REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE-ALGER
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة - الجزائر

Mémoire de magister en vue de l'obtention d'un diplôme de magister en sciences vétérinaires.

Option microbiologie médicale vétérinaire.

THÈME :

EVALUATION DES CARACTERISTIQUES DE LA TECHNIQUE ELISA-i DANS LE DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE BOVINE ET ESTIMATION DE LA PREVALENCE REELLE DANS L'OUEST ALGERIEN.

Réalisé par Abdeldjalal BOUZIRI
Soutenu le 07/02/2013

Le jury :

Président : Mr HAMDI T. M., Maître de conférences classe A à l'ENSV.

Promoteur : Mr KHELEF Dj., Professeur à l'ENSV.

Examinatrice 1 : Melle BOUKOURS K. T., Professeur à l'ENSV.

Examinatrice 2 : Melle AIT OUDHIA Kh., Maître de conférences classe A à l'ENSV. .

Année universitaire 2012/2013

REMERCIEMENT

Je tiens à remercier mon directeur de mémoire, qui m'a dirigé durant ce travail. Je lui suis reconnaissant pour ses encouragements, son enthousiasme et sa confiance.

Un sincère remerciement au directeur du laboratoire vétérinaire régional de MOSTAGANEM d'avoir ouvrir les portes afin que je puisse réaliser ma partie expérimentale.

Je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire vétérinaire régional de MOSTAGANEM de leur aide et leur appui technique qu'il m'a fourni durant toute ma période de stage

Je voudrais également remercier les membres du jury d'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail.

Merci à tous mes amis pour leur amitié

ملخص

الفحص من الحمى المتموجة يتم عادة في مصل الدم. ويمكن استخدام مختلف طرق التشخيص المصلية للكشف عن وجود عدوى الحمى المتموجة. الأكثر استخداما في الجزائر هي اختبار التراص السريع و اختبار تثبيت المتممة من بين التقنية الأخرى من أجل التشخيص المصلية، طريقة تطبق حديثا: المناعة الإنزيمية غير المباشرة . و هكذا، فإن الهدف من هذه الدراسة المصلية هو أولا إجراء مقارنة تقييميه لحساسية ولدقة تقنية المناعة الإنزيمية غير المباشرة مقارنتا مع اختبار التراص السريع و اختبار تثبيت المتممة. في حين أن الهدف الثاني يتألف من استيفاء معدل الانتشار المصلي ل الحمى المتموجة عند الأبقار. في هذا السياق، عينة من 275 مصل الأبقار تم تحليلها في مختبر بيطري إقليمي لمستغانم وأظهرت النتائج أن اختبار المناعة الإنزيمية غير المباشرة فعالا بشكل خاص في تشخيص الحمى المتموجة مع معدل الانتشار المصلي 1,82 ٪ تم الحصول عليها باستخدام هذه تقنية مقابل 0,75 ٪ في اختبار التراص السريع مكملة باختبار تثبيت المتممة. وعلاوة على ذلك، يتضح في اختبار المناعية للأنزيم غير مباشر أنه أكثر حساسية (حساسية = 65,81٪) و أكثر دقة (خصوصية = 98,65 ٪). من اختبار التراص السريع. يبدو أن تقنية غير المباشرة الإنزيمية المناعة هو اختبار المصلي الأمثل لتشخيص عن وجود البروسيلا في الأبقار نظرا لدقتها وسهولة التنفيذ لاختبار الأمصال متعددة في وقت قصير مقارنة مع اختبار تثبيت المتممة التي تستخدم بالكاد لأن من الصعب تنفيذها

Résumé

Les plus couramment employées en Algérie sont l'épreuve à l'antigène tamponné (EAT) et la réaction de fixation du complément (FC). Etant donné la réaction d'agglutination donne lieu à de nombreuses interférences et les taux d'agglutinations sont voisins que l'infection soit due à *Brucella* ou à *Yersinia enterocololitica* 09. En revanche, une épreuve sérologique idéale de diagnostic de la Brucellose doit être efficace et fiable. Parmi les autres techniques de diagnostic sérologique, la méthode immuno-enzymatiques indirecte (ELISA-i) est d'application la plus récente. La présente étude sérologique se fixe pour objectif, en premier lieu une évaluation des caractéristiques techniques intrinsèques et extrinsèques de la technique ELISA-i et, en second lieu, une estimation de la prévalence réelle de la Brucellose bovine dans la région du ouest algérienne. Deux cent soixante-quinze (275) sérums de bovins laitiers ont été analysés au laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem, en utilisant deux tests sérologiques pour le dépistage de la Brucellose bovine : EAT et le test ELISA-i. Un troisième test sérologique était utilisé à titre de confirmation, c'est le test FC. Ainsi, le test ELISA-i est démontrée à être plus sensibles (sensibilité = 67,81 %) et plus spécifique (spécificité = 98,65 %) que l'épreuve de l'antigène tamponné. Utilisée à la place de l'EAT et FC, la technique ELISA-i semble être le test de choix pour le dépistage de la Brucellose vu ses valeurs de détectabilité des animaux séropositifs significativement meilleur que EAT et FC et sa simplicité d'exécution permettent de tester plusieurs sérums en un minimum de temps en l'occurrence de la technique FC qui n'est plus guère utilisée car délicate à mettre en œuvre.

Mots clés : Brucellose, *Brucella*, ELISA, EAT, FC, sensibilité, spécificité, dépistage, prévalence, surveillance

Abstract

Most commonly used in Algeria are buffered antigen test (EAT) and the reaction of complement fixation (CF). Given the agglutination reaction gives rise to many interferences and agglutination rates are neighbors infection is caused by *Brucella* or *Yersinia enterocololitica* 09. However, a serological test ideal diagnostic Brucellosis must be efficient and reliable. Other serological diagnostic techniques, the method indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-i) is the most recent application. This serological study's objective, first an assessment of the technical characteristics of intrinsic and extrinsic ELISA-i and, second, an estimate of the true prevalence of bovine brucellosis in the region of western Algeria. Two hundred sixty-five (275) dairy cattle sera were analyzed at regional veterinary laboratory Mostaganem, using two serological tests for the detection of bovine brucellosis: EAT and ELISA-i. A third serological test was used for confirmation, the CF test. Thus, the i-ELISA was demonstrated to be more sensitive (sensitivity = 67.81%) and specific (specificity = 98.65%) than the buffered plate antigen test. Used instead of the EAT and CF, ELISA-i seems to be the test of choice for screening saw Brucellosis values detectability of seropositive animals and significantly better than EAT FC and ease of execution can several test sera in a minimum time in the case of CF technique is hardly used because difficult to implement.

TABLE DES MATIERES

Partie bibliographique : ETUDE DE LA BRUCELLOSE

I. INTRODUCTION 1

II. HISTORIQUE DE LA BRUCELLOSE 1

III. IMPORTANCE DE LA BRUCELLOSE 2

III.1. Importance économique 2

III.2. Importance pour la santé publique 3

IV. EPIDEMIOLOGIE 3

IV.1. Répartition géographique 3

IV.2. Espèces sensibles 4

IV.3. Réservoir 4

IV.4. Matières virulentes 4

IV.5. Mode de transmission 5

V. AGENT PATHOGENE 6

V.1. Taxonomie 6

V.2. Caractères structuraux, métabolique et culturaux 7

V.3. Pouvoir immunogène 7

V.3.1. Antigènes de surfaces 7

V.3.2. Antigènes internes 8

V.4. Pouvoir pathogène 8

VI. PATHOGENIE 9

VI. 1. Pathogénie chez l'animal 9

VI.1.1. Phase primaire 9

VI.1.2. Phase secondaire 10

VI. 2. Pathogénie chez l'homme 11

VII. REPONSE IMMUNITAIRE 12

VII.1. Immunité humorale 12

VII.2. Immunité cellulaire 13

VIII. SYMPTOMES 14

VIII.1. Symptômes chez l'animal 14

VIII.2. Symptômes chez l'homme 14

IX. DIAGNSOTIC 15

IX.1. Diagnostic bactériologique 15

IX.2. Diagnostic sérologique 16

IX.2.1. Séro-agglutination de Wright (SAW) 16
IX.2.2. Epreuve de l'antigène tamponné (EAT) 17
IX.2.3. Réaction de fixation du complément (FC) 18
IX.2.4. Test d'immuno-enzymatique (ELISA) 18
IX.2.4. Test d'immunofluorescence indirecte (IFI) 18
IX.3. Diagnostic immunologique 19
IX.3.1. Ring test 19
IX.3.2. Epreuve cutanée allergique 19
IX.5. Diagnostic moléculaire 20
X. TRAITEMENT 20
X.1. Traitement médicale 20
X.2. Traitement chirurgical 24
XI. PROPHYLAXIE 24
XI.1. Prophylaxie sanitaire 24
XI.1.1. Pays ou zones faiblement infectés 25
XI.1.2. Pays indemnes 26
XI.2. Prophylaxie médico-sanitaire 26
XI.2.1. Pays ou zones très infectés 27
XI.2.2. Pays ou zone moyennement infectés 28

TABLE DES MATIERES

Partie expérimentale : ÉVALUATION DES CARACTERISTIQUES DE LA TECHNIQUE ELISA-I PAR RAPPORT AUX TECHNIQUES USUELLES ET ESTIMATION DE LA PREVALENCE REELLE DE LA BRUCELLOSE BOVINE

I. INTRODUCTION 29

II. MATERIELS ET METHODES 30

II.1. Prélèvement 30

II.1.1. Lieu de l'étude : 30

II.1.2. période d'étude 30

II.1.3. Réalisation des prélèvements 30

II.1.4. Transport du prélèvement 31

II.2. Analyses sérologiques 31

II.2.1. Préparation des sérums 31

II.2.2. Réalisation des analyses 33

II.2.1.1. Épreuve de l'antigène tamponné (EAT) 33

II.2.2.2. Réaction de fixation du complément (FC) 34

II.2.2.3. Technique d''ELISA 37

II.3. Traitement des résultats 45

II.3.1. calcul de la sensibilité et spécificité 45

II.3.1. Estimation de la prévalence 46

II.3.1.1. Estimation de la prévalence apparente 46

II.3.1.2. Estimation de la prévalence réelle 47

II.3.1. Calcul de la valeur prédictive positive et négative 47

II.3.1. Valeur prédictive positive VPP 47

II.3.2. Valeur prédictive négative VPN 47

III. RESULTATS 48

III.1. Calcul de la valeur de sensibilité et de spécificité de la technique ELISA-i 49

III.2. Estimation de la prévalence de la brucellose bovine 50

III.2.1. Calcul de la prévalence apparente ou séroprévalence 50

III.2.2. Calcul de la prévalence réelle 51

III.3. Calcul de la valeur prédictive positive et négative de la technique ELISA 51

III.3.1. Calcul de la valeur prédictive positive VPP 51

III.3.2. Calcul de la valeur prédictive négative VPN 52

IV. DISCUSSION 52

V. CONCLUSION 55

VI. RECOMMANDATIONS 56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Caractère épidémiologique de différentes espèces et biovars du genre *Brucella* (Maurin 2007) 5

Tableau 02 : Pouvoir pathogène chez l'homme des différentes espèces et biovars du genre *Brucella* (Maurin, 2007) 8

Tableau 03 : Principaux antibiotiques prescrits au cours de la brucellose (Chakroun, 2007) 22

Tableau 04 : Principaux antibiotiques prescrits au cours de la brucellose (Chakroun, 2007)..... 23

Tableau 05 : Propositions thérapeutiques (Chakroun, 2007) 23

Tableau 06 : Stratégies de contrôle de la brucellose en fonction de la prévalence (Benkirane, 2001) . 25

Tableau 07 : Résultats de test de l'épreuve à l'antigène tamponné 48

Tableau 08 : Résultats de test de fixation du complément (pour confirmation) 48

Tableau 09 : Résultats du test Elisa-i..... 48

Tableau 10 : Présentation des résultats du test d'ELISA-i par rapport à EAT-FC..... 49

Tableau 11 : Séroprévalence de la brucellose 50

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Progression de l'infection à *Brucella abortus* chez les bovins adultes (Quin et Markey, 2003) 11

Figure 02 : Découpage administratif de l'Algérie ; situation géographique des zones ayant fait l'objet de prélèvements 32

Figure 03 : Découpage administratif de l'Algérie ; zoning relevant du périmètre d'activité du laboratoire. 32

Figure 04 : Situation géographique du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem 32

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

Ac : anticorps

Ag : antigène

ARN : acide ribonucléique

B19 : souche vaccinale 19 de *Brucella abortus*

C' : complément

CD4+ : cluster de différenciation 4 +

CD8+ : cluster de différenciation 8 +

CFU : unités formant colonie

CH : complexe hémolytique

CMI : concentration minimale inhibitrice

CMT : California Mastitis Test

CO_2 : dioxyde de carbone

DO : densité optique

EAT : Epreuve de l'antigène tamponné

Elisa-i : indirect enzyme-linked immunosorbent assay

FC : fixation du complément

GR : globules rouges

H_2S : sulfure d'hydrogène

HSR : hypersensibilité retardée

IFI : immunofluorescence indirecte

IVS : Institut de veille Sanitaire

IgG : immunoglobuline G

IgM : immunoglobuline M

INMV : Institut National de la Médecine Vétérinaire

IV : Inspection vétérinaire

LCR : liquide céphalo-rachidien

LPS : lipopolysaccharides

LVRM : laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem

N : témoin négatif

OIE : Office International des Epizooties

OMS : Organisation mondiale de la santé

P : témoin positif

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

RFSP : réactions sérologiques faussement positives

SAW : Séro-agglutination de Wright

TNF : tumor necrosis factor

TRB : test au Rose Bengale

USA : United States of America

Partie bibliographique

ETUDE DE LA BRUCELLOSE

I. INTRODUCTION

La Brucellose, appelée également fièvre de Malte, fièvre sudoro-algique, fièvre ondulante, mélitococcie ou fièvre méditerranéenne, est une anthropozoonose due aux bactéries du genre *Brucella*, responsable de maladies animales et humaines.

La Brucellose Bovine est généralement due à *Brucella abortus*, moins souvent à *Brucella melitensis*, et à *Brucella suis*. L'infection est présente au niveau mondial. La plupart des pays d'Europe centrale et septentrionale, le Canada, le Japon, l'Australie et la Nouvelle-Zélande sont considérés comme indemnes de l'infection.

Cliniquement, la maladie se manifeste par l'un ou plusieurs des signes suivants : avortement, rétention placentaire, orchite, Épididymite et, rarement, arthrite, avec excrétion de *Brucella* dans les sécrétions utérines et le lait.

Le diagnostic de certitude repose sur l'isolement de *Brucella* à partir de prélèvements d'avortement, des sécrétions mammaires ou de prélèvements post mortem comme les nœuds lymphatiques, les testicules ou les épididymes. Le diagnostic présomptif repose sur la mesure de l'immunité cellulaire ou humorale dirigée contre les antigènes de *Brucella* (OIE, 2005)

La Brucellose humaine reste une maladie pouvant entraîner des complications graves si un traitement n'est pas rapidement mis en place. *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* et *Brucella suis* sont fortement pathogènes pour l'homme et tous les organes infectés, les cultures et tous les matériels potentiellement contaminés doivent être manipulés dans des conditions de sécurité appropriées (OIE, 2008).

II. HISTORIQUE DE LA BRUCELLOSE

La Brucellose a été caractérisée, comme entité nosologique, au XIXe siècle par des médecins anglais installés sur l'ile de Malte (Sarinas et Chitkhara, 2003). Ainsi, la première description clinique fiable de la Brucellose est attribuée à Allen Jeffery Marson en 1859 et, l'agent causal (nommé initialement Micrococcus melitensis) de cette maladie, est isolé en 1886 par David Bruce à partir des rates de militaires décédés de cette maladie à Malt. En 1887, Almorth Wright décrit le test diagnostique par séro-agglutination en tube. Le rôle de la chèvre comme réservoir de l'agent de la Brucellose, sur l'ile de malte, est décrit en 1905 par Themistocles Zammit, bactériologiste maltais.

La Brucellose ou fièvre de Malte est ensuite décrite dans de nombreux autres endroits, sous des dénominations variable : Fièvre de Crimée ; Fièvre de Gibraltar ; Fièvre de Chypre ; Fièvre de Crète ; Fièvre de Constantinople etc. Parallèlement, Bernard Bang, vétérinaire danois, isole en 1895, chez les Bovins présentant des avortements à répétition, une nouvelle bactérie qu'il nomme *Bacillus abortus*.

La relation entre *micrococcus melitensis* et *bacillus abortus* n'est établie qu'en 1917 par Alice Evans, bactériologiste américain, qui a proposé la création du genre *Brucella* (et des espèces *Brucella melitensis* et *Brucella abortus*) en l'honneur des travaux de Bruce. Quatre espèces sont ensuite caractérisées ; *Brucella suis* en 1917 isolée par Traum chez des truies présentant des avortements ; *Brucella canis* reconnue en 1966 par Carmichael comme agent d'avortement chez la chienne ; *Brucella ovis* isolée de moutons en 1953 ; et *Brucella neotomae*, espèce isolée de rats du désert (*Neotoma lepida*) dans les USA en 1957.

III. IMPORTANCE DE LA BRUCELLOSE

La Brucellose est une maladie hautement contagieuse, dont l'impact économique sur le développement des industries animales est considérable. Étant considérée comme la zoonose la plus répandue dans le monde, elle représente une menace sérieuse pour la santé humaine (OMS, 1986). Elle appartient pour cela à la liste des maladies prioritaires de l'Office International des Epizooties. C'est une maladie importante en raison de son aspect zoonotique et ses conséquences économiques qu'elle engendre.

III.1. Importance économique

La Brucellose animale occasionne des pertes économiques sévères, résultants à la fois des effets directs sur les animaux (avortements, stérilité, diminution de la production laitière), et des effets indirects, notamment sur les industries animales, lesquels sont associés aux coûts des interventions vétérinaires et de la reconstitution des cheptels.

Elle a également de sévères répercussions sur les échanges commerciaux liés au freinage imposé aux mouvements et au commerce des animaux, en raison des sanctions imposées à l'exportation d'animaux ainsi que de produits d'origine animale (Quin et Markey, 2003).

En plus, il n'y a pas que des pertes liées à la production animale, mais également des pertes liées à la santé publique. A titre d'exemple, en Algérie, en ne prenant en compte que les cas

aigus septicémiques, nécessitant en moyenne 7 jours d'hospitalisation et 45 jours de soins à domicile, ils ont trouvé que les dépenses pour chaque patient est l'équivalaient à huit mois du « salaire minimal interprofessionnel » Ainsi, les pertes entraînées par la Brucellose sont très lourdes, en particulier dans les pays de l'Afrique du Nord et du Proche-Orient où les services vétérinaires et les services de santé publique ne sont pas suffisamment bien structurés, de même qu'en raison du contexte social et de certaines habitudes culinaires qui prévalent dans ces pays (Benkirane, 2001).

III.2. Importance pour la santé publique

Bien qu'il soit reconnu un rôle important à *Brucella* suis dans les infections humaines dans plusieurs régions du monde (Asie du Sud-Est, Europe centrale et occidentale, Amérique du Nord) ; dans la région circumméditerranéenne et le Proche et Moyen-Orient, c'est *Brucella* melitensis qui est l'agent responsable de la plupart des cas cliniques sévères de Brucellose humaine. Cette dernière est considérée comme l'une des zoonoses les plus répandues dans le monde. L'OMS estime l'incidence mondiale de la maladie à 500.000 cas par an (Dao, 2009).

En outre, la maladie peut entraîner des cas de mortalité. Le plus souvent, elle se traduit par un état débilitant aigu ou chronique ayant des conséquences sévères sur le développement économique et social. En effet, les populations rurales vivent en contact étroit avec leurs animaux et préfèrent généralement consommer du lait et des produits laitiers crus ou légèrement acidifiés. Pour cette raison, la prévention de la maladie humaine est centrée, d'une part, sur les contaminations par contact avec des animaux infectés ou des objets contaminés et, d'autre part, sur la contamination alimentaire (Benkirane, 2001).

IV. EPIDEMIOLOGIE

IV.1. Répartition géographique

La Brucellose animale a une répartition mondiale avec une prédominance dans le bassin méditerranéen, l'Asie de l'ouest, le Moyen-Orient, l'Amérique du sud, l'Amérique centrale et l'Afrique noire (IVS, 2000). Cependant, plusieurs pays en Europe centrale et du nord, ainsi que le Canada, le Japon, l'Australie et la Nouvelle Zélande sont considérés comme indemnes (OIE, 2005). Dans les pays endémique, les foyers de la Brucellose animale se situent dans les exploitations agricoles où se trouvent des Bovins, des Ovins, des Caprins et/ou des porcs. Ils

persistent très longtemps malgré les mesures prophylactiques et hygiéniques qui peuvent être pris (Roux, 1979).

Par ailleurs, la Brucellose humaine demeure endémique dans certains pays du bassin méditerranéen, au moyen orient, en Asie de l'ouest, dans certaines régions d'Afriques et d'Amériques latine (Corbel, 1997). En Europe, la Brucellose humaine reste endémique dans les pays des Balkans (Grèce, Macédoine, Albanie, Serbie, et Monténégro), et un degré moindre au Portugal, en Espagne et en Italie.

IV.2. Espèces sensibles

La Brucellose est une maladie essentiellement animale. L'homme n'est qu'un hôte accidentel. Il s'agit donc d'une une zoonose avant d'être une anthropozoonose. La caractéristique essentielle de cette zoonose est de pouvoir atteindre à peu près tous les animaux domestiques et sauvages. Il n'existe pratiquement aucune espèce animale résistante a l'infection par *Brucella* et c'est évidemment la raison de la dispersion mondiale de la maladie (Roux, 1979).

IV.3. Réservoir

Le réservoir animal des *Brucella* est constitué de nombreux mammifères terrestres et marins (Maurin, 2007). Tout animal infecté, malade ou apparemment sain, constitue une source potentielle de *Brucella*. Il peut en outre rester porteur de germe et contagieux durant toute sa vie ; c'est la raison pour laquelle tout animal infecté doit être considéré de façon définitive comme une source possible de *Brucella* et toute action de lutte doit tenir compte non seulement de la présence des malades, mais aussi de celle des porteurs de germes qui en plus sont plus nombreux. La contagiosité des sujets infectés est toutefois variable est souvent intermittente : elle est surtout importante en période de reproduction et les animaux les plus dangereux sont en fait les femelles infectées au moment de la vidange de l'utérus gravide (point vétérinaire, 1990).

IV.4. Matières virulentes

Les matières virulentes les plus importantes sont le contenu de l'utérus gravide, expulsé pendant l'avortement ou la mise bas, avec une excrétion qui débute dès la liquéfaction du bouchon muqueux obturant le col et qui disparait généralement deux à trois semaines après l'expulsion du fœtus. Les sécrétions vaginales et l'urine peuvent quant à eux, être virulentes. De même, il existe

une excrétion transitoire (de quelque jours après la mise bas) et discrète des bactéries dans le lait et le colostrum (Acha et Szyfres, 2005).

Chez le mâle, il y a une excrétion de *Brucella* dans le sperme. Des bactéries sont parfois présentes dans les produits de suppuration (hygroma), dans les fèces (jeunes nourris par du lait infecté) et dans les viscères infectés (contamination humaine).

Les *Brucella* sont sensibles à la pasteurisation, mais elles peuvent résister plusieurs semaines voir plusieurs mois dans les matières virulentes, dans l'environnement (pâturage, points d'eau, lisiers …etc.) et plus de huit mois dans un avorton à l'ombre et/ou dans des fosses à purin ; deux à trois mois dans un sol humide et trois à quatre mois dans les fèces (Lefèvre *et al.,* 2003).

IV.5. Mode de transmission

Chez les animaux, il existe une transmission directe qui est soit fœto-maternelle, soit génitale, soit digestive et une transmission indirecte par l'environnement. Généralement, les animaux s'infectent par ingestion de nourriture, d'eau, de colostrum ou de lait contaminé ou par léchage du placenta, de l'avorton, du veau ou de l'appareil génital d'un Bovin ayant avorté ou mis bas récemment (OMS, 1986).

Les animaux peuvent s'infecter également par voie conjonctivale (Nicoletti, 1980). La Brucellose peut également être transmise de la vache à son veau, in utéro ou immédiatement après la naissance. De même, les animaux peuvent se contaminer par les organes génitaux lors des saillies. La conséquence est une dissémination importante des *Brucella* et la contamination des autres animaux.

Chez l'homme, le principal réservoir de la *Brucella spp* est constitué par des animaux d'élevage. Ainsi, pour une région donnée, l'épidémiologie humaine est en général très parallèle à la situation animale et à son évolution (De Massis *et al.,* 2005) et la Brucellose humaine est structurellement liée à la Brucellose animale, du faite que la transmission interhumaine de la Brucellose est exceptionnelle (Ruben *et al.,* 1991). Par conséquent, la maladie humaine ne disparaitra que lorsque la maladie animale aura été éliminée, grâce à des mesures de prophylaxie médicale (vaccination des troupeaux) et sanitaire (dépistage par des méthodes sérologiques et autres et, si les impératifs économiques le permettent, abattage des animaux infectés) (Roux, 1979),

La contamination humaine a principalement lieu lors de l'ingestion de produits laitiers contaminés (alimentaire) ou bien lors de contact avec des avortons et des animaux ayant mis bas. Ces modes de contamination expliquent la fréquence des Brucelloses chez les vétérinaires, bergers, agriculteurs, bouchers, équarrisseurs, employés d'abattoirs et de laboratoires dans les pays enzootiques (Papas *et al.,* 2005). La Brucellose peut être contractée également chez le personnel du laboratoire lors de manipulation des cultures de *Brucella* (Robichaud *et al.,* 2004) et/ou lors de la manipulation des vaccins anti-Brucellique pour les animaux (Young, 1995).

V. AGENT PATHOGENE

V.1. Taxonomie

Les *Brucella* appartiennent au groupe alpha des Proteobacteria (Moreno *et al.,* 1990) au même ordre que les Rhizobium dans les alphaprotéobactéries et à la famille des Rhizobiaceae (Yanagi et Yamasato, 1993). Le genre *Brucella* est divisé en 8 espèces de *Brucella* (*melitensis, suis, abortus, canis, ovis, neotermae, cetecea, pinnipediae*), elles-mêmes séparées en biovars, en fonction notamment d'une relative spécificité de l'hôte animal infecté par chaque espèce. Cinq espèces du genre *Brucella* sont principalement responsables de l'infection chez l'animal. Le tableau suivant représente les principales espèces du genre *Brucella* et leurs principaux biovars.

Tableau 01 : caractère épidémiologique de différentes espèces et biovars du genre *Brucella* (Maurin 2007)

Espèce	**Biovars**	**Hôte habituel**	**Répartition géographique**
B. abortus	1 à 6 et 9	Bovins, ongulés sauvages	Ubiquitaire
B. melitensis	1 à 3	Ovins, Caprins, ongulés sauvages	Bassin méditerranéen, moyen orient
B. suis	1 à 3	Suidés	Amérique, Asie, Océanie
	2	Suidés et lièvres	Europe centrale et occidentale
B. canis	--	Chiens	Ubiquitaire (fréquence élevée en Amérique du sud)
B. ovis	--	Ovins	Bassin méditerranéen,

Toutefois, des études basées sur l'hybridation ADN/ ADN ou sur la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S ont montrée que le genre *Brucella* est **en fait** monospécifique. L'homogénéité génétique des *Brucella* est grande : les hybridations DNA:DNA montrent 90% d'homologie. Par conséquent, il a été proposé (mais pas encore accepté par le Sous-comité de Taxonomie) que les espèces *Brucella*, infectant les mammifères terrestres, seront assimilées à une espèce unique dont le nom proposé est *Brucella melitensis* (Bricker *et al.,* 2000). Les autres espèces classiques (*abortus*, *melitensis*, etc.) seront considérées comme n'étant que des biovars ou des sous-espèces d'une seule et même espèce (OIE, 2005).

V.2. Caractères structuraux, métabolique et culturaux

Les *Brucella* sont des petits coccobacilles, à Gram négatif, immobiles, non capsulés ni sporulés. Elles mesurent 0,5 à 0,7 µm de laegeur et 0,6 à 15 µm de longeur. (Quin *et al.,* 2003).

Ce sont des bactéries aérobies strictes, catalase positive, oxydase positive et souvent uréase positive (Shapiro et Wong, 1999). Cependant, elles n'utilisent pas le citrate et ne produisent pas d'indole ni acétyl-méthyl-carbinol (réaction de Voges-Proskauer négative). En fait, les trois espèces classiques de *Brucella* (*abortus*, *melitensis* et *suis*) sont divisées en biovars, principalement sur la base de leur exigence en CO_2 ; leur capacité à produire le H_2S ; leur sensibilité aux colorants (thionine et fuchsine basique) et de leur agglutination avec des sérums spécifiques (Alton *et al.,* 1988).

Les colonies des *Brucella abortus, Brucella melitensis et Brucella suis* sur un milieu solide apparaissent rondes, lisses, de 3 à 4 mm de diamètre en 2 à 3 jours de culture. Elles sont brillantes, bleuâtres et translucides après incubation pendant 3 à 5 jours et deviennent opaques avec l'âge. En revanche, les colonies de *Brucella ovis et Brucella. canis* prennent toujours un aspect rugueux, mât, jaunâtre et opaque (Freney *et al.,* 2000).

V.3. Pouvoir immunogène

V.3.1. Antigènes de surface

Le lipopolysaccharide (LPS) est l'antigène le plus immunogène. Il se comporte comme étant un antigène « T-indépendant », ce qui n'est pas le cas de la majorité des protéines. Par conséquent, les anticorps dirigés contre lui n'ont pas besoin d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire pour être synthétisés (Ko et Splitter, 2003). Etant donné, le LPS de la

membrane externe est le principal déterminant de la virulence. Celle-ci est due en fait à la toxicité de lipide A (endotoxine) et aux chaines latérales O qui empêchent l'attachement du complexe d'attaque membranaire du système du complément.

En revanche, l'immunogénicité des protéines membranaires, péri-plasmiques ou cytoplasmiques est bien inférieur à celle du LPS (Ko et Splitter, 2003). Toute fois, les porines de la membrane externes sont suggérées pour stimuler la réaction d'hypersensibilité de type IV chez les sujets infectés (Walker, 2002).

Par ailleurs, le LPS est le support essentiel des réactions croisées entre *Brucella* spp, et *Yersinia entérocolitica* O : 9, ou plus accessoirement *Francisella tularensis, Vibrio cholerae* O : 1, *Escherichia hermanii*, E. *Coli* O : 157, et *Salmonella* O : 30.

V.3.2. Antigènes internes

L'analyse d'extraits solubles de *Brucella* à l'aide d'épreuve d'immuno-précipitation permet de dénombrer entre 1 et 9 antigènes protéiques intracellulaires, dont A1, A2, A3, A4, B1, B2 et C. ils induisent chez l'animal une réponse à la fois humorale et cellulaire (Cherwonogrodzky *et al.,* 1990). La propriété de certains de ces antigènes internes, liées au développement d'une immunité cellulaire induisant une hypersensibilité retardée, est mise à profit dans le dépistage allergique par le test d'intradermoréaction (Grain-Bastuji, 1993).

V.4. Pouvoir pathogène

Les *Brucella* sont des bactéries pathogènes spécifiques responsables d'une infection animale transmise accidentellement à l'homme « anthropozoonose ». Elles infectent de très nombreuses espèces animales, causant d'importantes pertes dans les élevages. L'Homme n'est qu'un hôte accidentel des Brucelles et n'en constitue jamais le réservoir. Il n'y a pas de transmission interhumaine de la maladie. (Godfroid *et al.,* 2005).

Sur le plan clinique, la Brucellose animale est essentiellement une maladie de la reproduction. Elle se caractérise par une infection chronique, conduisant à des avortements et des troubles de la reproduction. Chez l'homme, les *Brucella melitensis* et *Brucella abortus* sont les espèces le plus souvent en cause en pathologie humaine (Corbel, 1997). Elles provoquent un syndrome pseudo-grippal : fièvre, sueurs, anorexie, asthénie, céphalées, myalgie, arthralgie. La pathogénicité des *Brucella* vis-à-vis de l'homme est présentée dans le tableau ci après.

Tableau 02 : pouvoir pathogène chez l'homme des différentes espèces et biovars du genre *Brucella* (Maurin, 2007)

Espèce	**Biovars**	**Pathogénicité chez l'homme**
B. abortus	1 à 6 et 9	Modérée
B. melitensis	1à 3	Forte
B. suis	1 à 3	Forte
B. canis	--	Faible
B. ovis	--	Nulle

L'évolution spontanée de la Brucellose se caractérise surtout par la possibilité de survenue des localisations secondaires ou Brucellose focalisée, qui peut être le mode de révélation et qui détermine en même temps la gravité de l'infection (Colmenero *et al.,* 1996).

VI. PATHOGENIE

VI. 1. Pathogénie chez l'animal

Les étapes initiales de l'établissement de l'infection brucellique sont peu connues. Comme dans toute maladie infectieuse, l'initiation de l'infection dépend de facteurs liés à l'agent pathogène (dose, virulence), à l'hôte (résistance naturelle, âge, sexe, état physiologique) et à l'environnement (Lefèvre *et al.,* 2003).

La pénétration de la bactérie se fait généralement via la muqueuse orale, du nasopharynx, des conjonctives, la muqueuse de l'appareil génital, mais également par des abrasions ou des lésions cutanées. Il se produit alors une réaction inflammatoire aiguë de la sous muqueuse avec infiltration de leucocytes (granulocytes neutrophiles et monocytes), puis il y a extension par voie lymphatique aux nœuds lymphatiques locaux (Godfroid *et al.,* 2003).

On distingue, dans l'évolution de la Brucellose, deux phases :

VI.1.1. Phase primaire

Après une durée d'incubation variable d'une espèce animale à une autre, le germe se dissémine à partir des sites ganglionnaires de multiplication locorégionale, en empruntant les voies lymphatiques et sanguines. La voie lymphatique est prépondérante dans la majorité des espèces faisant de la Brucellose.

L'importance de la dissémination sanguine est en revanche variable selon l'espèce infectée : ainsi la bactériémie est discrète dans l'espèce Bovine (il est très difficile d'obtenir chez cette espèce une hémoculture positive) (Enright, 1990).

Si la *Brucella* n'est pas éliminée à cette étape, elle se propage. La dissémination peut mener à l'infection d'une grande variété des tissus ; tissus lymphoïdes (surtout les nœuds lymphatiques de la sphère génitale) ; glande mammaire et organes reproducteurs (placenta des femelles gravides; testicules et leurs annexes) (Ko et Splitter, 2003). Ces localisations peuvent s'accompagner des manifestations cliniques caractérisant la phase primaire : avortement; orchite ou épididymite, etc (Enright, 1990).

VI.1.2. Phase secondaire

Cette phase est caractérisée par un état de résistance de l'hôte, suite au développement de l'immunité. A cet effet, deux issus sont possible ; la guérison ou la persistance des *Brucella* (Brucellose chronique).

La guérison, marquée par l`élimination totale des *Brucella* est une éventualité possible mais peu fréquente. En fait, elle dépend de facteurs variés tenant au germe (*Brucella canis* persiste très longtemps chez le chien alors que ce dernier se débarrasse facilement de *Brucella abortus*) ou à l'hôte (80 % des brebis infectées se débarrassent de *Brucella melitensis* en 1 à 2 ans alors que la majorité des Bovins restent infectés toute leur vie) (Enright, 1990).

L'établissement d'infections chroniques par *Brucella*, éventualité la plus fréquente, résulterait de sa capacité à survivre dans les cellules phagocytaire, qui la mettent à l'abri des mécanismes extracellulaires de défense de l'hôte tels que le complément et les anticorps. Etant donné leur LPS est moins toxique pour les macrophages, moins pyrogène et moins inducteur de sécrétion d'interféron-γ et de TNF-α que celui des entérobactéries. Elles sécrètent également un facteur empêchant l'apoptose des macrophages infectés (Gross *et al.,* 2000).

Toutefois, leur multiplication peut être réactivée dans certaines circonstances, notamment pendant la gestation. Cette multiplication intracellulaire a lieu dans un autophagosome, après inhibition de la fusion phagolysosomiale (Michaux-Charachon *et al.,* 2002).

La figure ci-après montre la progression de l'infection à *Brucella abortus* chez les Bovins adultes.

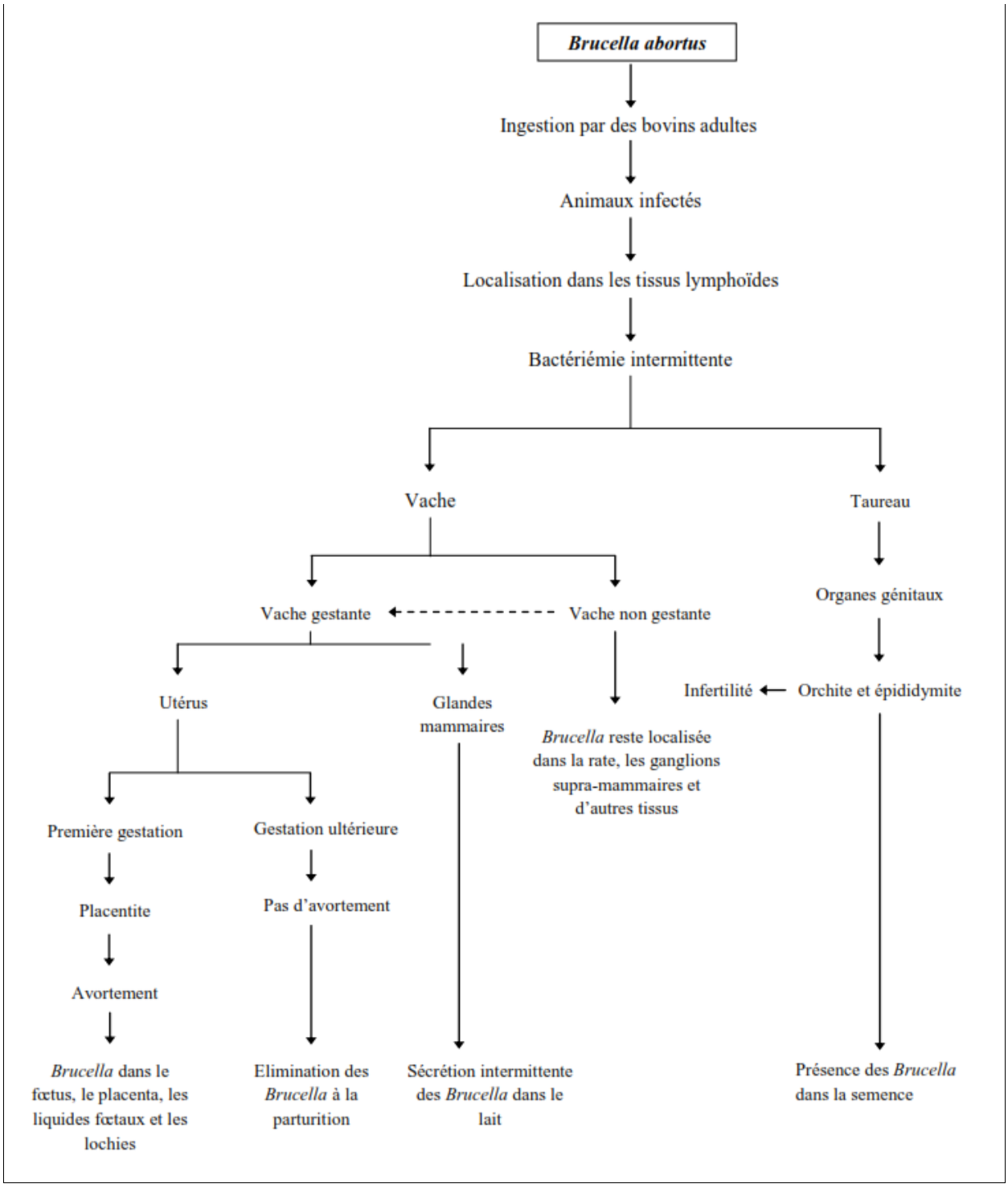


Figure 01 : progression de l'infection à *Brucella abortus* chez les Bovins adultes (Quin et Markey, 2003).

VI. 2. Pathogénie chez l'homme

La Brucellose est une maladie chronique dont la physiopathologie fait intervenir plusieurs phases successives. Au cours de la période d'incubation, qui dure en moyenne 15 jours, les

bactéries migrent par voie lymphatique jusqu'au premier relais ganglionnaire où elles se multiplient. La Brucellose se caractérise dans sa phase aiguë par une septicémie d'origine lymphatique, les bactéries colonisent les organes riches en cellules réticulohistiocytaires (ganglions, foie, rate, tissus osseux, génital..) où vont se constituer des foyers bactériens intra-cellulaires entourés d'une réaction inflammatoire histiomonocytaire et lymphocytaire (Vanderkerckhove, 1993). La multiplication intracellulaire a lieu dans un autophagosome (Janbon, 2000). Au cours de cette phase, surviennent des manifestations cliniques aiguës de la maladie et les hémocultures sont positives.

L'apparition d'anticorps sériques et spécifiques (IgG, IgM, IgA), à partir de la deuxième semaine va s'opposer, en partie, au développement de l'infection qui, même en l'absence de traitement, va cliniquement s'apaiser. La maladie peut évoluer ensuite vers une phase subaiguë avec la possibilité d'apparition d'une ou rarement plusieurs localisations secondaires. Celles-ci peuvent être ostéo-articulaires, neurologiques, testiculaires, hépatospléniques, etc. (Maurin, 2005). L'infection tissulaire se traduit par une réaction cellulaire entraînant l'apparition de granulomes limités par une réaction cellulaire lympho-plasmocytaire disposée en couronne, certaines cellules peuvent se transformer en cellules géantes multi nucléées donnant à l'ensemble un aspect tuberculoïde et réalisant le classique granulome de Bang. Rarement, la fusion de ces granulomes donne naissance à des lésions à centre caséifié appelées « brucellome ». Les lésions suppurées et nécrotiques sont exceptionnelles chez l'homme (Janbon, 2000). Une virulence exceptionnelle de la souche et un terrain déficient sont susceptibles de déterminer une atteinte polyviscérale maligne.

La Brucellose chronique se définit par une évolution prolongée au-delà d'un an, avec ou sans découverte d'une localisation secondaire. Les *Brucella* sont des bactéries intracellulaires facultatives qui sécrètent un facteur empêchant l'apoptose des macrophages infectées expliquant leur persistance dans l'organisme (Janbon, 2000).

VII. REPONSE IMMUNITAIRE

VII.1. Immunité humorale

La réponse immunitaire des animaux est à la fois humorale et à médiation cellulaire. La réponse humorale est identique chez toutes les espèces animales infectées. Elle est dirigée principalement contre l'antigène majeur de *Brucella*, à savoir la chaîne O de son lipopolysaccharide. Celui-ci étant un antigène « T-indépendant », ce qui n'est pas le cas de la

majorité des protéines. Les anticorps dirigés contre lui n'ont pas besoin d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire pour être synthétisés.

Ces anticorps anti-LPS de type IgM induisent une lyse bactérienne par la voie classique du complément ainsi que par opsono-phagocytose. La bactérie opsonisée serait également plus rapidement phagocytée. Cependant, vue la résistance des *Brucella* à l'activité bactéricide des macrophages, une extension possible de l'infection dans l'organisme de l'hôte. A ce stade, seule la réponse immunitaire à médiation cellulaire permettrait encore la maitrise de l'infection.

VII.2. Immunité cellulaire

Cette réponse est exclusivement dirigée contre des protéines, contrairement à la réponse humorale qui lors d'une infection par *Brucella*, est dirigée à la fois contre les LPS et contre les protéines bactériennes.

L'immunité cellulaire se décompose en quatre étapes (Godfroid *et al.,* 2003) : les macrophages infectés produisent des cytokines ; puis les lymphocytes précurseurs se différentient en lymphocytes de type 1 (T1) ; ces lymphocytes 1 se divisent en lymphocytes « helpers » CD4+ et cytotoxiques CD8+ ; et enfin l'interféron gamma produit par ces deux lymphocytes induit la destruction de la bactérie. (Oliveira et splitter 1995). L'immunité cellulaire est essentielle avec formation de granulomes où des macrophages activés par des Lymphocytes T tentent de tuer les *Brucella*.

Les lymphocytes T renforcent l'activité bactéricide des macrophages qui détruisent les *Brucella* au sein d'un granulome spécifique. Par conséquent, les *Brucella* sont phagocytées plus ou moins rapidement par les macrophages puis détruits avec libération des antigènes et d'endotoxines. Parfois, les *Brucella* peuvent résister, plusieurs années, dans certains sites privilégiés comme dans les nœuds lymphatiques, demeurant à l'intérieur des cellules phagocytaires.

Leur persistance intra-macrophagique entretient un état d'hypersensibilité retardée (HSR) qui est la cause fondamentale des troubles observés pendant la phase chronique (Godfroid *et al.,* 2003). Il est possible de mettre en évidence l'immunité cellulaire par la réaction d'hypersensibilité retardée suite à l'injection dans le derme des antigènes de *Brucella*.

VIII. SYMPTOMES

VIII.1. Symptômes chez l'animal

Elle touche essentiellement les Bovins, Ovins, Caprins et porcins. L'incubation peut durer de quelques jours à plusieurs mois. Très souvent, la Brucellose animale est une maladie chronique, bien tolérée, mais responsable chez les femelles d'avortement et/ou une excrétion de bacilles au cours de la mise bas (Maurin, 2007).

L'avortement survient généralement au dernier tiers de gestation, surtout entre le 5ème et le 7ème mois, chez les génisses infectées au moment de la saillie ou juste au début de la gestation. Cependant, l'avortement n'est pas systématique et une gestation qui arrive à terme avec part normal est possible, notamment chez les génisses infectées en fin de gestation (Gourreau et Bendali, 2008). Dans ce cas, la génisse infectée donne naissance à des veaux infectés. Le nouveau-né peut succomber néanmoins dans les 24 à 48 heures du fait des lésions nerveuses secondaires à une hypoxie.

Suite à l'avortement, une rétention placentaire suivie d'une métrite peut survenir. Chez les vaches infectées, la production laitière peut chuter de 25% malgré qu'il n'y ait pas de mammite apparente (Lefèvre *et al.,* 2003).

D'autre part, les males peuvent présenter une orchite uni ou bilatérale, une épididymite et une atteinte des vésicules séminales. Les *Brucella* retrouvés dans les spermes peuvent provoquer des abcès testiculaires (Kahn, 2008).

VIII.2. Symptômes chez l'homme

De nombreux patients infectés par les *Brucella* demeurent asymptomatiques ou peu symptomatiques. Dans ce cas, le diagnostic ne peut être établi que de façon fortuite, par exemple au cours d'une enquête sérologique systématique après une exposition avérée.

Chez les patients symptomatiques, l'incubation habituelle de la Brucellose est de 1 à 3 semaines, mais peut être beaucoup plus longue (Corbel, 1997). Les manifestations cliniques sont classiquement protéiformes et peu spécifiques, survenant sur un mode aigu ou subaigu. Il s'agit souvent d'un tableau pseudo-grippal : fièvre, sueurs, anorexie, asthénie, céphalées, myalgie, arthralgies.

L'évolution spontanée de la Brucellose se caractérise surtout par la possibilité de survenue des localisations secondaires ou Brucellose focalisée, qui peuvent être le mode de révélation et font la gravité de cette infection (Young, 1995).

Cette phase est caractérisée par des localisations secondaires au niveau ostéo-articulaires, péricardiques, neurologiques, génitales et splénohépatiques. Les plus fréquentes sont ostéo-articulaires (Doganay *et al.,* 2003).

La Brucellose chronique est définie par une évolution de la maladie supérieure à un an, avec ou sans localisation secondaire (Young, 1995). Elle est responsable chez la femme enceinte d'avortement, d'accouchement prématurés et de mort in-utéro dans 10 à 46 % des cas (khan *et al.,* 2001).

IX. DIAGNSOTIC

Tous les avortements Bovins devraient être considérés comme une suspicion de Brucellose et faire l'objet d'analyses, mais ce signe n'est nullement pathognomonique (OIE, 2005). Par ailleurs, le diagnostic de certitude des infections à *Brucella* repose sur l'isolement et l'identification de la bactérie, mais lorsque la bactériologie ne peut être mise en œuvre, le diagnostic peut faire appel à des techniques sérologiques, immunologiques voir moléculaires.

IX.1. Diagnostic bactériologique

La présence de *Brucella* dans les échantillons biologiques peut être suspectée par une coloration suivie d'un examen microscopique, mais le résultat, qu'il soit positif ou négatif doit être confirmé par culture.

Les échantillons les plus intéressants pour sa réalisation sont : des cotylédons issus du placenta, des excrétions vaginales, du poumon, du foie et/ou du contenu abomasal du fœtus. l'hémoculture reste un bon moyen de diagnostic et demeure constamment positive pendant la phase aiguë, fréquemment positive pendant la phase subaiguë, exceptionnellement positive pendant la phase chronique (AVRIL, 1992). L'isolement des *Brucella* à partir du sang par hémoculture demeure la technique de référence pour établir un diagnostic certain de Brucellose (Shapiro et Wong, 1999). L'isolement direct et la culture des *Brucella* sont habituellement réalisés sur milieu solide. Cette méthode est la méthode de choix car elle permet le développement de colonies pouvant être isolées et aisément reconnues.

De tels milieux limitent également l'apparition de mutants rugueux et le développement excessif de contaminants. Cependant, les milieux liquides peuvent être recommandés pour les échantillons volumineux et pour l'enrichissement.

Une grande variété de milieux de base commerciaux déshydratés est disponible, tel que le milieu de base pour *Brucella* (*Brucella* medium base), la gélose trypticase (ou tryptone)-soja (TSA). L'ajout de 2 à 5 % de sérum de Bovin ou de cheval est nécessaire pour la croissance de souches de *Brucella. abortus*. D'autres milieux sont satisfaisants tels que la gélose sérum-dextrose (serum-dextrose agar [SDA]) ou glycérol dextrose (ALTON *et al.,* 1988).

Dans le cas de l'isolement d'une souche bactérienne, le genre *Brucella* peut être suspecté sur des caractères culturaux et biochimiques suivantes : des colonies non hémolytiques, de croissance lente en milieu enrichi, possédant une catalase, une oxydase et une uréase.

NB : toute suspicion de Brucellose doit être signalée au laboratoire du fait du risque élevé de contamination du personnel technique (Maurin, 2007).

IX.2. Diagnostic sérologique

Bien que le diagnostic de certitude de la Brucellose demeure basé sur l'isolement en culture des *Brucella*. Cependant, du faite de la faible sensibilité des hémocultures dans les stades ultérieurs de la maladie, le diagnostic sérologique indirect des *Brucella* ne serait souvent évoqué qu'à un stade où les hémocultures sont négatives ou non réalisées.

La sérologie est principalement basée sur la détection des anticorps spécifiques par différentes méthodes sérologiques indirectes tels que la Séro-agglutination de Wright (SAW) ; Epreuve de l'antigène tamponné (EAT) ; Réaction de fixation du complément (FC) ; Test d'immuno-enzymatique (ELISA) ; Test d'immunofluorescence indirecte (IFI).

IX.2.1. Séro-agglutination de Wright (SAW) :

La séro-agglutination de Wright (SAW) est la méthode la plus anciennement utilisée ; c'est une réaction de référence pour l'OMS qui garde son intérêt dans la Brucellose aiguë ; elle consiste à rechercher l'agglutination en tube des *Brucella* (souche de *Brucella abortus*) en présence de dilutions du sérum à étudier ; elle met en évidence des Anticorps de type IgM ; elle est la plus précocement positive au cours de la maladie (environ 10 à 15 jours après le

début), mais elle se négative rapidement ; parfois elle est négative dans les Brucelloses subaiguës et presque toujours négatives dans les Brucelloses chroniques.

De fausses agglutinations peuvent être dues à la parenté antigénique entre les *Brucella* et d'autres bactéries : *Yersinia enterocolitica* sérotype 09, *Vibrio cholerae* (vaccination), *Francisella tularensis* et rarement *Escherichia coli* 0 157.

Chez les anciens mélitococciques, le taux d'agglutination peut s'élever d'une façon transitoire à la suite d'une infection banale ou d'une vaccination hétérologue. De plus, dans 1% des cas, des anticorps bloquants sont présents de type IgA : ils sont détectés par un blocking test (Avril *et al.,* 1992).

IX.2.2. Epreuve de l'antigène tamponné (EAT) :

L'épreuve de l'antigène tamponné (EAT), coloré au Rose-Bengale, est une réaction rapide d'agglutination sur lame. Elle utilise une suspension en milieu acide tamponné de *Brucella* inactivés et colorés par le Rosé Bengale. Ne mettant en évidence que les IgG, cette réaction est positive un peu plus tardivement que le sérodiagnostic de Wright (Avril *et al.,* 1992).

Il a été amélioré par l'emploi d'un antigène tamponnée acide qui a augmenté sa spécificité ; en effet, l'activité agglutinante des IgG Bovines est facilitée à pH acide tandis que celles des IgM est fortement réduite.

Il s'agit d'un test simple, rapide à exécuter et offrant une grande sensibilité (Godfroid *et al.,* 2003). Selon les recommandations de l'Office International des Epizooties (OIE), le test Rose Bengale est un bon test de dépistage (OIE, 2005). Cependant, cette réaction peut être faussement positive dans les mêmes circonstances que le sérodiagnostic de Wright.

Les réactions d'agglutination (E.A.T. et S.A.W.) donnent lieu à de nombreuses interférences et les taux d'agglutinations sont voisins que l'infection soit due à *Brucella* ou à *Yersinia enterocololitica* 09. Qu'il s'agisse du dépistage ou du diagnostic sérologique de Brucellose, il est nécessaire d'associer aux réactions d'agglutinations (E.A.T. ou S.A.W.) à des réactions plus spécifiques et/ou sensibles (Laudat, 1987).

Classiquement, tous les sérums classés « positifs » par le test au rose Bengale sont ensuite testés par la technique de fixation du complément. Un sérum est considéré comme provenant d'un animal infecté lorsqu'il se révèle positif dans les deux tests (Godfroid *et al.,* 2003).

IX.2.3. Réaction de fixation du complément (FC) :

De mise en œuvre délicate, la réaction de fixation du complément met en évidence les IgG. L'épreuve de fixation du complément (FC) montre une spécificité diagnostique supérieure à celle de la SAW (OIE, 2005). Il est, de longue date, considéré comme le plus spécifique en matière de Brucellose (Grain-Bastuji, 1993).

Les réactions non spécifiques sont peu fréquentes dans ce test et, contrairement au test de SAW, les titres d'anticorps peuvent persister lorsque l'infection devient chronique (Godfroid *et al.,* 2003).

C'est une technique très utilisée comme test de confirmation mais elle est très compliquée à réaliser, demande un équipement de laboratoire sophistiqué et une équipe bien formée.

IX.2.4. Test d'immuno-enzymatique (ELISA) :

L'immuno-enzymatique (ELISA) est mieux adaptée au titrage spécifique des IgG et des IgM anti-*Brucella* (Maurin, 2007). C'est le test qui donne des résultats de la façon la plus précoce (Godfroid *et al.,* 2003) ; elle reste positive longtemps après l'épisode aigu, permettant un diagnostic sérologique rétrospectif de la Brucellose subaiguë ou chronique (Crosjean *et al.,* 2009).

Des tests ELISA permettent de détecter spécifiquement des anticorps anti-LPS ou des anticorps anti-protéines cytoplasmique de *Brucella* (Baldi *et al.,* 1999 ; Goldbaum *et al.,* 1992). Ces tests présenteraient une meilleure spécificité, notamment par diminution des réactions sérologiques croisées. De plus, L'ELISA indirect est une épreuve très sensible et peut être utilisé pour le dépistage épidémiologique (OIE, 2004). Mais comme tous les autres tests sérologiques, il ne permet pas de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés (Godfroid *et al.,* 2003).

IX.2.4. Test d'immunofluorescence indirecte (IFI) :

L'immunofluorescence indirecte (IFI), quant à lui, détecte les IgM et IgG. (Crosjean *et al.,* 2009). L'IFI est classiquement plus tardive que la SAW ou l'EAT, mais demeure positive au cours des formes chroniques de Brucellose, alors que les autres techniques peuvent être négatives à ce stade (Maurin, 2007).

IX.3. Diagnostic immunologique

IX.3.1. Ring test

Le dépistage de la Brucellose en troupeaux laitiers est possible sur le lait de mélange par l'épreuve de l'anneau (ou ring-test) (OIE, 2005). Il détecte les immuniglobulines du lait, soit IgM provenant du sang par filtration ; soit les IgA produites localement dans la mamelle. Cette dernière épreuve étant moins fiable en grands troupeaux. Dans les grands troupeaux (>100 vaches en lactation), l'épreuve devient moins sensible. Toutefois, ce test peut être utilisé sur le plan individuel (Fensterbank, 1987).

Des réactions faussement positives peuvent apparaître également chez les Bovins vaccinés depuis moins de 4 mois, sur des échantillons contenant un lait anormal (tel que du colostrum) ou en cas de mammite. De plus, l'épreuve n'est pas recommandée dans les très petits troupeaux où ces événements ont un effet notable sur la qualité des résultats des tests (OIE, 2005).

IX.3.2. Epreuve cutanée allergique

L'épreuve cutanée allergique, autre épreuve immunologique disponible, peut être utilisée en dépistage ou comme épreuve de confirmation de troupeau lors de réactions sérologiques positives en l'absence de tout facteur de risque patent de Brucellose en troupeau non vacciné (OIE, 2005). Il consiste en la mise en évidence d'une réaction d'hypersensibilité retardée suite à l'injection dans le derme de la Mélitine, appelé également Brucelline. Il a un intérêt particulier dans la Brucellose chronique (Crosjean *et al.,* 2009).

La réaction est considérée comme positive lorsque l'épaississement du pli cutané, constaté 72h après l'injection, est supérieur à deux millimètres. Cette réaction est spécifique mais peu sensible (beaucoup de faux négatifs). C'est donc un bon test complémentaire des approches sérologiques, mais il ne permet pas non plus de différencier un animal infecté d'un animal vacciné.

L'épreuve cutanée allergique dispose d'une spécificité très élevée qui permet de considérer comme animal infecté tout Bovin non vacciné et séronégatif mais ayant réagi à l'épreuve cutanée allergique (Pouillot *et al.,* 1997). Dès lors cette épreuve présente une grande importance pour l'interprétation des réactions sérologiques positives supposées être des RSFP liées à des bactéries croisant au plan antigénique, en zone indemne tout particulièrement (Saergerman *et al.,* 1999).

IX.5. Diagnostic moléculaire

Ces techniques ne sont pas encore de pratique courante et restent réservées à certains laboratoires. La technique la plus couramment utilisée est la PCR. Cette dernière, sensible et spécifique, est particulièrement utile en cas d'antibiothérapie préalable empêchant l'isolement de *Brucella*. La PCR permet un diagnostic plus rapide (en 24 heures) que les hémocultures, au cours de la phase aiguë septicémique, par la détection de l'ADN de *Brucella* à partir du sang ou du sérum. Au cours des Brucelloses focalisées, la détection de l'ADN de *Brucella*, à partir du pus ou de diverses biopsies, est plus sensible que la culture (Maurin, 2005).

La plupart des tests actuellement disponibles sont spécifiques de genre et ne permettent pas de déterminer l'espèce en cause (Maurin, 2005). Toute fois, malgré le fort degré d'homologie ADN au sein du genre *Brucella*, plusieurs techniques moléculaires, PCR, PCR-Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP) et Southern blot, ont été mises au point qui permettent, dans une certaines mesure, une différenciation entre les espèces de *Brucella* et entre certains de leurs biovars (Moreno, 2002).

L'électrophorèse en champs pulsés permet également la différenciation de plusieurs espèces de *Brucella* (Jensen *et al.,* 1999). Ces techniques sont sensibles et spécifiques. Néanmoins, aucune de ces méthodes n'a été complètement évaluée, ni standardisée et certaines d'entre eux n'est largement accessible. Elles sont réalisées dans certains laboratoires de référence (OIE, 2005).

X. TRAITEMENT

X.1. Traitement médicale

Le traitement curatif de la Brucellose repose essentiellement sur l'antibiothérapie. Son but est de traiter la maladie et d'éviter la survenue de complications et de rechutes. Les antibiotiques prescrits doivent être actifs sur *Brucella*, avoir une bonne diffusion intracellulaire et une activité conservée en intracellulaire. Les antibiotiques les plus actifs sont les cyclines (oxytétracyline et doxycycline), les aminosides (streptomycine et gentamicine) et la rifampicine.

Tous ces antibiotiques sont bactéricides in vitro vis-à-vis de *Brucella*. Les cyclines et la rifampicine conservent leur activité en milieu intracellulaire et en pH acide, alors que les aminosides ont surtout une activité extracellulaire (tableau 03). La prescription des phénicolés

est actuellement abandonnée en raison de leur faible activité (CMI : 1,5 à 3 mg/l) ainsi que leur hématotoxicité (surtout le chloramphénicol) (Janbon, 2000).

Les fluoroquinolones, molécules récentes dans cette indication, ont une bonne biodisponibilité orale et une bonne diffusion intracellulaire. Le tableau 04 résume les modalités de prescription, les effets indésirables et les éléments de surveillance des principaux antibiotiques.

L'expérience clinique a permis de montrer que la prescription d'une monothérapie et/ou d'un traitement de courte durée s'accompagne d'un taux élevé d'échec thérapeutique et de rechute à l'arrêt du traitement (Maurin, 2005). De ce fait, l'antibiothérapie de la Brucellose repose obligatoirement sur une association d'antibiotiques pendant une durée prolongée afin d'éviter les rechutes (Karabay *et al,* 2004).

La prescription d'une association comportant une cycline est la plus recommandée (Rolain et Maurin, 2000). L'association cycline + aminoside se montre plus efficace que l'association cycline + rifampicine, particulièrement au cours des spondylodiscites et s'accompagne d'un taux de rechute plus faible (Rolain et Maurin, 2000).

La rifampicine, puissante inductrice enzymatique, diminue nettement les taux sériques résiduels de la doxycycline et pourrait expliquer la moindre efficacité de cette association (Janbon, 2000). L'association du cotrimoxazole avec la streptomycine ou une cycline s'avère moins efficace (Rolain et Maurin, 2000).

Les fluoroquinolones sont insuffisamment efficaces en monothérapie, leur association avec la rifampicine est aussi ou moins efficace que l'association cycline + rifampicine (Maurin, 2005). Une étude récente portant sur 64 malades et comparant l'efficacité de l'association doxycycline + rifampicine pendant 45 jours et l'association ofloxacine + rifampicine pendant 30 jours a conclu à une équivalence entre les deux schémas thérapeutiques (Karabay *et al,* 2004). Les fluoroquinolones peuvent avoir un intérêt au cours de la neuro-brucellose en raison de la mauvaise diffusion des cyclines dans le LCR (Maurin, 2005).

La conduite du traitement figure sur le tableau 04. Elle est fonction du stade de la maladie et du terrain. Le protocole préconisé par l'OMS repose sur l'association doxycycline ou oxytétracycline, pendant 6 semaines + streptomycine, pendant les deux premières semaines, avec comme deuxième alternative l'association doxycycline + rifampicine pendant 6 semaines (Janbon, 2000).

Tableau 03 : Principaux antibiotiques prescrits au cours de la Brucellose (Chakroun, 2007)

Familles	**Molécules**	**Posologie adulte et voie d'administration**	**Effets indésirables**	**Précautions d'emploi**
Cyclines	Oxytétracycline	35 mg/kg/j PO	Photosensibilité	Contre indication : femme enceinte et enfant < 8 ans
	Doxycycline	200 mg/j PO		
Aminosides	Streptomycine	1 g/j IM	Néphro et ototoxicité	Adaptation de la posologie en cas d'insuffisance rénale
	Gentamicine	5 mg/kg/j IM		
Rifamycines	Rifampicine	15 mg/kg/j PO	Coloration rouge des urines Manifestations immunoallergiques (prise discontinue)	
Sulfamides	Triméthoprime	8 mg/kg/j	Leucopénie, anémie Allergie	Surveillance NFS Contre indication : femme enceinte
	Sulfaméthoxazole	40 mg/kg/j PO		
Fluoroquinolones	Ofloxacine	400 mg/j	Photosensibilité Tendinopathie	
	Ciprofloxacine	1,5 g/j		

Tableau 04 : Principaux antibiotiques prescrits au cours de la Brucellose (Chakroun, 2007)

Familles	Molécules	Posologie	Effets indésirables	Précautions d'emploi
Cyclines	Oxytétracyclines	35 mg/kg/j PO	Photosensibilité	Contre indication : femme enceinte et enfant < 8 ans
	Doxycylines	200 mg/j P		
Aminosides	Streptomycine	1 g/j IM	Néphro et ototoxicité	Adaptation de la posologie en cas d'insuffisance rénale
	Gentamycine	5 mg/kg/j IM		
Rifamycines	Rifampicine	15 mg/kg/j P	Coloration rouge des urines Manifestations immunoallergiques (prise discontinue)	
Sulfamides	Triméthoprime Sulfaméthazole	40 mg/kg/j PO	Leucopénie, anémie Allergie	Surveillance NFS Contre indication : femme enceinte
Fluoroquinolones	Ofloxacine	400 mg/j	Photosensibilité Tendinopathie	
	Ciprofloxacine	1,5 g/j		

Tableau 05 : Propositions thérapeutiques (Chakroun, 2007)

Stades de la maladie et terrains	**Protocoles thérapeutiques**	**Durée du traitement**
Brucellose aigue	cycline + aminoside ou cycline + rifampicine	45 jours (14 à 21 jours pour la streptomycine, 7 jours pour la gentamicine, 21 à 45 jours pour la rifampicine)
Brucellose ostéo-articulaire	cycline + rifampicine + aminoside	3 à 6 mois (21 jours pour la streptomycine, 8 à 15 jours pour la gentamicine)
Endocardite brucelienne	cycline + rifampicine + aminoside	6 à 12 semaines (21 à 30 jours pour la streptomycine, 15 jours pour la gentamicine). Durée plus longue si prothèse valvulaire
Brucellose neuroméningée	rifampicine + cotrimoxazole + aminoside ou rifampicine + fluoroquinolone + aminoside	8 à 12 semaines (21 jours pour la streptomycine, 8 à 15 jours pour la gentamicine).
Femme enceinte	Rifampicine seule ou rifampicine + cotrimoxazole	45 jours. Arrêt du cotrimoxazole 8 à 15 jours avant terme.
Enfant < 8 ans	cotrimoxazole + rifampicine ou cotrimoxazole + aminoside	45 jours (21 jours pour la streptomycine, 7 jours pour la gentamicine)
Sujet âgé	cycline + rifampicine	45 jours.

X.2. Traitement chirurgical

Un traitement chirurgical est souvent indiqué en cas d'endocardite délabrante (remplacement valvulaire). En cas de localisation ostéo-articulaire, le recours à un traitement chirurgical est nécessaire dans 10 à 15% des cas (Colmenero, 1991). Sous antibiothérapie, l'apyrexie est rapidement obtenue et les signes d'accompagnement disparaissent en quelques jours.

Le suivi clinique et biologique du malade doit être régulier jusqu'à l'arrêt du traitement, puis à 3 mois et à 9 mois pour s'assurer de l'absence de rechutes. Les rechutes s'observent le plus souvent au cours des 3 à 6 mois qui suivent l'arrêt du traitement. Elles sont difficiles à différencier des réinfections dans les groupes exposés au risque. Le traitement de la rechute repose sur la reprise du traitement initial car la sensibilité du germe ne se modifie pas (Janbon, 2000). Il n'existe pas d'arguments objectifs de la guérison définitive, le recul du temps de quelques années reste encore un critère valable.

XI. PROPHYLAXIE

Diverses stratégies ont été adoptées, séparément ou conjointement, pour le contrôle puis l'éradication des Brucelloses animales. Quelle que soit la stratégie adoptée, il est extrêmement important de disposer d'un système efficace pour la surveillance des maladies animales, en vue de suivre, en permanence, les progrès du programme de contrôle et d'y apporter les corrections nécessaires.

Il est évident que le choix d'une stratégie dépendra de la prévalence de la maladie dans la région en question (voir tableau 06 ci-après). Généralement, il existe la prophylaxie sanitaire et la prophylaxie médico-sanitaire (Benkirane, 2001).

XI.1. Prophylaxie sanitaire

Recommandée dans les pays dont la prévalence est faible (<1%) voir nulle, la prophylaxie sanitaire repose sur des mesures de surveillance active des cheptels par dépistage sérologique de ce dernier et éliminations des animaux séropositif.

Toutefois, les dispositifs de surveillance diffèrent selon le taux de prévalence qui sévit dans la région.

Tableau 06 : Stratégies de contrôle de la Brucellose en fonction de la prévalence (Benkirane, 2001)

Prévalence	**Méthode de surveillance**		**Résultats recherchés**
A. Prévalence élevée chez les animaux ; incidence clinique élevée chez les humains	Vaccination en masse	Recensement et identification des animaux Contrôle sérologique	Passer à B
B. Prévalence modérée	Vaccination des femelles	Suivi bactériologique Communication active	Passer à C
C. Prévalence faible (< 1 %)	Surveillance dans les étables et aux abattoirs; Suivi sérologique ; Enquêtes dans les groupes cibles ;		Passer à D
D. Absence de la maladie	Contrôle des mouvements Surveillance des indicateurs de risque		Maintenir cet état

XI.1.1. Pays ou zones faiblement infectés

La vaccination doit être prohibée et un contrôle sanitaire strict doit être effectué en parallèle, à l'intérieur du pays (ou de la zone) ainsi qu'au niveau des frontières.

– Une surveillance clinique des avortements dans les étables doit être réalisée, en ayant recours :

a) chez les Bovins, au test de l'anneau et à des examens bactériologiques ;

b) chez les petits ruminants, aux examens bactériologiques et, éventuellement, au test cutané à la Brucelline. Toutefois, celle-ci ne peut être utilisée en toute sécurité qu'après avoir s'assuré que tous les animaux ayant été préalablement vaccinés ont été éliminés du cheptel.

- La surveillance au niveau des abattoirs doit être réalisée par examen bactériologique des ganglions prélevés sur les animaux abattus. En cas de résultat positif, il est indispensable de réaliser une enquête en amont des cas confirmés.
- La surveillance sérologique, dans cette situation, constitue un instrument performant. On pourra ainsi suivre, de manière régulière et précise, l'état de l'infection.
- Des enquêtes sérologiques doivent être effectuées dans les populations humaines constituant des groupes cibles, afin de mesurer l'impact sanitaire de la maladie.

XI.1.2. Pays indemnes

Dans ce contexte, les stratégies de lutte préconisées sont les suivantes :

a) dans les étables : pratiquer régulièrement le test de l'anneau chez les Bovins ; procéder en outre à des enquêtes épidémiologiques destinées à explorer toutes les suspicions d'infection et prendre en compte la possibilité de réactions sérologiques non spécifiques (Pouillot 1997) ;

b) aux frontières : contrôler les mouvements des bétails et réglementer le commerce ;

c) lors d'importations : celles-ci ne doivent être autorisées qu'à partir de pays indemnes, avec certificat d'origine et une mise en quarantaine des animaux importés, complété par tests sérologiques donnant des résultats négatifs.

XI.2. Prophylaxie médico-sanitaire

Ce type de prophylaxie est préconisé dans les régions moyennement à fortement infectées (prévalence > 2%). Il combine la prophylaxie médicale à la prophylaxie sanitaire. La prophylaxie médicale consiste en la vaccination des animaux. Quant à la prophylaxie sanitaire, elle est basée sur le dépistage et l'élimination des animaux infectés.

XI.2.1. Pays ou zones très infectés

La vaccination doit être pratiqué à tout le cheptel réceptif à la maladie indépendamment de l'espèce, du sexe ou de l'âge des animaux, et ce à l'aide d'un vaccin efficace et inoffensif à la dose d'utilisation aussi bien pour le manipulateur que pour les femelles vaccinées en cours de gestation.

Chez les Bovins, le vaccin indiqué est le B19 à base d'une souche spontanément atténuée de *Brucella abortus*. Son utilisation est recommandée à la dose ordinaire (60,109 unités formant colonie [CFU]), par voie sous-cutanée chez les femelles impubères et à la dose prouvée dépourvue d'effet abortif (variant de 5,107 à 109 CFU), par voies sous-cutanée ou conjonctivale chez les animaux adultes. Chez les Ovins et les Caprins, le vaccin de choix demeure le Rev. 1 ; son utilisation est recommandée à la dose de 109 CFU, administrée de préférence par voie conjonctivale (Garin-Bastuji, 1996).

La vaccination sera répétée, à un rythme régulier, tous les uns ou les deux ans, jusqu'à ce que le contexte épidémiologique et/ou socio-économique s'améliore et que la prévalence de la maladie diminue sensiblement. Un certain nombre d'actions sont à réaliser impérativement en parallèle, en vue de renforcer les structures vétérinaires et de donner au programme de prophylaxie quelques garanties de succès, entre autres (Benkirane, 2001) :

- acquérir une meilleure maîtrise du processus de privatisation de la médecine vétérinaire ;
- former le personnel technique et mettre en place des mesures incitatives pour stimuler ses efforts. Il est à rappeler que ce programme requiert des interventions massives et répétitives, et que le risque de lui faire perdre tout son intérêt est constamment présent. En effet, les autorités vétérinaires se trouvent quelquefois forcées, lorsque surgit une épizootie nouvelle (fièvre aphteuse, peste équine, etc.), de dévier les ressources humaines et financières dont elles disposent vers le contrôle de cette épizootie, au détriment des actions prophylactiques de longue haleine ;
- établir des unités (même modestes) pour le dépistage et le diagnostic de la Brucellose dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire.
- veiller à la présence d'une structure commune à tous les pays adhérant à un plan de prophylaxie régional pour le diagnostic bactériologique et le typage épidémiologique des brucelles ;

- associer, à l'effort de lutte, les autres départements ministériels concernés (Santé, Intérieur, etc.) et les autorités locales, et faire judicieusement usage des médias ;

- agir sur les mouvements incontrôlés des troupeaux ; des solutions spécifiques sont à rechercher dans chaque pays ou région, en fonction du contexte socio-économique, de l'importance du commerce du bétail, etc. ;

- gérer au mieux les ressources disponibles ; par exemple en associant la vaccination anti-brucellique à d'autres programmes prophylactiques.

La surveillance sérologique, basée sur les tests actuellement disponibles (épreuve à l'antigène tamponné, séro-agglutination lente en tubes, fixation du complément, etc.), est illusoire dans un tel contexte (OIE, 2000). On peut, cependant, tenter d'examiner périodiquement un échantillon représentatif de la population (vaccinée) à l'aide d'un test sérologique capable de faire la distinction entre les anticorps post-infectieux et les anticorps post-vaccinaux (par exemple, les tests au Rivanol et au Mercapto-éthanol), mais le manque de sensibilité de ces tests rend l'interprétation des résultats délicate. Le test immuno-enzymatique (ELISA) de compétition est actuellement disponible pour le diagnostic de la Brucellose à *Brucella abortus* (Nielsen, 1998), néanmoins son utilisation dans ce contexte nécessite encore d'être correctement validé et standardisé.

XI.2.2. Pays ou zone moyennement infectés

La vaccination sera réservée à une partie de la population (jeunes femelles, petits ruminants, etc.) à l'aide d'un vaccin de bonne qualité immunologique, mais qui ne confère qu'un état de séroconversion éphémère ou, idéalement, aucune séroconversion, lorsqu'il est dépourvu de lipopolysaccharides qui sont révélés par tous les tests sérologiques disponibles (par exemple le RB51 chez les Bovins ; toutefois, cette souche vaccinale est dépourvue d'efficacité chez les Ovins). Une nouvelle stratégie vaccinale a été récemment expérimentée en Argentine. Elle consiste à effectuer des rappels vaccinaux à l'aide de la souche RB51 sur des vaches pleines ayant préalablement reçu du B19 en primo-vaccination. Les résultats obtenus montrent que cette stratégie offre le double avantage de l'innocuité et de l'absence de réactions sérologiques vaccinales préjudiciables à un programme d'éradication de la maladie ; il reste cependant à démontrer son intérêt en matière de protection contre l'infection par rapport à la simple vaccination par la souche B19 (Samartino 2000).

Partie expérimentale

ÉVALUATION DES CARACTERISTIQUES DE LA TECHNIQUE ELISA-I PAR RAPPORT AUX TECHNIQUES USUELLES ET ESTIMATION DE LA PREVALENCE REELLE DE LA BRUCELLOSE BOVINE

INTRODUCTION

La Brucellose est une maladie fortement pathogène, due à des bactéries du genre *Brucella spp*, affectant aussi bien les humains que de nombreuses espèces animales domestiques et sauvages ; elle est considérée comme l'une des zoonoses les plus répandues dans le monde (Pappas, 2006).

Selon Roux J., 1979, la Brucellose humaine est structurellement liée à la Brucellose animale ; par conséquent, la maladie humaine ne disparaitra que lorsque la maladie animale aura été éliminée grâce à des mesures de prophylaxie médicale (vaccination des troupeaux) et sanitaire (dépistage par des méthodes sérologiques). Cependant, le choix de la stratégie de lutte dépend de la prévalence de l'infection, de l'incidence des avortements brucelliques et des moyens dont disposent les autorités sanitaires pour mener à bien ces programmes (Garin-Bastuji, 1993).

Dans ce contexte, la surveillance sérologique de la Brucellose animale est fortement recommandée dans les zones faiblement infectées (Benkirane., 2001). Elle est basée sur le dépistage sérologique des troupeaux et l'abattage sanitaire des animaux infectés. Les principaux tests utilisés actuellement en Algérie pour la surveillance sérologique de la Brucellose sont le test au rose Bengale et le test de fixation du complément. Ils utilisent comme antigène des suspensions inactivées de *Brucella abortus*, et détectent principalement les anticorps anti-LPS (Baldi *et al.,* 1999).

Cependant, la nature lipopolysaccharidique des antigènes de *Brucella* utilisés dans les techniques sérologiques est à l'origine de nombreuses réactions croisées (dont *Yersinia enterocolitica*) (Dracourt *et al.,* 1997).

De plus, d'une part, les épreuves sérologiques peuvent donner des résultats discordants car elles ne décèlent pas toujours les mêmes classes d'anticorps IgM, IgG1, IgG2 et IgA (AVRIL *et al.,* 1992).

D'autre part, leur relatif manque de sensibilité individuelle et/ou de spécificité est compensée par leur complémentarité (Godfroid *et al.,* 2003), selon OIE (2004), aussi les échantillons positifs aux épreuves de dépistage doivent être confirmés selon une stratégie établie. En outre, ces tests peuvent être défaillants notamment dans la Brucellose chronique où les hémocultures sont pratiquement toujours négatives (Jeanjean *et al.,* 1973).

Or, le succès d'un programme de contrôle ou d'éradication est directement conditionné par l'efficience de la stratégie de dépistage. Celle-ci doit éviter les erreurs par défaut (non détection de sujets infectés) ainsi que les erreurs par excès (détection des animaux non infectés). Ainsi, un test de diagnostic de la Brucellose devrait détecter l'infection précocement, identifier les infectés chroniques et ne peut être influencé par la présence d'anticorps non-spécifique dans le sérum des animaux.

Parmi les autres techniques de diagnostic sérologique, la méthode ELISA indirect est d'application la plus récente. Cette technique permet l'analyse de sérums individuels et de mélanges, et se prête particulièrement bien à l'automatisation. La présente étude sérologique se fixe pour objectif, en premier lieu, une évaluation des caractéristiques techniques intrinsèques et extrinsèques de la technique immuno-enzymatiques indirecte (ELISA-i) par rapport à l'épreuve à l'antigène tamponnée et à la réaction de fixation du complément et en second lieu, une estimation de la prévalence réelle de la Brucellose bovine dans la région du moyen ouest algérien.

I. MATERIELS ET METHODES

II.1. Prélèvement

II.1.1. Lieu de l'étude :

Deux cent soixante-quinze (275) sérums de bovins laitiers âgés de 1 à 7 ans provenant de trois wilayas situées dans l'ouest de l'Algérie (Mascara, Relizane et Chlef) (figue 02) ont été prélevés. Les prélèvements sanguins ont été réalisés par les vétérinaires inspecteurs des wilayas sus-citées, et ce dans le cadre du programme de dépistage systématique de la Brucellose bovine.

II.1.2. période d'étude :

Cette étude a été réalisée dans la période allant de (Avril à juin 2011).

II.1.3. Réalisation des prélèvements

En pratique, le prélèvement de sang est réalisé au niveau de la veine caudale située sur la face ventrale de la queue à 15 cm à peu près de l'orifice rectal. Prélevés dans des tubes vacutainer sous vide, stériles, les tubes sont ensuite numérotés, et le numéro est reporté sur une fiche de demande d'analyse.

II.1.4. Transport du prélèvement

Les prélèvements sanguins, réalisés par les vétérinaires, sont transportés sous couvert du froid, dans une glacière à 4 °C, tenus en position inclinée, et ce jusqu'au laboratoire où les sérums font l'objet de tests sérologiques.

II.2. Analyses sérologiques

La réalisation des analyses sérologiques des 275 sérums récoltés a lieu dans le laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem « LVRM ».

Brève présentation du laboratoire d'analyse

- Sa situation géographique : le Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem, situé au bord de la route N17 menant à Hassi-Mammèche, fait partie de l'Institut National de la Médecine Vétérinaire « INMV » (figure 04).
- Son périmètre d'activité : son zoning comprend les wilayas de Mostaganem ; Mascara ; Relizane ; Tiaret ; Chlef et de Tissemsilet (figure 03).
- Ses principales activités :
  1. diagnostic des maladies animales et particulièrement les maladies réputées légalement contagieuses (Brucellose, Fièvre catarrhale ovine, Rhinotrachéite infectieuse bovine, etc.) ;
  2. contrôle microbiologique et physico-chimique des denrées alimentaires d'origine animale et leurs dérivés ;
  3. contributions aux enquêtes épidémiologiques
  4. Recyclage et vulgarisation des personnels vétérinaires et agriculteurs dans le domaine de l'hygiène, de la santé et la production animale.

II.2.1. Préparation des sérums

Une fois les prélèvements sont amenés au laboratoire d'analyse, ils subissent une centrifugation à 2500 tours/min pendant cinq minutes, afin de récupérer les sérums nécessaires pour les analyses sérologiques prévues.

Figure 02 : découpage administratif de l'Algérie ; les wilayas ayant fait l'objet de l'étude.

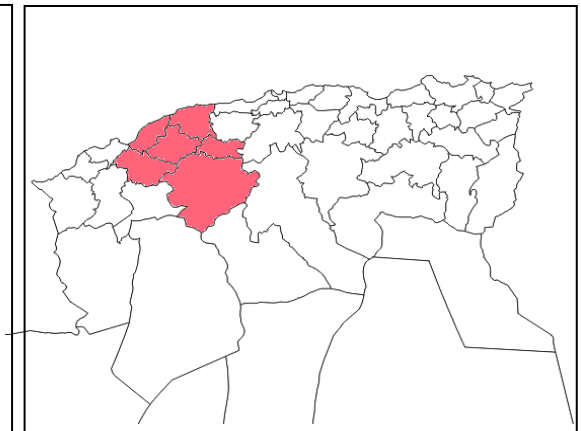


Figure 03 : découpage administratif de l'Algérie ; zoning relevant du périmètre d'activité du laboratoire.

Figure 04 : situation géographique du laboratoire d'analyse.

II.2.2. Réalisation des analyses

Les sérums sont analysés en utilisant deux tests sérologiques pour le dépistage de la Brucellose bovine préconisés pour les échanges internationaux (OIE, 2010) qui sont l'épreuve à l'antigène tamponné (EAT) et le test immuno-enzymatique indirect (ELISA-i). Un troisième test sérologique a également été utilisé pour la confirmation des résultats, c'est la réaction de fixation de complément (FC).

Protocole expérimental :

D'abord, tous les sérums sont testés par l'épreuve de l'antigène tamponné et le test immuno-enzymatique indirect.

Ensuite, les sérums, révélés positifs par l'épreuve à l'antigène tamponné sont confirmés positifs par la technique de fixation du complément.

Sont considérés provenant d'un animal infecté, les sérums qui se révèlent positifs à la technique Elisa-i et/ou positif pour les deux tests conjoints (EAT + FC).

II.2.1.1. Épreuve de l'antigène tamponné (EAT)

Appelé également test au Rose Bengale (TRB), c'est une réaction d'agglutination rapide sur lame au moyen d'une suspension de *Brucella* colorée au rose Bengale en milieu acide tamponné. C'est l'une des méthodes les plus faciles à mettre en œuvre et la plus largement utilisée pour le dépistage sérologique de la Brucellose (*Brucella melitensis, abortus* et *suis*)

Principe

Le test au Rose Bengale est une épreuve rapide au cours duquel on mélange une goutte d'antigène à une goutte de sérum afin d'observer une réaction d'agglutination.

Réactif

Un flacon contient une suspension concentrée de *Brucella abortus* (souche 99 de Weybridge) inactivée par la chaleur et le phénol (0,5%), diluée en tampon acide et colorée par le Rose Bengale. Cet antigène est calibré pour donner une réaction positive au 1/45e et une réaction

négative au 1/55e avec le sérum étalon International (OIEISS) ou national secondaire, conformément aux exigences de l'OIE.

Matériels

- Plaques : des plaques en verre à surface plane
- Agitateur : un agitateur à mouvement de va et vient unidirectionnel, effectuant 30 oscillations par minute,
- Appareils de lecture : des appareils de lecture constitués d'une simple surface blanche, translucide, de verre ou de plastique, ces appareils de lecture sont éclairés par le bas.
- Centrifugeuse ; une centrifugeuse capable de tourner à au moins 2500 tours/ min ;
- Compte-goutte : un compte goutte distribuant des doses de 25 microlitre est fourni avec l'antigène.
- Mélangeurs : mélangeur en verre.
- Micropipettes : des micropipettes distribuant des doses de sérum de 25 microlitre

Mode opératoire :

- Amener l'antigène et les sérums à température ambiante 21 °C (± 5,°C), pendant 30 à 60 minutes avant le début du test, sur une plaque.
- Déposer successivement, aux endroits prévus à cet effet sur les plaques destinés au test, un volume (25 à 30 µl) de chacun des échantillons de sérum à contrôler
- Lorsque tous les échantillons de sérum sont déposés sur une plaque ou que celle-ci est pleine, agiter le flacon contenant l'antigène et mettre le même volume d'antigène (25 à 30µl) à côté de chaque sérum ;
- Mélanger soigneusement l'antigène et le sérum. Agiter la plaque pendant 4 minutes exactement et lire immédiatement.

Lecture :

Lorsque l'antigène coloré au Rose Bengale est mis en présence de sérums contenant des anticorps spécifiques, il se produit une agglutination visible à l'œil nu, tandis qu'en l'absence d'anticorps, le mélange reste homogène.

Note : pour les animaux positifs à l'épreuve à l'antigène tamponné, prendre 1 ml du sérum en question, qui sera mis dans un tube Eppendorf puis conservé au congélateur, jusqu'à la fin de l'opération, pour la confirmation par la réaction de fixation du complément.

II.2.2.2. Réaction de fixation du complément (FC)

C'est une méthode réglementaire de confirmation largement utilisée pour le diagnostic de la Brucellose (Garin-Bastuji, 1993), mais elle est compliquée à réaliser, demande un équipement de laboratoire sophistiqué et une équipe bien formée.

Principe :

L'épreuve de la FC comporte deux étapes et requiert l'utilisation de cinq composants.

1. Dans la FC appliquée à la Brucellose, on procède au cours d'une première étape au mélange de l'ensemble antigène brucellique et sérum à tester (complexe antigène-anticorps) avec du sérum normal de cobaye (complément).

   Si le sérum à examiner contient des anticorps brucelliques, le complément est entièrement utilisé ou fixé de sorte qu'il ne peut réagir au cours de la deuxième étape avec le système indicateur ou « système hémolytique ».

2. La deuxième étape consiste à ajouter une suspension d'hématies de mouton préalablement sensibilisées, c'est-à-dire recouvertes d'anticorps anti-moutons. On constate alors dans l'hypothèse retenue qu'il ne se produit aucune hémolyse, ce qui signifie que le sérum testé contient des anticorps brucelliques.

   Au contraire, l'appariation d'hémolyse indique que le complément n'a pas été fixé au cours de la première étape, autrement dit que le sérum testé ne contient pas d'anticorps brucelliques. La réaction dans ce cas est négative.

Réactif :

L'antigène pour la réaction de fixation du complément est une suspension concentrée de *Brucella abortus* (souche S99 de Weybridge) inactivée par la chaleur et le phénol.

Matériels

- Bain marié, réglable pouvant garantir une température de 37 °C ± 0,5 °C
- Bacs : Bacs de volume de 25ml et de 50ml
- Becher : Becher de volume de 50 ml et de 100 ml
- Centrifugeuse ; une centrifugeuse capable de tourner à au moins 2500 tours/ min ;
- Embouts jetables ;
- Eprouvette graduée : Eprouvette graduée de 500ml ;
- Gants latex, de taille 7 ou 8 ;
- Micropipettes : des micropipettes distribuant des doses de sérum de 25 microlitre ;
- Pipettes graduées, Pipettes graduées de volume de 05ml, de 10ml et de 20 ml ;
- Portoirs : Portoir pour microtubes ;
- Réfrigérateur, un réfrigérateur à 4 °C pour l'entreposage des réactifs
- Tubes à hémolyse
- Tubes hépariné

Mode opératoire :

La fixation du complément peut être réalisée selon deux technique, la première, appelée « technique standard », est basée sur l'utilisation d'une quantité de complément exprimée en unités hémolytiques à 50 pour cent (C'H ou CH50 = quantité de complément nécessaire pour provoquer la lyse de 50 pour cent des hématies d'une suspension, dans des conditions bien définies).

La seconde méthode, appelée la méthode Kolmer simplifiée « macro-méthode », est une épreuve utilisant des tubes. La méthode utilisée dans notre étude est celle de la macro-méthode.

- Préparation des réactifs

– Calculer de la quantité de complément à préparer. Le complément est titré avant chaque série de tests. Ce titrage est effectué en tubes.

- Lavage des hématies : centrifuger le prélèvement sanguin à 2500 tours/5-10 min. puis jeter le surnagent et la remplacer par de l'eau physiologique. Répéter l'opération 3 fois de suite. Conserver le culot (GR lavés) à 4 °C.

- Distribution des réactifs

Réactifs (ml)	Tube	Tube	Témoins		CH
	N1	N2	Ag	C'	
Tampon véronal	0,15	0,35	0,2	0,4	0,6
Sérum	0,05	0,05	/	/	/
C'	0,2	0,2	0,2	0,2	/
Antigène	0,2	/	0,2	/	/

- Incubation à 4 °C pendant une nuit (18h à 20 h) ;
- Le lendemain, préparer le CH ;
- Sortir les tubes 10 min à température ambiante, puis incuber 10 min à 37 °C ;
- Distribuer 0,4 ml de C.H dans les tubes ;
- Incuber au bain marie (37 °C) jusqu'à la lyse complète du témoin Ag (+ 5 minutes)
- Centrifuger à 1500 et 2000 tours/min pendant 5 minutes ;
- Effectuer la lecture en comparant le tube N °1 avec celui du témoin H50.

Lecture :

La présence de complément libre est mise en évidence par addition d'un complexe hémolytique : globules rouges de mouton + sérum hémolytique correspondant. Si des anticorps spécifiques de *Brucella abortus* sont présents, il y a absence d'hémolyse, tandis qu'en l'absence de ces anticorps, une hémolyse se produit.

II.2.2.3. Technique d'`ELISA

La technique immuno-enzymatique indirecte permettant la détection dans les sérums bovins, ovins et caprins individuels et de mélanges de 10 sérums bovins (selon la réglementation en vigueur) des anticorps anti-lipopolysaccharides (LPS) de *Brucella* (synbioticis, France). Les

sérums ont été analysés à l'aide du kit ELISA nommé SERELISA® *Brucella* OCB Ab Mono Indirect et portant la marque des produits du laboratoire SYNBIOTICS EUROPE SAS

Principe :

La réaction comporte en général 3 étapes distinctes :

1. Chaque échantillon est déposé dans une cupule sensibilisée par les LPS de *Brucella*. Les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon se lient à l'antigène bactérien.

   Il se forme des complexes LPS-anticorps par lesquels les anticorps bovins se trouvent fixés sur les parois du puits.

2. Après lavage, un anticorps conjugué peroxydase est ajouté. Il vient se fixer sur les immunoglobulines préalablement captées, aboutissant à la formation d'un complexe : (Ag LPS) - (Ac anti LPS) - (conjugué peroxydase).

3. Après lavage, L'excès de conjugué est éliminé par lavages. L'enzyme liée au complexe est révélée par addition d'un substrat qu'elle transforme en un produit coloré. Après arrêt de la réaction enzymatique, les densités optiques sont mesurées.

   La présence ou l'absence d'anticorps est déterminée à partir de valeurs seuils obtenues en fonction du témoin positif.

Matériel

- Centrifugeuse : capable de tourner à au moins 2500 tours/ min ;
- Cuvette et papier absorbant : pour recueillir les liquides de lavage
- Embouts jetables ;
- Eprouvette graduée : de 500ml ;
- Etuve : réglé à 37 °C pour l'incubation des microplaques
- Gants latex, de taille 7 ou 8 ;
- Micropipettes : distribuant des doses de sérum de 25 microlitre ;
- Micropipettes multicanaux : distribuant des doses de sérum allant jusqu'à de 200 microlitre
- Papier essuie et poubelle de table

- Pipettes graduées : de volume de 05ml, de 10ml et de 20 ml ;
- Plaques de microtitration « qualité ELISA »- puis à fond palt
- Petites pissettes pour conditionnement de tampon de lavage
- Portoirs pour conditionnement des réactifs
- Réfrigérateur : réglé à 4 °C pour l'entreposage des réactifs

Réactif

Le kit SERELISA dispose de 4 microplaques sensibilisées avec LPS du genre *Brucella* fixé sur les parois des puits des microplaques en polystyrène.

Mode opératoire :

A. Étapes préparatoires :

A.1. Établir soigneusement le plan de distribution et d'identification des témoins et des échantillons.

A.2. Préparer les échantillons à analyser

Pour le protocole sur sérums individuels (dilution 1/100ème), diluer les échantillons au 1/10ème en tube ou dans une plaque de dilution dans le diluant des échantillons.

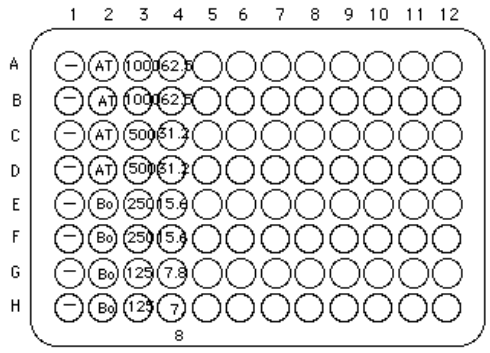
Diluer à nouveau au 1/10ème en tube ou directement dans la cupule à raison de 10 µl de pré-dilution dans 90 µl de diluant des échantillons.

B. Réalisation du test

B.1. Dépôt des échantillons et témoins

B1.a. Distribution des témoins : selon deux protocoles

– Pour les deux protocoles suivants, le témoin négatif (N) est déposé dilué dans les cupules A1 et A2, le témoin positif (P) dilué dans les cupules B1 et B2 à raison de 100 µl par puits.



B1.b. Distribution des témoins : protocole sur sérums individuels (dilution 1/100ème),

- après agitation des flacons, diluer par exemple les témoins au 1/10ème dans le diluant des échantillons en tube ou dans une plaque de dilution puis diluer à nouveau au 1/10ème en tube ou directement dans la cupule à raison de 10 µl de pré-dilution dans 90 µl de diluant des échantillons.

B1.c. Distribution des échantillons :

Les échantillons sont testés en simple ou en double et la distribution est effectuée en colonne. Distribuer 100 µl par puits ;

- Toujours disposer les barrettes sur un cadre. Celui-ci sera nécessaire pour utiliser le laveur et le lecteur.
- Recouvrir les cupules avec la longueur nécessaire de film adhésif ;
- Homogénéiser par agitation douce manuelle ou à l'aide d'un agitateur de plaque ;

B.2. Incubation

- Incuber les microplaques pendant 1 h (± 5 min) à +37°C (± 3°C).

B.3. Lavage :

- préparer la quantité suffisante par dilution de la solution de lavage concentrée 10 fois en eau distillée ou déminéralisée ;
- ôter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

B.4. Ajout du conjugué

B.4.a. Préparation du conjugué : protocole sur sérums individuels (dilution 1/200ème) :

- préparer la solution de conjugué par dilution du conjugué concentré 200 fois dans le diluant du conjugué (2 ml sont nécessaires par barrette, soit 10 µl de conjugué dilué dans 1,99 ml de CD.

B.4.b. Distribution du conjugué :

- Distribuer 100 µl de conjugué dilué dans toutes les cupules ;
- Recouvrir avec un film adhésif neuf.

B.5. Incubation du conjugué :

- Incuber le conjugué 30 minutes (± 5 min) à +37°C (± 3°C).

B.6. Lavage :

- Ôter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

C. Révélation

C.1. Ajout du substrat :

- Distribuer 100 µl de tampon substrat par cupule. Ne pas mettre de film adhésif lors de cette étape ;
- Homogénéiser en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque.

C.2. Incubation du substrat :

- Incuber 30 min. ± 5 min. à température du laboratoire (+20°C ± 5°C) et à l'obscurité.

C.3. Ajout de la solution d'arrêt :

- Distribuer 50 µl de solution d'arrêt par cupule ;
- Homogénéiser en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque ;
- S'assurer qu'il n'y a pas de formation de bulles dans les cupules ;
- Essuyer soigneusement le dessous des plaques.

D. Lecture :

Mesurer les densités optiques (DO) en monochromatisme à 450 nm ou bichromatique à 450 nm et 630 nm. Dans le cas d'utilisation d'un lecteur monochromatique, veillez attentivement à l'état de propreté du fond des cupules avant lecture. Les résultats de lecture de la densité optique des 3 microplaques par le lecteur Elisa sont donnés dans l'annexe I.

E. Validation du test :

Les résultats de chaque série sont validés si :

$$\overline{DO\ P} > 0{,}5 \text{ et } \overline{DO\ N} < 0{,}3 * \overline{DO\ P}.$$

Avec, $\overline{DO}$: moyenne des *DO* pour les échantillons testés en double.

E.1. Validation de la 1ère microplaque

Densité optique des témoins positifs	Densité optique des témoins négatifs
DO P 1 = 0,584 DO P 2 = 0,622	DO N 1 = 0,070 DO N 2 = 0,068

$\overline{DO\ P} > 0,5$

$\overline{DO\ P} = (0,584 + 0,622)/2 = 0,603$ *par conséquent* $0,603 > 0,5$

$\overline{DO\ N} = (0,070 + 0,068)/2 = 0,069$ *cependant,* $\overline{DO\ N} < 0,3 * \overline{DO\ P}$.

$0,3 * \overline{DO\ P} = 0,3 \times 0,603 = 0,1809$ *donc* $0,069 < 0,1809$

Conclusion : la 1ère microplaque est validée quant à sa fiabilité

E.2. Validation de la 2ème microplaque

Densité optique des témoins positifs	Densité optique des témoins négatifs
DO P 1 = 0,606 DO P 2 = 0,937	DO N 1 = 0,080 DO N 2 = 0,066

$\overline{DO\ P} > 0,5$

$\overline{DO\ P} = (0,606 + 0,937)/2 = 0,7715$ *par conséquent* $0,7715 > 0,5$

$\overline{DO\ N} = (0,080 + 0,066)/2 = 0,073$ *cependant* $\overline{DO\ N} < 0,3 * \overline{DO\ P}$.

$0,3 * \overline{DO\ P} = 0,3 \times 0,7715 = 0,1231$ *donc* $0,073 < 0,1231$

Conclusion : la 2ère microplaque est validée quant à sa fiabilité

E.3. Validation de la 3ème microplaque

Densité optique des témoins positifs	Densité optique des témoins négatifs
DO P 1 = 0,952 DO P 2 = 0,825	DO N 1 = 0,164 DO N 2 = 0,089

$\overline{DO\ P} > 0,5$

$\overline{DO\ P} = (0,952 + 0,825)/2 = 0,8885$ *par conséquent* $0,8885 > 0,5$

$\overline{DO\ N} = (0,164 + 0,089)/2 = 0,253$ *cependant* $DO\ N < 0,3 * \overline{DO\ P}$.

$0,3 * \overline{DO\ P} = 0,3 \times 0,603 = 0,2665$ *donc* $0,253 < 0,2665$

Conclusion : la 1ère microplaque est validée quant à sa fiabilité

F. Expression des résultats

Pour sérums individuels et mélanges de sérums :

Valeur seuil positif => $\alpha = 0.6 \times (\overline{DO\ P})$ Comparer chacune des DO des échantillons à cette valeur seuil.

Tout échantillon ou mélange d'échantillons, présentant une $DO > \alpha$ est considéré comme positif.

Tout échantillon ou mélange d'échantillons, présentant une $DO < \alpha$ est considéré comme négatif.

F.1. Calcul de la Valeur seuil α de positivité 1ère microplaque :

$\alpha_1 = 0.6 \times (\overline{DO\ P}) = 0,6 \times 0,603 = 0,3618$

Par conséquent, en se référant aux résultats de lecture de la DO pour la 1ère microplaque (voir annexe), deux échantillons ont une valeur de densité optique > 0,3618

Échantillons positifs	Densité optique
1	3,382
2	0,841

F.2. Calcul de la Valeur seuil α de positivité de la 2ème microplaque :

$$\alpha_2 = 0.6 \times (\overline{DO\ P}) = 0,6 \times 0,7715 = 0,4629$$

Par conséquent, en se référant aux résultats de lecture de la DO de la 2ème microplaque (voir annexe), quatre échantillons ont une valeur de densité optique > 0,4629

Échantillons positifs	Densité optique
1	3,278
2	0,464
3	3,588
4	3,309

F.2. Calcul de la Valeur seuil α de positivité :

$$\alpha_3 = 0.6 \times (\overline{DO\ P}) = 0,6 \times 0,8885 = 0,5331$$

Par conséquent, en se référant aux résultats de lecture de la DO de la 2ère microplaque (voir annexe), un échantillon a une valeur de densité optique > 0,5331

Échantillons positif	Densité optique
1	1,275

II.3. Traitement des résultats

L'évaluation d'un test de dépistage doit se faire par rapport à un test de référence ou gold standard qui permet de définir le statut des animaux malades ou sains.

Les résultats obtenus doivent être représentés dans une table de contingence qui permet en autre, de croiser les résultats des deux tests (gold standard et test à évaluer).

		Gold standard	
		Résultat positif Animal malade	Résultat Négatif Animal sain
Test à évaluer	Résultat positif	*a*	*b*
	Résultat Négatif	*c*	*d*
	Total	a + c	b + d

II.3.1. Calcul de la sensibilité et spécificité

La sensibilité d'un test (*Se*) est définie par la proportion d'animaux qui ont la maladie recherchée et dont le test est positif, en d'autres termes par la proportion de patients malades de la maladie M que le test détecte correctement (vrais positifs).

Par opposition, la proportion de patients porteurs de la maladie M que le test n'a pas détecté sont des résultats faussement négatifs (Nendaz, 2004).

$$Se = \frac{a}{a + c}$$

avec :

a : représente le nombre d'individus malades avec un test positif,
c : représente le nombre d'individus malades avec un test négatif,

La spécificité d'un test (*Sp*) est définie par la proportion d'animaux qui n'ont pas la maladie recherchée et dont le test est négatif, en d'autres termes par la proportion d'animaux non malades de la maladie que le test détermine correctement (vrais négatifs).

Par opposition, la proportion d'animaux non porteurs de la maladie chez qui le test est positif sont des résultats faussement positifs (Nendaz, 2004).

$$Sp = \frac{d}{b + d}$$

avec :

b : représente le nombre d'individus non malades avec un test positif,
d : représente le nombre d'individus non malades avec un test négatif.

Imperfection du test de référence

Pour obtenir une estimation correcte de la prévalence, un test parfait ou "gold standard" avec une sensibilité et une spécificité de 1 est donc nécessaire. En revanche, le test de référence ou Épreuve à l'antigène tamponné qui a permis de classer les sujets comme porteur ou non-porteur n'est pas parfait; il présente une sensibilité et une spécificité propre.

Il est indispensable de tenir compte de cette imperfection pour déterminer la sensibilité et la spécificité réelle du test Elisa-i. Si Se_R et Sp_R sont respectivement la sensibilité et la spécificité du test de référence, les formules utilisées pour le calcul de la sensibilité et de la spécificité réelles du test étudié deviennent:

$$Se = \frac{(a + b) * Sp_R - b}{N * Sp_R - (b + d)}$$

$$Sp = \frac{(c + d) * Se_R - c}{N * Se_R - (a + c)}$$

II.3.1. Estimation de la prévalence

II.3.1.1. Estimation de la prévalence apparente

Les calculs des taux de la séroprévalence, ou prévalence apparente, sont effectués en utilisant la formule ci après :

Prév. apparente = nombre d'animaux positifs/ nombre d'animaux testés.

Le taux de prévalence n'est que l'expression de la prévalence sous forme de pourcentage.

II.3.1.2. Estimation de la prévalence réelle

L'estimation de la prévalence réelle d'une maladie est capitale dans la plupart des domaines de l'Épidémiologie.

Cette estimation dépend des caractéristiques des tests impliqués dans le diagnostic de la maladie comme suggéré dans la formule suivante (Rogan et Gladen, 1978) :

$$\textit{Prév. réelle} = \frac{\textit{Prév. apparente} + (Sp - 1)}{Se + Sp - 1}$$

II.3.1. Calcul de la valeur prédictive positive et négative

II.3.1. Valeur prédictive positive VPP

Valeur prédictive d'un test positif VPP (= probabilité pour qu'un test positif corresponde à un sujet malade) est calculé selon la formule plus connue, de la valeur prédictive d'un résultat positif d'un test suivante (Toma *et al.,* 1991) :

$$VPP = \frac{Se \times \textit{Prév. réelle}}{Se \times \textit{prév. réelle} + (1 - \textit{prév. réelle}) \times (1 - Sp)}$$

II.3.2. Valeur prédictive négative VPN

Valeur prédictive d'un test négatif VPN (= probabilité pour qu'un test négatif corresponde à un sujet non malade) est calculé selon formule suivante (Toma *et al.,* 1991) :

$$VPN = \frac{Sp \times (1 - \textit{Prév. réelle})}{Sp \times (1 - \textit{prév. réelle}) + \textit{prév. réelle} \times (1 - Se)}$$

II. RESULTATS

Un total de 275 sérums bovins ont été mis à l'épreuve pour le dépistage sérologique de la Brucellose bovine en utilisant deux techniques dédiées à cet effet : l'EAT et l'ELISA-i. Les résultats du premier test sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau 07 : résultats du test de l'épreuve à l'antigène tamponné

Nombre de sérums	Observation	Résultats
2	Présence des agglutinants	Positifs
273	Absence des agglutinants	Négatifs

Selon les recommandations de l'OIE, les échantillons positifs aux épreuves de dépistage doivent être confirmés selon une stratégie établie (Nielsen, 2002). Ainsi, dans les mesures de confirmation, les sérums ayant présenté un résultat positif pour le test de l'EAT doivent être testés à nouveau avec des tests plus performants. Dans ce contexte, la réaction de fixation du complément s'avère une épreuve très largement utilisée et acceptée comme épreuve de confirmation. En effet, d'après Garin-Bastuji, (1993) la réaction de fixation du complément est considérée comme la plus spécifique en matière de Brucellose. Ainsi, les deux sérums révélés positif par le test d'EAT ont été confirmé par la technique de FC. Les résultats obtenus sont reportés sur le tableau suivant.

Tableau 08 : résultats de test de fixation du complément (pour confirmation)

Nombre de sérums	Observation	Résultats
2	supérieur à 20 UCEEs/ml	Positifs

Pour la technique Elisa-indirect, les résultats obtenus sont reportés sur le tableau suivant.

Tableau 09 : résultats du test Elisa-i

Nombre de sérums	Observation	Résultats
7	DO > α	Positifs
268	DO < α	Négatifs

III.1. Calcul de la valeur de sensibilité et de spécificité de la technique ELISA-i

Sur un total de 275 sérums testés dans la présente étude, le test Elisa indirect a donné 7 sérums positifs (deux étaient positif à l'épreuve de l'antigène tamponné considéré comme le test de référence « gold standard ». Les résultats obtenus sont représentés dans d'une table de contingence qui permet de croiser le résultat du test Elisa-i (positif ou négatif) avec le statut du sujet (malade ou sain).

Tableau 10 : présentation des résultats du test d'ELISA-i par rapport à EAT-FC

		Épreuve à l'antigène tamponné (EAT-FC)	
		Résultat positif Animal malade	Résultat Négatif Animal sain
Test immuno-enzymatique indirect (ELISA-i)	Résultat positif	2 *(a)*	5 *(b)*
	Résultat Négatif	0 *(c)*	268 *(d)*
	Total	2	273

III.1. Sensibilité

$$Se = \frac{a}{a + c}$$

avec :

a = 2

c = 0

donc,

$$Se = \frac{2}{2 + 0}.$$

Se = 100%

III.2. Spécificité

$$Sp = \frac{d}{b + d}$$

avec :

b = 2

d = 0

donc,

$$Sp = \frac{268}{5 + 268}$$

Sp = 98,17 %

Imperfection du test de référence

$$Se = \frac{(a+b)*Sp_R - b}{N*Sp_R - (b+d)}$$

avec :

Se = 1

Sp = 0,98

donc,

$$Se = \frac{(2+5)*Sp_R - 5}{275**Sp_R - (5+268)}$$

$$Sp = \frac{(c+d)*Se_R - c}{N*Se_R - (a+c)}$$

avec :

Se = 1

Sp = 0,98

donc,

$$Sp = \frac{(0+268)*Se_R - 0}{N*Se_R - (2+0)}$$

Sachant que Se_R = 59,65 % (IC 95% ; 21-98,3%) et Sp_R = 84,4 % (IC 95% :68,8-100%) (Nielsen., 2002), la sensibilité et la spécificité réelles du test Elisa-i, en tenant en compte de l'imperfection du test de référence, sont respectivement de 67,81 % et 98,65 %.

III.2. Estimation de la prévalence de la Brucellose bovine

III.2.1. Calcul de la prévalence apparente ou séroprévalence

Les analyses sérologiques pratiquées sur 275 sérums de bovins ont permis d'obtenir une estimation de la prévalence apparente ou séroprévalence de la Brucellose bovine dans les régions ayant fait l'objet de prélèvements. La séroprévalence par test est présentée dans le tableau suivant.

Tableau 11 : séroprévalence de la Brucellose

Tests sérologiques	Nombre de positive	Séroprévalence
Test EAT-FC	2	0,72 %
Test ELISA	7	2,55 %

Il ressort de ce tableau que le test Elisa indirect, se révèle particulièrement performant en matière de diagnostic de Brucellose. Les résultats obtenus à partir des tests sérologiques, effectués sur 275 sérums, indiquent une séroprévalence de 0,72 % avec l'épreuve de l'antigène tamponné confirmé avec la fixation du complément. La séroprévalence de l'infection établie par titrage immuno-enzymatique indirect s'élève à 2,55 %.

III.2.2. Calcul de la prévalence réelle

$$\textit{Prév. réelle} = \frac{\textit{Prév. apparente} + Sp - 1}{Se + Sp - 1}$$

Sachant que

Prév. apparente = 2,55

Se, sensibilité = 67,81 %

Sp, spécificité = 98,65%

Donc,

$$\textit{Prév. réelle} = \frac{2{,}55 + 98{,}65 - 100}{67{,}81 + 98{,}65 - 100}$$

Prév. réelle = 1,82 %

III.3. Calcul de la valeur prédictive positive et négative de la technique ELISA

III.3.1. Calcul de la valeur prédictive positive VPP

$$VPP = \frac{Se \times \textit{Prév. réelle}}{Se \times \textit{prév. réelle} + (1 - \textit{prév. réelle}) \times (1 - Sp)}$$

Sachant que

Prév. réelle = 1,82 %

Sp = 65,81 %

Sp = 98,65 %

Donc,

$$VPP = \frac{65{,}81 \times 1{,}82}{65{,}81 \times 1{,}82 + (100 - 1{,}82) \times (100 - 98{,}65)}$$

VPP = 48,35 %

III.3.2. Calcul de la valeur prédictive négative VPN

$$VPN = \frac{Sp \times (1 - Prév.\ réelle)}{Sp \times (1 - prév.\ réelle) + prév.\ réelle \times (1 - Se)}$$

Sachant que

Prév. réelle = 1,82 %

Sp = 65,81 %

Sp = 98,65 %

Donc,

$$VPN = \frac{98,65 \times (100 - 1,82)}{98,65 \times (100 - 1,82) + 1,82 \times (100 - 65,81)}$$

VPN = 99,4 %

IV. DISCUSSION

Un test de dépistage est définit par ses performances intrinsèques et extrinsèques. Les performances propres (intrinsèques) du test de dépistage sont sa sensibilité et sa spécificité. Elles sont définies et calculées en conditions expérimentales et sont donc indépendantes du type d'individu testé. Par contre, les caractéristiques de la population testée, en particulier la prévalence de la maladie, conditionnent les performances extrinsèques du test. Ces performances extrinsèques sont les valeurs prédictives positives et négatives. Elles sont relatives à l'utilisation du test pour une population donnée et diffèrent selon les caractéristiques de la population testée. Elles sont définies et calculées en situation de dépistage et permettent d'apprécier la pertinence de l'utilisation du test dans cette population précise.

D'après les résultats de la présente étude, le test Elisa-i a permis d'identifier 7 animaux séropositifs sur 275 sérums testés dont deux sérums correspondent à des animaux malades, puisque ils se sont révélés positifs par le test d'EAT (test de référence). Ainsi, la prévalence apparente ou séroprévalence des animaux identifiés par le test Elisa est donc de 7 sur 275 sérums testés, soit 2,55 %.

Le test immuno-enzymatique indirect est considéré comme plus sensible (sensibilité = 67,81 %) par rapport à l'épreuve à l'antigène tamponné (sensibilité = 59,65 %) et plus spécifique (Spécificité = 98,65 %) par rapport à la réaction de fixation du complément (spécificité = 84,4 %).

Ainsi, au vu des résultats obtenus (résultats performances propres (intrinsèques) dépendant des caractéristiques techniques du test qui déterminent sa capacité de différencier, au sein de la population cible, les personnes probablement atteintes de la maladie de celles qui sont probablement indemnes).

Le test ELISA-i présente des avantages évidents du point de vue de la sensibilité et de la spécificité, par rapport au test d'EAT qualifié comme test de référence « gold standard » dans la présente étude. D'après Chakroun et Bouzouaia, 2007 ; Crosjean *et al.,* 2009 : la technique Elisa reste sensible presque dans tous les stades observés lors de la Brucellose clinique. En revanche, la sensibilité de l'épreuve à l'antigène tamponné semble moins performante, notamment dans la phase aigue et chronique de la maladie.

Dans ce sens, pour Crosjean *et al.,* 2009 la technique Elisa permet de distinguer les formes aigue et chronique, ce qui est un avantage certain particulièrement dans nos régions où ces phases d'avoir être maitrisées ce qui permet de mieux appréhender la maladie. Godfroid *et al.,* (2003) abondent dans le même sens en signalant que la technique ELISA est le test qui donne les résultats de la façon la plus précoce. En plus, cette technique présente l'avantage de rester positive pendant longtemps après l'épisode aigu, permettant un diagnostic sérologique de la Brucellose chronique, période pendant laquelle la cinétique du titre en anticorps IgG décroit progressivement et où les autres réactions, notamment qualitatives (positive/ négative), telles l'EAT, deviennent négatives, donnant ainsi un résultat faussement négatif (Maurin, 2007).

En fait, l'épreuve à l'antigène tamponné est une technique sérologique primaire, basé sur l'agglutination en masse des Ac-Ag. Donc, c'est une réaction qualitative et, en cas de positivité, les sérums doivent être titrés par rapport à un autre test qui lui doit être quantitatif (LPC., 2007). En revanche, l'immuno-enzymatique (ELISA-i) est une technique sérologique tertiaire mieux adaptée au titrage spécifique des IgG et des IgM anti-*Brucella* (Maurin M., 2007).

Comparée à l'EAT, le test ELISA-i est une technique quantitative (rapports de densité optique) qui permet de détecter de faibles taux d'anticorps dans les sérums des animaux. Son seuil de

positivité est très bas comparé à celui de la technique EAT ce qui permet de déceler particulièrement des sérums positifs correspondant à des animaux en cours de séroconversion où le titre des anticorps est faible (passage de la séronégativité à la séropositivité ou vise versa).

Dans l'ensemble, la réaction immuno-enzymatique par la technique ELISA est très sensible et très spécifique, elle reste longtemps positive (Chakroun et Bouzouaia 2007).

Par ailleurs, quoique la sensibilité et la spécificité décrivent les caractéristiques d'un outil diagnostique et sont dérivées de populations d'animaux dont on connaît le statut de la maladie ou non parce qu'ils ont subi un test de référence, mais le vétérinaire est souvent confronté au résultat du test et ne sait évidemment pas si le l'animal est réellement malade ou non. Il doit donc connaître, si le test est positif, quelle est la probabilité que l'animal soit réellement malade ; et si le test est négatif, quelle est la probabilité que l'animal ne soit pas malade. Ces renseignements sont donnés par les notions de valeur prédictive positive et valeur prédictive négative d'un test.

Du fait que la représentativité de l'échantillon n'est pas suffisante pour déterminer les valeurs prédictives d'un test à partir du tableau de contingence, nous avons utilisé des formulations reposant sur le théorème de Bayes en nous servant de la sensibilité et de la spécificité calculées sur l'échantillon et la prévalence réelle de la Brucellose dans la population prélevée.

Prévalence réelle de la maladie dans la population	1,82%
Sensibilité du test (= proportion de patients malades dont le test est positif)	67,81 %
Spécificité du test (= proportion de patients non malades dont le résultat est négatif)	98,65%

Cette présentation des données fournies par les tests de diagnostic est très intéressante à plus d'un titre et est souvent connue sous l'expression "raisonnement bayesien".

Par conséquent, le test Elisa indirect a donné une bonne valeur prédictive négative (VPN = 99, 4 %). Ainsi, un animal, dont le test est négatif par le test Elisa-i, aura donc en réalité une probabilité proche à 100 % de ne pas avoir réellement la Brucellose. En revanche, la valeur prédictive positive est très faible (VPP = 48,35 %). Ainsi, un animal, dont le test est positif par le test Elisa-i, aura donc en réalité un risque proche à 50 % d'avoir réellement la Brucellose.

En effet, la valeur prédictive négative d'un test donné va s'améliorer d'autant que la maladie est rare (peu prévalente). Il en est de même pour la valeur prédictive positive qui va s'améliorer d'autant que la maladie est fréquente. Autrement dit, quelles que soient les performances intrinsèques du test (sensibilité et spécificité), si la prévalence de la maladie est faible (ce qui est habituellement le cas dans le cadre du dépistage), la probabilité qu'une personne ayant un test positif soit réellement malade est faible.

V. CONCLUSION

A l'instar de toutes les études menées de ce sens, nous avons tenté de démontrer, tout au long de cette étude, la limite des performances de détectabilité de l'épreuve à l'antigène tamponné (EAT) et de la réaction de fixation du complément (FC) dans le diagnostic de la Brucellose bovine en faveur du test Elisa-i.

Effectivement, la présente étude a révélé que le test Elisa-i s'avère être d'une part plus sensible que l'EAT avec une sensibilité qui est respectivement de 67,81 contre 59,65%, et d'autres part plus spécifique que FC avec une spécificité qui est respectivement de 98,65 % contre 95,30 %.

Pour obtenir une estimation de la prévalence réelle, un test parfait avec une sensibilité et une spécificité de 1 est donc nécessaire (Nicolas Praet, 2006), les tests qui ont à la fois une sensibilité et une spécificité très élevées sont rares (M.R. Nendaz, 2004), Garin-Bastuji B. (2008) précise qu'il n'existe pas encore de test sérologique de Brucellose bovine ayant toute les qualités de sensibilité, de simplicité d'exécution, de cout réduit et qui permettent de différencier sans équivoque un animal vacciné d'un animal infecté. De ce fait, en pratique sérologique courante, on choisira de préférence l''EAT, test sensible, puisque l'objectif est la détection du plus grand nombre possible de sujets malades. En revanche, on choisira FC, test de confirmation effectué chez les sujets dont le test de dépistage s'est révélé positif avec une spécificité très élevée, afin de minimiser le risque de faux positifs.

Afin de résoudre cette contrainte, la technique Elisa-i peut être choisie à la fois comme un test de dépistage dans le diagnostic sérologique de la Brucellose bovine, car d'après les résultats de cette étude, elle présente une sensibilité aussi bonne que le test EAT, et également comme test de confirmation, puisque elle présente une spécificité comparable à celle de la FC, s'y ajoute sa simplicité d'exécution par rapport au test FC qui généralement n'est plus utilisée, car délicate à mettre en œuvre.

D'autre part, les informations recueillies au cours de cette étude ont permis d'estimer la prévalence réelle de la Brucellose dans la population des bovins des régions ayant fait l'objet de prélèvements. Ainsi, la prévalence obtenue est de 1,82 %. Une telle prévalence appelle davantage les autorités vétérinaires à poursuivre leur programme de prophylaxie sanitaire, basé sur le dépistage sérologique de la Brucellose bovine et l'abattage sanitaire des animaux séropositifs, afin de parvenir au stade final du programme de prophylaxie de la Brucellose.

VI. RECOMMANDATIONS

Les recommandations qui découlent de notre étude s'articulent sur l'amélioration des techniques pour un meilleur diagnostic, en recommandant d'envisager la standardisation et la systématique du test ELISA indirect dans le dépistage de la Brucellose bovine dans tous les laboratoires agrés pour le diagnostic des maladies infectieuses. Bien que le coût reste parfois relativement élevé, mais les conséquences de la maladie sont infiniment plus onéreuses au regard des frais engendrés par l'antibiothérapie des personnes ayant contracté la Brucellose, ses séquelles souvent handicapante chez beaucoup patients bien que cliniquement guéris, sans oublier les rechutes fréquentes.

En plus de son caractère zoonotique, la Brucellose est responsable de pertes économiques importantes en élevage, aussi bien chez les grands ruminants que chez les caprins, en raison de la perte des produits lors d'avortements des chutes des productions de lait et de laine (Thakur *et al.,* 2002). Toutes ces pertes directes ou indirectes, provoquées par la Brucellose peuvent être réduites par l'utilisation de tests efficace quelque soit la phase de la maladie, cela pourrait être le cas par l'utilisation des kits ELISA nécessaire pour le dépistage de la Brucellose animale en toute perfectionnement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Acha. N. P. & B. Szyfres.(2005) : Zonnose d'origine professionnelle. EMC-Toxicologie pathologie. 2 :163-177.

2. Alton G.G., L.M., Jones, R.D. Angus & J.M. Verger. (1988) : Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.

3. Avril JL, H. Dabernat, F. Denis & H. Monteil. (1992) : Bactériologie clinique. 2ème édition Ellipses : 296.

4. Baldi P.C., G.F. Araj, G.C. Racaro, J.C. Wallach & C.A. Fossati. (1999) : Detection of antibodies to Brucella cytoplasmic proteins in the cerebrospinal fluid of patients with neurobrucellosis. Clinical diagnose Immunologie. 6 : 756-759.

5. Benkirane A. (2001) : Surveillance épidémiologique et prophylaxie de la brucellose des ruminants : exemple de la région Afrique du Nord et Proche-Orient. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 20 (3) : 757-767

6. Bricker B.J. (2002) : PCR as a diagnostic tool for brucellosis, Vet. Microbiol., 90, 435–446.

7. Cherwonogrodzky J.W., G. Dubray E. Moreno & H. Mayer. (1990) : Antigens of Brucella. Animal brucellosis. Nielsen et Duncan Edition. CRC. Press. Boca. Raton. USA. 19-64.

8. Colmenero J.D, Reguera J.M, Fernandez-Nebro A, CabreraFranquelo F, (1991) : Osteoarticular complications of brucellosis.AnnRheum Dis ; 50 (1) :23-6.

9. Colmenero J, D., J.M. Reguera, F. Martos, D. Sanchez De Mora, M. Delgado, M. Causse, A. Martin-Fartan, Juarez. (1996) : Complications associated with brucella melitensis infection : a study of 530 cases. Medecine 75 : 195-210.

10. Corbel, M.J. (1997) : Brucellosis. an overview. Emerg. Infec. Dis. 3 : 213-221.

11. Crosjean J., D. Clavé, M. Archambaud & C. Pasquier. (2009) : Bactériologie et virologie pratique. Edition de Boeck. 153.

12. Dao S. (2009) : Seroprevalence of human brucellosis in Mopti, Mali. Revue Tunisienne d'Infectiologie - Oct. 2009; Vol.2 : 24 – 26

13. De Massis F, Di Girolamo A, Petrini A, Pizzigallo E, Giovannini A., (2005) : Correlation between animal and human brucellosis in Italy during the period 1997-2002. Clin.Microbiol.Infect.;11;632-6.

14. Doganay M. & B. Aygen. (2003) : Human brucellosis. An overview. Int. J. Infect. Dis 7 : 173-182.

15. Enright F.M (1990) ; The pathogenesis and pathologiolohy of brucella infection in Domestic Animals. 301-334.

16. Fensterbank R. (1987): Brucellose des bovins et des petits ruminants : diagnostic, prophylaxie et vaccination in brucellose des bovins, ovins et caprins, série technique numéro 6, OIE édition. 286

17. Freney J.R., F. Renaud, W. Hansen & C. Bollet. (2000) : Précis de bactériologie clinique. Edition ESKA. Paris. 1413-1420.

18. Gourreau & F. Bendali. (2008) : Manuel pratique des maladies des bovins. 4ème édition. France agricole. 80-82.

19. Garin-Bastuji B. (1993) : Brucellose bovine, ovine et caprine. contrôle et prévention. Point Vét. 25 : 107-114

20. Garin-Bastuji B. & Benkirane A. (1996) : FAO/WHO/OIE Round Table on the use of Rev. 1 vaccine in small ruminants and cattle. 21-22 septembre 1995, Centre national d'études vétérinaires et alimentaires (CNEVA), Maisons-Alfort. CNEVA, Maisons-Alfort, 115 pp.

21. Garin-Bastuji B. & Y. Millemann, (2008) : Brucellose. Maladies des bovins. 4ème édition. 81-82.

22. Godfroid J, A. Al-Mariri, K. Walravens J.J. Letesson, (2003) : Brucellose bovine. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. 2 (71) : 880 p

23. Institut de veille Sanitaire. (2000) : La brucellose humaine de 1998 à 2000. Surveillance nationale des maladies infectieuses. Revue Tunisienne d'Infectiologie - Oct. 2009; Vol.2 : p 24 -26

24. Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP., (2005) : From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis.Vet.Research;36:313-26.

25. Janbon F. (2000) : Brucellose. Encycl Méd Chir, Maladies Infectieuses, 8-038-A-10 : 11

26. Jeanjean MF., J. Mandin & J. Roux. (1973) : La réaction d'immunofluorescence dans le sérodiagnostic des brucelloses humaines. Médecine et maladies infectieuses. 3 : 53-62

27. Jensen A.E., N.F. Cheville, C.O. Thoen, A.P. Macmillan & W.G. Miller (1999) : Genomic fingerprinting and development of a dendrogram for Brucella spp. isolated from seals, porpoises, and dolphins. J. Vet. Diagn.Invest., 11, 152–157.

28. khan, M.Y., M.W. Mah & Z.A. Memish. (2001) : Brucellosis in pregnant women Clin. Infec. Dis. 32 :1172-1177.

29. Kahn C.M., (2008) : Manuel vet Merk, 3th edition. Edition Merk & Co., INC. 1110-1159.

30. Ko. J. & G.A. Splitter. (2003) : Molecular host-pathogen interaction in brucellosis : current understanding and futur approchaes to vaccine developpment for mince and humains. Clin. Microbio. Rev. 16 : 65-78.

31. Laboratoire Pasteur Cerba (2007) : Guide des analyses spécialisées. 5e édition Elsevier Masson. 223.

32. Laudat P., A Audurier., P. Choutet, C. Gialluly, J.P. Ducroix & J. Loulergue (1987) : Sérologie de la brucellose : évaluation comparative des réactions d'agglutination, de fixation du complément, d'immuno-fluorescence indirecte et de la contre-immuno-électrophorèse. Médecine et Maladies Infectieuses. Published by Elsevier SAS. Volume 17, Pages 58-61.

33. Lefèvre P.G., J. Blancou & R. Chermette (2003) : Principales maladies infectieuse et parasitaire du bétail (Europe et régions chaudes). Edition Tec et Doc, édition médicales internationale. Londres paris. New york.

34. Office International des Épizooties « OIE » (2000) : Bovine brucellosis. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 4e éd., Chapitre 2.3.1 : 328-345.

35. Office International des Épizooties « OIE » (2004) : Bovine Brucellosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 13ème édition, Chapitre 2.3.1.

36. Office international des Épizooties « OIE » (2005) : Brucellose bovine. Manuel terrestre de l'OIE section 2.3. maladies bovines de la liste b. chapitre 2.3.1 : 457

37. Office international des épizooties « OIE » (2008) : Brucellose bovine. Manuel terrestre de l'OIE. XIV

38. Office international des épizooties « OIE » (2010) : LISTE DES ÉPREUVES PRESCRITES POUR LES ÉCHANGES INTERNATIONAUX. Manuel terrestre de l'OIE. chapitre 2.4.3. p 681

39. Oliveira S.C. &tt G.A. Splitter. (1995) : CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular Brucella abortus infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I-and class II-défcient mice. Eur. J. Immuno., 25 : 25551-2557.

40. Organisation mondiale de la santé « OMS » (1986). : Comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose. Sixième rapport. Série de Rapports techniques, n° 740. OMS, Genève, 145 pp

41. Marin C.M., E. Moreno, I. Moriyon, R. Diaz & J.M. Blasco (1999) : Performance of competitive and indirect enzymelinked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. Clin. diagn. Lab. Immunol., 6 (2), 269-272.

42. Maurin M. (2005) : La brucellose à l'aube du 21Eme siècle. Méd Mal Infect; 35 : 6-16.

43. Maurin M. (2007) : Précis de bactériologie clinique. 2ème édition ESKA. 82 : 1377-1383.

44. Moreno E., A. Cloeckaert & I. Moriyon (2002): Brucella evolution and taxonomy. Vet. Microbiol., 90, 209–*227.*

45. Nicoletti P. (1980) : The epidemiology of bovine brucellosis. Adv. Vet. Sci. comp. med., 24 : 69-98

46. Nielsen K. (1998) : Brucellosis: development and success using ELISAs for diagnosis. In Towards livestock disease diagnosis and control in the 21st Century. Proc. of an International Symposium on diagnosis and control of livestock diseases using nuclear and related techniques. 7-11 avril 1997, Vienne. Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA), Vienne, 35-45.

47. Nielsen K. (2002) : Diagnosis of brucellosis by serology. Vet. Microbiol., 90, 447–459.

48. Papas G, Akritidis N, Bosilkovski M (2005) : Brucellosis. NEJM ;352(22) :2325-36.

49. Pappas G, P. Papadimitriou, N. Akritidis, L. Christou, & EV. Tsianos. (2006) : The new global map of human brucellosis. Lancet Infect. Dis., 6 : 91-99

50. Pouillot R., B. Garin-Bastuji, G. Gerbier, Y. Coche, C. Cau, B. Dufour & F. Moutou (1997) : The brucellin skin test as a tool to differentiate false positive serological reactions in bovine brucellosis. Vet. Res., 28, 365–374.

51. Quin P.J.et B.K. Markey. (2003) : Concise review of veterinary microbiology, Blackwell science Ltd, 9600 garsington road, oxford OX 4 2 DQ, UK. 52-55

52. Robichaud, S., M. Libman, M. Behr & E. Rubin. (2004) : Prevention of laboratory-acquierd brucellosis. Clin. Infec. Dis. 38 :119-122.

53. 21- Rolain J.M, Maurin M . Le traitement des brucelloses. Antibiotiques 2000 ; 2 : 101-9.

54. Roux J. (1979) : Epidémiologie et prévention de la brucellose. Bulletin de l'Organisation mondial de la Sante6, 57 : 179-194.

55. Ruben B., J.D. Band, P. Wong & J. Coliville. (1991) : Person-to-person transmission of Brucella melitensis. Lancet 1 : 14-15.

56. Saergerman C., Vo T.-K.O., L. De Waele, D. Gilson, A. Bastin, G. Dubray, P. Flanagan, J.N. Limet, J.J. Letesson & J. Godfroid (1999) : Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. Vet. Rec., 145, 214–218.

57. Sarinas, P.S.A. & R.K. Chitkhara. (2003) : Brucellosis. Sem. Resp. infec. 18 : 168-182.

58. Shapiro D.S. & J.D. Wong. (1999) : Brucella In Manuel of clinical microbiologie, eds P.R. murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Yolken 7e edition. American society for microbiology, Washington DC, 625-631.

59. Samartino L, D. Gall, R. Gregoret & K. Nielsen (1999) : Validation of enzyme-liked immnosorbent assay for diagnostic of bovine brucellosis. Vet. Microbio. 70 : 193-200.

60. Samartino L.E., Fort M., Gregoret R. & Schurig G.G. (2000) : Use of Brucella abortus vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. Prev. vet. Med. , 45, 193-199.

61. Thakur S.D., R. Kumar & D.C. Thapliyal, (2002) : Human brucellosis : review of an under-diagnosed animal transmitted disease. J. Commun. 34 (4) : 287-301.

62. Vanderkerckhove C, Stahl J.P. Brucellose (1993) Données épidémiologiques et thérapeutiques. Rev Prat 1993 ; 7 : 47-52.

63. Walker R.L. (2002) : Brucella. In veterinary microbiology. Edition Blackwell science. USA. 105-112.

64. Yanagi M & K. Yamasato. (1993) : Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequence. FEMS microbio. Lett. 107 : 115-120.

65. Young E.J, (1995) : An overview of human brucellosis. Clin. Infec. Dis. 21 : 283-290.

Annexe

SYNBIOTICS EUROPE SAS
2, rue Alexander Fleming
F- 69367 Lyon, Cedex 07

SERELISA® Brucella OCB Ab Mono Indirect

KIT DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI LIPOPOLYSACCHARIDES DE *Brucella* DANS LES SERUMS BOVINS (INDIVIDUELS ET MELANGES), OVINS ET CAPRINS (INDIVIDUELS)

TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE INDIRECTE

384 réactions monocupules

I. PRINCIPE DU TEST

Le kit « SERELISA® Brucella OCB Ab Mono Indirect » utilise une technique immuno-enzymatique indirecte permettant la détection dans les sérums bovins, ovins et caprins individuels et mélanges de 10 sérums bovins (selon la réglementation en vigueur) des anticorps anti-lipopolysaccharides (LPS) de *Brucella*. La réaction comporte 3 étapes :

1. Chaque échantillon est déposé dans une cupule sensibilisée par les LPS de Brucella. Les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon se lient à l'antigène bactérien.

2. Après lavage, un anticorps conjugué peroxydase est ajouté. Il vient se fixer sur les immunoglobulines préalablement captées, aboutissant à la formation d'un complexe :
(Ag LPS) - (Ac anti LPS) - (conjugué peroxydase).

3. L'excès de conjugué est éliminé par lavages. L'enzyme liée au complexe est révélée par addition d'un substrat qu'elle transforme en un produit coloré. Après arrêt de la réaction enzymatique, les densités optiques sont mesurées. La présence ou l'absence d'anticorps est déterminée à partir de valeurs seuils obtenues en fonction du témoin positif.

II. COMPOSITION ET CONSERVATION DU KIT

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
4 microplaques contenant 6 barrettes de 2 x 8 cupules sensibilisées avec des LPS de Brucella	Utiliser dans les 4 semaines après ouverture du sachet. Refermer le sachet après utilisation.
Conjugué peroxydase (**CJ**)	*Protocole sur sérums individuels* : diluer **200 fois** dans le CD. *Protocole sur mélanges de sérums* : diluer **100 fois** dans le CD. Utiliser dans les 2 h après dilution.
Tampon substrat de la peroxydase (**PS**)	Prêt à l'emploi
Témoin négatif (**N**)	*Protocole sur sérums individuels* : diluer **100 fois** dans le SD. *Protocole sur mélanges de sérums* : diluer **200 fois** dans le SD.
Témoin positif (**P**)	*Protocole sur sérums individuels* : diluer **100 fois** dans le SD. *Protocole sur mélanges de sérums* : diluer **200 fois** dans le SD.
Diluant des échantillons (**SD**)	Prêt à l'emploi
Solution de lavage (**W**) (10 fois concentrée)	Diluer 10 fois en eau distillée ou déminéralisée. Utiliser dans les 48 heures après dilution.
Diluant du conjugué (**CD**)	Prêt à l'emploi
Solution d'arrêt (**S**)	Prêt à l'emploi
Films adhésifs	12 films

NB : Les réactifs dilués doivent être conservés à +5°C ± 3°C et utilisés dans les délais indiqués ci-dessus.

III. MATERIEL ET REACTIFS NECESSAIRES NON FOURNIS

- Eau distillée ou déminéralisée.
- Pipettes réglables, ou fixes, pour mesurer et délivrer de 0 à 1000 µl.
L'erreur de la mesure doit être ≤ 10% pour des volumes ≤10 µl et ≤ 5% pour tous les autres volumes indiqués.
- Eprouvettes graduées de 100 ml et 1000 ml.
- Dispositif de lavage, de préférence automatique pour plaques de microtitration.
- Appareil de lecture pour microplaques équipé de filtres pour lecture bichromatique à 450 et 630 nm. Il est toutefois possible d'utiliser un lecteur monochromatique équipé d'un filtre à 450 nm.

IV. PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

La qualité des résultats dépend du respect du mode opératoire (cf. paragraphe VI) et des bonnes pratiques de laboratoire.

1. Ne pas mélanger ou associer des réactifs provenant de kits portant des numéros de lots différents.
2. Ne pas utiliser le kit après la date de péremption.
3. Placer les réactifs à la température du laboratoire au minimum 1 heure avant utilisation. Attention : seuls les réactifs utilisés dans l'étape suivante sont concernés.
4. Manipuler réactifs et échantillons comme des produits à risques.
5. Eviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact accidentel, rincer abondamment à l'eau froide les parties exposées.
6. Ne pas pipeter les réactifs à la bouche.
7. Eviter les contaminations inter-échantillons lors du prélèvement, du stockage ou du transport. Il est nécessaire de changer d'embout de pipette pour chaque échantillon.
8. Ne pas contaminer la solution substrat par des ions métalliques, des oxydants, des détergents. Veiller à la propreté des récipients. Ne pas utiliser le même récipient ou le même embout de pipette pour le conjugué et le substrat.
9. Il est conseillé d'éliminer les réactifs et matériels en contact avec les réactifs selon les exigences réglementaires. Les fiches de sécurité du produit sont disponibles sur demande.

Phrases de risques :
R 23/25 : Toxique par inhalation et par ingestion.
R35 : Provoque de graves brûlures.
R 36/37/38 : Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau.
R 41 : Risque de lésions oculaires graves.
R 42/43 : Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et contact avec la peau.
S 7 : Conserver le récipient bien fermé.
S 24 : Eviter le contact avec la peau.
S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
S30 : Ne jamais verser de l'eau dans le produit.
S45 : En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

V. TRAITEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

La réaction est effectuée sur sérums individuels dilués au **1/100ème** et sur mélanges de 10 sérums au maximum dilués au **1/20ème**. Les échantillons peuvent être conservés comme suit :

Echantillons	Froid (+5°C)	Congélation (-20°C)	Température ambiante (20°C)
Sérums individuels ou mélanges (non dilués)	max. 7 j.	Oui	Non

VI. MODE OPERATOIRE

Suivre le mode opératoire. Distribuer les témoins négatif et positif en double pour chaque série de déterminations et au minimum pour chaque plaque.

A. ETAPES PREPARATOIRES

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des témoins et des échantillons.

2. Préparer les échantillons à analyser :

Protocole sur sérums individuels ***dilution 1/100ème :***
A titre d'exemple : diluer les échantillons au 1/10ème en tube ou dans une plaque de dilution dans le diluant des échantillons (SD). Diluer à

nouveau au 1/10ème en tube ou directement dans la cupule à raison de 10 µl de pré-dilution dans 90 µl de diluant des échantillons (SD).

Protocole sur sérums bovins en mélanges ***dilution 1/20ème :***
Préparation des mélanges : par exemple, additionner 10 µl de chacun des sérums individuels pour former un mélange de 10 échantillons de 100 µl.
Diluer les mélanges au 1/20ème en tube ou directement dans la plaque à raison de 5 µl de mélange dans 95 µl de diluant des échantillons (SD).

B. REALISATION DU TEST

I - DEPOT DES ECHANTILLONS ET TEMOINS

1. Distribution des témoins :

Pour les deux protocoles suivants, le témoin négatif (N) est déposé dilué dans les cupules A1 et A2, le témoin positif (P) dilué dans les cupules B1 et B2 à raison de 100 µl par puits.

Protocole sur sérums individuels ***dilution 1/100ème :***
Après agitation des flacons, diluer par exemple les témoins au 1/10ème dans le diluant des échantillons (SD) en tube ou dans une plaque de dilution puis diluer à nouveau au 1/10ème en tube ou directement dans la cupule à raison de 10 µl de pré-dilution dans 90 µl de diluant des échantillons (SD).

Protocole sur sérums bovins en mélanges ***dilution 1/200ème :***
Après agitation des flacons, diluer les témoins au 1/10ème dans le diluant des échantillons (SD) en tube ou dans une plaque de dilution puis diluer à nouveau au 1/20ème en tube ou directement dans la plaque à raison de 5 µl de pré-dilution dans 95 µl de diluant des échantillons (SD).

2. Distribution des échantillons :

Voir paragraphe VI.A.2 pour la préparation des sérums et la dilution directement en cupule.
Les échantillons sont testés en simple ou en double et la distribution est effectuée en colonne. Distribuer 100 µl par puits.
Toujours disposer les barrettes sur un cadre. Celui-ci sera nécessaire pour utiliser le laveur et le lecteur.
Recouvrir les cupules avec la longueur nécessaire de film adhésif.
Homogénéiser par agitation douce manuelle ou à l'aide d'un agitateur de plaque.

3. Incubation de la plaque
1 h (± 5 min) à +37°C (± 3°C)

LAVAGE :
Solution de lavage : préparer la quantité suffisante par dilution de la solution de lavage concentrée (W) 10 fois en eau distillée ou déminéralisée.
Oter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

II – AJOUT DU CONJUGUE

1. Préparation du conjugué :

Protocole sur sérums individuels ***dilution 1/200ème :***
Préparer la solution de conjugué par dilution du conjugué (CJ) concentré **200 fois** dans le diluant du conjugué (CD) (2 ml sont nécessaires par barrette, soit 10 µl de CJ dilué dans 1,99 ml de CD).

Protocole sur sérums bovins en mélanges ***dilution 1/100ème :***
Préparer la solution de conjugué par dilution du conjugué (CJ) concentré **100 fois** dans le diluant du conjugué (CD) (2 ml sont nécessaires par barrette, soit 20 µl de CJ dilué dans 1,98 ml de CD).

2. Distribution du conjugué :
Distribuer 100 µl de conjugué dilué dans toutes les cupules.
Recouvrir avec un film adhésif neuf.

3. Incubation du conjugué :
Incuber le conjugué 30 minutes (± 5 min) à +37°C (± 3°C).

LAVAGE :
Oter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

III – REVELATION

1. Ajout du substrat :
Distribuer 100 µl de tampon substrat (PS) par cupule. Ne pas mettre de film adhésif lors de cette étape. Homogénéiser en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque.

2. Incubation du substrat :
Incuber 30 min. ± 5 min. à température du laboratoire (+20°C ± 5°C) et à l'obscurité.

3. Ajout de la solution d'arrêt :
Distribuer 50 µl de solution d'arrêt (S) par cupule.
Homogénéiser en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque. S'assurer qu'il n'y a pas de formation de bulles dans les cupules. Essuyer soigneusement le dessous des plaques.

4. Mesure des densités optiques :
Mesurer les densités optiques (DO) en bichromatisme à 450 et 630 nm ou en monochromatisme à 450 nm (dans le jaune).
La lecture en bichromatisme est fortement recommandée.
Dans le cas d'utilisation d'un lecteur monochromatique, veillez attentivement à l'état de propreté du fond des cupules avant lecture.

VII. VALIDATION DU TEST

Les résultats de chaque série sont validés si :

$\overline{DO}$ P ≥ 0,5 et $\overline{DO}$ N <0,3 * $\overline{DO}$ P.

$\overline{DO}$: moyenne des DO pour les échantillons testés en double.

VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

La présence ou l'absence d'anticorps anti-LPS de *Brucella* est déterminée par la comparaison des Densités Optiques (DO) à des valeurs seuils obtenues à partir du témoin positif.
Deux méthodes de calcul et d'interprétation sont utilisables :

Méthode 1 : CALCUL DES INDICES :

La valeur seuil positive en indice = 0

Pour sérums individuels et mélanges de sérums :

Indice échantillon = 0,50 x (DO échantillon – 0.6 x $\overline{DO}$ P)

Tout échantillon, ou mélange d'échantillons, présentant un indice ≥ 0 est considéré comme **positif**.

Tout échantillon, ou mélange d'échantillons, présentant un indice < 0 est considéré comme **négatif**.

Méthode 2 : ANALYSE DE DENSITES OPTIQUES

Pour sérums individuels et mélanges de sérums :

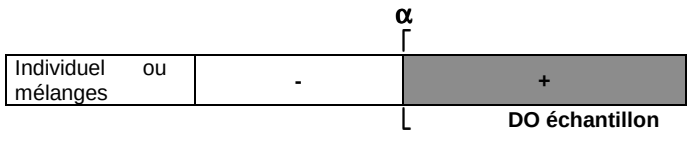
Valeur seuil positif => α = **0.6 x ($\overline{DO}$ P)**

Comparer chacune des DO des échantillons à cette valeur seuil.

Tout échantillon ou mélange d'échantillons, présentant une DO ≥ α est considéré comme **positif**.

Tout échantillon ou mélange d'échantillons, présentant une DO < α est considéré comme **négatif**.

Interprétation des résultats



Pour toute question, nous contacter :
SYNBIOTICS EUROPE - 2 rue Alexander Fleming
69367 LYON Cedex 07 – France
Tel : 04.72.76.11.11 - Fax : 04.72.76.11.10
www.synbiotics.fr info@synbiotics.fr

POUR USAGE VETERINAIRE SEULEMENT /
POUR USAGE IN VITRO SEULEMENT

MULTISKAN EX PRIMARY V. 2.3

ABSORBANCE MODE
CONTINOUS MOVEMENT
FILTER 450

ABSORBANCE
25 JUILET 2011 10 :54 :21

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

MULTISKAN EX PRIMARY V. 2.3

ABSORBANCE MODE
CONTINOUS MOVEMENT
FILTER 450

ABSORBANCE
25 JUILET 2011 12 :48 :04

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,584	0,069	0,090	0,067	0,064	0,127	0,291	0,068	0,067	0,067	0,060	0,064
B	0,622	0,066	0,066	0,062	0,060	0,064	0,061	0,841	0,064	0,072	0,065	0,064
C	0,070	0,065	0,078	0,065	0,266	0,095	0,061	0,066	0,060	0,063	0,065	0,075
D	0,068	0,084	0,084	0,073	0,074	0,151	0,070	0,075	0,064	0,072	0,089	0,075
F	0,088	0,089	0,059	0,246	0,075	0,066	0,069	0,159	0,066	0,059	0,063	0,069
E	0,061	0,067	0,073	0,062	0,069	0,065	0,065	0,060	0,061	0,061	0,068	0,097
G	0,098	3,382	0,092	0,065	0,090	0,062	0,061	0,055	0,062	0,068	0,078	0,076
H	0,071	0,070	0,093	0,075	0,071	0,079	0,063	0,072	0,064	0,064	0,080	0,110

MULTISKAN EX PRIMARY V. 2.3

ABSORBANCE MODE
CONTINOUS MOVEMENT
FILTER 450

ABSORBANCE
25 JUILET 2011 12 :52 :32

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,606	0,067	0,090	0,064	0,061	0,067	0,117	0,074	0,065	0,141	0,069	0,065
B	0,937	0,050	0,122	0,060	0,066	0,076	0,075	0,066	0,152	0,464	0,081	0,064
C	0,080	0,076	3,588	0,199	0,060	0,064	3,278	0,070	0,070	0,079	0,074	0,089
D	0,066	0,106	0,079	0,080	0,062	0,066	0,116	0,082	0,081	0,122	0,067	0,094
F	0,067	0,065	0,121	0,061	0,059	0,063	0,070	0,092	0,073	0,062	0,105	0,070
E	0,067	0,069	0,076	0,066	0,131	0,074	0,080	3,309	0,097	0,115	0,060	0,106
G	0,083	0,064	0,085	0,088	0,064	0,146	0,166	0,089	0,417	0,059	0,139	0,094
H	0,069	0,164	0,070	0,070	0,058	0,065	0,088	0,066	0,060	0,077	0,086	0,085

MULTISKAN EX PRIMARY V. 2.3

ABSORBANCE MODE
CONTINOUS MOVEMENT
FILTER 450

ABSORBANCE
26 JUILET 2011 12 :23 :36

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

MULTISKAN EX PRIMARY V. 2.3

ABSORBANCE MODE
CONTINOUS MOVEMENT
FILTER 450

ABSORBANCE
26 JUILET 2011 12 :39 :40

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,952	0,117	0,100	0,073	0,067	0,075	0,075	0,068	0,091	0,536	0,083	0,110
B	0,825	0,079	0,398	0,079	0,073	0,309	0,064	0,161	0,066	0,070	0,070	0,074
C	0,164	0,066	0,087	0,072	0,069	0,126	0,105	0,058	0,076	0,066	0,078	0,077
D	0,089	0,071	0,099	0,070	0,070	0,068	0,075	0,066	0,167	0,188	0,070	0,075
F	0,135	0,218	0,082	0,069	0,173	0,073	0,071	0,091	0,091	0,084	0,264	0,073
E	0,142	0,095	0,077	0,124	0,073	0,083	0,108	0,085	0,105	0,065	0,068	0,072
G	0,144	0,109	0,087	0,278	0,093	0,090	0,078	0,464	0,060	0,074	0,075	0,080
H	0,158	0,159	0,136	0,294	0,143	0,065	0,139	0,096	0,059	0,092	0,131	0,088