantillon 1/40 dans CiNa 9 g/L avant de réaliser le test sur lame.
- Il est possible d'accélérer les temps d'incubation de la manière suivante:
 - Antigènes somatiques (O) et Proteus: 48-50°C, 4 h.
 - Antigènes flagellaires (H): 48-50°C, 2 h.
- Un résultat positif isolé est moins significatif qu'une variation de titres obtenus lors d'essais réalisés à différents intervalles de temps. Le diagnostic clinique ne doit pas uniquement se faire à partir des résultats du laboratoire: les données cliniques ou patient doivent être prises en compte en même temps.
- L'agglutination somatique se caractérise par un aspect fin et granulaire, de formation lente et difficilement désagrégeable. L'agglutination flagellaire est colonneuse, de formation rapide et facilement désagrégeable.

BIBLIOGRAPHIE

- Edward J Young, Clinical Infectious Diseases 1995; 21: 283-290.
- Coulter JBS, Current Pediatrics 1996; 6: 25-29.
- David A et al. Current Opinion in Infectious Diseases 1994; 7: 616-623.
- David R et al. Current Opinion in Infectious Diseases 1993; 6: 54-62.
- Bradley D Jones, Annu Rev Immunol 1996; 14: 533 - 61.

SGIS06 F-P 18/09/13

BACTERIAL ANTIGENS

Antigénios Bacterianos

Agglutinação em porta e tubo

Determinação qualitativa de anticorpos febris IVD

Conserver a 2 - 8 °C.

PRINCIPIO DO METODO

Os Antigénios Bacterianos são uma técnica de aglutinação em porta e em tubo para a detecção e semi-quantificação de anticorpos anti-Salmonella, Brucella e Proteus no soro humano. Os reagentes, suspensões bacterianas, coloradas e standardizadas, aglutinam na presença do anticorpo homólogo correspondente nas amostras testadas.

SIGNIFICADO CLINICO

O diagnóstico de doenças febris pode ser feito tanto pelo isolamento do microorganismo no sangue, urina ou fezes como pela demonstração do título de anticorpos específicos, somáticos (O) e flagellares (H) no soro do paciente. A determinação destes anticorpos forma a base para o ensaio de Widal que estabelece que elevados níveis de anticorpos O e H superiores a 1/100 no soro, é indicativo de infecção por estes microorganismos.

REAGENTES

REAGENTE	Antigénio	Ref.	Apresentação
Salmonella paratyphi AH	a flagellar	1205011	5 mL
Salmonella paratyphi AO	1,2,12, somático	1205021	
Salmonella paratyphi BH	b flagellar	1205031	
Salmonella paratyphi BO	1,4,5,12 somático	1205041	
Salmonella paratyphi CH	c flagellar	1205051	
Salmonella paratyphi CO	6,7 somático	1205061	
Salmonella typhi H	d flagellar	1205071	
Salmonella typhi O	1,9,12 somático	1205081	
Brucella abortus (*)	somático	1205091	
Brucella melitensis	somático	1205097	
Proteus OX2	somático	1205101	1 mL
Proteus OX19	somático	1205111	
Proteus OXK	somático	1205121	
Control +		1205201	4 x 100 test
Control -		1205211	
Kit de Antigénios Bacterianos		1205006	8 x 100 test
		1205008	6 x 100 test
		1205010	

(*) Adequada também para a determinação de anticorpos anti-Br. suis.

COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES

- Antigénios Bacterianos: Suspensão de Salmonellas, Brucellas e Proteus em tampão glicina, pH 8.2. Conservante.
- Controles: Soro animal. Conservante.

CALIBRAÇÃO

Não existe referência internacional para a standardização da sensibilidade destes reagentes, pelo que se utiliza um controlo interno constituído por soro animal que contém anticorpos frente a cada um dos antigénios citados anteriormente e que foi titulado com reagentes comerciais de qualidade reconhecida.

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE

Antigénios Bacterianos: Prontos para utilização. Agitar suavemente antes de usar. Controlos: Prontos para utilização. Manter os frascos sempre em posição vertical. Em caso de mudança de posição, agitar até que possíveis agregados se dissolvam. Indicar a deterioração dos reagentes: Presença de partículas e agregados. Todos os componentes do kit devem estar estáveis até ao final do prazo de validade indicado no recipiente. Quando os frascos são mantidos bem fechados, a 2-8°C, e se evita a contaminação durante a sua utilização. Não congelar.

MATERIAL ADICIONAL

- Agitador rotativo de velocidade regulável a 80-100 r.p.m. - Estufa a 37°C - Agitador vortex. - Pipetas de 50 µL.

AMOSTRAS

Soro fresco. Estável 8 dias a 2-8°C ou 3 meses a -20°C.

As amostras com restos de fibrina devem ser centrifugadas antes do teste. Não utilizar amostras altamente hemolizadas ou lipémicas.

PROCEDIMENTO

A. Método de agglutinação em porta (qualitativo)

- Deixar que os reagentes e as amostras atinjam a temperatura ambiente. A sensibilidade do ensaio diminui a baixas temperaturas.
- Depositar 50 µL da amostra a testar (Nota 1 e 2) e 1 gota (50 µL) de cada controlo em círculos separados de uma porta.
- Misturar o reagente vigorosamente ou com o agitador vortex antes do teste. Adicionar uma gota (50 µL) de antígeno próximo da amostra a testar.
- Misturar com a ajuda de um palito, procurando estender a mistura por toda a superfície interior do círculo.
- Método de agglutinação em porta (titulação)
 - Utilizando uma micropipeta, dispensar 80, 40, 20, 10 e 5 µL de amostra não diluída em círculos separados de uma porta.
 - Depositar uma gota (50 µL) de antígeno em cada círculo, próximo da amostra a testar.
 - Misturar com a ajuda de um palito, procurando estender a mistura por toda a superfície interior do círculo.
 - Situar a porta sobre um agitador rotativo a 80-100 r.p.m. durante 1 minuto.
- Método de agglutinação em tubo tubo (semi-quantificação)
 - Preparar uma série de tubos tal como se segue:

Diluições	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	...
Amostra (µL)	100	1	1	1	1	1	...
NaCl 9 g/L (mL)	1,9	1	1	1	1	1	...
	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL descartar

- Preparar mais 2 tubos para Controlo Positivo e Negativo: 0,1 mL Controlo + 0,9 mL NaCl 9 g/L.
- Adicionar uma gota (50 µL) de antígeno a cada tubo.
- Agitar e incubar os tubos a 37°C durante 24 h (Nota 3).

LEITURA E INTERPRETAÇÃO (Nota 4)

Método de agglutinação em porta

Examinar macroscopicamente a presença ou ausência de agglutinação imediatamente depois de retirar a porta do agitador e comparar os resultados com os soros controlo.

Os resultados obtidos com o método de titulação em porta, são aproximadamente equivalentes aos que se obtieram com o método de agglutinação em tubo com diluições do soro de 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320 respectivamente. Qualquer resultado positivo, é aconselhável a confirmação do título mediante o método de agglutinação em tubo.

Método de agglutinação em tubo

Examinar macroscopicamente o modelo de agglutinação (Nota 5) e comparar os resultados com os obtidos nos tubos controlo. O controlo positivo deve mostrar agglutinação parcial ou completa. O controlo negativo não deve mostrar nenhum tipo de agglutinação. Considera-se como resultado positivo qualquer grau de agglutinação parcial ou completa, com diversos graus de clarificação do sobrenadante. O título da amostra define-se como a diluição maior que dá resultado positivo.

CONTRÓLE DE QUALIDADE

Recomenda-se utilizar o controlo positivo e negativo para controlar a funcionalidade dos reagentes, assim como, para modelo de comparação para a interpretação de resultados. Qualquer resultado distinto do controlo negativo será considerado como positivo.

VALORES DE REFERÊNCIA

São indicativos de infecção recente: Salmonellas: títulos $\geq 1/80$ (anticorpos somáticos) e $\geq 1/160$ (anticorpos flagellares); Brucellas: títulos $\geq 1/80$; Proteus: títulos de OX19 $\geq 1/80$, OX2 $\geq 1/20$ e OXK $\geq 1/80$. O nível normal de anticorpos febris varia amplemente conforme os diferentes países e comunidades. É recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

Todas as características diagnósticas dos distintos reagentes de Antigénios Bacterianos podem encontrar-se nos correspondentes Relatórios técnicos que estão à disposição do utilizador que os solicita.

INTERFERÊNCIAS

Bilirrubina (20 mg/dL), hemoglobina (10 g/L), lipídios (10 g/L) e factores reumatoides (300 UI/mL), não interferem.

LIMITAÇÕES DO METODO

- A infecção recente, a imunodepressão, o efeito prozona (Brucelose) e a terapêutica com antibióticos (somáticos), podem ocasionar falsas negatividade.
- Foram descritas reacções cruzadas com Brucella em casos de infecção ou vacinação com algumas estirpes de *Vibrio cholerae*, *Pasteurella*, *Proteus OX19* e *Y. enterocolitica* (serotipo 9).
- Uma elevada proporção de indivíduos normais dá resultados positivos com antígenos de Proteus, especialmente no ensaio de agglutinação em porta. Um título inferior a 1/160 no tubo, não deve considerar-se significativo.

NOTAS

- Nos testes de anticorpos anti-Brucella, recomenda-se reduzir a amostra a 20 µL para evitar o efeito prozona.
- Em determinadas áreas geográficas, com elevada prevalência de doenças febris, se recomenda-se a diluição da amostra 1/40 com NaCl 9 g/L antes de realizar o ensaio em porta.
- Pode-se acelerar os tempos de incubação da seguinte maneira:
 - Antigénios somáticos (O) e Proteus: 48-50°C, 4 h.
 - Antigénios flagellares (H): 48-50°C, 2 h.
- Um resultado positivo isolado é menos significativo do que uma variação de títulos obtidos nos testes realizados a distintos intervallos de tempo. O diagnóstico clínico não deve realizar-se unicamente com os resultados do laboratório, mas deve considerar-se simultaneamente os dados clínicos do paciente.
- A agglutinação somática caracteriza-se por ser fina e granular, de formação lenta e dificilmente desagregável. A agglutinação flagelar é alongada, de formação rápida e facilmente desagregável.

BIBLIOGRAFIA

- Edward J Young, Clinical Infectious Diseases 1995; 21: 283-290.
- Coulter JBS, Current Pediatrics 1996; 6: 25-29.
- David A et al. Current Opinion in Infectious Diseases 1994; 7: 616-623.
- David R et al. Current Opinion in Infectious Diseases 1993; 6: 54-62.
- Bradley D Jones, Annu Rev Immunol 1996; 14: 533 - 61.

SPINREACT, S.A.S.U. Ctra. Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) SPAIN
Tel. +34 972 69 08 00 Fax +34 972 69 00 99 e-mail: spinreact@spinreact.com