



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa.
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie appliquée



MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème :

**Détection des anticorps anti-*Brucella spp.*
chez l'espèce ovine dans la région de
Tébessa**

Présenté par :

SAFI kater ennada

TOUAIBIA Mayada

Devant le jury :

M. GASMI Salim	MCB	Université de Tébessa	Président
M. BENLAKEHAL Amar	MAA	Université de Tébessa	Rapporteur
M. MENASRIA Taha	MAA	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance :

25 juin 2020

الملخص

داء البروسيلات هو داء عالمي تسببه مختلف أصناف البروسيلات، يصيب بشكل كبير كل من الأبقار والماعز والأغنام. ويعرف أيضا بكونه مرض مهني حيث أنه يسبب عواقب وخيمة على الصحة العامة وتربية المجترات في الجزائر وعلى الرغم من تأثير هذا المرض على صحة الإنسان، فإن الدراسات لتحديد نسبة إنتشار هذا المرض البكتيري تبقى محدودة جدا. ولهذا الغرض، أجريت دراسة عرضية في ولاية تبسة؛ الهدف منها تقدير معدل الانتشار المصلي لمضادات البروسيلات عند الأغنام باستخدام تقنية التراص المصلي (Wright)، وأيضا لتحديد الارتباط الإحصائي المحتمل بين الإيجابية المصلية الفردية وعوامل خطر معينة بالإضافة لقياس التوافق بين النتائج التي تم الحصول عليها بواسطة اختبار Wright مع تلك التي تم الحصول عليها بواسطة تقنية ELISA. تم أخذ 96 عينة موزعة على 23 قطيعا في الفترة الممتدة بين سبتمبر 2016 ونوفمبر 2018. معدل الإيجابية المصلية الفردية هو 9.38% (95 IC) 3.55 - 15.19 مع 21.74% (95 IC) 29.98 - 13.5 من القطعان التي تم دراستها تظهر حالة مصابة إيجابية واحدة على الأقل. كشف اختبار Fischer exact أن عامل حجم القطيع فقط كان مرتبطا بشكل كبير بالإيجابية المصلية الفردية ($p = 0.039$). أظهر معامل ($\kappa = 0.17$ Kappa Cohen؛ $p = 0.00$ و $95\% \text{ IC } -0.027 - 0.367$) توافقا طفيفا بين نتائج اختبارين. هذه النتيجة ذات أهمية حاسمة لممارسي الصحة العامة والممارسين البيطريين لإعادة تأسيس برامج جديدة لمكافحة داء البروسيلات والوقاية. ومع ذلك، سيتعين إجراء المزيد من الدراسات لاستكشاف التأثير الحقيقي لهذه البكتيريا على الصحة العامة والحيوانية.

الكلمات المفتاحية: بروسيلا spp، الأغنام، رايت، إلزا، عوامل الخطر، تبسة، الجزائر.

Résumé

Résumé

La brucellose est une anthroponose bactérienne causée par diverses espèces de *Brucella* spp. de distribution cosmopolite, affectent principalement les bovins, les chèvres et les moutons et est connue comme une maladie professionnelle. C'est une maladie qui cause des conséquences graves sur la santé publique et sur l'industrie d'élevage des ruminants. En Algérie malgré l'impact de cette maladie sur la santé humaine, les études menées pour déterminer l'occurrence de ce genre bactérien est limitée. Pour cet effet une étude transversale a été menée dans la wilaya de Tébessa ; pour estimer le taux de séroprévalence des anticorps anti-*Brucella* spp. chez l'espèce ovine par l'utilisation de technique de séroagglutination de Wright, ainsi pour déterminer une éventuelle association statistique entre la séropositivité individuelle et certains facteurs de risque et pour mesurer l'accordance entre les résultats obtenus par le test de Wright avec ceux obtenus par la technique d'ELISA. 23 troupeaux englobant 96 ovins ont été échantillonnés entre Septembre 2016 et Novembre 2018.

Le taux de séropositivité individuelle est 9.38% (IC95% 3.55 - 15.19) avec 21.74% (IC95% 13.5 - 29.98) de troupeaux étudiés ont été présentés au moins un cas séropositif. Le test Fischer exact a révélé que seul le facteur taille de troupeau est associé significativement avec la séropositivité individuelle ($p = 0.039$). Le coefficient Kappa Cohen ($\kappa = 0.17$; $p = 0.00$ et IC 95% : -0.027 – 0.367) a montré un léger accord entre les résultats de deux tests. Ce résultat a une importance cruciale pour les praticiens chargés de la santé publique et pour les vétérinaires praticiens pour réimplanter des nouveaux programmes de contrôle et de prophylaxie contre la brucellose. Néanmoins, d'autres études devront être effectuées pour explorer le véritable impact de ce bactérie en santé publique et animale.

Mots clés : *Brucella* spp., Ovine, Wright , ELISA, Facteurs de risque, Tébessa, Algérie.

Abstract

Abstract

Brucellosis is a bacterial anthroponosis caused by various species of *Brucella* spp. of cosmopolitan distribution; mainly affect cattle, goats and sheep and is known as a zoonotic disease. A disease causes serious consequences for public health and the ruminant farming industry. In Algeria, despite the impact of this disease on human health, studies to determine the occurrence of this bacterial genus are limited. For this purpose, a cross-sectional study was carried out in the wilaya of Tébessa; to estimate the seroprevalence rate of anti-*Brucella* spp. in the sheep species by the use of Wright's seroagglutination technique, thus to determine a possible statistical association between individual seropositivity and some risk factors and to measure the agreement between the results obtained by the Wright test with those obtained by the ELISA technique.

23 flocks including 96 sheep were sampled between September 2016 and November 2018. The individual seroprevalence is 9.38% (95% CI 3.55 - 15.19) and 21.74% (95% CI 13.5 - 29.98) of herds studied were showing at least one seropositive animal. The exact Fischer test revealed that only the herd size factor was significantly associated with individual seropositivity ($p = 0.039$). The Kappa Cohen coefficient ($\kappa = 0.17$; $p = 0.00$ and 95% CI: -0.027 - 0.367) showed slight agreement between the results of two tests. This result is of crucial importance for public health practitioners and for veterinary practitioners to re-establish new brucellosis control and prophylaxis programs. However, more studies will need to be done to explore the true impact of these bacteria in public and animal health.

Keywords: *Brucella* spp., Sheep, Wright , ELISA, Risk factors, Tébessa, Algérie.

Remerciement

Remerciement

Tout d'abord, on tient à remercier le bon Dieu le tout Puissant de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Nous voulons avant tout exprimer notre gratitude à notre encadreur M.

BENLAKEHAL Ammar pour avoir accepté de nous encadrer, dans cette étude. Nous la remercions pour son implication, son soutien, et ses encouragements au long de ce travail.

Aux membres du jury :

Président du jury: Dr Zouaioui Nassim

Examineur: Dr Djermane Nadia

Enfin, Nous remercions à toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de cette mémoire

Dédicaces

Dédicaces

*Je dédie ce mémoire safi kater ennada aux deux personnes que j'ai tant aimé .
À celui qui a pris soin de moi, à celui qui a tout enduré, à celui qui a doté le plaisir
qu'il a fait de tout don et de tendresse, le droit aux soins et mon soutien était dans
l'adversité, et elle l'a appelée au succès, elle m'a suivie pas à pas dans mon travail,
à qui je me suis reposée chaque fois que je me souvenais de son sourire face à la
source de la tendresse Ma mère, que Dieu lui donne la meilleure récompense dans
les deux mondes.*

*À celui qui m'a doté de tout ce qu'il possède, à celui qui m'a poussé vers celui qui a
regardé mon éducation avec de grands sacrifices, à l'homme qui a possédé
l'humanité avec toute sa force, à ma première école de vie, traduite dans son respect
pour la connaissance, mon cher père, dans mon cœur, Dieu a prolongé sa vie.*

*Je leur dédie cet humble travail pour apporter le bonheur à leur cœur
Aux grands cœurs battant d'amour et de bonté, mes frères et sœurs, que Dieu les
protège et les conserve.*

Je dédie ce mémoire touaibia mayada

*Aujourd'hui et après toutes ces années, j'ai l'honneur, mais surtout le plaisir de
dédier ce travail à toutes les personnes qui m'aiment, qui croient en moi et me
donne des raisons de devenir meilleure :*

A ma mère

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur tu es
une source inépuisable de tendresse, de patience. Ta prière et ta bénédiction m'ont
été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne
pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. Puisse dieu
tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

A mon père

Dédicaces

Tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme, En témoignage de brut des années de sacrifices, d'encouragement et de prières. Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de tous vos efforts. En ce jour, j'espère réaliser l'un des tes rêves.

Puisse dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.

Liste des Tableaux

Liste des Tableaux

Tableau 1: Caractéristiques des différentes techniques de diagnostic sérologique	20
Tableau 2: Analyse statistique des facteurs de risque (Test Fischer exact)	35
Tableau 3: Tableau contingence pour les résultats de deux tests	36

Liste de figures

Figure 1: Principales espèces de Brucella et hôtes de prédilection.	3
Figure 2 : culture de Brucella	15
Figure 3:Test Rose Bengale	17
Figure 4: Réaction de l'anneau dans le lait	17
Figure 5: Technique immuno-enzymatique (ELISA)	18
Figure 6: Le Test de Fixation du complément	19
Figure 7 : Localisation géographique et organisation administrative de la wilaya de Tébessa	23
Figure 8 : Coagulation de sang et décantation de sérum.	25
Figure 9 : Réactif de wright	26
Figure 10 : Dilution des sérums	27
Figure 11 : Sérum positif et sérum négatif	28
Figure 12: Taux de séropositivité individuelle.	30
Figure 13 : Taux de troupeau infecté	31
Figure 14 : Distribution de séropositivité en fonction de survenue d'avortement en dernière gestation	31
Figure 15 : Distribution de séropositivité en fonction de taille de troupeau	32
Figure 16 : Distribution de séropositivité en fonction de nombre de parité	33
Figure 17 : Distribution de séropositivité en fonction de la présence d'espèce caprine	33
Figure 18 : Distribution de séropositivité de Taux d'avortement	34
Figure 19 : Distribution de séropositivité en fonction d'année	34
Figure 20 : La séropositivité en fonction de l'existence d'avortement chez l'espèce caprine	35

Liste des Abréviations et Symboles

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique.

B : *Brucella*.

CD8+ : Cluster de différenciation 8+

CMH : Complexes Majeurs d'histocompatibilité

EAT : Epreuve de l'antigène tamponné

ECA : épreuve cutanée allergique

ELISA: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

FC : Fixation du Complément

IFN γ : Interféron γ

IgA : Immunoglobuline A

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IL-12 : Interleukine-12

LPS : Lipopolysaccharide

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PCR : Polymérase Chain Réaction

PH : Acidité

RBT: Rose Bengal test

RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux

RT : Ring test

SNP : Polymorphisme nucléotidique simple

T CD4+ : lymphocyte T Cluster de différenciation 4+

TCR : T cell receptor

Th1: Helper de Type 1

UV: Ultraviolet

Sommaire

المخلص

Résumé

Abstract

Dédicace

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations et symboles.

Sommaire

Introduction:..... 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Historique:..... 2

2. Définition :.....2

3. Etiologie :.....3

3.1. Classification :.....3

3.2. Caractères bactériologiques :.....4

3.3. Caractères génétique :.....4

4. Epidémiologie :.....5

4.1. Epidémiologie analytique :.....5

4.1.1. Sources de contagion:.....5

4.1.2. Matières virulentes :.....5

4.2. Epidémiologie synthétique :.....7

5. Pathologie de *B. melitensis* chez les petits ruminants domestiques :.....8

5.1. Pathogénie et réponse immunitaire:.....8

5.2. Les différentes phases de l'infection brucellique:8

5.3. Réponse immunitaire :.....10

5.3.1. Immunité innée :.....10

5.3.2. Immunité spécifique acquise :.....10

5.4. Les stratégies d'échappement à la réponse immunitaire :.....11

6. Manifestations cliniques de la brucellose animale :.....12

7. Techniques de diagnostic :.....14

Sommaire

7.1. Diagnostic épidémio-clinique :.....	14
7.2. Diagnostic de laboratoire :.....	14
7.2.1. Diagnostic bactériologique :.....	14
7.2.2. Les techniques d'amplification génique :.....	15
7.2.3. Diagnostic sérologique :.....	16
7.2.4. Diagnostic allergique :.....	19
8. Prophylaxie :.....	20
8.1. Prophylaxie sanitaire :.....	20
8.2. Prophylaxie médicale (La vaccination) :.....	21
PARTIE EXPÉRIMENTALE	
1. Matériel et Méthodes :.....	22
1.1. Présentation générale de la région d'étude :.....	22
1.2. Échantillonnage et prélèvements sanguins :.....	24
1.2.1. Période d'étude :.....	24
1.2.2. Animaux :.....	24
1.2.3. Prélèvements sanguins :.....	24
1.3. Test sérologique :.....	24
1.3.1. Description et principe :.....	25
1.3.2. Réactif :.....	25
1.3.3. Matériels nécessaires :.....	26
1.3.4. Mode opératoire :.....	26
1.3.5. Interprétation des résultats :.....	28
1.4. Récolte et analyse des données :.....	28
1.4.1. Analyse statistique:.....	29
1.4.2. Calculs des taux de séroprévalence et des intervalles de confiance :....	29
1.4.3. Test <i>Kappa</i> :.....	29
2. Résultats :.....	30

Sommaire

2.1.Prévalence individuelle apparente :.....	30
2.2.Taux de troupeau infecté :.....	31
2.3.Les facteurs de risque associés à la présence des Anticorps anti- <i>Brucella</i> spp..	31
2.3.1.Facteur d'avortement :.....	31
2.3.2.Taille de Troupeau :.....	32
2.3.3.Facteur nombre de parité :.....	32
2.3.4.Présence d'espèce caprine :.....	33
2.3.5.Facteur taux d'avortement :.....	34
2.3.6.Facteur année (2016 /2017/ 2018) :.....	34
2.3.7. Facteur d'avortement chez l'espèce caprine :.....	35
2.4.Résultats d'analyse statistique :.....	35
2.5.Comparaison de résultats (coefficient Kappa) :.....	36
3.Discussion :	37
Conclusion:	38
Références bibliographiques	39

Introduction

La brucellose est une maladie infectieuse courante chez l'homme et l'animale qui touche des population humaines du monde entier [1][2][3][4] . elle est causée par la bactérie du genre brucella .[5][6][7][8]

La brucellose est classée parmi les sept principales zoonoses négligées dans le monde[9]. La bactérie affecte un grand nombre de mammifères, y compris les bovins, les petits ruminants, les porcs, les équidés, les rongeurs, les mammifères marins ainsi que les humains [10].

En Algérie, comme dans les pays méditerranéens, la prévalence de la brucellose est toujours élevée, malgré l'instauration du programme de lutte en 1995 (dépistage/abattage) et son renforcement par la vaccination obligatoire des petits ruminants en 2006. Cependant le développement sporadique de cas de brucellose bovine dont les conséquences directes seraient des pertes économiques considérables (abattage sanitaire, avortements, pertes en lait) ainsi que des répercussions systématiques sur la santé des individus en contact étroit avec les animaux infectés (les éleveurs, les vétérinaires, le personnel des abattoirs.....)

Le diagnostic de la brucellose chez l'homme et l'animal repose principalement sur la détection d'anticorps spécifiques du brucella LPS dans des échantillons de lait et de sérum au moyen de tests sérologiques , s'effectue par deux méthodes différent directe comme PCR et indirecte comme sérodiagnostic de Wright et ELIZA[11].

La différenciation des animaux infectés à partir de vaccins (DIVA) n'est pas possible avec les vaccins les plus protecteurs, ce qui limite les efforts de lutte contre la maladie. la vaccination du bétail peut être un moyen rentable de contrôler la maladie et de limiter son impact sur la santé humaine et animale[12].

Cette étude a été réalisée pour la détection des anticorps anti-brucella spp. Chez les petites ruminant dans la région de Tébessa. en utilisation deux techniques (techniques de fixation de complément et technique de Wright), pour comparer les résultats de deux techniques utilisées dans la détection des anticorps anti-brucella.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01 : La Brucellose

1 Historique :

La maladie connue aujourd'hui sous le nom de brucellose attira pour la première fois l'attention de médecine militaires britanniques, sous le nom de fièvre méditerranéenne à malte , durant la guerre de Crimée , dans les années 1850 [13] .

En 1887, le microbiologiste Davide Bruce qui isolé l'agent infectieuse de la brucellose (*Microccus melitensis*) à partir de la rate de soldats décédé [14][15][16][17][13][18][19][20] .

En 1897 la présence d'anticorps agglutinants dans le sérum des maladie fut démontrée par Wright[16]. En 1918, Alice Evans suggéra le lien entre *Bacterium abortus* et *Micrococcus melitensis*, confirmé par Karl Meyer en 1920, et l'organisme fut renommé Brucella en l'honneur de son découvreur [21][15][17].

En 1940, Mignot affirma que l'existence de cette maladie dans le Hoggar n'aurait pu avoir pour mode d'introduction que les caravanes maliennes.

L'existence de la brucellose en Algérie remonte au 19ème siècle , des recherches furent instituées en 1907 sur des élevages caprins par Sergent et collaborateurs à Alger et Oran. Ces études révélèrent l'infection non seulement des caprins mais aussi des autres animaux domestiques. Le taux était élevé dans les élevages comprenant des chèvres maltaises. A publié le gouverneur général de l'Algérie pris un arrêté interdisant l'importation de caprins et bovins provenant de Malte (le berceau de la brucellose). Ceci fût les premières mesures prophylactiques prises contre la brucellose, en Algérie.

2 Définition :

La brucellose une maladie infectieuse due à une bactérie aérobie Gram négatif du genre *Brucella*[22][3], et contagieuse chez l'animal, transmissible à l'homme par voie cutanée chez les éleveurs qui sont au contact permanent avec ces animaux, et par voie digestive lorsqu'on consomme des produits artisanaux à base de laitages frais ou fromages au cru , elle se manifeste par une fièvre ondulante et des atteintes

articulaires [23]. C'est une maladie à déclaration obligatoire connue sous plusieurs noms, notamment «maladie de Corps», «fièvre méditerranéenne», «fièvre ondulante», «fièvre de Malte», «fièvre de Gibraltar» (chez l'Homme).

3 Etiologie :

3.1 Classification :

Les *Brucella spp.* appartenant à la famille des *Brucellaceae*, ordre *Rhizobiales*, classe *Alphaproteobacteria*, phylum *Proteobacteria*[16]. Parmi les sept genres (les autres étant *Crabtreeella*, *Daeguia*, *Mycoplana*, *Ochrobactrum*, *Paenochrobactrum*, *Pseudochrobactrum*). [17]

Ce genre comprend dix espèces qui diffèrent par leurs hôtes de prédilection et leur pathogénie (**Figure 1**) et peuvent être séparées en deux groupes.

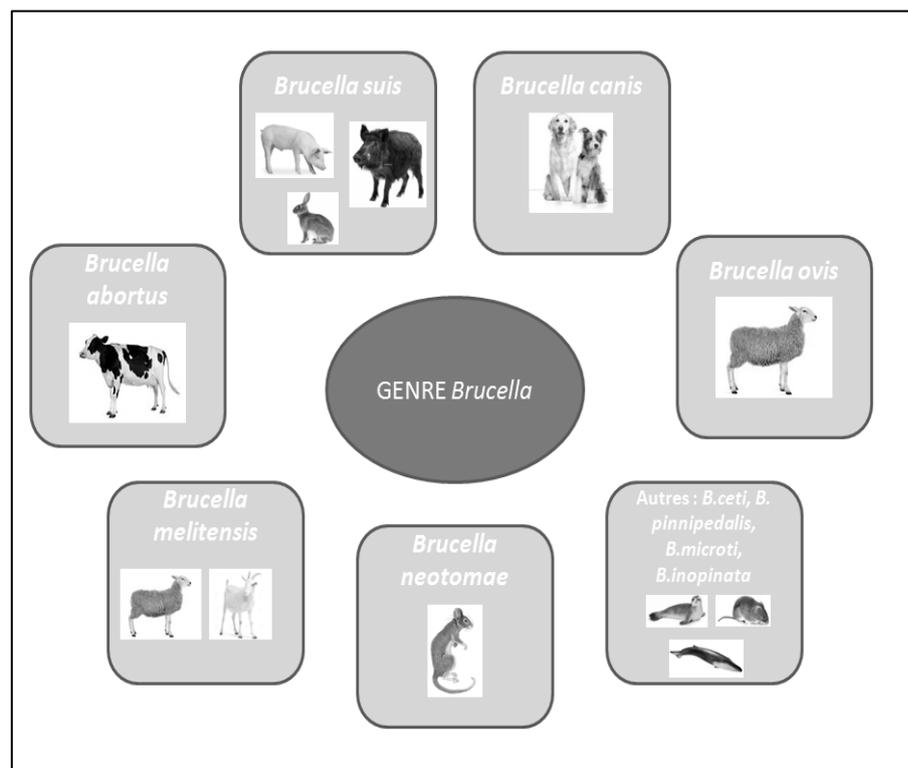


Figure 1: Principales espèces de *Brucella* et hôtes de prédilection.

Le premier groupe rassemble les six espèces qui constituent la taxonomie de référence, chacune ayant son hôte de prédilection : *B. abortus* (bovins), *B. canis* (chien), *B. ovis* (mouton), *B. suis* (porc, sanglier, lièvre), *B. melitensis* (mouton, chèvre) et *B. neotomae* (chez le néotoma du désert)[24]. Outre ces espèces hôtes

préférentielles, cette bactérie est capable d'infecter de nombreuses espèces domestiques et sauvages : elle n'a pas de spécificité d'hôtes forte. Au sein de certaines de ces espèces, différents biovars ont été identifiés : *B. abortus* regroupe ainsi sept biovars (1-6 ;9), *B. suis* en regroupe cinq (1-5), tandis que trois différents biovars ont été mis en évidence pour *B. melitensis* (1-5). Chaque biovar possède sa propre répartition géographique et sa pathogénicité pour l'Homme

Le second groupe est formé des nouvelles espèces récemment identifiées, touchant essentiellement des animaux sauvages. *Brucella ceti* et *B. pinnipedalis* ont été ainsi isolées de cétacés et pinnipèdes respectivement, dans les mers et océans d'Europe et d'Amérique du Nord dans les années 1990[25]. Les deux dernières espèces historiquement identifiées sont *B. microti*, isolée chez le campagnol commun (*Mircrotus arvalis*) [26]et *B. inopinata*, mise en évidence au niveau de l'implant mammaire d'une femme ayant présenté des signes de brucellose[27].

3.2 Caractères bactériologiques :

La *Brucella* est une coccobacille à Gram négatif intracellulaire facultatif [28][29], de 0,5 à 0,7 µm de diamètre et 0,5 à 1,5 µm de longueur [30][31]. Les cellules sont immobiles et ne forment ni flagelle conventionnel, ni capsule, ni spore. Les bactéries du genre *Brucella* sont aérobies strictes, mais certaines souches nécessitent une atmosphère enrichie en CO₂ (5 à 10 %) pour leur croissance [32], donnant des colonies oxydase positive, catalase positive et à activité uréasique rapide. Elles sont d'identification difficile par les méthodes phénotypiques ou en spectrométrie de masse, plus facilement identifiées par les méthodes moléculaires [33][34][35].

3.3 Caractères génétique :

Les AND de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, et *B. canis* contiennent de 56 à 58 moles % de guanine-plus- cytosine.

La capacité d'hybridation entre un AND monocaténaire et un autre AND monocaténaire provenant d'une source hétérologue permet de mesurer la parenté génétique des germes. des études sur l'homologie des AND ont montré que certains membres du genre *Brucella* ne présentent aucune homologie avec d'autres germes dont les AND renferment des pourcentages analogues de guanine-plus-cytosine (*Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis* et *Bordetella*

bronchiseptica). Par contre, chez toutes les membranes du genre *brucella*, les séquences de polynucléotides présentent de nettes similitudes. Pour *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. netomomase*, l'homologie est complète, alors qu'il manque à l'AND de *Br. ovis* certaines séquences de polynucléotides communes aux autres espèces du genre, à la suite, semble-t-il, d'une amputation chromosomique naturelle. Le fait qu'une forte proportion de polynucléotides de *Br. ovis* sont analogues à ceux d'autres espèces de *Brucella* justifie néanmoins son inclusion dans le genre.

L'AND de *B. canis*, autre espèce pathogène stable, non lisse, trouvée dans la nature, présente une homologie complète avec celui de *Br. suis* et, par conséquent, avec celui des autres *Brucella*. Cette espèce est donc à considérer comme appartenant au genre *Brucella*[36].

4 Epidémiologie :

4.1 Epidémiologie Analytique :

4.1.1 Sources de contagion:

Les sources de contagion sont toujours des animaux malades surtout pendant l'agnelage ou le vêlage, qui contamine directement un animal sain ou excrète une grande quantité de *Brucella* dans le milieu extérieur.

Les mâles jouent un rôle important dans la dissémination et la persistance de l'infection car ils sont souvent porteurs. La persistance du germe dans l'environnement joue aussi un rôle important.

4.1.2 Matières virulents :

- 1) **Contenu de l'utérus gravide :** Expulsé dans le milieu extérieur au moment de l'avortement ou à l'occasion d'une mise bas apparemment normale, le contenu de l'utérus gravide représente la matière virulente essentielle. L'excrétion virulente est cependant transitoire. L'excrétion débute dès la préparation de la femelle, lors de la liquéfaction du bouchon muqueux obturant le col utérin ; elle passe par son maximum lors de l'expulsion des eaux foetales, avorton, placenta et lochies ; elle disparaît habituellement chez les bovins au bout de 2 à 3 semaines.

- 2) **Sécrétions vaginales** : elles peuvent aussi contenir des bactéries (période entourant la mise bas, parfois au moment des chaleurs).
- 3) **Urine** : contaminée par les sécrétions utérines, elle est fréquemment virulente en période de mise bas.
- 4) **colostrum** et **lait** : 20 à 60 % des vaches sérologiquement positives, sans symptôme de brucellose, éliminent le germe dans le colostrum et le lait et ce taux s'élève à 70-80% après un avortement. Cette excrétion est néanmoins transitoire (souvent limitée à quelques jours après la mise-bas) et discrète dans l'espèce bovine (surtout importante après un avortement).
- 5) **Sperme** : même en l'absence de symptômes, la localisation des *Brucella* dans les organes génitaux du mâle permet leur excrétion dans le sperme.
- 6) **Autres** : les *Brucella* sont présentes dans les **produits de suppuration** (hygromas), parfois les **féces** (cas des jeunes nourris avec du lait infecté). Les **viscères infectés** (utérus, mamelle, tissus lymphatiques... ne jouent de rôle éventuel que dans la contamination humaine).
- 7) **Modes de transmission:**

 **La transmission horizontale:**

Ce mode de transmission fait intervenir deux principales voies de contamination :

- la voie directe, par laquelle les individus sains entrent en contact direct avec des individus excréteurs et se contaminent via des aérosols, par ingestion de matière contaminée ou par voie vénérienne. Les mâles peuvent ainsi jouer le rôle de vecteurs mécaniques ou même transmettre la bactérie via le sperme en cas d'orchite ou d'épididymite.

- la voie indirecte, faisant intervenir l'environnement. La bactérie est alors transmise : par l'intermédiaire des locaux, pâturages, véhicules de transport, aliments, eaux, matériel divers (vêreuse, lacs,...) contaminés par des matières virulentes. Un autre élément à prendre en compte est le rôle des canidés, qui pourraient jouer le rôle de vecteurs mécaniques et biologiques pour *B. melitensis*, mais ce phénomène n'a pas été fréquemment étudié. Il a été cependant montré que la présence de chiens dans des exploitations touchées par la brucellose en Jordanie constituait un facteur de risque [37].

 **La transmission verticale:**

A l'image des mécanismes de transmission de *B. abortus* chez les bovins, *B. melitensis* a la capacité de contaminer le nouveau-né à partir de sa mère. Seule une faible proportion des jeunes sont contaminés *in utero* ou lors du passage de la filière pelvienne, la majorité entrant en contact avec la bactérie lors de l'ingestion de colostrum puis de lait contaminés. Ils peuvent alors être victimes d'une multiplication bactérienne au niveau des noeuds lymphatiques drainant le tube digestif et excréter la bactérie dans leurs fèces, ce qui complète encore le tableau des différentes voies d'excrétion. Les jeunes ovins et caprins domestiques semblent néanmoins se débarrasser de l'infection par un phénomène d'auto-guérison, à l'image de ce qui est suspecté chez les bovins[38]. Ils restent cependant susceptibles de développer une nouvelle infection une fois la maturité sexuelle atteinte, aucune immunité efficace n'ayant pu se mettre en place.

- 8) Sensibilité et réceptivité:** La gestation est un facteur important de sensibilité, et lors de la contamination hors gestation, on observe une infection transitoire et guérissant spontanément dans plus de 50 % des cas. De plus, l'âge est un facteur de sensibilité[39].

4.2 Epidémiologie synthétique :

La contamination des cheptels indemnes se fait surtout par la transhumance, ainsi que par les échanges commerciaux et le prêt des mâles. Elle est aussi possible par des pâtures ou des bergeries contaminées. L'extension de l'infection dans les troupeaux a lieu au cours de la période des mises bas.

De plus, la conservation des jeunes femelles nées de mères infectées sont à l'origine de résurgences dans les cheptels assainis. Parfois, il y a intervention d'autres espèces comme les chiens[40].

Chez les petits ruminants domestiques, la brucellose à *B. melitensis* est une maladie observée chez l'adulte qui touche aussi bien les mâles que les femelles. Les jeunes n'ayant pas atteint la maturité sexuelle peuvent être contaminés mais ne présentent pas de signes cliniques, bien que généralement une faible réponse sérologique transitoire soit détectable lorsque la contamination a lieu après la mise en place de leur propre système immunitaire[38]. La réceptivité de l'hôte augmente grandement après la maturité sexuelle et surtout lors de gestation.

La plupart des races de chèvres domestiques sont sensibles à l'infection brucellique à *B. melitensis* alors qu'il existe une grande variabilité de sensibilité à la bactérie entre les différentes races ovines, celles destinées à la production laitière étant plus enclines à développer les signes de la maladie. Le facteur comportemental joue un rôle important puisque les brebis ont tendance à se regrouper lors de la mise-bas et la nuit, ce qui constitue un facteur de risque, contrairement aux chèvres qui ne présentent pas ce type de comportement.

La conduite de l'élevage est également un facteur de risque : en cas de densité animale élevée, de mélanges d'animaux d'origines différentes etc. La transhumance et la pratique de l'estive semblent ainsi augmenter le risque pour les troupeaux d'être touché par *B. melitensis*.

5 Pathologie de *B. melitensis* chez les petits ruminants domestiques:

5.1 Pathogénie et réponse immunitaire:

B. melitensis est une bactérie intracellulaire facultative du système réticulo-endothélial, elle se multiplie préférentiellement au sein des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules trophoblastiques du placenta [41]. Sa virulence dépend grandement de la souche et de la dose d'inoculation. La pathogénie varie également selon l'espèce hôte et l'individu (le statut reproducteur est prépondérant). En conséquence, tous les degrés d'atteinte intermédiaires sont observés sur le terrain, de l'absence de signe clinique à l'infection aigüe et sévère.

5.2 Les différentes phases de l'infection brucellique :

La voie d'entrée la plus fréquente chez les petits ruminants est représentée par la muqueuse de l'oropharynx et des voies respiratoires supérieures. La voie vénérienne offre également une possibilité de contamination à considérer.

On distingue alors trois phases dans l'évolution clinique de l'infection brucellique : une période d'incubation, avant les premiers signes cliniques, une phase d'infection aigüe, pendant laquelle la bactérie se multiplie et des symptômes cliniques, hématologiques et des lésions tissulaires sont observables, et enfin une phase d'infection chronique, caractérisée par des signes cliniques intermittents consécutivement à la mise en place d'une réaction d'hypersensibilité de type IV. La succession et la durée de ces différentes phases dépend de l'hôte[42] .

Parallèlement à cette évolution clinique, la physiopathologie de l'infection brucellique consiste en la succession de deux périodes :

La période primaire, qui suit la contamination et qui comprend elle-même trois étapes :

- ✓ La 1^{ère} étape consiste en la multiplication des *Brucella* dans les noeuds lymphatiques de la porte d'entrée[43] . Cette étape dépend principalement de l'immunité cellulaire développée par l'hôte et dirigée contre les bactéries nouvellement introduites. En effet, les *Brucella* sont rapidement phagocytées par les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. Dans ces deux derniers types cellulaires, elles résistent aux mécanismes de digestion et à la fusion avec les lysosomes pour finalement se réfugier au sein des réticulums endoplasmiques et s'y multiplier[44].
- ✓ La 2^{ème} étape correspond, après quelques jours à plusieurs semaines, à la dissémination, par voie lymphatique et/ou sanguine, via le système réticulo-endothélial[43]. Chez les petits ruminants, la bactériémie est détectable dix à vingt jours après contamination et peut persister de trente jours à plus de deux mois. Elle n'est pas aussi longue que chez l'homme, ce qui exclut l'hémoculture pour le diagnostic dans ces espèces.
- ✓ La 3^{ème} est marquée par la multiplication des bactéries en certains sites électifs : les tissus lymphoïdes (notamment les noeuds lymphatiques de la sphère génitale et mammaire, parfois la rate), l'utérus et le placenta chez les femelles gravides, les testicules et ses annexes chez le mâle, la glande mammaire et les bourses séreuses et synoviales et certaines articulations. Ces localisations peuvent alors s'accompagner de manifestations cliniques caractérisant la brucellose aiguë : avortement (généralement au tiers de la gestation), orchite, épидидymite, arthrite, mammite subclinique, etc. Elles expliquent également les sources d'excrétion et de dissémination de la bactérie : sécrétions génitales, annexes foetales, sperme, lait, etc. Cependant, chez un certain nombre d'individus, l'infection est limitée par le système immunitaire et ceux-ci deviennent alors des porteurs asymptomatiques potentiellement excréteurs via leurs sécrétions[45] .

La période secondaire: est associée à un état de résistance de l'hôte plus ou moins marqué, lié au développement d'une immunité de type cellulaire. Les *Brucella* peuvent alors être éliminées ou persister. En effet, ces bactéries ont la capacité

d'échapper au système immunitaire, de se maintenir plusieurs années dans certains sites privilégiés comme les noeuds lymphatiques, puis de se réactiver. C'est le cas lors de chaque gestation : les bactéries peuvent alors, via l'infection placentaire (placentite exsudative et nécrotique qui interrompt les échanges entre la mère et son foetus), provoquer un avortement (généralement une unique fois) et/ou induire une excrétion bacillaire à l'occasion des mises-bas[46]. Leur persistance dans les bourses séreuses et articulations peut être à l'origine d'hygromas ou d'arthrites chroniques.

5.3 Réponse immunitaire :

L'infection par la bactérie *Brucella* provoque la mise en jeu de l'immunité cellulaire et humorale, mais l'ampleur et la durée de cette réponse dépendent de nombreux éléments : la virulence de la souche, la dose inoculatrice, l'espèce hôte, le sexe, le statut reproducteur et immunitaire de l'individu, etc [47][48]. Les bactéries du genre *Brucella* ont longtemps constitué un modèle pour l'étude de l'immunité mise en place contre les agents bactériens intracellulaires. Il a été ainsi rapidement démontré que la résistance de l'hôte à ce genre d'agents pathogènes repose essentiellement sur l'immunité cellulaire[49].

5.3.1 Immunité innée :

Elle repose sur l'action des macrophages et des cellules dendritiques, qui phagocytent les bactéries et les éliminent. Les Toll Like Receptors (TLRs) de ces cellules reconnaissent différents éléments bactériens (LPS, lipoprotéines, acides nucléiques) puis, en entraînant la production de cytokines proinflammatoires, amorcent la réponse immunitaire spécifique. Les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle clé dans l'immunité innée, en représentant la population cellulaire recrutée en premier sur le site de l'inflammation. Par phagocytose puis fusion du phagosome avec leurs granules antimicrobiens, les PNN éliminent de nombreuses bactéries, celles-ci ne pouvant pas s'y multiplier à l'inverse des macrophages et cellules dendritiques. Certains lymphocytes, dont le type NK (Naturel Killer), initient également la réponse immunitaire spécifique en produisant de manière précoce de l'interféron gamma (IFN γ) [50].

5.3.2 Immunité spécifique acquise :

Cette réponse immunitaire se décline en deux volets complémentaires : cellulaire et humorale. Elle se déploie après l'activation de l'immunité innée dans le

but de développer et maintenir une défense de l'hôte durable et spécifiquement dirigée contre *Brucella*. Il a été démontré que cette réponse est principalement de type cellulaire Th1, c'est-à-dire qu'elle repose sur la sécrétion d'IFN γ par des lymphocytes T (surtout des CD4+) reconnaissant spécifiquement les antigènes de *Brucella*. Cette cytokine est essentielle dans la réponse immunitaire, en activant les mécanismes bactéricides des macrophages, en promouvant l'expression de molécules de co-stimulation au sein des cellules présentatrices d'antigènes, en stimulant les lymphocytes cytotoxiques et en potentialisant l'apoptose des macrophages infectés [50].

Les lymphocytes B sont quant à eux les principaux acteurs de la partie humorale de l'immunité spécifique en produisant des anticorps spécifiquement dirigés contre les antigènes brucelliques. Les anticorps n'ont pas seulement un effet neutralisant : ils facilitent la phagocytose grâce à leur effet opsonisant, ils activent le complément et aident à la cytotoxicité anticorps-dépendante. Leurs actions sont surtout remarquables sur les *Brucella* extra cellulaires, n'agissant que très peu sur les bactéries une fois intégrées aux cellules de l'hôte. C'est pourquoi le rôle de la partie humorale de l'immunité spécifique contre les *Brucella* est limité et peu protectrice [51]. Attendue dans les deux à quatre semaines qui suivent l'exposition, son intensité est ainsi très variable, parfois inexistante. La réponse sérologique est très forte en cas de placentite accompagnée ou non d'avortement, modérée en cas d'atteinte de la mamelle, faible à absente si seuls des noeuds lymphatiques sont concernés par la multiplication bactérienne .

5.4 Les stratégies d'échappement à la réponse immunitaire :

Les bactéries du genre *Brucella* ont développé différentes stratégies dans le but d'échapper à la réponse immunitaire immédiate innée et à la réponse plus tardive mais spécifique. Un des phénomènes décrits correspond à l'envahissement par *Brucella* des macrophages et des cellules dendritiques dans le but de survivre et de se multiplier au sein de l'hôte sur le long terme. Ainsi, les bactéries interfèrent avec les mécanismes de présentation d'antigènes et de lyse bactérienne de ces cellules en altérant la reconnaissance des motifs bactériens via les TLR [51]. Cette stratégie ouvre alors une « fenêtre » de répllication pour la bactérie, avant l'activation de la réponse cellulaire de type Th1 [50] .

La réponse sérologique dépend donc des caractéristiques individuelles de l'individu (sexe, stade de gestation, exposition précédente à l'agent pathogène), de l'évolution clinique de la maladie, de la souche impliquée et de la dose inoculatrice, ainsi que du statut de l'individu (porteur latent ou excréteur). Ces variations soulèvent la question de la confiance à accorder aux résultats donnés par les tests sérologiques. Ainsi, les réponses sérologiques les plus fortes sont observées en cas d'infection active et ce pendant plus de 30 semaines chez des brebis gestantes mais aucune étude n'a évalué la fiabilité des tests sérologiques sur de plus longues durées [52]. Nous ne pouvons donc pas écarter que des individus porteurs de la bactérie puissent entretenir des niveaux d'anticorps circulants inférieurs aux seuils de détection des tests sérologiques classiquement utilisés. C'est ce qui a d'ailleurs été décrit chez des agneaux contaminés dès la naissance : un phénomène d'immunotolérance a été suspecté en isolant *B. melitensis* chez de jeunes individus séronégatifs [38].

6 Manifestations cliniques de la brucellose animale :

L'incubation est très variable et les symptômes sont inconstants et identiques pour *Brucella abortus* ou *B. melitensis*. La maladie est généralement asymptomatique ; les symptômes les plus courants concernent l'appareil génital. La symptomatologie est particulièrement fruste et les formes chroniques ou asymptomatiques sont plus fréquentes chez les bovins.

En effet, le premier signe chez la femelle gravide est l'avortement, sans dystocie.

Chez la vache, l'avortement est possible à n'importe quel stade de la gestation mais, intervient le plus souvent vers 6-7 mois quand la génisse a été infectée à la saillie ou au tout début de la gestation. La vache n'avorte en général qu'une fois (dans 80% des cas), mais elle reste infectée et peut excréter des bactéries. La rétention placentaire et endométrite sont fréquentes après l'avortement. Le pourcentage d'avortement dans un troupeau n'ayant jamais été au contact de la bactérie est de 50 à 70% [53].

Chez les petits ruminants, il semblerait que la brucellose, même en l'absence d'avortements, soit un facteur de stérilité chez la chèvre et la brebis.

Chez les ovins, l'avortement ne survient qu'une seule fois et ils ont tendance à se débarrasser spontanément des *Brucella* plus facilement en produisant souvent l'auto-stérilisation dans un délai de 6 mois à 1 an en période de repos sexuel. Néanmoins, la persistance de l'infection sur un certain nombre d'animaux assure la pérennité de la maladie dans le troupeau.

Chez les caprins, les signes cliniques sont pauvres voire absents. Elle contraste avec la distribution extensive de *B. melitensis* dans l'organisme. Contrairement à la brebis, la chèvre demeure généralement infectée une grande partie de sa vie. La réponse sérologique après infection apparaît en outre plus durable. Les porteurs chroniques de *Brucella* apparaissent nombreux et sont une source importante de contamination [54].

Chez le mâle, des orchites ou orchio-épididymites (uni- ou bilatérales) sont observées, entraînant une stérilité fréquente.

Les symptômes extra-génitaux sont rares chez les bovins, associés à une évolution chronique. Ce sont alors des hygromas, uni- ou bilatéraux, et généralement localisés au carpe ou des arthrites. Ces symptômes sont plus fréquents en régions tropicales.

L'épididymite contagieuse du bélier due à *B. ovis*, se caractérise par l'évolution chez le bélier d'une inflammation chronique de l'épididyme aboutissant à une baisse importante de fertilité. Chez la brebis, l'infection est souvent inapparente en raison du faible taux de multiplication des bactéries ce qui facilite leur auto-stérilisation.

Néanmoins, l'avortement et les atteintes articulaires sont observés chez les camélins comme chez les autres espèces. Certains auteurs révèlent que l'avortement se produit généralement à la première moitié de la gestation et que les chamelons infectés ont une sérologie positive jusqu'à l'âge de 5 mois [55].

Concernant les lésions, ils n'existent pas des lésions brucelliques spécifiques. Toutefois, on observe des altérations histopathologiques peu spécifiques, variables et inconstantes.

Au niveau de l'appareil génital, chez les femelles un exsudat utérin gris sale, de consistance visqueuse et d'aspect floconneux, a été observé. De plus, Les enveloppes chorioniques enflammées d'aspect œdémateux et diffus, les cotylédons

avec nécrose des villosités et les eaux fœtales troubles ont été cités. Quant aux mâles, les testicules enflammés avec zone de nécrose et les atteintes des vésicules séminales sont fréquentes.

Chez les avortons, on constate des gastroentérites catarrhales ; une hypertrophie de la rate et des nœuds lymphatiques ; de la pneumonie.

7 Techniques de diagnostic :

7.1 Diagnostic épidémiologique :

Il est difficile à réaliser car les symptômes de la brucellose sont tardifs et peu spécifiques. En effet, après une longue période asymptomatique, la maladie est sub-clinique chez la plupart des animaux. Cependant, le recueil des commémoratifs du troupeau peut faciliter une suspicion. Le diagnostic de laboratoire est donc toujours nécessaire, par isolement de la bactérie ou la mise en évidence d'anticorps dans le sérum [56].

Une suspicion de brucellose bovine peut être émise lors de : avortement isolé ou en série, mort d'un veau en anoxie dans les 48h après la mise bas, fréquence anormale des rétentions placentaires, hygromas, et orchite/épididymite chez le mâle [57]. Pour les petits ruminants, un troupeau est suspecté de brucellose lors d'avortements en phase terminale de gestation, de mortalité post natale, ou d'atteinte des organes génitaux mâles[56].

7.2 Diagnostic de laboratoire :

Le recours à des méthodes de laboratoire est essentiel afin de confirmer la suspicion par l'isolement de l'agent pathogène, la mise en évidence ses antigènes ou la détection de réponse immunitaire de l'hôte [58].

7.2.1 Diagnostic bactériologique :

Les échantillons les plus fiables pour sa réalisation sont : des cotylédons du placenta, les excréments vaginales, ou du poumon, foie et contenu abomasal du fœtus. Ce genre de diagnostic est réalisé par un examen microscopique avec colorations, ou par culture en milieux sélectifs (**Figure 2**), permettant une identification des *Brucella*[56].

La coloration et l'examen microscopique sont les deux premières étapes de l'examen bactériologique, l'isolement de *Brucella* sur un milieu sélectif (pour inhiber la croissance d'autres organismes) est nécessaire pour confirmer la présence de bactérie dans les échantillons biologiques. Après 3-4 jours d'incubation ; *Brucella* donne des colonies bombées, transparentes de couleur miel, lisses, luisantes, avec un contour régulier et 1-2 millimètre de diamètre; trois tests biochimiques sont utilisés pour l'identification des colonies de *Brucella* recherche de l'oxydase, catalase et de l'urease [59].

L'inconvénient de cette méthode revient du fait qu'elle est peu spécifique à cause de la possibilité de confusion des *Brucella* avec *Chlamydia* et *Coxiella*, fastidieux et dangereux de part la manipulation. En plus, elle présente une faible sensibilité pour le lait et produits laitiers où les *Brucella* sont en faible quantité et l'interprétation est souvent rendue difficile par la présence des globules gras [60].



Figure 2: Culture de *Brucella*

7.2.2 Les techniques d'amplification génique :

Le diagnostic direct de brucellose par amplification génique est réalisé dans certains laboratoires de référence. La technique la plus couramment utilisée est la PCR[61][62]. Plus récemment, l'utilisation de la technique de PCR en temps réel dans le diagnostic de la brucellose a été rapportée[63],[64]. La PCR est une technique sensible et spécifique, particulièrement utile dans le cas où l'administration d'une antibiothérapie empirique empêche l'isolement des *Brucella*. La détection de l'ADN de *Brucella* peut être réalisée à partir du sang ou du sérum, en phase aiguë

bactériémique, permettant un diagnostic plus précoce (en 24 heures) que l'hémoculture [65][66][67]. La détection de l'ADN de *Brucella* dans diverses suppurations ou biopsies tissulaires, au cours des formes focalisées de brucellose, semble particulièrement intéressante du fait d'une sensibilité bien supérieure à celle de la culture [62].

La présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase dans les échantillons cliniques peut conduire à de faux négatifs, alors que les contaminations en laboratoire ou plus rarement des réactions d'amplification croisée peuvent induire des faux positifs. Les gènes cibles utilisés dans le cadre du diagnostic direct sont principalement le gène *bcp31* codant pour une protéine de membrane externe de 31 kDa [65][68][62], et la séquence d'insertion IS711 [63][29], dont plusieurs copies sont présentes dans le génome des *Brucella*. La plupart des tests PCR utilisés sont spécifiques de genre, et ne permettent pas de déterminer l'espèce en cause.

7.2.3 Diagnostic sérologique :

Les tests sérologiques font intervenir des suspensions antigéniques de cellules entières inactivées de *B. abortus* et le sérum suspect. Les anticorps détectés sont alors pour la plupart, spécifiques d'épitopes portés par les lipopolysaccharides (LPS) et certaines protéines membranaires. Il existe plusieurs tests sérologiques dont les plus connus sont les suivants :

7.2.3.1 Le sérodiagnostic de Wright (SW) :

La technique d'agglutination en tube ou séroagglutination de Wright (SAW) est la première technique sérologique décrite, et demeure la référence préconisée par l'OMS du fait de sa standardisation. En effet, il existe un sérum étalon international titré à 1000 UI, distribué par le Laboratoire vétérinaire central en Angleterre (Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, England). De faux négatifs sont observés par phénomène de zone en excès d'anticorps, ou du fait de la présence d'anticorps bloquants. L'évaluation de différentes dilutions du sérum test permet de détecter un phénomène de zone. L'absence d'agglutination après mélange d'un sérum positif contrôle au sérum test permet de révéler la présence d'anticorps bloquants.

7.2.3.2 Réaction à l'antigène au Rose Bengale, ou antigène tamponné :

C'est une réaction d'agglutination rapide sur lame, sensible et spécifique. Elle est réalisée au moyen d'une suspension bactérienne colorée au Rose Bengale en

milieu acide tamponné. Elle permet le dépistage de pratiquement tous les cas de brucellose. Bien qu'elle ne mette en évidence que les IgG, elle ne se positive guère plus tardivement que le sérodiagnostic de Wright. Elle est donc très utile dans la phase aiguë. De plus, elle reste positive très longtemps et demeure ainsi souvent utilisable dans la phase chronique. Ce n'est pas une réaction quantitative et, en cas de positivité, les sérums doivent être titrés par SAW. Cette réaction, de par sa simplicité, sa rapidité, sa sensibilité et sa spécificité, est devenue la technique de base du sérodiagnostic de brucellose, utilisée aussi bien pour le diagnostic et la surveillance de la brucellose-maladie que pour le dépistage et les enquêtes épidémiologiques [69].

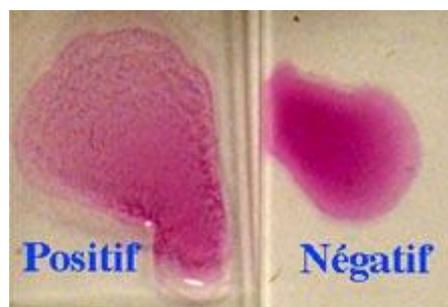


Figure 3: Test Rose Bengale

7.2.3.3 Epreuve de l'anneau sur le lait : « Ring Test » :

Utilisé pour mettre en évidence des anticorps brucelliques dans le lait (**Figure 4**). C'est un test très efficace, facile à réaliser, économique (utilisé sur lait de mélange), et très utile chez les bovins. Il peut être réalisé à grande fréquence pour le dépistage des troupeaux laitiers infectés. Le Ring test est une réaction d'agglutination qualitative obtenue par interaction des anticorps présents dans le lait dirigés contre le LPS bactérien avec un antigène coloré par l'hématoxyline ; ce qui conduit à l'apparition d'un anneau.



Figure 4: Réaction de l'anneau dans le lait

7.2.3.4 Réaction d'immunofluorescence indirecte :

Elle permet la détection et le titrage des IgG et des IgM. C'est une réaction très sensible et plus spécifique que les techniques d'agglutination. Les anticorps ainsi mis en évidence apparaissent à peine quelques jours plus tard que les agglutinines, mais persistent plus longtemps, au-delà de 18 mois. Ces anticorps sont le plus souvent présents dans les brucelloses chroniques.

7.2.3.5 ELISA (Enzym Linked ImmunoSorbent Assay):

Ce test est équivalent au test de fixation du complément, en termes de sensibilité et de spécificité. Il peut être réalisé sur des sérums ou sur des laits dans les cheptels laitiers.

Cette technique permet de détecter des anticorps à partir de divers antigènes de brucelles entières ou fractionnées plus ou moins purifiées (**Figure 05**).

Parmi celle-ci, le LPS-S ou un extrait soluble brut détectent des anticorps de même spécificité que l'agglutination.

L'intérêt des tests ELISA réside dans leur grande sensibilité, supérieur à celle de l'immunofluorescence. Ils Mettent en évidence de très faibles quantités d'anticorps, et ils sont bien adaptés à la réalisation des enquêtes épidémiologiques [70].

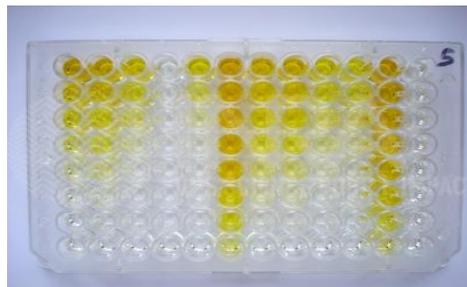


Figure 5: Technique immuno-enzymatique (ELISA)

7.2.3.6 Réaction de fixation de complément :

Cette technique est très utilisée comme test de confirmation mais elle est compliquée à réaliser, demande un équipement de laboratoire sophistiqué et une équipe bien formée. La fixation du complément peut être réalisée à chaud (37°C pendant 30 minutes) ou à froid (4°C pendant 14-18 heures), avec des caractéristiques légèrement différentes, à adapter à la qualité des sérums testés [71].

Si des anticorps spécifiques de *Brucella abortus* sont présents, il y a absence d'hémolyse, tandis qu'en l'absence de ces anticorps, une hémolyse se produit. Il est indispensable de mettre en place différents témoins pour pouvoir interpréter les réactions : un témoin sérum, un témoin antigène, un témoin complément et un témoin globules rouges.

L'interprétation des résultats est standardisée : il existe un système d'unité pour la lecture, basé sur le sérum standard de l'Office International des Epizooties, qui contient 1000 ICFTU (International Complement Fixation Test Units) par millilitre. Chaque laboratoire pratiquant ce test doit donc être agréé pour que ses résultats soient interprétables suivant les normes internationales. Ainsi, les sérums donnant un titre équivalent à 20 ICFTU/mL ou plus sont considérés comme positifs [71].

Ce test est très spécifique, mais certains faux positifs peuvent apparaître à cause du vaccin S19. Les femelles vaccinées avec le vaccin S19 entre 3 et 6 mois sont considérées comme positives si le sérum donne une fixation positive à un titre de 30 ou plus ICFTU/mL lorsque les animaux sont testés à l'âge de 18 mois ou plus [72].

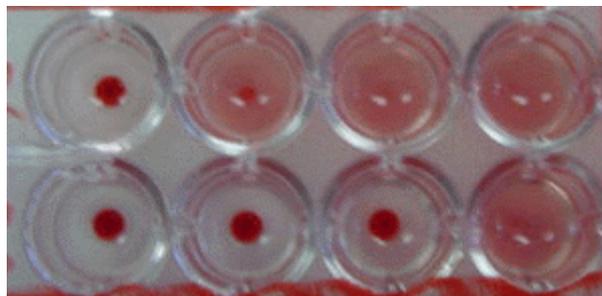


Figure 6: Le Test de Fixation du complément

7.2.4 Diagnostic allergique :

Le dépistage allergique consiste en la mise en évidence de l'immunité cellulaire. C'est une intradermo-réaction à la brucelline. La réaction est considérée positive lorsque l'épaississement du pli cutané, constaté 72h après l'injection, est supérieur à deux millimètres. Cette réaction est spécifique mais peu sensible (beaucoup de faux négatifs) [73].

C'est une réaction d'hypersensibilité retardée suite à l'injection dans le derme de *Brucella*. Elle est peu utilisée en routine, avec une bonne spécificité mais une

sensibilité moyenne. C'est donc un bon test complémentaire des approches sérologiques mais il ne permet pas non plus de différencier un infecté d'un vacciné. Il n'est jamais mis en œuvre en pratique [56].

Chez les petits ruminants, on pratique une injection par voie sous-cutanée à la paupière inférieure. Une réaction locale nettement positive se produit au bout de 48h chez les infectés : œdème de la paupière et de la région zygomatique. C'est un moyen de dépistage des troupeaux infectés (et non des animaux infectés), car il y a beaucoup de faux négatifs [56].

Tableau 1: Caractéristiques des différentes techniques de diagnostic sérologique

Test	Sensibilité	Spécificité	Immunoglobulines détectées	Distinction vaccinés/ maladies	Coût	Faisabilité
EAT	+++ selon situation épidémiologique	+++	IgM IgG1 IgG2	NON	Faible	Facile : peut se faire sur le terrain
Ring Test	+++ selon la taille du troupeau	++	IgG	OUI généralement	Faible	Assez facile, mais nécessite une étuve
Séroagglutination de Wright	++	+	IgG2	NON	Faible	Facile
FC	+++	++++	IgG1 IgG2	NON	Elevé	Compliqué et Nécessite matériel de pointe
BPA	+++	+++	IgG	NON	Faible	Plus compliqué que EAT pour résultats équivalents
ELISA Indirecte	++++	+++	IgG1 IgG2	NON	Elevé	Difficile
ELISA de Compétition	+++	++++	IgG1 IgG2	OUI	Elevé	Difficile
FPA	+++	++++		OUI	Moyen	Facile, faisable sur le terrain, mais nécessite matériels spécifiques

8 Prophylaxie :

8.1 Prophylaxie sanitaire :

La prophylaxie sanitaire a pour but d'éviter l'apparition et la propagation d'une maladie en n'ayant recours qu'à des moyens hygiéniques : désinfection, quarantaine, périmètre de sécurité, dépistage des individus malades, porteurs ou sains. Les mesures s'adaptent ainsi en fonction de la situation épidémiologique et du but recherché [58].

✚ Défensive :

Les mesures défensives sont indispensables pour les pays déjà infectés qui envisagent une lutte contre la brucellose et également pour les pays indemnes[75]. Les mesures défensives sont : contrôle aux frontières des animaux pour n'admettre que l'introduction de bovins certifiés indemnes, mise en quarantaine et contrôle individuel par sérologie, renforcer l'hygiène de la reproduction et surveiller les animaux à haut risque surtout lors de l'insémination artificielle ou le monte publique[76]. En plus, il est nécessaire de maintenir le cheptel à l'abri des contaminations de voisinage, d'isoler les femelles lors de parturition et détruire les placentas, désinfecter les locaux et contrôler régulièrement les cheptels[56].

✚ Offensive ou mesures d'assainissement:

Les mesures offensives sont un ensemble de mesures visant à l'assainissement des exploitations infectées. Les mesures d'assainissement sont : le dépistage, isolement puis l'abattage sanitaire des animaux infectés ; la désinfection périodique des locaux et des objets infectés ; l'élimination des jeunes femelles nées de mère infectée ; le contrôle de toutes les espèces réceptives et élimination des infectés ; l'utilisation de l'insémination artificielle à fin de limiter la transmission vénérienne[56][75].

8.2 Prophylaxie médicale (La vaccination) :

Elle est basée sur la vaccination, qui est interdite chez l'espèce bovine sauf en cas de dérogation, et pratiquée chez les ovins et les caprins seulement dans les milieux très infectés pour éviter les pertes économiques.

PARTIE

EXPÉRIMENTALE

Objectifs de travail:

L'objectif de cette étude transversale, était (i) la détection des anticorps anti-*Brucella* spp. par l'utilisation de Séroagglutination de Wright (SAW) chez l'espèce ovine dans la région de Tébessa et à identifier une éventuelle association entre la séropositivité avec certains facteurs de risque putatifs ; et (ii) d'autre part de comparer ces résultats avec les résultats obtenus lors de l'analyse de mêmes échantillons par le test immuno-enzymatique(ELISA) dans une étude précédente (données non publiées).

1. Matériels et Méthode :

1.1. Présentation générale de la région d'étude :

La wilaya de Tébessa se situe au Nord-Est de l'Algérie ; s'étend sur une superficie de 13.878 km², c'est une zone qui regroupe un vaste étendu steppique de notre pays en position de transit entre le Nord et le Sud, son altitude varie entre -1 et 1713m. Elle est limitée au Nord par la Wilaya de Souk-Ahras, au Sud par la Wilaya d'El Oued, à l'Ouest par les Wilayet d'Oum Elbouaghi et Khenchela et à l'Est par la république tunisienne sur une distance de 300 km de frontière. Sur le plan administratif, la wilaya compte 28 communes regroupées en 12 Daïras (**Figure7**).

Cette région étant une zone de transition météorologique est considérée comme une zone agro-pastorale avec une présence d'un nombre important de phénomènes (gelée, grêle crue, vent violent). Elle se caractérise par un hiver froid avec faible pluviométrie, et un été chaud et humide (la température dépasse 40°C en juillet).

La superficie totale de la wilaya se divise en quatre zones homogènes du côté des données climatiques.

- ✚ La zone Subhumide (400 à 500 mm/an) très peu étendu, il couvre que quelques ilots limités aux sommets de quelque reliefs (une superficie de 135000 ha, soit 10% de la superficie totale).
- ✚ La zone Semi-aride (300 à 400 mm/an) représenté par les sous étages frais et froid, il couvre toute la partie Nord de la wilaya avec une superficie de 229450 ha.
- ✚ La zone Sub-Aride (200 à 300 mm/an) couvre les plateaux steppiques d'Oum-Ali, Safsaf-El-Ouesra, Thlidjene et Bir El-Ater, occupe environ 50% de la superficie totale de la wilaya.

Et, la zone Aride ou saharien doux (-200 mm/an), commence et s'étend au-delà de L'Atlas saharien et couvre les plateaux de Negrine et Ferkane, soit une superficie de 202457 ha.

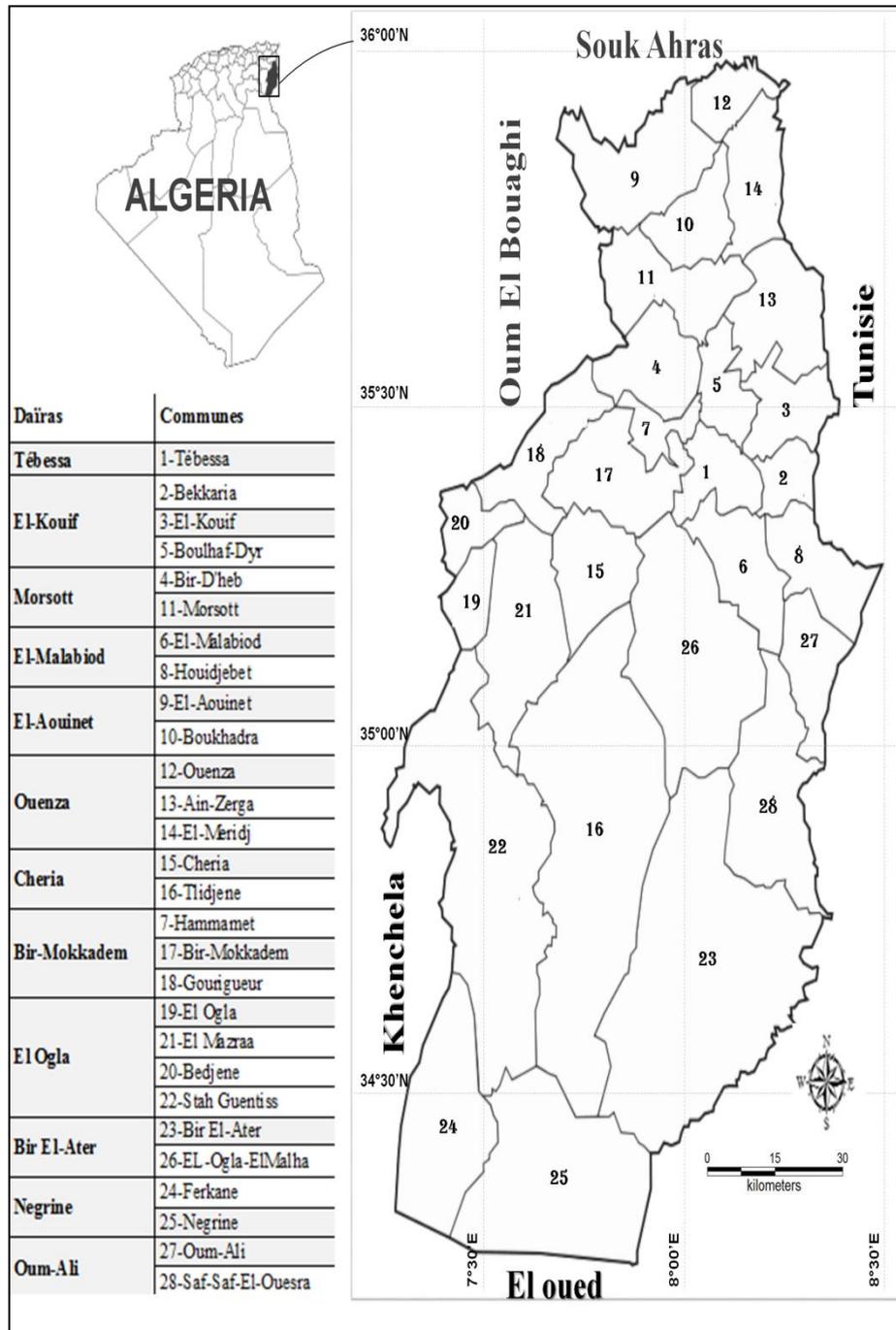


Figure 7 : Localisation géographique et organisation administrative de la wilaya de Tébessa

1.2. Échantillonnage et prélèvements sanguins :

1.2.1. Période d'étude :

Les prélèvements ont été effectués pendant les saisons de pic d'agnelage entre une période s'étale entre le mois de Septembre 2016 à Novembre 2018. Alors que, l'analyse des échantillons par la technique de Wright s'est effectuée pendant la période entre 9 et 11 juin 2020.

1.2.2. Animaux :

Cette étude inclut 96 prélèvements provenant de 23 élevages privés d'espèce ovine, issus de 18 communes de la wilaya de Tébessa. Un échantillonnage aléatoire simple a été adopté au niveau de chaque troupeau pour sélectionner entre 1 à 18 animales.

1.2.3. Prélèvements sanguins :

Des échantillons de sang de 5 ml ont été prélevés à la veine jugulaire de l'animal ; en utilisant des tubes secs de type Vacutainer à l'aide d'une aiguille jetable et un porte-aiguille, ou bien à l'aide des seringues de 5cc pour d'autres échantillons.

Les sérums ont été extraits par centrifugation (3000 rpm for 10 min), ou bien après coagulation et décantation des prélèvements (**Figure 8**). Le sérum, obtenu a été aliquoté dans des tubes Eppendorf puis a été congelé à -20°C avant d'être analysé. Aucun prélèvement de sang total n'a été réfrigéré ou congelé pour éviter l'hémolyse.

A chaque prise de sang, le tube était ensuite numéroté, et le numéro reporté sur une fiche de prélèvement où étaient indiqués la description de l'animal (date de prélèvement, présence ou absence d'avortement pendant la dernière gestation, présence ou absence des chèvres dans le même élevage, nombre de parité, taille de troupeau et taux des avortements), ces informations sont enregistrées après avoir fait un questionnaire avec les éleveurs de cheptels.

1.3. Test sérologique :

Tous les sérums obtenus ont été testés via un test de séroagglutination de Wright (SAW) (Diagnostic sérologique direct de la Brucellose) ; la lecture a été faite au niveau du laboratoire d'hygiène EPSP –Chéria, pendant le mois de juin 2020.



Figure 8 : Coagulation de sang et décantation de sérum.

Ces échantillons sont aussi analysés auparavant via l'utilisation d'un kit ELISA (ID.vetInnovative Diagnostics, ID Screen, BRUCELLOSE Indirect®, France), au niveau de laboratoire de CRBt-Constantine. Ce kit de diagnostic est destiné à la mise en évidence d'anticorps spécifiques de la brucellose présents dans les sérums de ruminants.

1.3.1. Description et principe :

Le sérodiagnostic de Wright est une réaction d'agglutination utilisant comme antigène une suspension de *Brucella* tuées par le formol et la chaleur. Si un titre supérieur ou égal à 1/80 (120 U.I/ml) indique une brucellose active, un titre plus faible (1/40, et même 1/20) a valeur de forte présomption.

- ✚ La séroagglutination lente en tube ou sérodiagnostic de Wright est la plus ancienne technique étalonnée au plan international (réponse en Unités Internationales possible).
- ✚ la réaction a été effectuée sur six tubes, fin de prévenir un phénomène de zone éventuel (dilutions 1/10 au 1/320) .

la lecture des agglutinations est effectuée en comparant l'opacité du l'opacité du surnageant des six tubes de réaction (que l'on prend soin de ne pas secouer) à l'opacité du surnageant du tube témoin correspond, en opacité, à ++ .

1.3.2. Réactif :

- Présentation : 1 ampoule de 5 ml

- Nature du réactif : Antigène brucellique pour sérodiagnostic de Wright (suspension de *Brucellatuées* par la chaleur et le formol à 4%).
- Conservation : à + 2-8 °C.
- Validité : jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret en l'absence de contamination (y compris après ouverture).



Figure 9 : Réactif de wright

1.3.3. Matériels nécessaires :



Agitateur



Incubateur



micropipettes



Tubes à hémolyse



Eau physiologique.

1.3.4. Mode opératoire :

A. Dilution des sérums :

Les dilutions du sérum à tester sont effectuées directement avec la suspension bactérienne.

- ✚ Disposer sur un portoir une série de 9 tubes à hémolyse (de 5 ml de préférence) rigoureusement propres.
- ✚ Introduire dans le 1^{er} tube: 1,9 ml de suspension antigénique + 0,1 ml de sérum à étudier. Homogénéiser.
- ✚ Introduire 1 ml de suspension antigénique dans chacun des tubes numérotés de 2 à 8 et 250 µl dans le tube n° 9.
- ✚ Prélever dans le 1er tube 1 ml du mélange (qui représente la dilution au 1/20 du sérum étudié) et l'introduire dans le tube n° 2. Homogénéiser.
- ✚ Prélever 1 ml dans ce 2^{ème} tube et le transférer dans le tube n° 3. Homogénéiser.
- ✚ Procéder de la même façon jusqu'au tube n° 8, la quantité de 1 ml prélevée dans ce dernier tube étant jetée.
- ✚ Ajouter 750 µl d'eau physiologique dans le tube n° 9 qui sert de témoin de titration.

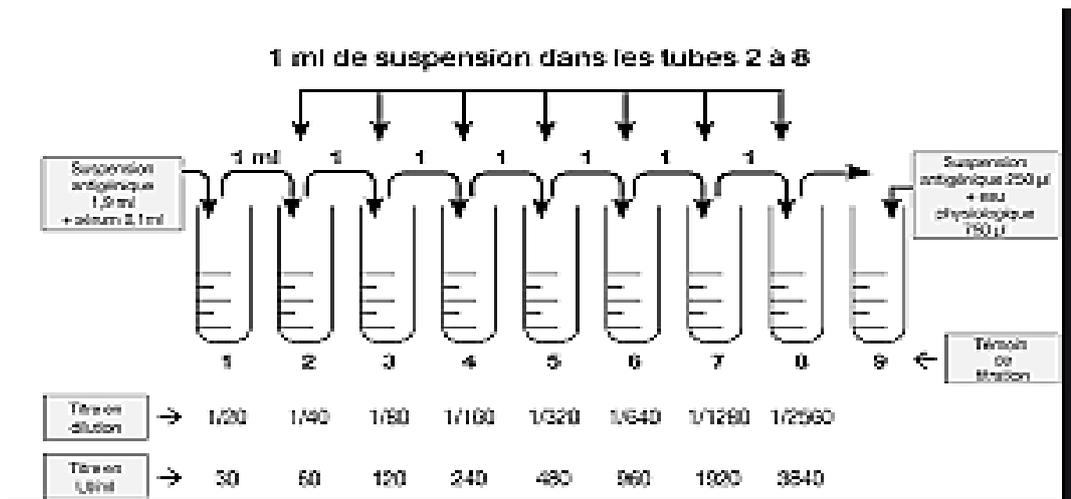


Figure 10 : Dilution des sérums

B. Incubation :

Placer les tubes à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures après les avoir bouchés (bouchon, parafilm).

En cas de nécessité, cette incubation peut être remplacée par une centrifugation de 5 minutes à 250 g.

C. Lecture :

Examiner les tubes, sans les secouer, sur fond noir, avec une source lumineuse située au-dessous et derrière les tubes.

- Constaté, en premier lieu, l'absence d'agglutination dans le tube témoin de titration.
- Plusieurs types d'agglutinats peuvent être observés :
 - agglutinats en crêpe dans le fond du tube avec liquide clair (+++).
 - agglutinats très visibles avec liquide légèrement trouble (++).
 - agglutinats visibles seulement à l'agglutinoscope (+).
 - L'absence d'agglutinats traduit une réaction négative (-).

En cas de réaction positive, le titre du sérum testé correspond à la plus haute dilution donnant un trouble analogue à celui du témoin de titration.

1.3.5. Interprétation des résultats :

- ❖ Un titre supérieur ou égal à 1/80 (120 U.I/ml) indique une brucellose active ; ce taux est habituellement dépassé.
- ❖ Un titre plus faible (1/40, et même 1/20) doit éveiller la suspicion et justifie un sérodiagnostic quelques jours plus tard.

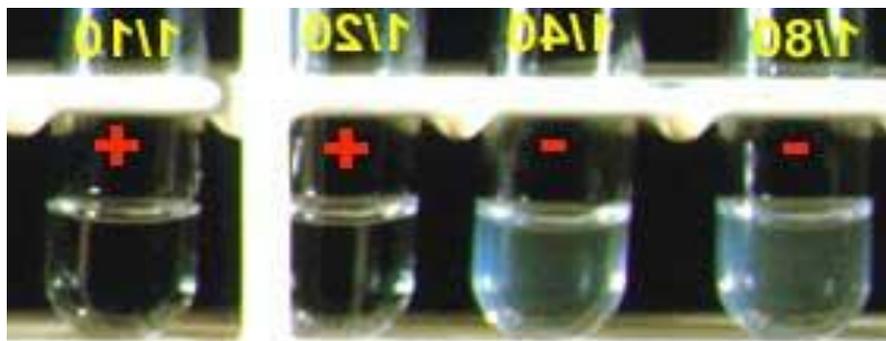


Figure 11 : Sérum positif et sérum négatif

1.4. Récolte et analyse des données:

Après avoir analysé les échantillons, nous avons procédé au (i) calcul des taux de séroprévalence instantanée individuelles de présence des anticorps anti-*Brucella* spp. et le taux de troupeaux séropositifs ; (ii) et de calculer le coefficient Kappa pour évaluer l'accordance entre nos résultats et celle de test ELISA.

1.4.1. Calculs des taux de séroprévalence et des intervalles de confiance:

Les calculs des taux de séroprévalence individuelle sont effectués en utilisant la formule suivante (Thrustfield, M., 2007. Veterinary Epidemiology. 3rd ed, Blackwell Publishing, Oxford.):

$$\textit{Prévalence apparente} = \frac{\textit{Nombre d'animaux positifs}}{\textit{Nombre d'animaux testés}}.$$

Le taux de troupeaux infectés est le rapport entre le nombre des troupeaux présentés au moins un seul cas séropositif sur le nombre des troupeaux étudiés. Les taux de séroprévalence calculés n'est que l'expression de la séroprévalence sous forme de pourcentage.

Les intervalles de confiance à 95% des pourcentages ont été établis à partir de la formule suivante :

$$IC = pA \pm 1.96 \sqrt{\frac{pA \times qA}{n}} ; \text{D'où :}$$

- pA : la prévalence apparente.
- $qA = (1 - pA)$
- n : la taille de l'échantillon

1.4.2. Analyse statistique

Après la collection et l'organisation des données, nous avons utilisés le test de khi-deux (ou bien test de Fisher, si $n < 5$) pour évaluer l'association statistique entre la séropositivité (variable dépendante) avec six facteurs de risque putatifs de nature qualitatives (Avortement antécédent, Nombre de parité, Présence d'espèce caprine, Avortement chez l'espèce caprine, Taille de troupeau et Année). Laseule variable explicative de nature quantitative (Taux d'avortement) a soumis à l'analyse par la régression logistique univariable. Les variables explicatives présentent une valeur de $p \leq 0.05$, ont été considérées associées significativement avec la variable dépendante. Les données ont été organisées dans des tableaux croisés et présentées graphiquement par l'utilisation du logiciel Microsoft Excel 2013, l'analyse statistique s'effectuée à l'aide du logiciel SPSS Statistics version 22 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

1.4.3. Test Kappa :

Pour donner l'agrément à un test, comme il n'y a souvent pas de gold standard dans les tests diagnostics, il est possible de prouver l'agrément entre deux tests, l'un étant la référence.

Le Test Kappa nous permet ici de mesurer l'agrément entre les tests sérodiagnostic de Wright et l'ELISA (gold standard) au-delà de ce qui peut être attendu par la chance. Nous avons donc calculé le coefficient de Kappa, qui chiffre l'intensité de l'accord réel entre des jugements qualitatifs appariés. Ce coefficient a un rang de 0 à 1, avec un agrément considéré comme modéré pour des valeurs autour de 0,4–0,5 et bon pour des valeurs supérieures à 0,5. Il se calcule avec la formule suivante (Bergeri, Michel, & Boutin, 2002):

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} ; \text{D'où :}$$

- P_o : la proportion d'accord observée entre les deux tests.
- P_e : la proportion d'accord aléatoire, ou concordance attendue sous l'hypothèse d'indépendance des jugements.

L'interprétation de coefficient Kappa (Landis & Koch, 1977):

$\kappa < 0$: Pas d'accord

κ entre 0.00 et 0.20 : léger accord

κ entre 0.21 et 0.40 : accord équitable

κ entre 0.41 et 0.60 : accord modéré

κ entre 0.61 et 0.80 : accord substantiel

κ entre 0.81 et 1.00 : accord presque parfait.

2. Résultats :

2.1. Prévalence individuelle apparente :

L'analyse des 96 sérums par la technique de Wright a révélé 09 sérums positifs à la présence des anticorps anti-*Brucella* spp., soit un taux de séroprévalence individuelle de 9,38% (IC 95% 3.55% - 15.19%) (Figure 12).

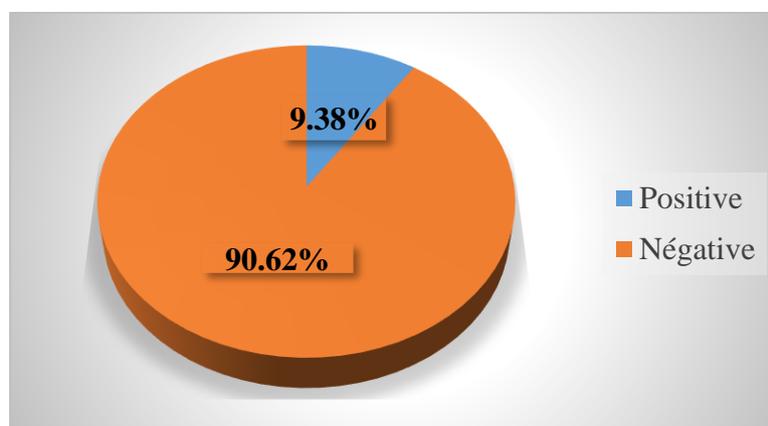


Figure 12 : Taux de séropositivité individuelle

2.2. Taux de troupeau infecté :

Les analyses sérologiques effectuées au niveau de 23 troupeaux, nous a permis de détecter 5 troupeaux, soit un taux de séropositivité de 21,74% (IC95%:13.5% - 29.98%)(Figure13).

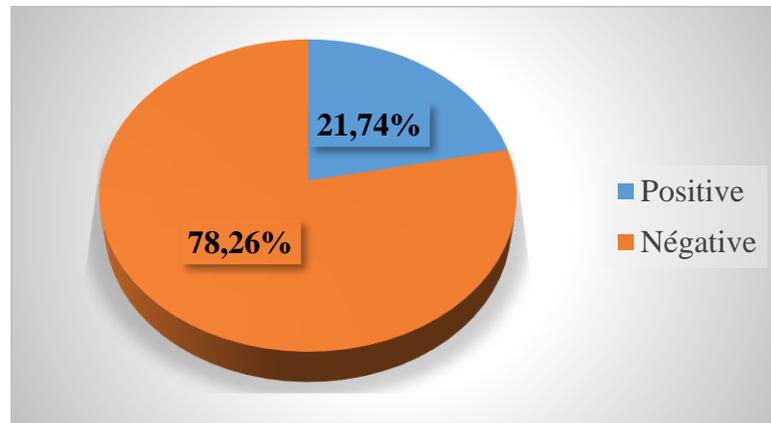


Figure 13: Taux de troupeau infecté

2.3. Les facteurs de risque associés à la présence des Anticorps anti-*Brucella* spp.

2.3.1. Facteur d'avortement:

Parmi les 96 femelles échantillonnées dans la région d'étude, 48 femelles ont été déclarés avoir subi un avortement à la dernière gestation ; dont 5 se sont révélées positives soit un taux de séropositivité de 10,42%. Pour les 48 femelles sans antécédents d'avortement à la dernière gestation, 4 se sont révélées positives soit un taux de séropositivité de 8,33% (Figure 14).

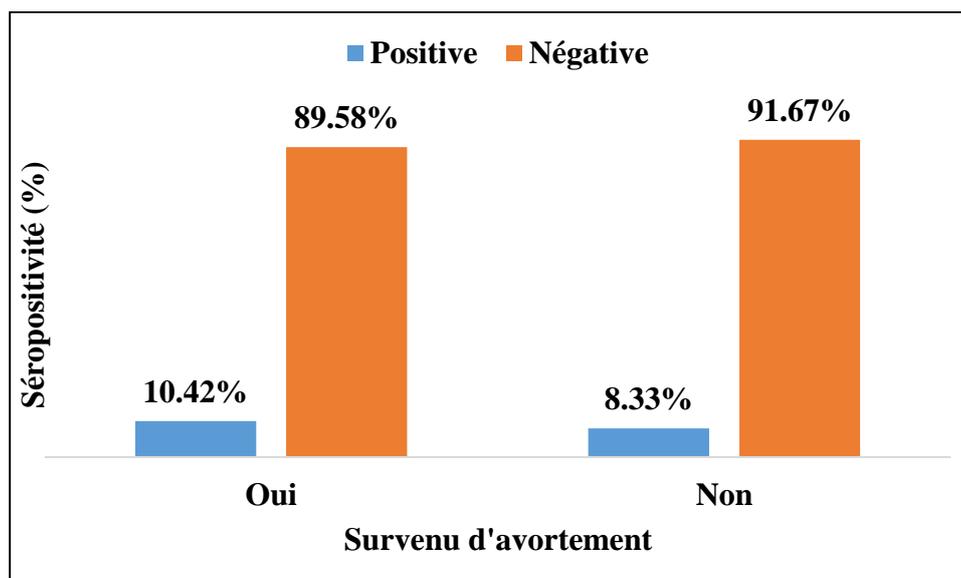


Figure 14: Distribution de séropositivité en fonction de survenue d'avortement en dernière gestation

2.3.2. Taille de Troupeau:

Les troupeaux étudiés, sont repartis en quatre classes en fonction de ses tailles (Taille <30 têtes/troupeau, 30-100 têtes/troupeau, 100-200 têtes/troupeau et >200 têtes/troupeau). Les résultats de séropositivité mesurés à l'échelle individuelle sont avérés comme suite (**Figure 15**) :

- Parmi deux têtes provenant du cheptel de taille moins de 30 têtes/troupeau, aucun échantillon positif, soit un taux de séropositivité de 0%.
- 39 animales ont été échantillonnées dans des troupeaux de taille 30-100 têtes/troupeau ; sept prélèvements se sont révélés positive soit un taux de séropositivité de 17,95 %.
- Dans les troupeaux de taille comprise entre 100-200 têtes/troupeau ; nous avons échantillonnés 32 animales, aucun échantillon positif, soit un taux de séropositivité de 0%.
- Et, pour la dernière classe (≥ 200 têtes/troupeau) ; 25 animales ont été échantillonnées, dont deux se sont révélés positive soit un taux de séropositivité de 8%.

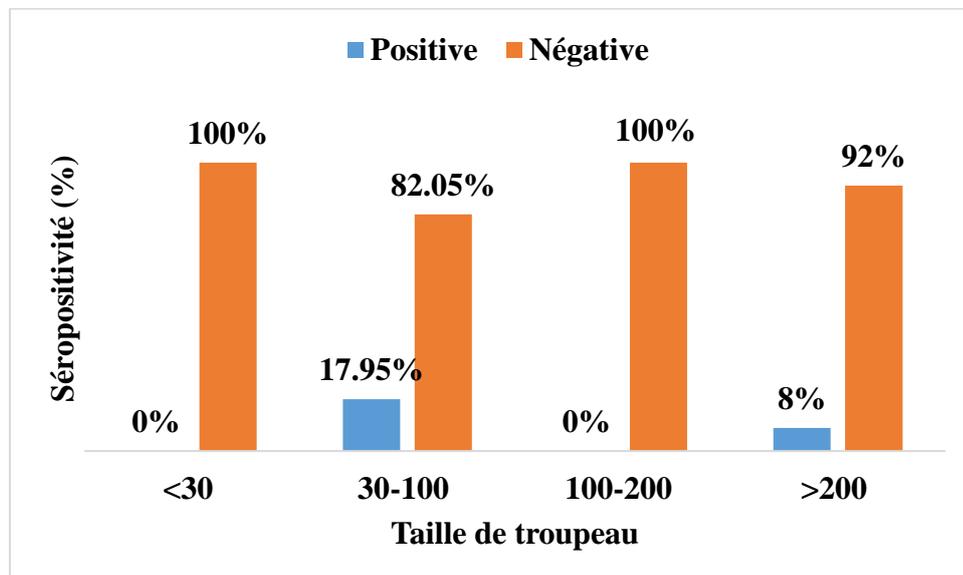


Figure 15: Distribution de séropositivité en fonction de taille de troupeau

2.3.3. Facteur nombre de parité :

Les animaux échantillonnés sont classés en trois classes en fonction de nombre de parité (multipare, primipare et nullipare), les résultats sont avérés comme suite :

- Parmi 75 animaux multipares ; six animales se sont révélées positives, soit un taux de séropositivité de 8%.

- 14 animaux primipares, entre eux trois se sont révélées positive, soit un taux de séropositivité 21,43 %.
- pour les sept animaux de nullipare ; il n'y avait pas des cas positif (**Figure 16**).

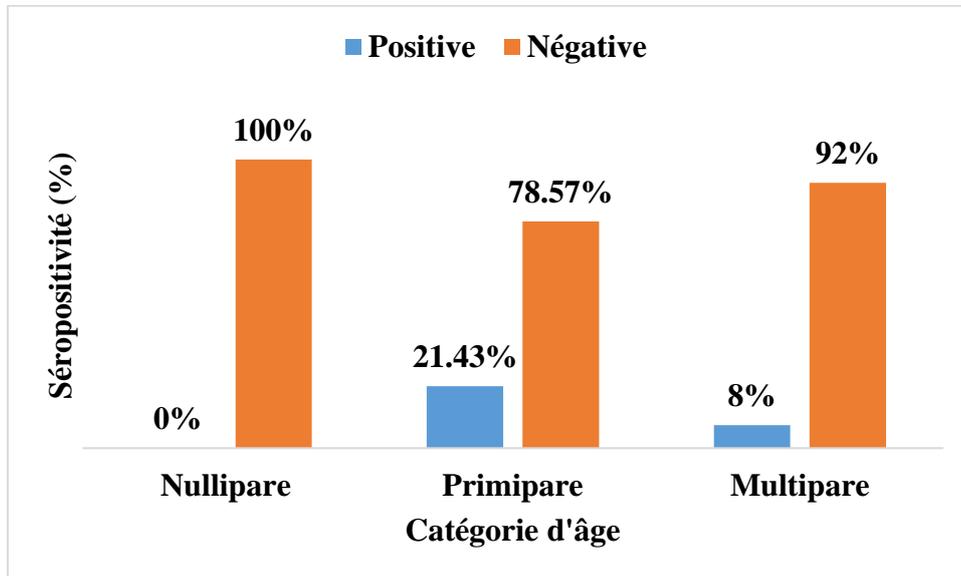


Figure 16: Distribution de séropositivité en fonction de nombre de parité

2.3.4. Présence d'espèce caprine :

Parmi 96 brebis échantillonnées dans la région d'étude, 67 têtes sont en élevage commun avec l'espèce caprine et 29 têtes n'ont pas en contact avec les chèvres, les taux de séropositivités sont 5,97% (4/67) et 17,24% (5/29) respectivement (**Figure 17**).

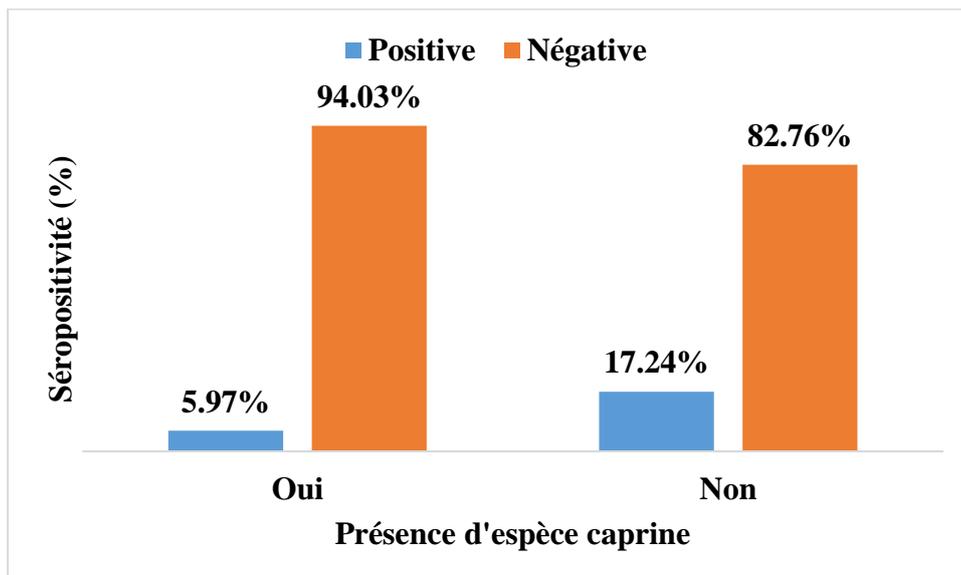


Figure 17: Distribution de séropositivité en fonction de la présence d'espèce caprine.

2.3.5. Facteur taux d'avortement :

Le taux d'avortement est le rapport entre le nombre de brebis ayant été avortée sur le nombre total des brebis présentent dans le troupeau, il est varié entre 0% et 48% avec un taux moyen de 12,17% (**Figure18**).

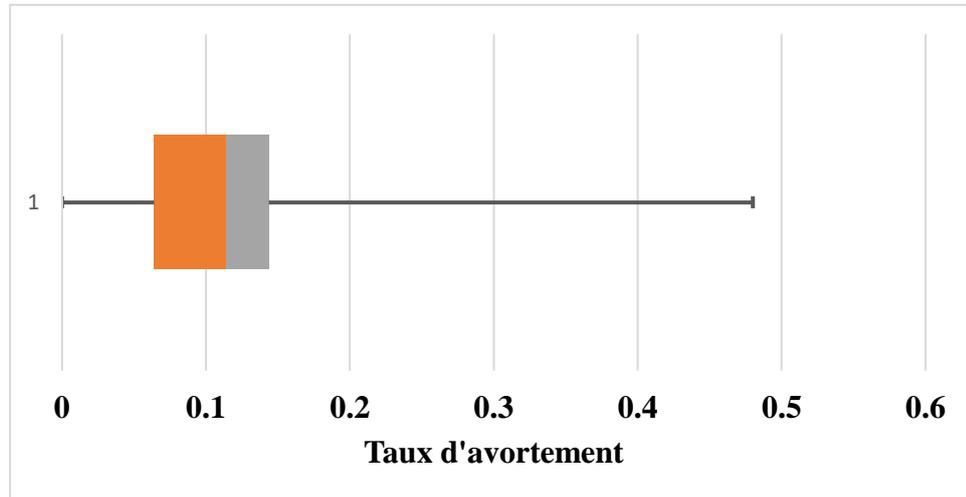


Figure 18: Variation de taux d'avortement dans les troupeaux échantillonnés

2.3.6. Facteur année (2016 /2017/ 2018):

Parmi les 96 animales échantillonnée dans la région d'étude tout au long de la période d'étude, les résultats se sont avérés comme suit (**Figure 19**) :

- En 2016, 50 animales ont été échantillonnés, sept se sont révélés positive soit un taux de séropositivité de 14%.
- En 2017 et 2018, Parmi les 23 animales échantillonnés, un seul cas a était séropositive 4,35 %.

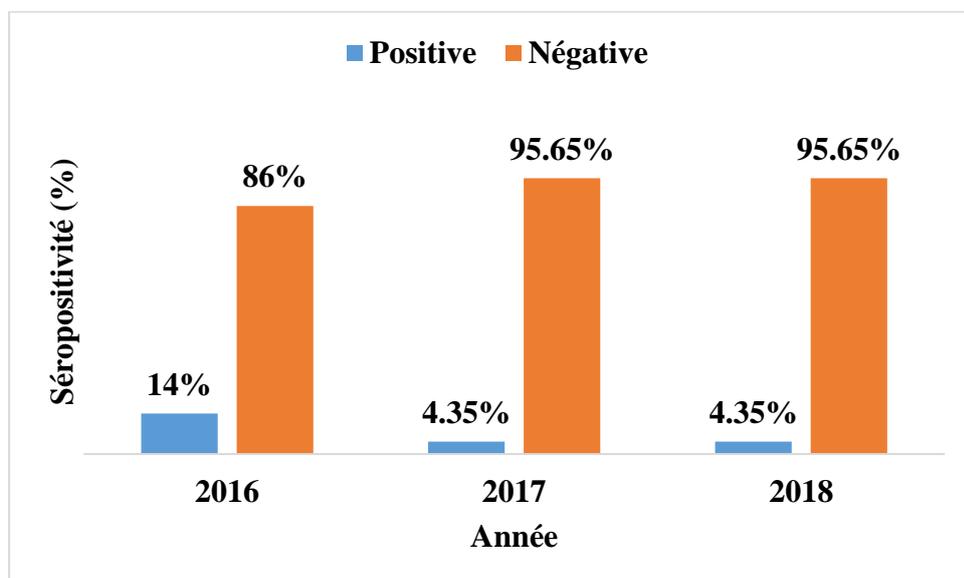


Figure 19: Distribution de séropositivité en fonction d'année

2.3.7. Facteur d'avortement chez l'espèce caprine :

Parmi les 96 brebis échantillonnées dans la région d'étude, 58 brebis sont en contact avec des chèvres ayant avoir un problème d'avortement, dont quatre sont révélées séropositives soit un taux de séropositivité de 6,90%. En revanche 38brebis n'ont pas en contact avec les chères ayant un problème d'avortement, cinq sujets positifs ont été trouvés, soit un taux de sérum positif de 13,16% (**Figure 20**).

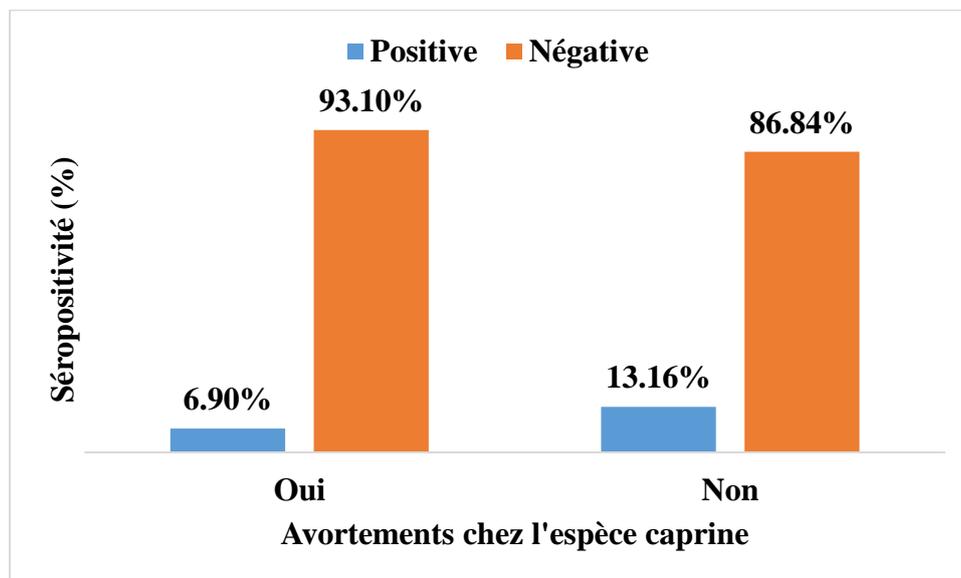


Figure 20: La séropositivité en fonction de l'existence d'avortement chez l'espèce caprine

2.4. Résultats d'analyse statistique :

L'analyse statistique (test de Fischer exact) a montré que seulement le facteur taille de troupeau est associé significativement avec la variable dépendante ($p=0.039$) (**Tableau 2**).

Tableau 2: Analyse statistique des facteurs de risque (Test Fischer exact).

Variable	Catégorie	Testé	Cas positif (%)	Valeur <i>P</i>
Avortement	Oui	48	5 (10.42)	1
	Non	48	4 (8.33)	
Nombre de parité	Nullipare	7	0 (0)	0.24
	Primipare	14	3 (21.43)	
	Multipare	75	6 (8)	
Présence d'espèce caprine	Oui	67	4 (5.97)	0.091
	Non	29	5 (17.24)	
Avorte chez les autres espèces	Oui	58	4 (6.90)	0.248
	Non	38	5 (13.16)	

Taille de troupeau	<30	2	0 (0)	0.039
	30-100	37	7 (18.91)	
	100-200	32	0 (0)	
	>200	25	2 (8)	
Année	2016	50	7 (14)	0.413
	2017	23	1 (4.35)	
	2018	23	1 (4.35)	
Taux d'avortement	Variable quantitative continue, régression logistique univariée P= 0,911 OR=0,998 IC95%=] 0,996, 1,026[

2.5.Comparaison de résultats (coefficient Kappa) :

L'analyse sérologique étant réalisée par le test de Wright et comparées avec celles obtenue par le test ELISA. L'accordance observée entre les deux tests a été trouvée dans cinq cas positif et 66 cas négatifs ; les résultats de 25 sérums ont été différents entre les deux tests (**Tableau 3**). La mesure d'accord entre les deux tests par le coefficient Kappa ($k = 0.170$) calculé à l'aide de logiciel SPSS 18 ; a montré que le test de Wright moins performant que le test ELISA considéré comme gold Standard.

Tableau 3: Tableau contingence pour les résultats de deux tests.

		Test ELISA		
		Positif	Négatif	Total
Test Wright	Positif	5	4	9
	Négatif	21	66	87
	Total	26	70	96

3. Discussion :

Dans cette étude, l'utilisation de technique de seroagglutination de Wright pour détecter les anticorps anti-*Brucella* spp. chez l'espèce ovine dans la région de Tébessa, a montré un taux de 9.38%. Ce résultat est supérieur à celui trouvé dans une étude précédente effectuée sur 376 prélèvements (dont les 96 prélèvements de cette étude) d'où le taux de séropositivité est de 8.24% par l'utilisation de technique d'ELISA (BENLAKEHAL donnée non publiée). Il est également supérieur aux résultats des études menées par Gabli 2015[79] dans les wilayet de Sétif et Batna, Aggad 2003[80] dans la région de Tiaret et par Nehari et al, 2014 dans la région d'el bayadh d'où les taux de séoprévalence sont 0.98%, 2.6% et 3% respectivement.

Les variations de taux de prévalence observée peuvent résider dans le fait que, (i) les techniques et l'hygiène d'élevage qui se différent d'un élevage à autre (ii) la technique de diagnostic utilisée d'où la sensibilité et la spécificité peuvent parfois varier d'un test à autre et (iii) le type d'étude d'où la taille d'échantillons et la procédure d'échantillonnage peuvent être à l'origine de résultats différents.

Conclusion

Conclusion

- * La brucellose persistera tant que le réservoir animal ne sera pas contrôlé.
- * Nécessité d'une collaboration des services de santé et des services vétérinaires.
- * Les services vétérinaires doivent être informés de tout nouveau cas humain et entreprendre une enquête dans le troupeau incriminé.
- * De même que tout foyer animal nouvellement dépisté devrait entraîner systématiquement une enquête sérologique dans la population à risque.

Références bibliographiques:

- [1] **Alavi,S. M. et Motlagh,M. E.** « A review of epidemiology, diagnosis and management of brucellosis for general physicians working in the Iranian health network », *Jundishapur J. Microbiol.*, vol. 5, n° 2, p. 384-387, 2012, doi: 10.5812/jjm.3248.
- [2] **Veterinärmedizin,F.** *Aus dem Institut für Tier und Umwelthygiene In Kooperation mit Friedrich-Loeffler-Institut - Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen ; Jena Molecular Epidemiology of Brucellosis in Egypt , Diagnostic Procedures , Proteomics and Pathogenesis Stud.* 2015.
- [3] **Blasco,J. M. et Molina-Flores,B.** « Control and Eradication of *Brucella melitensis* Infection in Sheep and Goats », *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.*, vol. 27, n° 1, p. 95-104, 2011, doi: 10.1016/j.cvfa.2010.10.003.
- [4] **Abdalla1,M. A. et al.**, « EC VETERINARY SCIENCE Research Article Effects of Probiotic (Sero-Prevalence of Brucellosis in Sheep in El-Gadarif State Mohammed », vol. 2, p. 59-65, 2019.
- [5] **Awah-Ndukum,J. et al.**, « Seroprevalence and risk factors of brucellosis among slaughtered indigenous cattle, abattoir personnel and pregnant women in Ngaoundéré, Cameroon », *BMC Infect. Dis.*, vol. 18, n° 1, p. 1-13, 2018, doi: 10.1186/s12879-018-3522-x.
- [6] **Boukary,A. R. et al.**, « Seroprevalence and potential risk factors for *Brucella* Spp. infection in traditional cattle, sheep and goats reared in urban, periurban and rural areas of Niger », *PLoS One*, vol. 8, n° 12, p. 1-12, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0083175.
- [7] **McDermott,J. J. et Arimi,S. M.** « Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact », *Vet. Microbiol.*, vol. 90, n° 1-4, p. 111-134, 2002.
- [8] **Ducrottoy,M. J. Conde-Álvarez,R. Blasco, J. M.et Moriyón,I.**« A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis », *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 171, p. 81-102, 2016, doi: 10.1016/j.vetimm.2016.02.002.
- [9] **Gorvel,J.-P.** « “If you bring an alarm, we will destroy it,” said *Brucella* to the host cell », *Virulence*, vol. 5, n° 4, p. 460-462, 2014.
- [10] **Cutler, S. J. Whatmore,A. M. et Commander,N. J.**« Brucellosis–new aspects of an old disease », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 98, n° 6, p. 1270-1281, 2005.
- [11] **Olsen,S. C.** « Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination », *Rev Sci Tech*, vol. 32, n° 1, p. 207-217, 2013.
- [12] **Bundle,D. R. et McGiven,J.** « Brucellosis: Improved Diagnostics and Vaccine Insights from Synthetic Glycans », *Acc. Chem. Res.*, vol. 50, n° 12, p. 2958-2967, 2017, doi: 10.1021/acs.accounts.7b00445.

Référence

- [13] **Yilma,M. Mamo,G. et Mammo,B.** « Review on Brucellosis Sero-prevalence and Ecology in Livestock and Human Population of Ethiopia », *Achiev. Life Sci.*, vol. 10, n° 1, p. 80-86, 2016, doi: 10.1016/j.als.2016.05.008.
- [14] « SENTINEL LABORATORY GUIDELINES FOR SUSPECTED AGENTS OF BIOTERRORISM *Brucella* species ASM American Society for Microbiology », *Change*, n° October, 2004.
- [15] **Currier,Russell W.** « Brucellosis History Summary », *Am. Vet. Med. Hist. Soc.*, p. 1-2, 1925.
- [16] **Seleem,M. N. Boyle,S. M.et Sriranganathan,N.** « Brucellosis: A re-emerging zoonosis », *Vet. Microbiol.*, vol. 140, n° 3-4, p. 392-398, 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.06.021.
- [17] Liu,D.*Brucella*, vol. 3. Elsevier Ltd, 2014.
- [18] **Haddad,F. S.** « Historical Preview », in *Neurobrucellosis*, Springer, 2016, p. 3-6.
- [19] **Boon,T. H. et Williams,E.** « Diagnosis of Brucellosis », *Lancet*, vol. 296, n° 7662, p. 51, 1970, doi: 10.1016/S0140-6736(70)92522-5.
- [20] **Pérez-Sancho,M. García-Seco,T. Domínguez,L. et Álvarez,J.** « Control of animal brucellosis, The most effective tool to prevent human brucellosis », *Updat. Brucell.*, vol. 10, p. 61222, 2015.
- [21] **Sriranganathan,N. et al.**, « Chapter 1 1 », p. 3-6, 2009.
- [22] **Ducrotoy,M. et al.**, « Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control », *Acta Trop.*, vol. 165, p. 179-193, 2017, doi: 10.1016/j.actatropica.2015.10.023.
- [23] **KALOUN,A. et NASRI,C.** « ÉPIDEMIOLOGIE DE LA BRUCELLOSE DANS LA DAIRA DE BOUSAADA ». Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila, 2019.
- [24] **ADJEB,M. E. A. et AÏT SI AMEUR, F.** « ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES ZONOSSES D'ORIGINE CANINE ». INSTITUT DES SCIENCE VETERINAIRE-université blida, 2017.
- [25] **Foster,G. B. Osterman,S. Godfroid,J. Jacques,I.et Cloeckert, A.** « *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts », *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 57, n° 11, p. 2688-2693, 2007.
- [26] **Scholz,H. C. et al.**, « *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis* », *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 58, n° 2, p. 375-382, 2008.
- [27] **Scholz,H. C. et al.**, « *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection », *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 60, n° 4, p. 801-808, 2010.

Référence

- [28] **Meyer, M. E.** « Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella* », in *Animal brucellosis*, CRC Press, Inc. Sunderland, Massachusetts, 1990, p. 1-17.
- [29] **Bricker, B. J. et Halling, S. M.** « Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 32, n° 11, p. 2660-2666, 1994.
- [30] **Fretin, D. et al.**, « The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection », *Cell. Microbiol.*, vol. 7, n° 5, p. 687-698, 2005.
- [31] **Ray, W. C.** « Brucellosis (due to *Brucella abortus* and *Brucella suis*) [Livestock, humans]. », *CRC Handb. Ser. zoonoses*, 1979.
- [32] **Brucellaceae, F.** « *Brucella* spp. », 2014.
- [33] **Young, E. J.** « An overview of human brucellosis », *Clin. Infect. Dis.*, vol. 21, n° 2, p. 283-289, 1995.
- [34] **Beytout, J. Delmont, J. Marchou, B. et Pichard, E.** « Manuel de maladies infectieuses pour l'Afrique », *John Libbey Eurotext, Paris*, p. 393-401, 2002.
- [35] **Aubry, P. P. et Gaüzère, D. B.** « Brucellose Actualités 2017 », p. 4-7, 2017.
- [36] « WHO_TRS_464_fre.pdf ». .
- [37] **Samadi, A. Ababneh, M. Giadinis, N. D. et Lafi, S. Q.** « Ovine and caprine brucellosis (*Brucella melitensis*) in aborted animals in Jordanian sheep and goat flocks », *Vet. Med. Int.*, vol. 2010, 2010.
- [38] **Grilló, M. J. Barberán, M. et Blasco, J. M.** « Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs », *Vet. Rec.*, vol. 140, n° 23, p. 602-605, 1997.
- [39] **Akakpo, A. J. et Bornarel, P.** « Epidémiologie des brucelloses animales en Afrique tropicale: enquêtes clinique, sérologique et bactériologique », *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, vol. 6, n° 4, p. 981-1027, 1987.
- [40] **Delafosse, A. Goutard, F. et Thebaud, E.** « Epidémiologie de la tuberculose et de la brucellose des bovins en zone périurbaine d'Abéché, Tchad », 2002.
- [41] **Moreno, E. et Moriyón, I.** « The genus *Brucella* », *The prokaryotes*, vol. 5, n° Part 1, p. 315-456, 2006.
- [42] **Martirosyan, A. Moreno, E. et Gorvel, J.** « An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen », *Immunol. Rev.*, vol. 240, n° 1, p. 211-234, 2011.
- [43] **Muñoz, P.-M. de Miguel M.-J. Grilló, M.-J. Marín, C.-M. Barberán, M. et Blasco, J.-M.** « Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams », *Vaccine*, vol. 26, n° 21, p. 2562-2569, 2008.
- [44] **Moreno, E. Gorvel, J.-P. et Moriyón, I.** « Invasion, intracellular trafficking and

Référence

- replication of *Brucella* organisms in professional and nonprofessional phagocytes », *Brucella Mol. Cell. Biol.*, vol. 1, p. 280-306, 2004.
- [45] **Capparelli,R. et al.**, « Heterogeneous shedding of *Brucella abortus* in milk and its effect on the control of animal brucellosis », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 106, n° 6, p. 2041-2047, 2009.
- [46] **Fensterbank, R.** « Some aspects of experimental bovine brucellosis », 1987.
- [47] **Grilló, M.-J. Blasco, J. M. Gorvel,J. P. Moriyón,I. et Moreno, E.** « What have we learned from brucellosis in the mouse model? », *Vet. Res.*, vol. 43, n° 1, p. 29, 2012.
- [48] **Pizarro-Cerdá,J. et al.**, « *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes », *Infect. Immun.*, vol. 66, n° 12, p. 5711-5724, 1998.
- [49] **Mackanness,G. B.** « The immunological basis of acquired cellular resistance », *J. Exp. Med.*, vol. 120, n° 1, p. 105-120, 1964.
- [50] **Skendros,P. et Boura,P.** « Immunity to brucellosis », *Rev Sci Tech*, vol. 32, n° 1, p. 137-147, 2013.
- [51] **Baldwin,C. L. et Goenka,R.** « Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? », *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 26, n° 5, 2006.
- [52] **Duran-Ferrer,M. et al.**, « Antibody response and antigen-specific gamma-interferon profiles of vaccinated and unvaccinated pregnant sheep experimentally infected with *Brucella melitensis* », *Vet. Microbiol.*, vol. 100, n° 3-4, p. 219-231, 2004.
- [53] **Acha,P. N. et Szyfres,B.** « Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux », 2005.
- [54] **Roux, J.** « Epidemiologie Et Prevention De La Brucellose », *Bull. World Health Organ.*, vol. 57, n° 2, p. 179-194, 1979.
- [55] **Fassi-Fehri,M. M.** « Les maladies des camélidés », *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, vol. 6, n° 2, p. 315-335, 1987.
- [56] **Sibille,C.** « Contribution à l'étude épidémiologique de la brucellose dans la province de l'Arkhangai (Mongolie) ». 2006.
- [57] **Boukary,A. R.** « Epidémiologie de la brucellose et de la tuberculose animales dans les milieux urbain, périurbain et rural au Niger », p. 1-212, 2013, [En ligne]. Disponible sur: papers3://publication/uuid/7A3A8E95-A583-4B59-B324-3AB88BACAD58%0Apapers2://publication/uuid/53BE8DF4-4E36-4470-A24B-CAA659C22866.
- [58] **Freycon,P.** « Rôle du bouquetin *Capra ibex* dans épidémiologie de la brucellose à *Brucella melitensis* en Haute-Savoie ». éditeur inconnu, 2015.

Référence

- [59] **Lefevre,P.-C. Blancou,J. et Chermette,R.** « Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et régions chaudes », 2003.
- [60] **ALAMBEIDJI,M. R. B. et KANE,M. Y.** « EVALUATION DE TROIS TESTS DE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE BOVINE POUR UNE AIDE DECISIONNELLE DE CONTROLE DE LA MALADIE DANS LE BASSIN LAITIER DE NIAMEY (NIGER) ».
- [61] **Sifuentes-Rincón, A. M. Revol, A. et Barrera-Saldaña,H. A.** « Detection and differentiation of the six Brucella species by polymerase chain reaction », *Mol. Med.*, vol. 3, n° 11, p. 734-739, 1997.
- [62] **Morata,P. Queipo-Ortuno,M. I. Reguera, J. Miralles,F. Lopez-Gonzalez, J. J. et Colmenero,J. D.** « Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, n° 10, p. 3743-3746, 2001.
- [63] **Newby,D. T. Hadfield, T. L. et Roberto,F. F.** « Real-time PCR detection of Brucella abortus: a comparative study of SYBR green I, 5'-exonuclease, and hybridization probe assays », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, n° 8, p. 4753-4759, 2003.
- [64] **Redkar, R. Rose,S. Bricker,B. et DelVecchio, V.** « Real-time detection of Brucella abortus, Brucella melitensis and Brucella suis », *Mol. Cell. Probes*, vol. 15, n° 1, p. 43-52, 2001.
- [65] **Queipo-Ortuño,M. I. Morata, P. Ocon, P. Manchado, P. et Colmenero,J. de D.** « Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, n° 11, p. 2927-2930, 1997.
- [66] **Zerva,L. Bourantas,K. Mitka, S. Kansouzidou,A. et Legakis,N. J.** « Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, n° 4, p. 1661-1664, 2001.
- [67] **Morata,P. Queipo-Ortuño,M. I., et de Dios Colmenero,J.** « Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, n° 9, p. 2443-2446, 1998.
- [68] **Matar,G. M. Khneisser, I. A. et Abdelnoor,A. M.** « Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton Brucella antigen DNA. », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 34, n° 2, p. 477-478, 1996.
- [69] **Aigu,P. I.** « Brucellose », n° tableau 3, 1986.
- [70] **Rivera A,D. Y. Rueda,O. E. Calderon,C. R. Mariño J,O. C. Gall,D. et Nielsen,K.** « Evaluación comparativa del método inmunoenzimático indirecto en leche para la detección de bovinos infectados con Brucella abortus, en hatos del departamento de Cundinamarca, Colombia », *OIE Rev. Sci. Tech.*, vol. 22, n° 3, p. 1065-1075, 2003, doi: 10.20506/rst.22.3.1454.

Référence

- [71] **Nielsen et W. L. Yu,K.** « Serological diagnosis of brucellosis », *Prilozi*, vol. 31, n° 1, p. 65-89, 2010.
- [72] **Zoli,D. E. N. P. A.** « Serological Survey of Bovine Brucellosis in Cameroon », vol. 1996, n° 20, p. 139-143, 1996.
- [73] **Fensterbank,R. et Souriau,A.** « Diagnostic allergique de la brucellose bovine. 2. Utilisation du test allergique dans les troupeaux infectés », 1977.
- [74] **Publique,S.** « Brucellose Brucellose Brucellose », p. 1-4, 2008.
- [75] **HEBANO,H. A.** « Etude Sero-Epidemiologique De La Brucellose Animale Dans La Republique De Djibouti », 2013.
- [76] **Bodelet, V.** « Brucellose et grossesse: revue de la littérature à propos d'un cas ». UHP-Université Henri Poincaré, 2002.
- [77] **Valette, L.** « Prophylaxie médicale de la brucellose animale », *Rev. d'élevage médecine vétérinaire des pays Trop.*, vol. 40, n° 4, p. 351-364, 1987.
- [78] **Kardjadj, M.** « The Epidemiology of Human and Animal Brucellosis in », *J. Bacteriol. Mycol.*, vol. 3, n° 2, p. 1-6, 2016, doi: 10.1109/PTC.2009.5281972.
- [79] **Gabli, A., Agabou, A., Gabli, Z.** (2015). *Brucellosis in nomadic pastoralists and their goats in two provinces of the eastern Algerian high plateaus*. *Tropical animal health and production* , 47(6), 1043-1048.
- [80] **Yasser N. Haggag., Hamed A. Samaha., Mohamed A. Nossair., Hend S. Mohammad.** (2003). Serological studies of animal brucellosis in Algeria. *Assiut veterinary medical journal*, 49, 121–130.