

22

7G 178535
BA TH 302

CIRAD-EMVT
Campus de Baillarguet
B.P. 5035
34032 MONTPELLIER Cedex 1

Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort
7, avenue du Général de Gaulle
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Institut National Agronomique
Paris-Grignon
16, rue Claude Bernard
75005 PARIS

Muséum National d'Histoire Naturelle
57, rue Cuvier
75005 PARIS

27 MAI 1999

**DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

**LA BRUCELLOSE CHEZ LES BOVINS
ET CHEZ L'HOMME
(sauf réglementation)**

par

Valérie ANTRAS

**CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet**

année universitaire 1997-1998



TH02858

Résumé

Le genre *Brucella* présente une grande homogénéité. Il s'agit d'un petit coccobacille Gram négatif et Stamp positif. L'antigène majeur est le lipopolysaccharide de la membrane externe.

Chez les bovins, en pathogénèse sont envisagés les différents stades de l'infection : invasion, focalisation, avortement et maladie chronique, ainsi que les phénomènes immunitaires et la sensibilité individuelle à l'infection.

La vaccination fait appel à des vaccins vivants (B19, *B. suis* 2, RB51 et rfbK) ou tués (45/20, antigènes purifiés).

Le diagnostic de certitude est bactériologique par examen direct et culture. Le dépistage repose sur la mise en évidence des réactions immunitaires humorales (EAT, fixation du complément, tests ELISA, SAW sur le sérum ; ring test sur le lait), ou cellulaires (test allergique). La vaccination est donc source d'interférences pour le diagnostic différentiel des animaux infectés et non infectés vaccinés.

La brucellose a une répartition mondiale. Chez les bovins, le climat et le mode d'élevage interviennent dans son épidémiologie ; la faune sauvage peut jouer un rôle de réservoir. En fonction du niveau de prévalence et du mode d'élevage, elle présente différents visages : connue sous sa forme abortive dans les zones à faible prévalence ou dans les élevages de type intensif, elle se caractérise dans les élevages extensifs en zone d'enzootie par un faible taux d'avortements et des manifestations de l'infection chronique : les hygromas.

Chez l'homme, c'est une zoonose exclusive. Les diverses espèces de *Brucella* sont plus ou moins pathogènes. La contamination se fait surtout par voie cutanée, parfois par voie buccale, voire par aérosol. Les *Brucella* résistent dans les laitages entre 24 h et 142 j selon le type de produit laitier et la température de conservation. Parmi les populations à risque, les éleveurs sont particulièrement exposés. L'infection asymptomatique est fréquente et la maladie se présente le plus souvent comme une fièvre ondulante avec sueur et douleurs diffuses. Le traitement est long et coûteux et les rechutes ne sont pas rares.

La brucellose entraîne des pertes de productivité des bovins, un coût élevé en santé publique et constitue une entrave aux exportations. En matière de santé publique, les autorités doivent en premier lieu informer les éleveurs des dangers de certaines pratiques pour eux comme pour leurs bétail. La mise en place de programmes de lutte contre la maladie animale se justifie surtout dans les structures de type intensif. En zone d'endémie, la vaccination à dose réduite est envisageable.

Mots-clés

brucellose- *Brucella*- bovin - homme - bactériologie - pathogénèse - immunité - diagnostic - vaccination - épidémiologie - économie.

Table des matières

Introduction	1
1. Aspects bactériologiques et structuraux du genre <i>Brucella</i>	2
1.1. Généralités	2
1.2. Ultra structure de la membrane externe	5
1.2.1. Le Lipopolyoside	6
1.2.2. Protéines de la membrane externe.	8
1.2.3. Protéines internes	8
2. Pathogénèse chez un animal sensible	9
2.1. Stade d'invasion et de multiplication loco-régionale	9
2.2. Bactériémie	9
2.3. Infection chronique	10
2.4. Phénomènes immunitaires en primo-infection.	12
2.4.1. Réaction non spécifique	12
2.4.2. Réaction immunitaire spécifique à médiation cellulaire	12
2.4.3. Réaction humorale	12
2.5. Facteurs de variation de la sensibilité individuelle à l'infection	13
2.5.1. Age	13
2.5.2. Race	13
2.5.3. Sexe	13
2.5.4. Stade de gestation	13
2.5.5. Statut immunitaire	13
3. Vaccination	14
3.1. Vaccins vivants	14
3.1.1. Vaccins à <i>B.abortus</i> B19	14
3.1.1.1. Jeunes entre 3 et 6 mois	14
3.1.1.2. Animaux adultes	15
3.1.1.3. Effets indésirables	15
3.1.2. <i>B. suis</i> 2	16
3.1.3. <i>B.abortus</i> RB51 et rfbK	16
3.2. Vaccins tués	16
3.2.1. <i>B.abortus</i> 45/20	16
3.2.2. Antigènes purifiés	16
4. Diagnostic de la brucellose	17
4.1. Diagnostic bactériologique	17
4.1.1. Examen direct	17
4.1.2. Culture	17
4.2. Dépistage par détection d'anticorps	18
4.2.1. Tests sur sérum	18
4.2.1.1. Epreuves à l'antigène tamponné [EAT]	19
4.2.1.2. Fixation du complément [CFT]	19
4.2.1.3. Tests ELISA	20
4.2.1.4. Séro-agglutination lente [SAW, SAL, SAT, TAT]	20
4.2.2. Tests sur le lait : Ring Test [RT]	22
4.2.3. Perspectives de développement	23

4.3.	Tests allergiques [HTR]	24
4.4.	Conclusion	24
5.	Aspects épidémiologiques	26
5.1.	Répartition mondiale de la brucellose bovine.	26
5.2.	Facteurs influant sur le niveau d'infection des troupeaux.	26
5.2.1.	Facteurs climatiques	26
5.2.2.	Mode d'élevage	29
5.2.2.1.	Elevage traditionnel	29
5.2.2.2.	Elevage semi-intensif, cas des ranches.	29
5.2.2.3.	Politique de renouvellement du troupeau	30
5.2.3.	Modélisation en zone indemne	30
5.2.3.1.	Le risque d'importation :	30
5.2.3.2.	Le risque d'exposition et de dissémination en cas d'introduction	30
5.2.3.3.	Le risque de non détection	30
5.2.4.	Contaminations interspécifiques	31
5.2.4.1.	Contact avec d'autres espèces domestiques	31
5.2.4.2.	Rôle de la faune sauvage	31
5.3.	Epidémiologie analytique	32
6.	Importance économique de la brucellose	33
6.1.	Perte de productivité	33
6.2.	Coûts de santé publique	33
6.3.	Obstacle à l'exportation	33
7.	La brucellose humaine	34
7.1.	Modes de contamination	34
7.2.	Symptomatologie	36
7.2.1.	Atteinte générale	37
7.2.2.	Focalisation de la maladie	37
7.2.2.1.	Appareil génital	37
7.2.2.2.	Appareil digestif	37
7.2.2.3.	Appareil urinaire	37
7.2.2.4.	Oeil	37
7.2.2.5.	Coeur	37
7.2.2.6.	Foie	38
7.2.2.7.	Système nerveux central	38
7.2.2.8.	Atteintes ostéoarticulaires	38
7.3.	Traitement.	38
	Conclusion	39
	Bibliographie	40
	Annexes	47

CIRAD-Dist
 UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
 Baillarguet

Liste des figures et cartes

Figure 1 : Phylogénie du genre <i>Brucella</i>	4
Figure 2 : Membrane externe des bactéries à Gram négatif	5
Figure 3 : structure du LPS des <i>Brucella</i>	6
Figure 4 : Evolution de la brucellose chez un individu	11
Figure 5 : Distribution de la brucellose bovine	27

Liste des tableaux

Tableau I : Espèces et biovars de <i>Brucella</i> spp. et leur hôte préférentiel	3
Tableau II : Liste cumulative des paires de ganglions lymphatiques permettant la détection de 100% de bovins positifs en culture à l'autopsie.	17
Tableau III : Fiabilité des tests de dépistage de la brucellose bovine	21
Tableau IV : Probabilité estimée de détecter une vache positive en Ring Test selon la taille du troupeau	23
Tableau V: Effecteurs de la réponse immunitaire en brucellose bovine	25
Tableau VI : Quelques cas significatifs de réponse aux tests de diagnostic individuel en brucellose bovine chez les animaux non vaccinés	25
Tableau VII : Survie des <i>Brucella</i> dans l'environnement	28
Tableau VIII : Concordance hygroma-sérologie	32
Tableau IX : Espèces de <i>Brucella</i> , hôtes animaux et pathogénie pour l'homme	34
Tableau X : Survie des <i>Brucella</i> dans les produits laitiers	35
Tableau XI : Quelques caractéristiques de la brucellose humaine, importantes pour l'évaluation des traitements	36

Introduction

L'objectif de ce travail bibliographique est d'obtenir une vue d'ensemble de la brucellose chez les bovinés en tenant compte des avancées dans le domaine bactériologique et dans la connaissance des réactions immunitaires mises en jeu lors de l'infection afin de bien comprendre leurs implications dans la vaccination et les techniques diagnostiques utilisées.

S'agissant d'un travail de préparation à un stage sur le terrain ne seront abordés, dans la partie diagnostic que les tests facilement utilisables et reconnus au niveau international, l'OIE faisant référence.

Si la maladie est identique à la surface du globe, sa traduction clinique connaît des variations importantes en fonction du niveau de prévalence et des modes d'élevage. Cet aspect sera développé dans le chapitre 5 avec une étude de l'importance économique de cette maladie particulièrement en zone d'enzootie, ce qui est le cas de la plupart des pays tropicaux

Enfin le dernier chapitre de ce travail sera consacré à la brucellose humaine, son caractère zoonotique donnant un relief particulier à cette affection.

1. Aspects bactériologiques et structuraux du genre *Brucella*

1.1. Généralités

Les *Brucella* forment un groupe très homogène. Ce sont des coccobacilles de petite taille (0,6 à 1,5 µm X 0,5 à 0,7 µm) immobiles, non sporulés, aérobies, parasites intracellulaires facultatifs.

A l'observation microscopique il est facile de les confondre avec *Coxiella burnetii* et *Chlamydia* spp. qui ont la même morphologie.

Le genre *Brucella* est négatif en coloration de Gram et positif en coloration de Stamp.

A la mise en culture, suivant l'aspect des colonies lors de l'isolement initial, on distingue les souches lisses ou souches S (smooth) qui sont blanc nacré et les souches rugueuses ou souches R (rough) qui sont de couleur blanc cassé à brun avec un aspect rugueux [46 p. 13-14]. Les souches se développent lentement et sont catalase + et oxydase+.

Le diagnostic de genre sera confirmé par agglutination par un sérum total anti-*Brucella*.

Les *Brucella* ne seraient génétiquement liées à aucune autre espèce bactérienne pathogène pour l'animal, elles possèdent en revanche une étroite parenté avec des pathogènes et symbiotes du règne végétal en particulier *Agrobacterium*, *Phyllobacterium* et *Rhizobium* [67].

Les différentes souches de *Brucella* sont typées par les laboratoires spécialisés selon plusieurs critères culturels dont les besoins en CO₂, en sérum, la production de H₂S et la capacité des colonies à se développer en présence de fushine et de thionine.

Le typage des *Brucella* fait également appel à des techniques modernes telles que l'utilisation d'anticorps monoclonaux permettant de différencier les antigènes membranaires de type A et M, et la sensibilité aux batériophages notamment la souche Tbilisi.

Il existe actuellement six espèces de *Brucella* dont certaines ont plusieurs biovars.

Chaque espèce est inféodée à un hôte préférentiel ou réservoir, au sein duquel la maladie est entretenue. Les différentes espèces de *Brucella* sont capables d'induire une infection dans de nombreuses espèces animales -et en particulier l'Homme- mais en l'absence du réservoir la maladie disparaît d'elle-même de la population.

Tableau I : Espèces et biovars de *Brucella* spp. et leur hôte préférentiel [44]

espèce	biovar	morphologie des colonies	hôte préférentiel
<i>B. abortus</i>	1,2,3,4,5,6,9	S*	bovins
<i>B. melitensis</i>	1,2,3	S	ovins, caprins
<i>B. suis</i>	1,3	S	porcs
	2	S	porcs, lièvres
	4	S	rennes
	5	S	rongeurs sauvages
<i>B. neotomae</i>	-	S	néotomes (Desert Wood Rat)
<i>B. ovis</i>	-	R	ovins
<i>B. canis</i>	-	R	chiens

* S : colonies naturellement en phase lisse ; R : colonies naturellement en phase rugueuse.

Différentes observations conduisent à penser qu'il n'existe en fait qu'une seule espèce de *Brucella*, toutes les espèces et souches identifiées n'étant en fait que des variants d'un organisme initial.

- la grande homogénéité des caractéristiques génétiques des souches entre elles puisque les études d'hybridation mettent en évidence une homologie ADN/ADN supérieure à 90 % et une homologie ADN/ARN parfaite [17, 46 p. 16].
- la propriété des *Brucella* de se transformer en formes L lorsqu'elles sont exposées à certains antibiotiques ou à d'autres produits chimiques a été mise en évidence chez des patients traités ou en expérimentation. Cette transformation est réversible mais le rétablissement de la structure antigénique, de la composition chimique et de la virulence est en général incomplet par rapport à la souche parentale.
- Expérimentalement une souche de *B. abortus* cultivée en présence d'hormones stéroïdes a abouti à la genèse d'une souche de caractères cultureux et morphologiques indifférenciables de *B. ovis* [59]. Ce phénomène peut revêtir une grande importance épidémiologique étant donné la grande probabilité d'exposition des *Brucella* à des hormones stéroïdes dans l'organisme hôte.

Deux candidats ont été proposés comme organisme géniteur possibles :

- *B. abortus* biovar 2 [59],

du fait du grand nombre de biovars existant pour cette espèce, de l'expérimentation décrite plus haut et des exigences culturales de cette souche qui sont supérieures aux autres.

Meyer propose le schéma suivant :

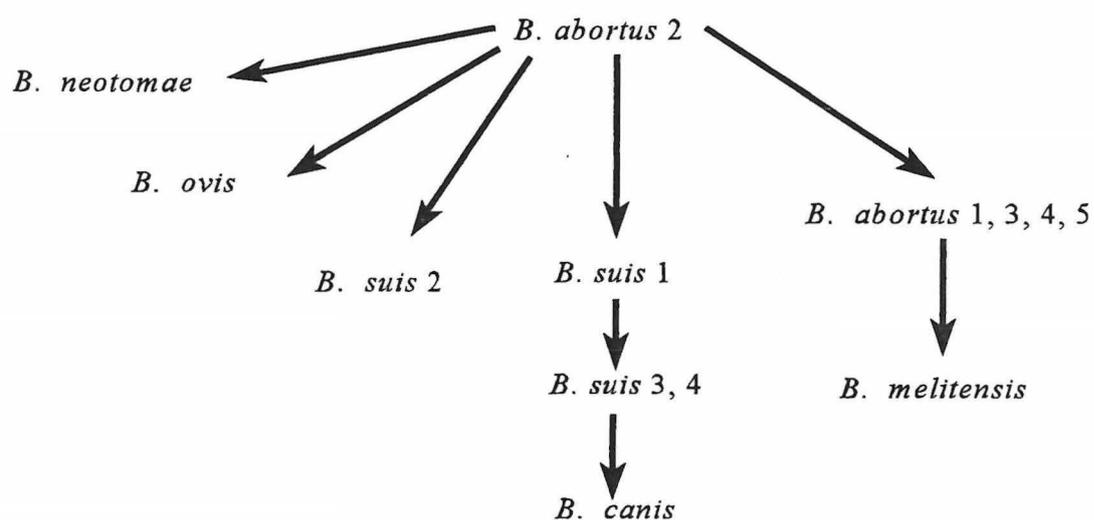


Figure 1 : Phylogénie du genre *Brucella* [59]

- *B. melitensis*

L'étude de l'ADN des différentes souches et de la structure des lipopolysides de la paroi bactérienne suggèrent quant à elles que la souche initiale serait *B. melitensis* [86, 46 p. 78].

1.2. Ultrastructure de la membrane externe des *Brucella* et rôle des différents composants

La membrane externe des *Brucella* présente la structure classique d'une bicouche lipidique dans laquelle sont incluses des protéines ayant un rôle fonctionnel dans la perméabilité membranaire : les porines. Cette membrane contient également des lipoprotéines et elle repose sur une couche de peptoglycane à laquelle elle est fortement liée par liaison covalente [91].

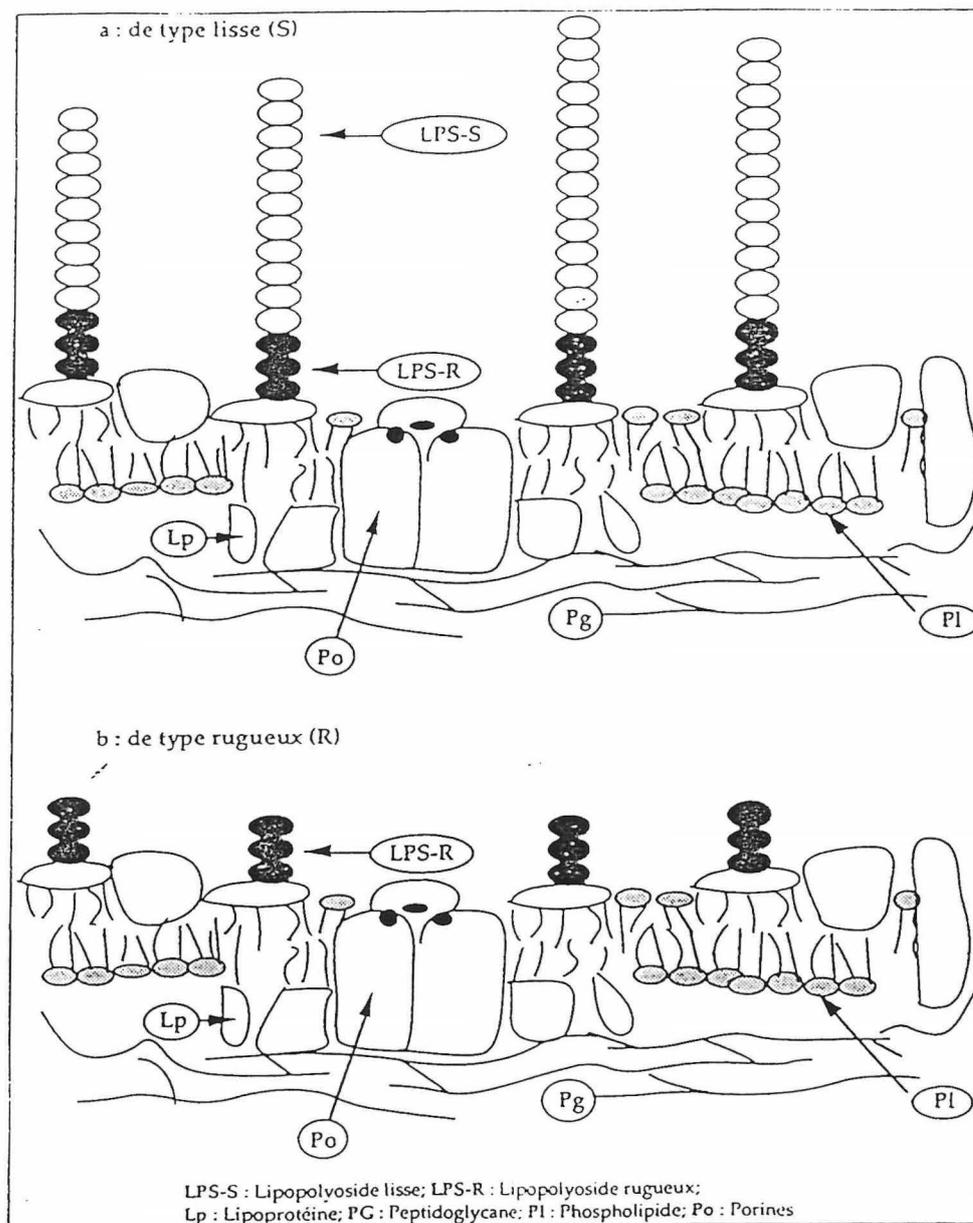


Figure 2 : Membrane externe des bactéries à Gram négatif [46 p. 53]

1.2.1. Le Lipopolyside (LPS)

Le LPS est une molécule présente à la surface de différentes entérobactéries. Il a été bien décrit pour des espèces telles que *Salmonella* ou *E. coli*. Celui des *Brucella* est maintenant mieux connu.

Le LPS des *Brucella* est formé de 3 parties : un lipide A qui constitue le point d'ancrage dans la couche phospholipidique, un noyau ou core, sensible à l'hydrolyse acide et une chaîne O de nature polysidique. Cette chaîne O est absente dans les souches R. Ces souches sont généralement moins virulentes que les formes S ce qui illustre bien l'importance de la chaîne O.

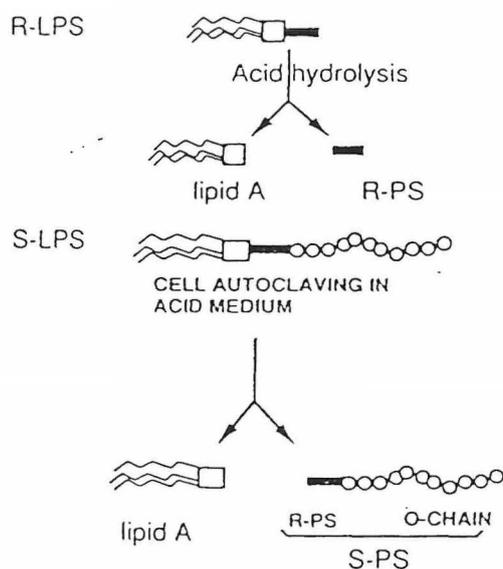


Fig. 1. Operational definitions of LPS.

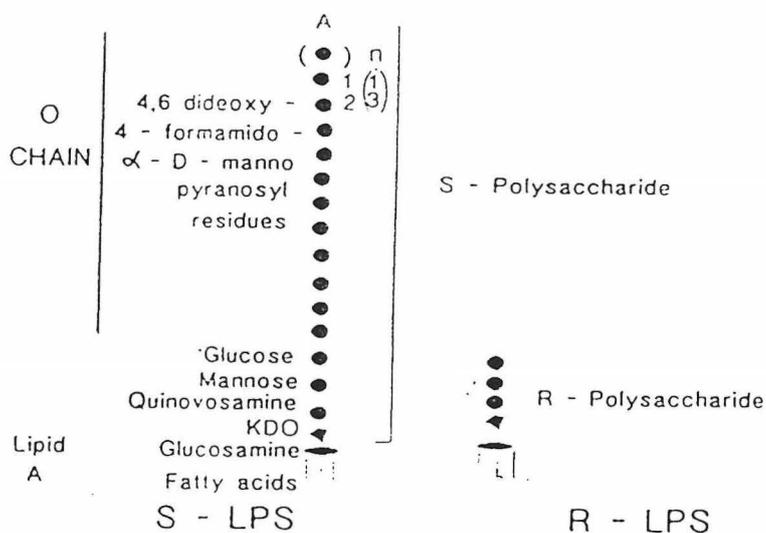


Fig. 2. S-LPS and R-LPS of *Brucella melitensis*.

Figure 3 : Structure du LPS des *Brucella* [91]

Au cours de l'infection, le LPS est l'antigène majeur des *Brucella* initiant la réponse immunitaire humorale. Tous les tests de diagnostic sérologiques actuellement utilisés sont basés sur la détection d'anticorps dirigés contre le LPS-S [17, 67, 47].

Les autres composés identifiés précédemment dans la littérature tels que l'haptène natif [90, 61] ou le polysaccharide B [15, 46 p. 83], tirent leurs propriétés antigéniques de la présence de LPS dans leur composition. Certains auteurs proposent d'ailleurs d'abandonner toutes ces dénominations afin de clarifier la terminologie [91].

Dès 1932 une différence a été mise en évidence entre les espèces *B. abortus* porteuse d'un antigène A et *B. melitensis* porteuse d'un antigène M [88]. Les recherches ont permis de relier cette différence antigénique, bien caractérisée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, à une différence de structure de la chaîne O du LPS des *Brucella*. Dans le type A, la chaîne O est formée d'un homopolymère d'un pentose, tous les monomères étant reliés entre eux par des liaisons 1-2. Dans le type M, le pouvoir optique des extraits de chaîne O est différent. Les monomères sont identiques mais une liaison 1-3 s'intercale dans la structure toutes les 4 liaisons [15]. L'utilisation d'anticorps monoclonaux montre qu'il existe des souches de caractéristiques intermédiaires. Les deux antigènes A et M seraient présents à la surface des *Brucella*. Il pourrait s'agir soit de deux antigènes distincts présents en proportions variables soit d'un seul antigène au sein duquel le pourcentage de liaisons 1-3 varierait entre 0 % (type A) et 20% (type M) [46 p. 78].

Le LPS ne semble jouer qu'un rôle mineur dans l'établissement de l'immunité à médiation cellulaire.

Outre son rôle antigénique, le LPS est largement impliqué dans la pathogénicité des *Brucella*. C'est un des éléments de l'endotoxine, dans la composition de laquelle entrent également des protéines et des phospholipides membranaires.

L'activité biologique du LPS de différentes entérobactéries (*Salmonella* et *E. coli* en particulier) a été étudié sur les animaux de laboratoire. Une grande partie des effets enregistrés a été attribuée au lipide A. Il est maintenant classiquement accepté que *Brucella* partage certaines propriétés avec ces autres germes avec des différences qualitatives et quantitatives, l'endotoxine de *Brucella* étant moins pathogène.

L'effet biologique du LPS de *Brucella* serait dû à la conjugaison de sa toxicité propre et des phénomènes immunitaires qu'il induit [46 p. 73-74].

1.2.2. Protéines de la membrane externe (PME)

Différents groupes de protéines ont été identifiées en fonction de leur poids moléculaire. Parmi elles on distingue des porines qui ont un rôle fonctionnel dans la perméabilité membranaire et des lipoprotéines qui sont fortement liées aux peptidoglycanes [17, 15].

Les PME, administrées avec un adjuvant peuvent provoquer la synthèse d'anticorps circulants détectables mais leur rôle principal dans l'interaction hôte - bactérie est la stimulation des mécanismes de la réaction immunitaire à médiation cellulaire [15].

1.2.3. Protéines internes

Le cytoplasme des *Brucella* contient de nombreuses fractions antigéniques, dont beaucoup sont de nature protéique. Ces éléments sont encore mal identifiés à l'exception de l'antigène A2, une glycoprotéine de fort poids moléculaire [15]. Des anticorps circulants dirigés contre cet antigène ont été identifiés chez des bovins et des caprins infectés.

Les protéines de *Brucella* ont été extraites et purifiées. C'est le cas notamment de la brucelline INRA- dont il existe une présentation commerciale Brucellergène® - qui contient plus de 20 antigènes protéiques d'origine membranaire et cytoplasmique et est dépourvu de LPS.

2. Pathogénèse chez un animal sensible [35]

2.1. Stade d'invasion et de multiplication loco-régionale

Les muqueuses et la peau lorsqu'elle est érodée constituent les portes d'entrée de *Brucella* dans l'organisme. Les voies les plus courantes sont les muqueuses de l'oropharynx lors de l'ingestion de matières souillées mais aussi la conjonctive ou les voies respiratoires supérieures lorsque les animaux sont étroitement confinés et les muqueuses du tractus génital femelle, en particulier lors d'insémination artificielle [35].

A la porte d'entrée, les *Brucella* se multiplient localement puis gagnent rapidement les noeuds lymphatiques (NL) régionaux par voie lymphatique et y réalisent une deuxième phase de multiplication.

Au plan lésionnel on observe dans les jours qui suivent l'infection, une réaction inflammatoire locale et 1 à 2 semaines après inoculation des noeuds lymphatiques réactionnels avec une hyperplasie des follicules lymphoïdes et du système réticulo-endothélial avec des micro-hémorragies.

2.2. Bactériémie et focalisation

Si les défenses de l'hôte sont débordées, les bactéries passent dans le torrent sanguin dans les 10 à 20 jours et sont disséminées dans tout l'organisme. Cette phase de bactériémie est assez longue, de 30 -50 j chez les ovins à plusieurs mois voire des années pour *B. suis* et *B. canis*.

Les colonies bactériennes s'établissent alors dans des sites privilégiés qui sont chez les ruminants le système lymphatique et réticulo-endothélial (rate ; NL régionaux de la tête, du tractus génital et de la mamelle chez la femelle) et les organes génitaux. Les bourses synoviales carpiennes constituent également une localisation fréquente. Enfin on peut observer une infection focale de la moelle osseuse, de l'oeil, de la corticale rénale ou du cerveau ces localisations étant plus souvent observées pour les espèces *B. suis* et *B. canis*.

Pendant le dernier tiers de la gestation, l'organe cible de l'infection par *B. abortus* et *B. melitensis* est l'utérus gravide. Ce tropisme serait lié à la richesse de cet organe et des tissus foetaux en erythritol. Cette substance est effectivement un facteur de croissance pour la culture de certaines souches de *Brucella* ; cependant des souches insensibles à l'erythritol, dont *B. abortus* B19, sont également à l'origine d'avortement [10, 20, 51, 79].

Les différentes localisations des *Brucella* au sein de l'organisme sont à l'origine de la symptomatologie qui est en général fruste, les seules signes cliniques observés étant souvent l'avortement des femelles en dernier tiers de gestation, non pathognomonique. L'allure épizootique des avortements peut orienter le diagnostic vers la brucellose.

Physio-pathogénie de l'avortement

Lors d'un avortement brucellique on observe une placentite avec des lésions de nécrose plus ou moins étendues au niveau des cotylédons et de la membrane allanto-choriale avec présence d'un épais exsudat contenant des débris cellulaires et des colonies bactériennes. L'épithélium de l'endomètre reste en général intact sauf lors d'infections secondaires.

Différentes hypothèses complémentaires ont été formulées quant aux causes de l'avortement.

- La placentite en perturbant les échanges foetaux maternels serait à l'origine d'une mort foetale.
- Une diminution du taux de progestérone suite à l'atteinte du placenta qui est la seule source de progestérone pendant le dernier tiers de gestation déclencherait l'avortement.
- L'endotoxine bactérienne à l'instar de celle d'autres bactéries aurait un effet abortif.
- La réaction foetale à l'infection se traduit par une élévation de sa cortisolémie qui est un des facteurs déclenchants du part en fin de gestation.

L'excrétion bactérienne est très importante au cours de l'avortement, l'avorton et ses annexes ainsi que les lochies sont hautement contaminés.

2.3. Infection chronique

Les femelles n'avortent en général qu'une seule fois. L'infection se maintient ensuite dans les noeuds lymphatiques, souvent au niveau de la mamelle, et au cours des gestations suivantes l'excrétion bactérienne reprend à un niveau inférieur, diminuant avec le rang de mise-bas [45, 22]. La guérison bactériologique est rare et dans cette phase de la maladie la symptomatologie est liée aux foyers d'infection non génitaux, surtout articulaires

Dans ces autres localisations il y a multiplication bactérienne avec formation d'exsudats inflammatoires, les lésions étant plus ou moins encapsulées par une réaction conjonctive puis fibreuse d'où la formation d'abcès et d'hygromas dans le cas des lésions articulaires. Dans les troupeaux à forte prévalence où la maladie sévit de façon enzootique, les avortements sont rares et ce sont les principaux signes observés [17, 67].

On retrouve des *Brucella* dans le lait, le sperme et dans le liquide d'hygroma.

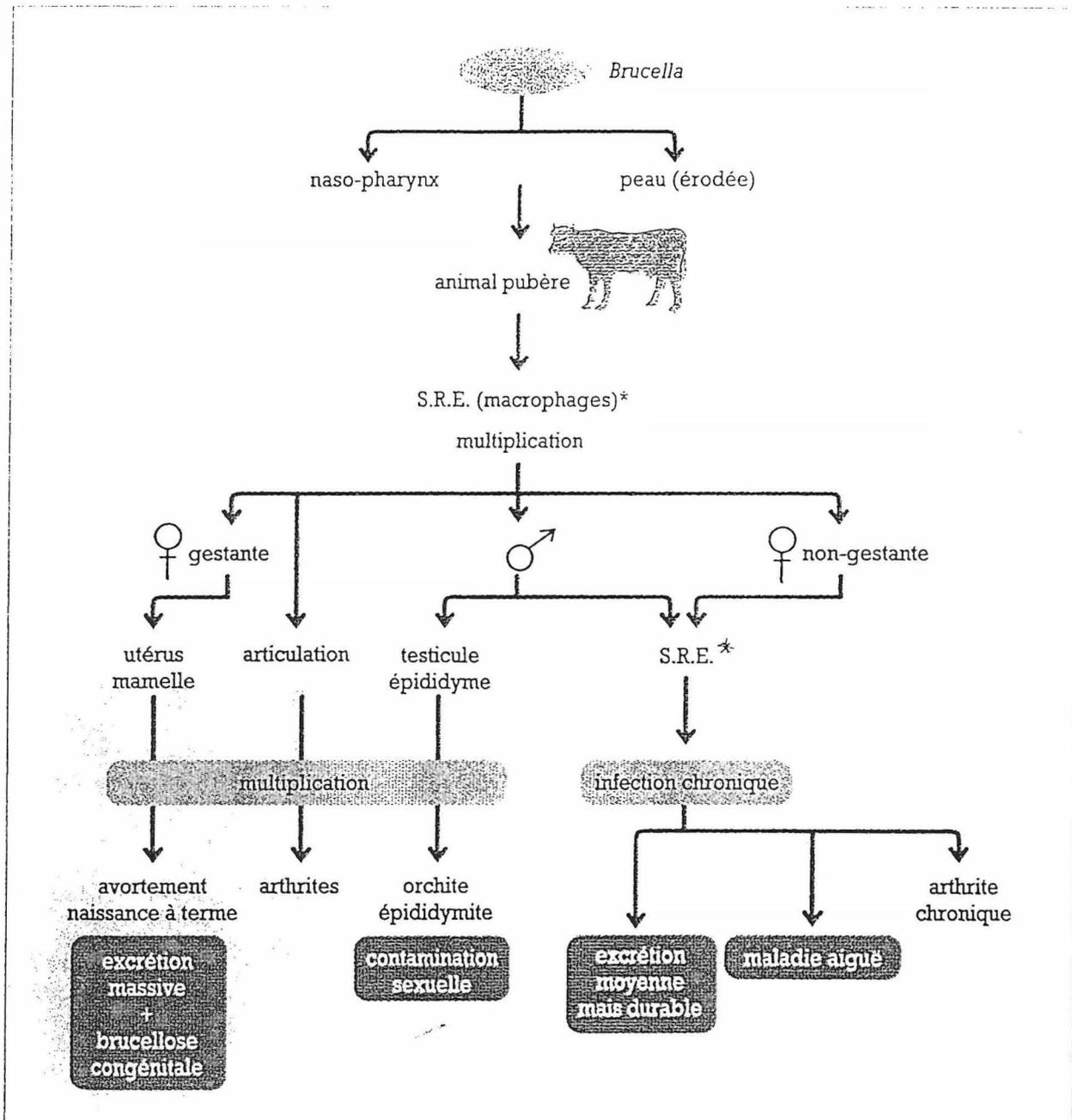


Figure 4 : Evolution de la brucellose chez un individu [45]

* SRE : système réticulo-endothélial

2.4. Phénomènes immunitaires en primo-infection

2.4.1. Réaction non spécifique

La traversée de l'épithélium muqueux et la multiplication locale des *Brucella* provoque une réaction immunitaire non spécifique avec recrutement des macrophages et afflux de polynucléaires neutrophiles, ces derniers ayant un rôle prépondérant [35, 64].

La virulence des souches de *Brucella* pourrait être liées à une double aptitude : être phagocytées puis survivre et se multiplier au sein de ces cellules [35, 49]. Cette survie est assurée par l'inhibition de la fusion des phagosomes et des lysosomes par un facteur de surface qui pourraient être des nucléotides : la guanosine monophosphate et l'adénosine [12, 11].

Chez les animaux immuns les immunoglobulines de type M et G (IgM et IgG) peuvent intervenir dans cette étape en opsonisant les antigènes bactériens ce qui active leur phagocytose, favorise le métabolisme oxydatif des macrophages mais inhibe la fusion lysosomiale [13, 48].

2.4.2. Réaction immunitaire spécifique à médiation cellulaire

Le contact avec les antigènes bactériens au niveau local et dans les noeuds lymphatiques sensibilise des lymphocytes T générant une population de cellules T cytotoxiques spécifiques et induisant la sécrétion d'interleukines activatrices du système macrophagique. Certaines cellules T à grande longévité conserveront ensuite la mémoire de l'antigène, permettant un établissement très rapide des réactions cellulaires lors de réinfection, qui se manifeste par une réaction d'hypersensibilité retardée, utilisée à des fins diagnostiques [17].

2.4.3. Réaction humorale

Les lymphocytes du groupe B réagissent 1 à 3 semaines après l'inoculation par la sécrétion d'IgM puis rapidement d'IgG qui chez les bovins sont de deux types électrophorétiques : IgG1 et IgG2. Les IgG1 sont en général le type le plus représenté mais la proportion d'IgG2 tend à augmenter avec l'âge des animaux et le nombre d'expositions. En début de lactation, les IgG1 font l'objet d'une exportation massive vers le colostrum. Dans ces deux cas les IgG2 peuvent alors être l'isotype dominant.

L'âge est un facteur important de variation dans le niveau de la réponse humorale qui est souvent transitoire voire absente chez les jeunes animaux et chez les femelles dans la période qui entoure le part ou l'avortement.

Dans le cas d'une infection par des souches sauvages les taux d'IgM et d'IgG1, après une phase de plateau de durée très variable selon la souche ou le statut de l'animal, diminuent en dessous des seuils de détection. Les IgG2 restent présents pour une durée de plusieurs années. [79, 17 p. 32].

Le lait contient également des IgA qui sont produites localement et ne sont pas détectées dans le sérum.

L'efficacité de la réponse immunitaire spécifique dépend essentiellement des phénomènes cellulaires. On ne dispose pas actuellement d'outil permettant de l'évaluer : Les titres en anticorps pour l'immunité humorale, l'ampleur de la transformation lymphoblastique ou des réactions

d'hypersensibilité pour l'immunité à médiation cellulaire sont des marqueurs de la réaction immunitaire mais ne sont pas corrélés avec la protection contre l'infection. [79, 64, 46].

2.5. Facteurs de variation de la sensibilité individuelle à l'infection

2.5.1. Age

De nombreuses études tendent à prouver que les animaux sexuellement immatures sont peu sensibles à l'infection par *Brucella* [22] et que des veaux nés de mère infectées et élevés avec elle ne développent pas d'infection [71]. Cependant il convient de se méfier des infections latentes : environ 5 % des animaux nés de mères infectées restent sérologiquement négatifs mais effectuent une séro-conversion et avortent à leur première gestation avec un isolement positif [17, 79]. Ce phénomène peut revêtir une importance capitale dans les élevages cherchant à éradiquer la maladie. Une seule étude concernant le buffle fait état d'une incidence 6,2 fois plus élevée chez des veaux nés de mère infectée que chez les veaux nés de mère saine [3].

2.5.2. Race

L'influence de la race est très controversée mais la rusticité semble un facteur de diminution de la sensibilité à l'infection, ce qui a été décrit pour beaucoup d'autres maladies [38]. Dans les races ovines on connaît des différences raciales de sensibilité à la brucellose.

2.5.3. Sexe

Les mâles semblent moins sensibles à l'infection brucellique que les femelles, même lorsqu'ils sont conduit avec le reste du troupeau [22]. Suite à l'infection ou la vaccination ils développent des titres en anticorps élevés [65].

2.5.4. Stade de gestation

La sensibilité à l'infection des femelles augmente avec l'âge du fœtus au moment de l'inoculation. Une étude a montré que la probabilité d'isoler des *Brucella* au moment de la parturition passait de 22 % pour un fœtus de 60 j à 90 % pour un fœtus de 150 j [22].

2.5.5. Statut immunitaire

De nombreux animaux exposés ne deviennent jamais ni infectés ni séropositifs, d'autres après une période d'infection transitoire élimineront les bactéries et résisteront aux réinfections, d'autres enfin resteront infectés de manière permanente. Le déterminisme de cette sensibilité individuelle passe par des facteurs génétiques mais aussi par l'état général de l'animal et du niveau de couverture de ses besoins alimentaires en particulier.

3. Vaccination

On distingue classiquement deux types de vaccins selon qu'ils contiennent des bactéries vivantes ou des corps ou fractions de corps de bactéries tuées.

3.1. Vaccins vivants

3.1.1. Vaccins à *B. abortus* B19

Ce type de vaccin est actuellement le plus universellement employé. La souche de référence pour ce vaccin est la souche B19 isolée au début des années 30. Cette souche de *Brucella abortus* de type lisse induit chez les animaux inoculés une infection modérée et transitoire. Cette faible virulence est stable même lors de passages répétés sur animal sensible. Elle confère une protection de bonne qualité contre les réinfections et plusieurs études de terrain ont établi au sein de cheptels infectés une réduction de la prévalence de la brucellose de 80 à 90% à la suite de la vaccination. Pour la production de vaccin, seule doit être utilisée la souche B19 qui peut être obtenue auprès de l'USDA [67].

La durée de l'immunité conférée est longue ; Mc Diarmid l'estime à 5 gestations ou plus [65].

La prémunition contre les infections est supérieure chez les animaux sexuellement matures mais elle reste acceptable chez les jeunes de plus de 2 mois. Une vaccination trop précoce est à proscrire chez les jeunes nés de mère infectée car les anticorps maternels absorbés avec le colostrum peuvent interagir avec la souche vaccinale jusqu'à 150 j.

Sur le plan immunologique, la réaction de l'animal est calquée sur celle observée lors d'infection par des souches virulentes avec une apparition primitive des IgM dont le pic de sécrétion est à 13 j rapidement suivie puis dépassée par une sécrétion d'IgG qui culmine entre le 28^e et le 42^e jour [65, 79].

Contrairement à ce que l'on observe lors d'une infestation par une souche sauvage, la population d'anticorps qui reste présente est de type IgM.

La persistance de titres d'anticorps détectables dépend fortement du protocole de vaccination.

3.1.1.1. Jeunes entre 3 et 6 mois

L'administration sous cutanée à de jeunes bovins entre 3 et 6 mois est compatible avec l'établissement d'une protection satisfaisante avec une production d'anticorps vaccinaux transitoire, les animaux retrouvant des titres négatifs 16 à 18 mois après la vaccination. Cette propriété revêt une grande importance dans le diagnostic des animaux infectés et leur différenciation par rapport aux animaux vaccinés. C'est donc le mode de vaccination conseillé en zone d'endémie [17].

Les Etats-Unis ont également validé un protocole de vaccination avec une dose réduite à $3 \cdot 10^8$ et $3 \cdot 10^9$ bactéries chez les animaux de 4 à 12 mois mais on observe chez les animaux vaccinés après 6 mois 5 à 10 % de titres persistants en anticorps et ce type de vaccination est réservé aux animaux destinés à la boucherie [67].

La dose standard est de $5-8 \cdot 10^{10}$ bactéries administrées par voie sous-cutanée. Des essais sur zébus montrent que la dose vaccinale suffisante est certainement plus proche de 10^9 bactéries vivantes ce qui permet, en particulier dans les pays à faibles ressources, d'envisager la production de vaccins à un coût diminué, compatible avec le revenu des éleveurs [55].

Un nouveau mode d'administration a été développé avec une inoculation de la souche vaccinale $5-10 \cdot 10^9$ par voie conjonctivale [37, 68, 69] qui emploie des doses réduites et entraîne une faible réponse sérologique.

une première administration chez des jeunes de 3 à 6 mois d'âge entraîne la séro-conversion de 10 % des animaux. Le protocole comprend un rappel six mois plus tard, on observe alors une proportion de 15 % d'animaux séropositifs, mais tous sont redevenus négatifs au bout de 3 mois.

La protection engendrée est comparable à celle obtenue par une administration sous-cutanée, la meilleure protection étant obtenue avec une injection sous-cutanée entre 3 et 6 mois suivie d'un rappel par voie conjonctivale 6 mois plus tard.

3.1.1.2. Animaux adultes

Les animaux âgés vaccinés développent des titres sérologiques élevés et persistants. Ce phénomène est observé même avec de très faibles doses d'où la nécessité de réserver à ce seul usage les seringues ayant contenu un vaccin contre la brucellose [65, 34, 36].

L'intérêt de la voie conjonctivale est l'absence de titres sérologiques persistants même chez les animaux adultes tout en permettant l'établissement d'une protection efficace, ce qui permet d'envisager une vaccination de tous les animaux en cas d'urgence.

Chez les femelles gestantes la réponse immunitaire est susceptible de varier avec le stade de gestation, avec une diminution observée dans le dernier tiers de la gestation [23]. Il a été démontré par ailleurs sur le modèle souris que la réponse immunitaire à médiation cellulaire est influencée par l'imprégnation oestrogénique [50].

3.1.1.3. Effets indésirables

La vaccination chez les jeunes peut occasionner une arthropathie à l'âge adulte en particulier au niveau de l'articulation fémoro-tibiale [65, 67].

- Femelles

La vaccination des femelles gestantes en fin de gestation peut s'accompagner d'avortement dans 0 à 5 % des cas [65]. La vaccination peut provoquer une hyperthermie transitoire avec abattement anorexie et chute de la production laitière pouvant atteindre les 30 %.

La situation revient à la normale en quelques jours. Des réactions de type anaphylactiques sont possibles.

- Mâles

Les mâles semblent plus sensibles à la souche B19 et peuvent déclarer une orchite vaccinale ; de plus, leur niveau de réactivité est supérieur et la persistance d'anticorps vaccinaux est fréquente, enfin des *Brucella* ont été isolées du sperme de mâles vaccinés. L'ensemble de ces éléments conduit à déconseiller la vaccination des mâles dans de nombreux pays [67].

3.1.2. *B. suis* 2

La vaccination par voie orale à base de *B. suis* 2 a été développée avec succès en Chine mais elle n'est pas standardisée au plan international et ne fait pas l'objet de recommandation par l'OIE. Ce mode d'administration présente des avantages certains et devrait faire l'objet de développements dans le futur.

3.1.3. *B. abortus* RB51 et rfbK

Cette nouvelle souche de type R vient d'être approuvée par l'USDA (février 1996) pour la vaccination du bétail. Elle n'entraîne pas la production d'anticorps détectables par les tests classiques et ne provoque que de rares avortements si elle est administrée aux femelles gestantes [76]. La souche rfbK possède les mêmes propriétés [6].

3.2. Vaccins tués

3.2.1. *B. abortus* 45/20

Cette souche de type R est utilisée tuée avec un adjuvant huileux. Ce dernier joue un rôle prépondérant dans l'établissement de l'immunité qui est essentiellement de type cellulaire.

La protection conférée est faible chez les animaux de moins de 6 mois et même avec une injection de rappel elle reste inférieure à celle obtenue par une seule injection de B19.

Son emploi a longtemps été réservé à la vaccination des adultes dans les foyers de brucellose car ce vaccin ne provoque pas de réponse sérologique détectable par les tests classiques sauf en cas d'administration à des animaux sensibilisés par une vaccination ou une infection antérieure : la mémoire immunitaire est alors stimulée et il y a production d'IgG à des titres élevés, le Ring Test restant négatif. Cette propriété peut d'ailleurs être exploitée pour le dépistage d'animaux infectés latents.

Le développement de l'inoculation par voie conjonctivale de B19 conduit à l'abandon progressif de ce vaccin.

3.2.2. Antigènes purifiés

Des résultats intéressants ont été obtenus avec des fractions purifiées de polyside O et de protéines administrées conjointement [6].

4. Diagnostic de la brucellose

Le diagnostic clinique de la brucellose est ardu : le seul symptôme est souvent l'avortement qui n'est pas pathognomonique. L'aspect épizootique des avortements peut renforcer la suspicion de brucellose dans les troupeaux nouvellement infectés mais la confirmation passe nécessairement par le laboratoire.

4.1. Diagnostic bactériologique

C'est le seul diagnostic de certitude mais il manque souvent de sensibilité.

Les prélèvements de choix sur animal vivant sont les produits de l'avortement (contenu stomacal, foie et poumons de l'avorton, annexes foetales) et les lochies. Le lait individuel, les sécrétions vaginales, le sperme et les liquides d'hygroma sont également exploitables. Post mortem on prélèvera les noeuds lymphatiques de la tête, du tractus génital et de la mamelle ainsi que la rate.

Tableau II : Liste cumulative des paires de ganglions lymphatiques permettant la détection de 100 % de bovins positifs en culture à l'autopsie [47]

Ganglions lymphatiques	Animaux positifs
Rétromammaires	79,6 %
Rétromammaires + Préscapulaires	89,6 %
Rétromammaires + Préscapulaires + Rétropharyngées	93,9 %
Rétromammaires + Préscapulaires + Rétropharyngées + Sous-maxillaires	98 %
Rétromammaires + Préscapulaires + Rétropharyngées + Sous-maxillaires + Iliques	100 %

4.1.1. Examen direct

Il se réalise par frottis ou calques d'organes et coloration de Stamp. Des confusions sont possibles avec des germes morphologiquement proches tels que *Coxiella burnetii* et *Chlamydia* spp. Cette méthode pêche par manque de sensibilité. Les techniques d'amplification géniques à la PCR (polymerase chain réaction) permettent d'abaisser le seuil de détection.

4.1.2. Culture

La mise en culture permet l'isolement des *Brucella* et le diagnostic de genre. Le typage doit être réalisé en laboratoire spécialisé (cf chapitre 1).

4.2. Dépistage par détection d'anticorps

De nombreuses techniques ont été développées et cet aspect diagnostique de la brucellose fait toujours l'objet de nombreuses recherches ce qui illustre bien qu'il n'existe à ce jour aucune technique pleinement satisfaisante qui permette de dépister à la fois les animaux récemment infectés, les animaux souffrant d'infection chronique et les animaux infectés latents.

Se pose en outre le problème de la différenciation des animaux vaccinés et des animaux naturellement infectés qui n'est toujours pas résolu, même si des pistes ont été découvertes. Ceci présente une grande importance économique tant pour la réussite des plans d'éradication de la maladie au sein d'effectifs et que comme obstacle majeur à la commercialisation d'animaux vaccinés [47].

L'OIE préconise pour le dépistage des troupeaux l'utilisation des épreuves à l'antigène tamponné, du Ring Test (troupeaux laitiers), ou de l'ELISA avec confirmation sur les animaux trouvés positifs par un test de fixation du complément ou un test ELISA.

Les épreuves de séro-agglutination lente font encore foi dans les échanges internationaux avec de nombreux pays dont l'Europe qui impose un titre maximum de 30 UI en séro-agglutination pour les animaux importés dans l'Union. Ces tests sont aujourd'hui dépassés et leur emploi doit être découragé [67].

4.2.1. Tests sur sérum

Prélèvements

Les prélèvements sanguins pour tests sérologiques doivent être réalisés sur tube sec maintenus 1-2 h à 25-37°C puis réfrigérés à 4°C sans qu'il soit nécessaire de séparer le sérum du caillot. Le dosage sera effectué dans les deux semaines suivant le prélèvement.

En cas de dosage différé dans le temps, la séparation du sérum sera effectuée et le prélèvement conservé à $\leq -20^{\circ}\text{C}$ [58].

Variabilité des titres en anticorps

On observe une forte variabilité individuelle des titres en anticorps en fonction du statut immunitaire de l'animal, de la virulence de la souche et surtout de l'âge de l'animal.

Standardisation

Toutes les suspensions antigéniques utilisées font intervenir des suspensions de cellules totales inactivées préparées à partir de deux souches de références : souche 99 conservée au laboratoire de référence de l'OIE à Weybrige UK et la souche 1119-3 conservée au National Veterinary Services Laboratory de l'USDA (annexe 1). Ces préparations permettent la détection dans le sérum d'anticorps dirigés contre le LPS-S.

Réactions croisées

La communauté antigénique avec le LPS-S de bactéries telles que *Salmonella urbana*, *E.coli* O:157, *Yersinia enterocolitica* O:9 et *Pseudomonas maltophilia* peut donc provoquer des réactions croisées ou atypiques en cas d'infection par ces bactéries, pour tous les tests sérologiques.

4.2.1.1. Epreuves à l'antigène tamponné [EAT] [67, 58, 21]

Le principe de ces tests est la mise en présence des corps bactériens colorés soit au Rose Bengale (test au Rose Bengale [RB] et Card Test) soit au vert brillant (Test tamponné d'agglutination sur plaque [BPAT]) avec le sérum testé. Après incubation et agitation, le mélange est observé, toute trace d'agglutination étant interprétée comme un résultat positif (cf annexes 1 et 2). L'automatisation de ces tests est possible et améliore leur sensibilité [18].

Une attention particulière doit être apportée à la température des réactifs qui doivent impérativement être à température ambiante.

L'antigène du test au Rose Bengale fait l'objet d'une standardisation internationale par rapport à l'ISABS (International Standard *Brucella abortus* Serum) qui peut être obtenu auprès du laboratoire de référence de Weybridge) de façon à ce que l'ISABS donne un résultat positif lorsqu'il est dilué au 1/47,5 et un résultat négatif au 1/55 [67, 58].

Les antigènes sont tamponnés à pH 3,65 ±0,05. L'acidité du milieu inhibant le pouvoir agglutinant des IgM, ces tests ne détectent que les IgG1.

- **Avantages**

Ces tests sont très sensibles, faciles à réaliser, rapides et peu coûteux ce qui permet leur utilisation sur de grands effectifs. Leurs atouts positionnent les tests au Rose Bengale comme les principaux tests de dépistage à mettre en oeuvre en zone tropicale [75, 62, 30]

- **Inconvénients**

Les infections par des souches ayant une structure de type M comme *B. melitensis* et *B. abortus* biovar 5 sont parfois mal diagnostiquées [67, 18].

Ces tests réagissent aux anticorps vaccinaux et sont assez sensibles aux réactions croisées, en outre ils ne permettent pas toujours la détection d'animaux dont le sérum est riche en IgG2 : infectés chroniques ou en tout début de lactation (phénomène de zone).

Les résultats de l'agglutination sur plaque sont légèrement inférieurs à ceux obtenus par le test au Rose Bengale et le Card Test [47].

4.2.1.2. Fixation du complément [CFT]

C'est le test de référence en matière de brucellose ; très sensible c'est aussi l'un des plus spécifiques. Il détecte exclusivement les IgG1.

Assez lourd à mettre en oeuvre, il est préconisé comme test de confirmation. C'est un test moins sensible aux réactions croisées et aux séquelles vaccinales que les précédents. En revanche il est sensible au phénomène de zone ce qui peut entraîner quelques rares faux négatifs.

La standardisation des résultats se fait par titrage simultané du sérum testé et d'un sérum de référence calibré par rapport à l'ISABS, sachant qu'une ampoule de 1ml d'ISABS correspond à 1 000 ICFTU (international complement fixation test unit), et que l'ISABS dilué au 1/200 doit donner un résultat de 50 % de fixation (cf annexe 1 et 4)[58, 67].

4.2.1.3. Tests ELISA

De nombreux tests sur le principe ELISA existent. L'OIE recommande l'utilisation de tests dont les conjugués sont préparés avec la peroxydase de raifort (horseradish peroxydase) et sont spécifiquement dirigés contre les IgG1.

Ces tests ont une sensibilité et une spécificité comparable ou supérieure à celle de la fixation du complément, ils sont plus faciles à réaliser et peuvent en outre s'effectuer sur sérum et sur lait. Ils sont donc utilisables à la fois en dépistage et en confirmation.

L'inconvénient majeur de ces tests résidait dans un manque de standardisation permettant une comparaison entre les résultats de différents laboratoires de diagnostic [84]. Mais il existe maintenant des tests standardisés sur le serum de référence.

Les recherches portent sur l'élaboration de tests réalisables rapidement (45 min) dans les conditions de terrain avec la mise au point de tests de type dot-ELISA [14].

4.2.1.4. Séro-agglutination lente [SAW, SAL, SAT, TAT]

Ces tests sont dépassés techniquement mais encore largement employés dans le monde. Ils présentent un défaut de sensibilité et surtout de spécificité. La séro-agglutination lente met en évidence les IgM et les IgG2 [26].

Les IgM sont à l'origine d'agglutination non spécifique et différentes techniques ont été proposées pour les neutraliser :

- l'ajout d'EDTA [58, 70, 83] qui élimine 70 à 80 % des réactions non spécifiques ;
- l'inactivation par la chaleur
- l'inactivation par réduction des ponts disulfures par le mercaptoethanol [2-ME] ou le dithiothréitol [DTT]. Le 2-ME est préconisé par Sandhu et Joshi sur le buffle
- la précipitation par le Rivanol.

Cette dernière est largement utilisée aux Etats-Unis et serait la technique de choix chez le buffle d'après Nicoletti [62].

Toutes ces modifications réduisent effectivement les réactions non spécifiques et les post-vaccinales mais peuvent diminuer la sensibilité du test dans les infections récentes [47].

Tableau III : Fiabilité des tests de dépistage de la brucellose bovine d'après [47]Sensibilité

nb d'animaux	RB	FC	SAW	2ME
164 ¹		98,2		
49 ¹	91,8	91,8		
167 ¹	74,9	79,0	68,9	59,9
27 ²	77,8	81,5	70,4	

Spécificité

nb d'animaux	RB	Card Test	FC	BPAT	SAW	2ME	HIGT
11 000 ³					94,6		
1 128 ³			100 (99,7-100)*		93,9 (92,3-95,2)		99,8 (99,4-100)
730 ³	100	100	100	98,9	99,5	99,7	
80 ⁴			100 (95,4 - 100)	92,5 (84,2 - 97,2)	85,0 (75,1 - 92)		
321 ⁴	100	100	100	98,8	98,8	100	

1 : animaux naturellement infectés positifs en culture ; 2 : animaux expérimentalement infectés par *B. abortus* et positifs en culture ; 3 : animaux issus de troupeaux indemnes ; 4 : bovins vaccinés jeunes au B19 et d'âge >18 mois ; * : entre parenthèses intervalle de confiance à 95 p.cent.

4.2.2. Tests sur le lait : Ring Test [RT]

L'antigène est constitué de corps bactériens des souches 99 ou 1119-3 colorés à l'hématoxyline. La présence d'immunoglobines réagissantes dans le lait sera révélée par une coloration de l'anneau de crème supérieure ou égale à celle du lait (cf annexes 1 et 3)[67].

Le prélèvement de lait doit être recueilli dans un récipient en plastique. Il est réfrigéré pendant 24 h à 4°C puis testé le plus rapidement possible.

Le lait ne doit pas contenir de colostrum ni de lait de mammite qui sont à l'origine de résultats faux positifs et ne doit pas subir d'agitation violente. Il doit être suffisamment riche en matière grasse ; le cas échéant il peut être enrichi par de la crème prélevée dans un troupeau indemne [47, 58]. Un lait trop riche en matière grasse - comme c'est souvent le cas pour le lait de bufflonne - devra être dilué par du lait négatif collecté dans des élevages indemnes.

Dans le cas d'un prélèvement individuel, le premier lait doit être écarté et les quatre quartiers doivent être prélevés car les titres en anticorps sont susceptibles de varier fortement : Roepke [74] a trouvé des variations de titre entre deux quartiers de facteur 1 à 400 avec une moyenne de 12,5.

Le RT détecte la présence dans le lait d'IgM et IgA et dans une faible mesure d'IgG1.

Sur lait individuel c'est un test de bonne sensibilité et spécificité appelant confirmation par une fixation du complément ou un test ELISA. on peut observer des discordances entre RT et sérologie : dans environ 20 % des cas l'infection ne touche pas la mamelle [80], de plus le RT est peu sensible aux réactions croisées ou aux anticorps vaccinaux. Inversement un RT peut être positif sans sérologie positive pour les animaux infectés latents.

Réalisé sur lait de mélange, il est préconisé comme test de dépistage des cheptels infectés et comme outil de suivi des cheptels indemnes. Les mélanges testés ne doivent alors pas provenir de plus de 80 à 100 animaux afin de tenir compte du facteur dilution susceptible de diminuer la sensibilité du test de façon considérable [74].

Tableau IV : Probabilité estimée de détecter une vache positive en Ring Test selon la taille du troupeau [74]

Nombre de vaches en production	Probabilité estimée (%)	Limite inférieure (confiance 95 %)
1	99,3	97,5
2	98,4	96,5
4	96,7	95
8	93,1	90,7
12	87,1	82,5
25	81,8	77,0
50	69,6	65,3
100	52,1	47,4
200	38,9	34,3
400	24,8	20,7

Ce facteur de dilution peut diminuer considérablement la sensibilité de ce test comme l'a démontré Kerkhofs [52] qui a évalué la sensibilité du RT en milieu infecté à 56 % sur des prélèvements de lait de mélange. La spécificité observée était de 99,9 %. L'ELISA réalisée en parallèle a démontré une sensibilité de 98,6 % et une spécificité de 99 %. L'ELISA serait capable de détecter la présence d'un animal positif au sein d'un troupeau allant jusqu'à 2 000 animaux. C'est le test de choix lorsque les troupeaux dépistés sont de grande taille et la prévalence faible du fait de sa sensibilité très supérieure [52, 33].

En zone de faible prévalence la valeur prédictive du RT semble faible. Elle a été estimée à 10-20 % [47]. Cependant son faible coût permet de le renouveler souvent ce qui augmente sa sensibilité et sa spécificité et permet d'éviter que des animaux échappent de manière accidentelle ou volontaire au dépistage. La qualité d'un dépistage par le RT dépend plus de sa fréquence que de sa valeur intrinsèque.

4.2.3. Perspectives de développement

L'un des problèmes majeurs qui retiennent l'attention des chercheurs est la possibilité de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés. L'analyse de la réponse sérologique aux antigènes protéiques de *Brucella* semble prometteuse dans ce domaine, avec l'utilisation de techniques sophistiquées telles que le Western blot [8].

4.3. Tests allergiques [HTR]

Ce test se réalise par administration intradermique de 0,1 ml de brucelline dans le pli de la queue, le flanc ou l'encolure. La réaction allergique est lisible 48 à 72 h après l'injection et se traduit par un épaissement de la peau au point d'injection [67]. Idéalement la réaction doit être objectivée par mesure de la différence d'épaisseur du pli à l'aide d'un cutimètre ; sur le terrain on considère que toute réaction palpable est positive [56].

La brucelline employée le plus fréquemment est la brucelline INRA qui est un composé d'au moins 20 antigènes protéiques d'origine membranaire et cytoplasmique, dépourvu de LPS. Elle est bien caractérisée sur le plan physico-chimique et moléculaire, standardisée et dispose de techniques de titration ; elle n'induit pas de réaction aux tests sérologiques ou allergiques, provoque une réaction locale facilement détectable et est stable [15].

Les test allergiques ne sont pas utilisables sur des animaux vaccinés [64, 47].

La spécificité de ce test est de 100 % [47] et sa sensibilité de l'ordre de 60 à 80 % [67, 47]. Cette sensibilité peut être sous évaluée si on la compare aux résultats sérologiques car il n'y a pas une parfaite convergence entre les deux tests : sur des animaux infectés on observe en général 50 % d'animaux positifs sur les deux tests, 25 % des animaux positifs en sérologie et négatifs en tests allergiques et 25 % donnent des résultats inverses [15].

- Les animaux positifs seulement en intradermoréaction peuvent être des animaux en début d'infection ou des animaux infectés latents.
- Pour les animaux positifs seulement en sérologie il peut s'agir de réaction croisées avec d'autres germes que *Brucella*, ou des animaux infectés chroniques en phase d'anergie comme cela a pu être observé dans le dépistage allergique de la tuberculose [64].

Les tests allergiques ne sont pas utilisables seuls pour l'éradication de la maladie au sein d'un effectif. Ils ont cependant le grand intérêt de révéler les animaux infectés latents, source potentielle de réinfection et de permettre l'élimination des réactions croisées dans le cas de sérologies atypiques. Leur emploi est donc vivement souhaitable en combinaison avec un dépistage sérologique [9, 47]. Néanmoins on peut les envisager comme test unique pour le dépistage des cheptels infectés lorsque ceux-ci sont de grande taille.

4.4. Conclusion

Il n'existe pas de test de dépistage parfait. On utilise une combinaison de tests capables de mettre en évidence différents effecteurs de la réponse immunitaire. Le diagnostic repose sur l'analyse de l'ensemble des résultats.

Tableau V: Effecteurs de la réponse immunitaire en brucellose bovine [47]

Tests	Mécanismes immuns				
	Immunoglobines				Cellules T sensibilisées
	G1	G2	M	A	
SAW	-	+	+	-	-
RB	+	-	+	-	-
FC	+	-	- (?)	-	-
RT	±	±	+	+	-
HTR	-	-	-	-	+
Vaccination	±	+	+	+	+
Infection	+	±	±	+	+

- / ± / + : intensité de la réaction ou de la réponse.

Tableau VI : Quelques cas significatifs de réponse aux tests de diagnostic individuel en brucellose bovine chez les animaux non vaccinés [47]

Tests	Cas numéro							
	1	2	3	4	5	6	7	8
SAW/RB/FC/ELISA	+	-	-	+	+	+	-	-
HTR	+	-	-	-	+	-	+	+
RT	+	-	+	-	-	+	-	+
culture (lait)	+	-	+	-	-	+	-	+
culture (ganglions lymphatiques)		+		-	+	+		
interprétation	+	+	+	?	+	+	+	+

1 : cas très fréquent : tous les tests sont positifs

2 : seule la culture des ganglions lymphatiques à l'abattoir est positive

3 : infection localisée à la mamelle avec excrétion de *Brucella* dans le lait

4 : réactions non spécifiques ou croisées ?

5 et 6 : cas fréquents

7 et 8 : non exceptionnel dans les brucelloses chroniques.

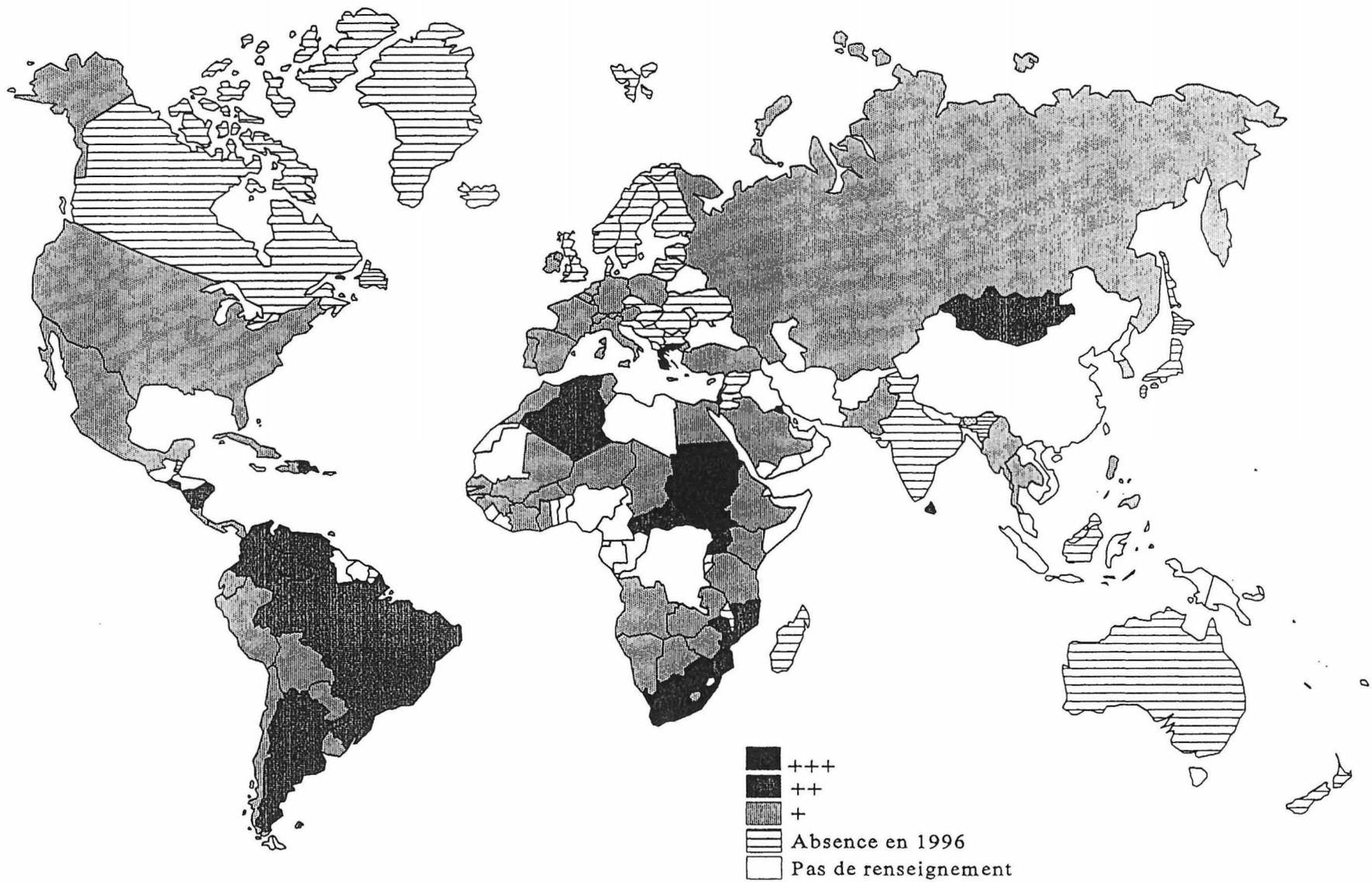


Figure 5 : Distribution de la brucellose bovine dans les pays déclarant à l'OIE source : OIE 1996 (annexe 5)

Tableau VII : Survie des *Brucella* dans l'environnement [45].

milieu	température / environnement	viabilité
rayonnement solaire direct	<31°C	4 h 30
sol	sec humide froid	4 jours 2 mois 5-6 mois
eau	-4°C 37°C	4 mois < 1 jour
foetus	à l'ombre	6 mois
urine	37,5°C 8°C	16 heures 6 jours
fumier	été 25°C hiver (-3 à 8°C)	1 jour 1 mois 2 mois - 1 an
purin lisier	été / hiver 10 - 15°C en tonne	3 - 6 mois 1,5 - 8 mois
laines	en entrepôt	4 mois
foin		quelques jours à quelques mois
poussières de rue barrière d'enclos ou sol en bois		3 à 44 jours 4 mois
pâturage	ensoleillée ombragée	15 jours 35 jours

5.2.2. Mode d'élevage

C'est le facteur prédominant. Il est parfois difficile de le démêler du précédent puisque climat et stratégie d'élevage sont intimement liés [2]. Le mode d'élevage fait intervenir trois facteurs aggravants vis-à-vis de l'infection brucellique : la concentration des animaux, la taille du troupeau et la fréquence des contacts entre les différents troupeaux. Ceci est parfaitement illustré par la situation en Afrique centrale [28, 29, 30, 31, 32] : pour un taux moyen d'infection des femelles reproductrices de 30 % on observe en effet de fortes variations.

5.2.2.1. Elevage traditionnel

Dans les petits troupeaux de 10 à 20 bêtes conduits de manière traditionnelle en élevage extensif la brucellose est presque absente avec 15,4 % de femelles positives à l'examen sérologique.

Dans les élevages petit-transhumants de zébus arabes où les troupeaux sont de taille modeste avec quelques dizaines de têtes mais où les animaux sont réunis en de vastes troupeaux (100 à 200), uniquement pendant la saison sèche, la brucellose est présente et 30 à 35 % des femelles sont positives.

Dans les élevages transhumants de zébus bororo, où les troupeaux sont regroupés pour la nuit tout au long de l'année, l'effectif est de l'ordre de la centaine. Dans ces élevages la brucellose est fréquente et le taux de femelles positives élevé : 35 à 40 %.

En périphérie des villes et des villages où la concentration des animaux est importante les taux d'infection sont particulièrement élevés. Akakpo [2] relève des taux d'infection de 42,5 à 55 % des animaux autour des villes au Burkina Faso, le taux moyen sur l'ensemble de la population étant de 12,5 %.

5.2.2.2. Elevage semi-intensif, cas des ranches

Les ranches d'élevage ont souvent constitué leur troupeau de départ par des campagnes d'achat auprès des éleveurs locaux. Ces derniers, conscients de la maladie, présentent en priorité les animaux dont ils souhaitent se débarrasser : vaches avorteuses ou porteuses d'hygroma. Un contrôle à l'achat a révélé une prévalence de 40 à 65 % parmi les animaux proposés [2].

La conduite de troupeau elle même comporte de nombreuses occasions de rassemblements des animaux (distribution d'aliment, soins...), source de dissémination de l'infection au sein des troupeaux.

Dans ces conditions la brucellose peut devenir rapidement un problème pathologique majeur avec des taux d'avortement atteignant les 30-40 % des gestations, mais aussi des problèmes de non-délivrance, une chute du taux de fertilité, une mortalité augmentée chez les jeunes...

Des mesures de contrôle de la brucellose sont indispensables dans ce type d'élevage.

5.2.2.3. Politique de renouvellement du troupeau

L'introduction d'animaux extérieurs au troupeau constitue un risque important, comme Vaz [85] l'a démontré en Espagne au cours d'une étude portant sur la brucellose ovine. L'analyse statistique des facteurs de risques liés à l'infection d'un troupeau a mis en évidence trois facteurs majeurs :

- La transhumance qui est une occasion de contact avec de nombreux autres troupeaux ;
- l'étalement de la saison d'agnelage qui augmente la période à risque pour les animaux sensibles ;
- les stratégies de renouvellement par des animaux achetés.

La taille des troupeaux est également liée au niveau d'infection mais ceci en relation avec le fort taux de réforme qui oblige à acheter des animaux.

En élevage bovin, dans le cas d'un renouvellement avec des animaux nés sur l'exploitation, il faut tenir compte du mode de reproduction : la monte naturelle ne présente que peu de risques de contamination, en revanche l'insémination artificielle est un mode de contamination efficace [35].

5.2.3. Modélisation en zone indemne

Darymple [24] propose une modélisation des risques d'introduction et de diffusion de la brucellose au sein du cheptel d'une zone saine qui prend en compte trois éléments :

5.2.3.1. Le risque d'importation

Il dépend essentiellement de la prévalence d'infection brucellique de la zone fournissant les animaux, des animaux eux même, notamment leur âge et leur statut vaccinal, et de la réglementation en vigueur dans les zones importatrices : restrictions des importations aux zones saines, dépistage avant achat et efficacité des contrôles à l'importation, en particulier le risque de fraudes.

5.2.3.2. Le risque d'exposition et de dissémination en cas d'introduction

Les principaux facteurs sont la taille des troupeaux qui est proportionnelle à la fréquence des achats d'animaux et la densité animale qui augmente le risque de contamination par voisinage.

5.2.3.3. Le risque de non détection

Il met en jeu le type de tests employés pour le dépistage, leur fréquence de réalisation et l'efficacité des services vétérinaires chargés de les exécuter.

La maîtrise de ces risques est un enjeu capital pour les pays qui ont investi des sommes considérables pour l'éradication de la maladie : elle est à l'origine des recommandations de l'OIE dans le code zoosanitaire international (annexe 7).

5.2.4. Contaminations interspécifiques

5.2.4.1. Contact avec d'autres espèces domestiques

B. melitensis est pathogène pour les bovins. Lorsque ceux-ci sont élevés au contact de petits ruminants ils peuvent s'infecter ce qui présente des dangers particuliers au niveau de la santé humaine. Les petits ruminants sont rarement infectés par *B. abortus*. Les camélidés sont sensibles à *B. melitensis* et *B. abortus* et peuvent constituer une source d'infection pour les bovins. Les Equidés s'ils sont sensibles à l'infection par *B. abortus* ne sont en général pas des sources de contamination efficace pour le bétail.

Le chien est une espèce sensible à l'infection par *Brucella*. Dans les exploitations infectées il présente fréquemment des sérologies positives et *B. abortus* a pu être isolée dans de nombreux cas. Les animaux se contaminent en ingérant des produits d'avortement brucellique. Les femelles gestantes peuvent avorter et excréter à cette occasion un nombre suffisant de bactéries pour contaminer des bovins au contact [42]. En outre, les chiens en transportant les produits d'avortement constituent un facteur important de dissémination de l'infection au sein d'un troupeau [39].

5.2.4.2. Rôle de la faune sauvage [82, 25]

Des animaux séropositifs ont été trouvés dans de très nombreuses espèces sauvages [60]. Ceci témoigne de la capacité qu'ont les *Brucella* d'infecter de nombreux hôtes. La question est de savoir si l'infection est capable de se maintenir au sein d'une espèce sauvage ou si elle reflète seulement l'infection des troupeaux domestiques.

Ainsi le rôle de réservoir de plusieurs espèces sauvages a été démontré pour plusieurs espèces: *B. abortus* a été isolé chez *Bison bison*, et *Cervus elaphus canadensis* aux Etats Unis et au Canada [25, 87, 81] dans des parcs nationaux et en dehors de toute recontamination par des espèces domestiques. Le bison européen *Bison bonasus* est également sensible à l'infection [53]. Rennes et caribous (*Rangifer* spp.) sont les hôtes spécifiques de *B. suis* biovar 4, pathogène pour l'homme [40] et les bovins [41]. Toujours en Europe, le lièvre pourrait jouer un rôle dans la dissémination de *B. suis* biovar 2 [77].

En Afrique, les espèces présentant des sérologies positives sont nombreuses [82] mais certaines sont plus fréquentes ce qui laisse supposer une sensibilité particulière et les identifie comme candidats au rôle de réservoir. Le buffle africain *Syncerus caffer* semble particulièrement sensible et une enquête menée dans le parc de Masai Mara au Kenya a chiffré à 30 % le nombre de buffles sérologiquement positifs [25].

Des sérologies positives et des isolements bactériens sont assez fréquemment relevées chez le zèbre (*Equus burchellia*), l'hippopotame (*Hippopotamus amphibius*) et le gnou (*Connochaetes taurinus*) [25].

Comme le chien, les carnivores sauvages pourraient jouer un rôle dans la dissémination de la maladie. Des sérologies positives ont été trouvées aux Etats-Unis chez le coyote (*canis latrans*) chez lequel la bactérie a également été isolée, le lycaon (*Lycaon pictus*), la hyène tachetée (*Crocuta crocuta*) et le chacal (*Canis mesomelas*).

Les oiseaux charognards peuvent également jouer le rôle de transporteurs de matières virulentes.

Le rôle des mouches par transport mécanique a été évoqué, mais il est certainement infinitésimal, la séparation des animaux permettant de prévenir leur contamination [16].

5.3. Epidémiologie analytique

Dans un troupeau sain l'arrivée de l'infection brucellique se traduit par une vague d'avortements. C'est le visage de la maladie telle qu'elle est connue en pays tempérés et en zone tropicale dès que les conditions d'élevage s'intensifient comme cela a été décrit précédemment.

Avec un mode d'élevage extensif, en zone d'enzootie, la brucellose se caractérise par un faible nombre d'avortements. En Afrique centrale le taux d'avortement brucellique a été évalué à 2 - 10 % [28]. En moyenne 5,4 % des femelles avortent au moins une fois en 5 ans. L'infection chronique est de règle et les animaux présentent fréquemment des atteintes articulaires en particulier des hygromas. Des études menées en Afrique mettent en évidence une relation étroite entre la présence d'hygroma et une sérologie positive avec 85,2 % de concordance [2].

Tableau VIII : Concordance hygroma-sérologie d'après [2]

pays	Avortement Nbre de cas observés	sérologie positive
Burkina	7	5
Cameroun	7	5
Togo	13	13
Total	27	23

Cette relation entre le pourcentage d'hygromas et le pourcentage d'avortement est de type linéaire et pour le cas de l'Afrique centrale Domenech [27p276] a calculé l'équation

$$y = 0,15 + 0,66x \pm 1\%.$$

Les hygromas sont bien connus des éleveurs et ils constituent un moyen efficace de dépister les troupeaux fortement infectés. Ils permettent en outre de se faire une idée de l'importance de la maladie en dehors d'une enquête sérologique [30].

6. Importance économique de la brucellose

6.1. Perte de productivité

En Afrique centrale où la prévalence de la Brucellose bovine est importante avec environ 30% des femelles reproductrices sérologiquement positives, les pertes liées à la brucellose sont dues aux avortements qui détériorent les indices de fécondité : pour les femelles séronégatives on trouve une fécondité moyenne de 63,3 % qui passe à 54,4 % chez les femelles séropositives. Pour un troupeau avec 30 % de femelles positives on obtient donc une fécondité globale de 60,5 %.

De plus les veaux nés de mère séropositive ont un taux de mortalité de 14 % contre 12,5 % pour les veaux nés de mère indemne [31]. Ces chiffres sont en accord avec les résultats trouvés dans le sud du Soudan [57] qui évaluent à 10 % la baisse du nombre de naissances de veaux avec un taux de séoprévalence de 25 %.

La perte en production laitière suite aux phénomènes inflammatoires au niveau de la mamelle est de l'ordre de 10 % [17].

En fonction des caractéristiques économiques de la région, ces pertes représentent en Afrique centrale environ 6 % du revenu brut par animal [32].

6.2. Coûts de santé publique

La brucellose est une zoonose. A ce titre elle occasionne des pertes, tant en travail qu'en coûts de traitements. L'analyse des coûts liés à la santé humaine n'a pas été réalisée en Afrique mais l'infection humaine n'est certainement pas rare. Une enquête réalisée au Bénin chez des éleveurs a révélé 17,7 % d'individus à sérologie positive avec 2 personnes sur 24 présentant des symptômes de brucellose chronique [7].

En Amérique latine l'évaluation des pertes liées causées par la brucellose bovine est de 240 à 600 millions de dollars selon les auteurs [54, 43] auxquels il faudrait encore ajouter un montant de 600 \$ par malade [54].

6.3. Obstacle à l'exportation

Cet aspect est particulièrement important dans les pays développés tels que l'Europe et les Etats-Unis qui sont de gros exportateurs. Ces pays mettent en oeuvre des plans d'éradication extrêmement lourds et coûteux.

7. La brucellose humaine

La brucellose est une zoonose exclusive. L'infection humaine se fait toujours à la suite d'une contamination animale. Plusieurs espèces de *Brucella* sont susceptibles d'infecter l'homme, provoquant une atteinte plus ou moins grave selon l'espèce en cause et la taille de l'inoculum.

Tableau IX : Espèces de *Brucella*, hôtes animaux et pathogénie pour l'homme d'après [5]

Espèce ^a du genre <i>Brucella</i>	Hôtes naturels	Autres espèces animales touchées	Maladie humaine
<i>B. melitensis</i>	caprins, ovins	animaux sauvages, bovins	grave
<i>B. suis</i>	porcins, lièvres, rennes	différentes espèces de faune sauvage	grave (excepté biovar 2)
<i>B. abortus</i>	bovins	ruminants sauvages, buffles d'eau	moins grave
<i>B. canis</i>	chiens	néant	bénigne
<i>B. ovis</i>	ovins (béliers)	néant	néant

^a une sixième espèce, *B. neotomae*, n'a été observée que chez le néotome américain et ne présente guère d'intérêt pratique.

7.1. Modes de contamination

La voie d'inoculation la plus efficace chez l'homme est la voie cutanée. Lors de contact entre l'homme et des animaux ou de matières contaminées telles que le lait ou le fumier, les *Brucella* passent la barrière cutanée au niveau des coupures et des érosions.

La voie orale est moins efficace, ce qui limite les risques de contamination par ingestion de lait et de produits dérivés. C'est surtout vrai pour *B. abortus* qui est plus sensible à l'acidité gastrique que *B. melitensis* et *B. suis*.

La contamination par aérosol a été mise en évidence aux Etats-Unis dans des abattoirs de porcs. Une grande partie des cas de brucellose dans ce pays est d'ailleurs due à *B. suis* [66].

Du point de vue épidémiologique, deux populations sont donc à prendre en considération

- les populations à haut risque :
éleveurs, ouvriers d'abattoirs et personnel vétérinaire qui peuvent entrer en contact direct avec des matières contaminées, et ce fréquemment. D'autant plus que certaines pratiques d'élevage peuvent fortement augmenter ce risque comme l'hébergement des très jeunes animaux dans l'habitation familiale ou l'insufflation vaginale des vaches avorteuses pour favoriser un démarrage de lactation [2, 57].

Parmi les populations à risque il faut mentionner également le personnel des laboratoires qui manipule des cultures de *Brucella* et est exposé au risque de contamination par inhalation, ingestion accidentelle lors de pipetage des cultures et projections de gouttelettes virulentes dans l'oeil. Les vaccins animaux sont en principe sans danger pour l'homme mais des cas de brucellose aigüe ont été déclarés chez des vétérinaires suite à une administration accidentelle.

- L'ensemble de la population en zone d'enzootie peut être concernée par une contamination orale, les principaux responsables étant les produits laitiers contaminés par *B. melitensis* : lait de chèvre ou de brebis, mais aussi lait de vache si celle-ci est élevée avec des petits ruminants infectés. Les produits laitiers peuvent contenir des *Brucella* pendant des durées variables en fonction du traitement technologique. La pasteurisation est efficace vis-à-vis de *Brucella* et la maturation des fromages, si elle dépasse trois mois est en général suffisante pour assurer l'inocuité des produits [44, 66].

Tableau X : Survie des *Brucella* dans les produits laitiers d'après [45,66]

Produit laitier	Espèce	Durée de survie	Température (°C)	pH
Lait	<i>B. abortus</i>	5-15 secondes	72°C	
	<i>B. abortus</i>	1 jour	35-37°C	
	<i>B. abortus</i>	18 mois	0°C	
	<i>B. abortus</i>	24 h	25 - 37	-
	<i>B. abortus</i>	18 mois	0	-
	<i>B. abortus</i>	< 9 h	38	4,0
Crème	<i>B. abortus</i>	6 semaines	4	-
	<i>B. melitensis</i>	4 semaines	4	-
Crème glacée	<i>B. abortus</i>	30 jours	0	-
Beurre	<i>B. abortus</i>	142 jours	8	-
Fromages				
divers	<i>B. abortus</i>	6 - 57 jours	-	-
Feta	<i>B. melitensis</i>	4 - 16 jours	-	-
Pecorino	<i>B. melitensis</i>	< 90 jours	-	-
Roquefort	<i>B. abortus</i>	2 mois	-	-
Erythrée	<i>B. melitensis</i>	44 jours	-	-
divers	<i>B. melitensis</i>	15 - 100 jours	-	-
Cheddar	<i>B. abortus</i>	6 mois	-	-
Fromage	<i>B. melitensis</i>	1 - 8 semaines	-	5,0 - 7,6
Petit lait	<i>B. abortus</i>	< 4 jours	17 - 24	4,3 - 5,9

Le bassin méditerranéen où l'élevage de petits ruminants et la consommation de lait et de fromages frais sont importants est la zone où la brucellose humaine pose les plus graves problèmes : plusieurs pays de cette région déclarent à l'OMS plus de 90 000 cas par an concentrés autour de la saison d'agnelage [1].

Plusieurs enquêtes réalisées en France[44] montrent que la maladie est prédominante dans les zones d'élevage ovin pratiquant la transhumance.

- 42 % des personnes infectées appartiennent à des professions à risque dont 23 % d'agriculteurs et 13 % de professionnels de la viande.
- 58 % des personnes n'exercent pas une profession à risque et se sont infectées en consommant du fromage de chèvre (54 %), par contact avec des animaux infectés (18 %), en manipulant du fumier (18 %) ou en consommant du lait de vache cru (16 %).

La contamination par voie orale à partir de produits carnés a été également mise en évidence au Nord- Canada et en Alaska avec des infections humaines à *B. suis* biovar 4 en relation avec une consommation habituelle de viande et de moelle osseuse de caribou [66, 40].

L'ingestion du sang d'un animal vivant pourrait également être un risque important de contamination mais n'a jamais été investiguée [19, 66].

7.2. Symptomatologie [89]

L'infection inapparente est de règle même pour les *Brucella* les plus pathogènes. On évalue à 1: 8 le ratio malade : infectés [66].

Le niveau de satisfaction des besoins nutritionnels et la présence de maladies intercurrentes jouent un rôle important dans la résistance à l'infection.

Tableau XI : Quelques caractéristiques de la brucellose humaine, importantes pour l'évaluation des traitements [73]

Fréquence de l'infection asymptomatique
Tendance à la guérison spontanée
Multiplication intracellulaire
Polymorphisme clinique
Focalisation
Rechutes
Inexistence de critères définis de guérison (Cliniques ou sérologiques)
Possibilité de réinfections dans un milieu endémique

7.2.1. Atteinte générale

La durée d'incubation est très variable, d'environ 3 semaines. La maladie se déclare avec l'apparition d'une fièvre dite ondulante du fait de l'allure irrégulière de la courbe de température. Elle s'accompagne fréquemment de sueurs nocturnes à odeur de "paille pourrie" et de douleurs diffuses, de myalgies et d'arthralgies. Le malade ressent une impression de fatigabilité, de faiblesse voire de dépression ; l'anorexie est fréquente. A la palpation on détecte parfois une splénomégalie et une lymphadénite non douloureuse.

Ces symptômes ne sont pas pathognomoniques mis à part l'odeur particulière de la sueur et ils sont rarement tous présents : par exemple la fièvre peut être légère ou absente dans environ 30 % des cas de brucellose clinique [73].

Le polymorphisme de la maladie est très favorable à la confusion, en particulier dans les zones d'endémie paludéenne. De plus, des infections à *B. abortus* moins graves se traduisent souvent par un syndrome fébrile transitoire souvent négligé. La brucellose est de ce fait une maladie vraisemblablement sous diagnostiquée.

7.2.2. Focalisation de la maladie

7.2.2.1. Appareil génital

Les patients masculins expriment une orchite dans 2 à 20 % des cas

En revanche il n'y a pas de tropisme génital chez la femme : même en cours de grossesse, la brucellose ne déclenche pas d'avortement.

7.2.2.2. Appareil digestif

Les manifestations digestives, avec une douleur dans le cadran inférieur droit simulant une crise d'appendicite sont assez fréquentes surtout en cas de contamination par voie orale.

7.2.2.3. Appareil urinaire

On observe parfois une atteinte rénale avec une néphrite évoluant en pyélonéphrite ou formation d'abcès dans la corticale.

7.2.2.4. Oeil

Les patients atteints de brucellose présentent fréquemment une uvéite qui serait plus liée à un dépôt d'immuns complexes qu'à un foyer infectieux localisé à l'œil.

7.2.2.5. Coeur

L'endocardite brucellose est rare mais elle est régulièrement mortelle en l'absence de soins. La plupart des cas mortels de brucellose sont attribués à une atteinte valvulaire par *B. abortus* aux Etats-Unis et au Royaume-Uni.

7.2.2.6. Foie

Une atteinte hépatique avec des lésions de type granulomateux est inconstante. Chez des patients en phase chronique on peut observer des abcès au foie et à la rate.

7.2.2.7. Système nerveux central

L'atteinte est rare.

7.2.2.8. Atteintes ostéoarticulaires

la fréquence de ce type de lésion est très variable selon les auteurs. Elles apparaissent essentiellement chez des personnes en phase chronique c'est-à-dire plus d'un an après l'expression des premiers symptômes. Ces lésions sont susceptibles de laisser des séquelles après guérison du malade et toutes les espèces de *Brucella* peuvent les provoquer.

Les localisations préférentielles sont la partie lombaire de la colonne vertébrale avec développement d'une spondylite et occasionnellement d'abcès paravertébraux et d'ostéomyélite sur les corps vertébraux adjacents. Le patient souffre alors de sciatique particulièrement douloureuse.

Les autres articulations impliquées sont celles des membres inférieurs et la jonction sacro-iliaque.

On peut également observer des atteintes articulaires aseptiques de type rhumatoïde, liées au dépôt d'immuns-complexes à ce niveau.

7.3. Traitement

Il n'existe pas de traitement efficace à 100 % et les rechutes sont fréquentes. Le traitement qui donne actuellement les meilleurs résultats est l'association Doxycycline-Streptomycine [78]. Les quinolones et les céphalosporines de 3^e génération pourraient représenter une alternative intéressante [4]. Leur activité in vitro est excellente et ces molécules sont connues pour leur bonne pénétration cellulaire [72].

Quel que soit le traitement utilisé les durées sont longues, de l'ordre de 4 à 6 semaines, d'où un coût important et d'éventuels problèmes de disponibilité des médicaments dans certains pays.

Conclusion

La brucellose a une double importance économique et sanitaire du point de vue de la santé humaine.

Du point de vue économique la brucellose n'est pas une maladie prioritaire dans les zones où sévissent d'autres maladies telles que la peste bovine qui cause des ravages bien plus importants. Dans ces zones où la brucellose est enzootique elle peut cependant poser un problème graves lorsque les pratiques d'élevage évoluent vers un mode concentrationnaire. L'intensification de l'élevage, comme par exemple les élevages laitier en zone péri-urbaine en Afrique, doit tenir compte de ce paramètre [2, 28, 32].

La lutte contre la brucellose en zone d'endémie ne peut reposer sur des campagnes de dépistage-abattage ; dès lors seule la vaccination est envisageable [17, 63].

Il ne serait pas économiquement rentable de l'appliquer dans tous les élevages et elle devrait être réservée aux troueaux où la prévalence dépasse 20 % d'animaux positifs [32]. Les nouvelles méthodes de vaccination à dose réduite permettent d'envisager la mise à disposition de vaccins à un coût compatible avec la rentabilité économique pour un plus grand nombre d'éleveurs [55].

Dans un premier temps l'élément essentiel menant à une diminution de la prévalence de la brucellose bovine sera une information des éleveurs afin de les sensibiliser au danger de certaines pratiques telles que le percement des hygromas [2], et favoriser la maîtrise de la contamination par des techniques faciles à mettre en oeuvre telles que la destruction des produits d'avortement, l'élimination préférentielle des femelles avorteuses ou porteuses d'hygroma idéalement la séparation des femelles ayant avorté pendant quelques jours...

L'exemple des éleveurs du plateaux du Nord-Cameroun montre qu'avec quelques pratiques simples le taux de prévalence constaté est inférieur à celui attendu étant données le mode d'élevage [28].

De plus l'information des éleveurs revêt une importance en santé publique puisque ces derniers sont les principaux intéressés par la maladie. Il est important d'attirer leur attention sur le danger que peuvent représenter les femelles ayant avorté ainsi que les produits de l'avortement.

Bibliographie

- [1] ABDOU A.E., 1996. Overview of the major bacterial zoonoses situation in the mediterranean region. *Inf. Circ. WHO Mediterr. Zoon. Control Cent.* (41) pp. 2-3.
- [2] AKAPO A.J., 1987. Brucelloses animales en Afrique tropicale. Particularités épidémiologique, clinique et bactériologique. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **40** (4) pp. 307-320.
- [3] AKHTAR S., MIRZA M.A., 1995. Rates of seroconversion in the progeny of *Brucella abortus* seropositive and seronegative cattle and buffalo. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **14** (3) pp. 711-718.
- [4] AKOVA M., 1997. Quinolone treatment of human brucellosis : comparative trial of Ofloxacin- Rifampin versus Doxycycline- Rifampin. *Inf. Circ. WHO Mediterr. Zoon. Control Cent.* (43) p. 8.
- [5] ALTON G.G., PLOMMET M., 1986. Brucellose : le sommet de Genève. *Chronique OMS* **40** (1) pp. 20-22.
- [6] Anonyme. 1997. WHO meeting on developpement of new/improved animal Brucellosis vaccines - Geneva, 11-12 December 1997. *Inf. Circ. WHO Mediterr. Zoon. Control Cent.* (44) p. 6- 7.
- [7] AUDURIER A., FAYOMI B., LAUDAT P., ZOHOUNI, 1987. Diagnostic sérologique de la brucellose humaine au Bénin. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **40** (4) pp 347-348.
- [8] BELZER C.A., TABATABAI L.B., DEYOE B.L., 1991. Differentiation by western blotting of immune responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or infected experimentally or naturally with virulent *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* **27** pp. 79-90
- [9] BERCOVICH Z., TER LAAK E.A., LIPZIG J.H.H., 1992. Detection of brucellosis in dairy herds after an outbreak of the disease using a delayed-type hypersensitivity test. *Prevent. Vet. Med.* **13** pp. 277-285.
- [10] BERMAN D.T., 1977. *In: Brucellosis Research : an evaluation.* National Research Council, National Academy of Sciences, Washington D.C., USA. Chapter 7.
- [11] BERTRAM T.A., CANNING P.C., ROTH J.A., 1986. Preferential inhibition of primary granule release from bovine neutrophils by an extract from *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* **52** p. 285.
- [12] CANNING P.C., ROTH J.A., TABATAI L.B., DEYOE B.L., 1985. Isolation of components of *Brucella abortus* responsible for inhibition of function in bovine neutrophils. *J. Inf. Dis.* **152** p. 913.
- [13] CANNING P.C., DEYOE B.L., ROTH J.A., 1988. Opsonin-dependent stimulation of bovine neutrophil oxidative metabolism by *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* **49** pp160.

- [14] CHAND P., SADANA J.R., BATRA H.V., 1990. Comparison of a dot-ELISA and a plate-ELISA for bovine brucellosis diagnosis. *Vet. Rec.* **127**, pp. 169-170.
- [15] CHERWONOGRODZKY J., DUBRAY G., MORENO E., MAYER H., 1990. Antigens of *Brucella*. In : Nielsen and Duncan eds. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, USA : CRC Press, pp. 19-64.
- [16] CHEVILLE N.F., ROGERS D.G., DEYOE W.L., KRAFSUR E.S., CHEVILLE J.C., 1989. Uptake and excretion of *Brucella abortus* in tissues of the face fly (*Musca autumnalis*). *Am. J. Vet. Res.* **50** (8) pp. 1 302-1 306.
- [17] Comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose, 1986. sixième rapport. Genève : OMS, 740, 145 p.
- [18] CORBEL M. J., 1985. Comparison of *Brucella abortus* and *B. melitensis* antigens for the Rose Bengal plate test on sera from cattle infected with *B. abortus* biovar 5. *Vet. Rec.* **117** pp. 385 - 386.
- [19] CORBEL M.J., 1989. Brucellosis : Epidemiology and prevalence world wide In : Young and Corbel eds. *Brucellosis : clinical and laboratory aspects*. Boca Raton USA, CRC press, pp. 25-40.
- [20] CORBEL M.J., 1989. Microbiology of the genus *Brucella*. In : Young and Corbel eds. *Brucellosis : clinical and laboratory aspects*. Boca Raton USA, CRC press, pp. 53-72.
- [21] CORBEL M.J., 1972. Identification of the immunoglobulin class active in the Rose Bengal plate test for bovine brucellosis. *J. Hyg.* **70** p. 779
- [22] CRAWFORD R.P., HUBER J.D., ADAMS B.S., 1990. Epidemiology and surveillance. In : Nielsen and Duncan eds. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, USA : CRC Press, pp. 131-151
- [23] CRAWFORD R.P., ADAMS L.G., FICHT T.A., TEMPLETON J.W., WILLIAMS J.D., 1991. Effect of stage of gestation on efficacy of *Brucella abortus* strain 19 vaccination in cattle. *Am. J. Vet. Res.* **52** (11) pp. 1 848-1 851.
- [24] DALRYMPLE M., 1993. Model for assessing the risk of introducing brucellosis into a brucellosis-free area. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **12** (4) pp. 1 175-1 186.
- [25] DAVIS D.S., 1990. Brucellosis in wildlife. In : Nielsen and Duncan eds. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, USA : CRC Press, pp. 324-334
- [26] DIAZ R., LEVIEUX D., 1972. Rôle respectif en sérologie de la brucellose bovine des antigènes et des immunoglobulines G1 et G2 dans les tests d'agglutination, de Coombs et au Rose Bengale ainsi que dans le phénomène de zone. *C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci.* **274** (10) pp. 1 593 - 1 595.
- [27] DOMENECH J., 1988. Aspects biogéographiques, épidémiologiques et économiques de la pathologie de la reproduction des bovins en Afrique centrale, notamment de la brucellose. Thèse doct. Sciences Naturelles. Université Paris XII, France.

- [28] DOMENECH J., LUCET P., VALLAT B., STEWART C., BONNET J.B., BERTAUDIÈRE L., 1980. La brucellose bovine en Afrique centrale- II. Etude clinique et épidémiologique : particularités régionales et problèmes de l'élevage semi-intensif. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **33** (3) pp. 277-284.
- [29] DOMENECH J., 1987. Importance des brucelloses animales en Afrique centrale. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **40** (4) pp. 321-324.
- [30] DOMENECH J., LUCET P., GRILLET C., 1980. La brucellose bovine en Afrique centrale- I. Méthodes d'enquête utilisables en milieu tropical. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **33** (3) pp. 271-276.
- [31] DOMENECH J., LUCET P., VALLAT B., STEWART C., BONNET J.B., HENTIC A., 1982. La brucellose bovine en Afrique centrale- III. Résultats statistiques des enquêtes menées au Tchad et au Cameroun. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **35** (1) pp. 15-22.
- [32] DOMENECH J., COULOMB J., LUCET P., 1982. La brucellose bovine en Afrique centrale- IV. Evaluation de son incidence économique et calcul du coût-bénéfice des opérations d'assainissement. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **35** (2) pp. 113-124.
- [33] DURAND M.P., CHATAGNON G., LEGARDINIER J.C., 1984. Prophylaxie de la brucellose bovine - Etude comparée du test de l'anneau (Ring-Test) et du test Elisa sur les laits. *Bull. Acad. Vét. de France*, **57**, pp. 109-118.
- [34] DURAND M.P., LEPLATRE J., 1984. Etude sur les sérologies bovines observées après inoculation de faibles quantités de B19 - Note à propos d'une contamination accidentelle après vaccination anti-aphteuse. *Bull. Acad. Vét. de France*, **57**, pp. 55-60.
- [35] ENRIGHT F.M., 1990. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In : Nielsen and Duncan eds. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, USA : CRC Press, pp. 301-320
- [36] ERASMUS J.A., ERASMUS M.C., 1987. The use of reduced-dose *Brucella abortus* strain 19 vaccine in the control of bovine brucellosis. *J. South Afric. Vet. Assoc.* **2**, pp. 71-75.
- [37] FENSTERBANK R., PLOMMET M., 1979. Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. IV Comparison between two methods of vaccination. *Ann. Rech. Vét.* **10** (1) pp. 131-139.
- [38] FERNEY J., CHANTAL J., 1976. Aspects cliniques et épidémiologiques de la brucellose bovine en Afrique tropicale. In : *International Symposium on Brucellosis (II), Rabat 1975. Develop. biol. Standard*. S.KARGER ed. Basel, Switzerland. **31** pp 274-278.
- [39] FERNEY J., 1987. Le chien, vecteur ou réservoir de l'infection brucellique. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **40** (4) pp. 331-333.
- [40] FORBES L.B., 1991. Isolates of *Brucella suis* biovar 4 from animals and humans in Canada, 1982 -1990. *Can. Vet. J.* **32** pp. 686-688.

- [41] FORBES L.B., TESSARO S.V., 1993. Transmission of brucellosis from reindeer to cattle. *J.A.V.M.A.* **203** (2) pp. 289-294.
- [42] FORBES L.B., 1990. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. *J.A.V.M.A.* **196** (6) pp. 911-916.
- [43] GARCIA-CARILLO C., 1990. Brucellosis in the Americas. Office International des Epizooties, Paris, France.
- [44] GARIN-BASTUJI B., 1994. Brucelloses humaine et animale : une évolution favorable, une éradication difficile. *Point Vét.*, **26** (numéro spécial) pp. 851-858.
- [45] GARIN-BASTUJI B., 1993. Brucelloses bovine, ovine et caprine : contrôle et prévention. *Point Vét.* **25** (152) pp. 107-114.
- [46] GARIN-BASTUJI B., 1993. Le lipopolyoside S des *Brucella* en phase lisse : approche immuno-chimique - Intérêt dans le diagnostic des brucelloses. Thèse doct. Sciences de la Vie, université de Tours, France.
- [47] GARIN-BASTUJI B., 1993. Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés - Le cas des sérologies atypiques en brucellose bovine. *Point Vét.* **25** (152) pp 115-124
- [48] HARMON B.G., ADAMS G.L., FREY M., 1988. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *Am. J. Vet. Res.* **49** (7) pp. 1 092-1 097
- [49] HARMON B.G., ADAMS G.L., TEMPLETON J.W., SMITH R., 1989. Macrophage function in mammary glands of *Brucella abortus*-infected cows and cows that resisted infection after inoculation of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* **50** (4) pp. 459-465.
- [50] KALLAND J., 1980. Alterations of antibody response in female mice after neonatal exposure to diethylstilbestrol. *J. Immunol.* **124** (1) pp. 194-198.
- [51] KEPPIE J., WILLIAMS A.E., WITT K., SMITH H., 1965. The role of erythritol in tissue localization of the *Brucellae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **46**, p 104
- [52] KERKHOFS P., BOTTON Y., THIANGE P., LIMET J.N., 1989. Le dépistage de la brucellose bovine par ELISA sur le lait. *Ann. Méd. Vet.* **133** pp. 663-672
- [53] KITA J., ANUSZ K., 1991 Serologic survey for bovine pathogens in free-ranging european bisons from poland. *J. wildlife diseases* **27** (1) pp. 16-20.
- [54] LOPEZ-MERINO A., 1989. Brucellosis in Latin America. In : Young and Corbel eds. Brucellosis : clinical and laboratory aspects. Boca Raton USA, CRC press, pp. 151-161.
- [55] MARTRENCHAR A., BOUCHEL D., NJANPOP. B.M., YAYA A., 1995. Utilisation de la souche B19 dans la prophylaxie médicale de la brucellose bovine au Nord-Cameroun. Etude de l'effet de la dose sur le taux et la durée de séroconversion chez des femelles zébus. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **48** (1) pp. 37-40.

- [56] MARTRENCHAR A., NJANPOP. B.M., YAYA A., NJOYA A., TULASNE J.J., 1993. Problems associated with tuberculosis and brucellosis skin test methods in northern Cameroon. *Prevent. Vet. Med.* **15** pp. 221-229.
- [57] Mc DERMOTT J.J., DENG K.A., JAYATILEKA T.N., EL JACK M.A., 1987. A cross-sectionnal cattle disease study in Kongor rural council, southern Sudan - II. Brucellosis in cows : associated factors, impact on production and disease control considerations. *Prev.vet. Med.* **5** pp. 125-132.
- [58] Mc MILLAN A.,1990. Conventional serological tests. *In* : Nielsen and Duncan eds. Animal Brucellosis. Boca Raton, USA : CRC Press, pp. 153 - 197
- [59] MEYER M., 1990. Current concepts in the Taxonomy of the genus *Brucella*. *In* : Nielsen and Duncan eds. Animal Brucellosis. Boca Raton, USA : CRC Press, pp. 1-18.
- [60] MOORE C.G., SCHNURRENBERGER P.R., 1981. A review of naturally occurring *Brucella abortus* infections in wild mammals. *J.A.V.M.A.* **179** (11) pp. 1 005-1 012.
- [61] MORENO E., MAYER H., MORIYON I., 1987. Characterization of a Native Polysaccharide Hapten from *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* **55** (11) pp. 2 850-2853.
- [62] NICOLETTI P., 1992. An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Trop. Anim. Health. Prod.* **24** 40-44
- [63] NICOLETTI P.L., 1984. The control of brucellosis in tropical and subtropical regions. *Prev. Vet. Med.* **2** pp. 193-196.
- [64] NICOLETTI P., WINTER A.J., 1990. The immune response to *B.abortus* : the cell-mediated response to infections.*In* : Nielsen and Duncan eds. Animal Brucellosis. Boca Raton, USA : CRC Press, pp. 83-95.
- [65] NICOLETTI P., 1990. Vaccination. *In* : Nielsen and Duncan eds. Animal Brucellosis. Boca Raton, USA : CRC Press, pp. 283-299
- [66] NICOLETTI P.L., 1989. Relationship. between animal and human disease. *In* : Young and Corbel eds. Brucellosis : clinical and laboratory aspects. Boca Raton USA, CRC press, pp. 41-51.
- [67] O.I.E., 1996. Bovine Brucellosis *In* : Manual of standards for diagnostic Test and Vaccines. Chapter 3.2.1. OIE Paris, France. pp. 242-255.
- [68] PLOMMET M., FENSTERBANK R.,1983. La vaccination antibrucellique administrée par voie conjonctivale. *Develop. Biol. standard.* **56**, pp. 681-687.
- [69] PLOMMET M., FENSTERBANK R., RENOUX G., 1990. Brucellose bovine expérimentale, XII - Persistance à l'âge adulte de l'infection congénitale de la génisse. *Ann. Rech. Vét.* **21** (4) pp. 419-435.
- [70] POTTS A. D., 1993. The use of EDTA in microtitration serum agglutination test in bovine brucellosis. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **60** pp. 47-50.

- [71] RAY C.W., BROWN R.R., STRINGFELLOW D.A., SCHNURRENBERGER P.R., SCANLAN C.M., SWANN A.I., 1988. Bovine brucellosis : an investigation of latency in progeny of culture positive cows; *JAVMA* **192** (2) pp. 182-186.
- [72] RODRIGUEZ-TORRES A. 1987. Traitement de la brucellose humaine. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **40** (4) pp373-379.
- [73] RODRIGUEZ-TORRES A., 1987. Situation actuelle et problèmes posés par la brucellose humaine. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **40** (4) pp. 335-339.
- [74] ROEPKE M.H., STILES F. C., 1970. Potential efficiency of Milk Ring Test for detection of brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* **31** (12) pp. 2 145 - 2 149.
- [75] SANDHU K.S., JOSHI D.V., 1993. Comparative study in cattle and buffaloes for evaluation of various diagnostic tests for brucellosis. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **36** 4 pp. 458-465.
- [76] SCHURIG G., GILSDORF M., 1997. Use of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to protect cattle and avoid serological interference on diagnostic tests. In : XV International symposium of W.A.V.M.I. : Salmonellosis and brucellosis as world health problems in humans and animals. Feb, 16-21, 1997. Nicosia, Cyprus.
- [77] SIMINTZIS G., 1972. Contribution a l'étude de la brucellose du lièvre (*Lepus europeus*). *Bull. Soc.Vet. et Méd. Comparée* **74** pp. 43-47.
- [78] SOLER J., 1997. Doxycycline - Rifampin versus Doxycycline - Streptomycin in treatment of human Brucellosis due to *Brucella melitensis*. *Inf. Circ. WHO Mediterr. Zoon. Control Cent.* (43) p. 9.
- [79] SUTHERLAND S. S., SEARSON J., 1990. The immune response to *Brucella abortus* : the humoral response. In : Nielsen and Duncan eds. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, USA : CRC Press, pp. 65-81.
- [80] SUTRA L., DUBRAY G., 1987. Interprétation des discordances entre le Ring Test et les épreuves sérologiques utilisés dans le dépistage de la brucellose bovine. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France*, **71** (10) pp. 565 - 577.
- [81] TESSARO S.V., 1986. The existing potential of brucellosis and tuberculosis in canadian wildlife : a review. *Can. Vet. J.* **27** pp. 119-124.
- [82] THIMM B., WUNDT W., 1976. The epidemiological situation of brucellosis in Africa. In : *International Symposium on Brucellosis (II), Rabat 1975. Develop. biol. Standard.* S.KARGER ed. Basel, Switzerland. **31** pp. 201-217.
- [83] TRAP. D., GARIN B., MOUTOU F., GAUMONT R., 1985. Brucellose bovine : élimination des séroagglutinations non-spécifiques par l'emploi de l'EDTA et de l'agglutination à 56°C. *Revue Méd. Vét.* **136** (5) pp. 399 - 409.
- [84] VALETTE L., 1987. La réaction ELISA dans le diagnostic de la brucellose animale. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* **40** (4) pp. 341-345.

- [85] VAZ Y.M., 1996. Analysis of policies for the eradication of brucellosis from sheep and goats in Portugal. Thesis Doct. of Philosophy, University of Reading, England. 323 p.
- [86] VERGER J.M., GRIMONT F., GRIMONT P.A.D., GRAYON M., 1985. *Brucella*, a monospecific species as shown by deoxyribonucleic acid hybridation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, pp. 292-295.
- [87] WILLIAMS E.S., THORNE E.T., ANDERSON S.L., HERRIGES J.D.Jr., 1993. Brucellosis in free-ranging Bison (*Bison bison*) from Teton County, Wyoming. *J. wildlife diseases* **29** (1) pp. 118-122.
- [88] WILSON G.S., MILES A.A., 1932. The serological differentiation of smooth strains of the *Brucella* group. *Br.J. Exp. Pathol.* **13** pp1-13.
- [89] YOUNG E.J., 1989. Clinical manifestations of human brucellosis. In : Young and Corbel eds. Brucellosis : clinical and laboratory aspects. Boca Raton USA, CRC press, pp. 97-126.
- [90] ZYGMUNT M.S., DUBRAY G., BUNDLE D.R., PERRY M.P., 1988. Purified native haptens of *Brucella abortus* B19 and *B. melitensis* 16M reveal the lipopolysaccharide origin of the antigens. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **139**, pp. 421-433.
- [91] ZYGMUNT M.S., DUBRAY G., LIMET J.N., CLOECKAERT A., JACQUES I., VO TK-O., 1991. Antigenic structure of *Brucella* : protective and diagnostic antigens. In : Symposium of the Federation of European Microbiological Societies, Izmir Turkey. September 24-26. The Turkish Microbiological Society, Istanbul Turkey. **16** pp. 27-37.

Annexes

Annexe 1

BOVINE BRUCELLOSIS

SUMMARY

Bovine brucellosis is usually caused by Brucella abortus, less frequently by B. melitensis, and rarely by B. suis. It is manifested by abortion, with excretion of the organisms in uterine discharges and in milk. Diagnosis depends on the isolation of Brucella from abortion material, udder secretion or from tissues removed at post-mortem. Alternatively, specific cell-mediated or serological responses to Brucella antigens can be demonstrated.

B. abortus, B. melitensis and B. suis are highly pathogenic for humans, and all infected tissues, cultures and potentially contaminated materials must be handled under conditions for biohazard containment.

Identification of the agent: *The demonstration by modified acid-fast or immunospecific staining of organisms of Brucella morphology in abortion material or vaginal discharges provides presumptive evidence of brucellosis, especially if supported by serological tests. Whenever possible, the organism should be isolated, and the species and biovar should be identified by phage lysis and/or oxidative metabolism tests, and by cultural, biochemical, and serological criteria. The recently developed polymerase chain reaction and DNA probe methods provide additional means of detection.*

Serological tests: *The buffered Brucella antigen tests (rose bengal plate agglutination test and buffered plate agglutination test) are suitable for screening herds and individual animals. The reactivity of positive samples should be confirmed by the complement fixation test or by enzyme-linked immunosorbent assay. The latter procedures can also be used for both screening and confirmation. The serum agglutination test is inferior to other tests in specificity and sensitivity, and is not recommended if other procedures are available. The milk ring test performed on bulk milk samples is effective for screening and monitoring dairy cattle for brucellosis, but is less reliable in large herds and is less sensitive with B. melitensis. Another immunological test is the brucellin skin test, which can be used for screening unvaccinated herds, provided that a purified, standardised antigen preparation (e.g. brucellin INRA) is available.*

Requirements for vaccines and diagnostic biologicals: *B. abortus Strain 19 live vaccine should be prepared from US-derived seed cultures¹, and each batch must conform to minimum standards for viability, smoothness, pathogenicity and ability to immunise guinea pigs and/or mice against challenge with a virulent Strain of B. abortus. B. melitensis Strain Rev. 1 vaccine may be used to immunise cattle at risk of infection with B. melitensis. It should be prepared from approved seed cultures, and each batch must conform to minimum standards similar to those for B. abortus Strain 19 vaccine. B. abortus Strain 45/20 adjuvant vaccine can be used to immunise cattle of all ages over 6 months, including pregnant animals. It must be prepared from a rough seed strain and each batch must be checked for efficacy and to ensure that it lacks toxicity and does not provoke excessive local reaction or induce agglutinating antibody. Brucellin preparations for the intradermal test must be free of lipopolysaccharide and must not produce nonspecific inflammatory reactions or interfere with serological tests. Diagnostic antigens must be prepared from approved smooth strains of B. abortus and comply with minimum standards for identity, purity, sensitivity and specificity. Antigens for serological tests should be standardised against standard sera calibrated against the International Standard B. abortus serum.*

¹ Obtainable from the United States Department of Agriculture (USDA), National Veterinary Services Laboratory (NVSL), 1800 Dayton Road, Ames, Iowa 50010, United States of America (USA).

A. DIAGNOSTIC TECHNIQUES

Brucellosis in cattle (also called Bang's disease, contagious abortion) is usually caused by biovars of *Brucella abortus*. In some countries, particularly in southern Europe and western Asia, where cattle are kept in close association with sheep or goats, infection can also be caused by *B. melitensis*. *B. suis* rarely causes infection in cattle. The disease is usually asymptomatic in nonpregnant females, but adult male cattle may develop an orchitis. Following infection with *B. abortus* or *B. melitensis*, pregnant adult females develop a placentitis usually resulting in abortion between the 5th and 9th month of pregnancy. Even in the absence of abortion, profuse excretion of the organism occurs in the placenta, fetal fluids and vaginal discharges. The mammary gland and associated lymph nodes may also be infected, and organisms may be excreted in the milk. Subsequent pregnancies are usually carried to term, but uterine and mammary infection recurs, with reduced numbers of organisms in cyetic products and milk. In acute infections, the organism is present in most major body lymph nodes. Brucellosis may be a cause of infertility and returns to service. Hygromas, usually involving leg joints, are a common manifestation of brucellosis in some tropical countries and may be the only obvious indicator of infection; the hygroma fluid is often infected with *Brucella*. An arthropathy, usually affecting the femoro-tibial joint, has been recognised as an infrequent complication of vaccination with strain 19 vaccine (5, 9).

Brucellosis has also been reported in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*) and in the two-humped camel (*C. bactrianus*), especially when they are in contact with large and small ruminants infected with *B. abortus* or *B. melitensis*. In addition, brucellosis has been observed in the domestic buffalo (*Bubalus bubalus*). It also occurs in the African buffalo (*Syncerus caffe*) and various African antelope species. The manifestations of brucellosis in these animals are similar to those in cattle.

Brucellosis is readily transmissible to humans, causing an acute febrile illness – undulant fever – which may progress to a more chronic form, and can also produce serious complications affecting the musculo-skeletal, cardiovascular and central nervous systems. Infection is acquired by the oral, respiratory, conjunctival, or possibly other routes, often as a result of an occupational exposure. Ingestion of infected dairy products, however, constitutes the main risk to the general public. Laboratory manipulation of live cultures or contaminated material from animals is hazardous and must be done under conditions of biohazard containment.

1. Identification of the agent

All abortions in cattle should be treated as suspected brucellosis and should be investigated. The clinical picture is not pathognomonic, although the herd history may be helpful. Smears of placental cotyledon, vaginal discharge and fetal lung, liver and

abomasal contents should be fixed with heat or ethanol and stained by the modified Ziehl-Neelsen (Stamp's), Kösters', Gram or Macchiavello methods, or with a fluorochrome- or peroxidase-labelled antibody conjugate. The presence of large aggregates of intracellular, weakly acid-fast organisms of *Brucella* morphology or immunospecifically stained organisms is presumptive evidence of brucellosis. Care must be taken in the interpretation of results as other infectious agents may have similar morphology (e.g. *Coxiella burnetii*, *Chlamydia*) or immunological cross-reactivity (e.g. *Yersinia*). DNA probes or polymerase chain reaction (PCR) methods can be used on smear or swab samples to demonstrate the agent.

Genetic evidence indicates that all members of the *Brucella* genus are closely related and probably should be considered to be variants of a single species. Nevertheless, there are real differences in host preference and epidemiology displayed by the major variants, as well as molecular evidence of genomic variation. From a practical point of view, it is convenient to maintain the classification into six nomenclatures: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, and *B. canis*. The first three of these are subdivided into biovars on the basis of cultural and serological properties. *Brucella* is not closely related to any other known animal pathogens, but shows close genetic relatedness to some plant pathogens and symbionts, including *Agrobacterium*, *Phyllobacterium* and *Rhizobium*.

Culture of placental cotyledon, vaginal discharge, fetal tissues or abomasal contents, or hygroma fluid should be made on plates of serum-dextrose agar and serum-dextrose agar supplemented with bacitracin (25 µg/ml = 25,000 U), cycloheximide (100 µg/ml), nalidixic acid (5 µg/ml), nystatin (100 units/ml), polymyxin B (5 µg/ml = 5,000 U), and vancomycin (20 µg/ml). Cultures can also be made from milk or colostrum, and from samples of tissues collected at post-mortem, such as mammary gland, uterus, supramammary, and internal iliac lymph nodes from females, and testes, epididymides, seminal vesicles, accessory glands, external inguinal, and internal iliac lymph nodes from males. The parotid, mandibular and retropharyngeal lymph nodes, from either males or females, are good sources of the organism.

As the numbers of *Brucella* organisms are likely to be lower than in abortion material, and as contaminating bacteria may be present in milk, colostrum and some tissue samples, enrichment is advisable in liquid medium consisting of serum-dextrose broth, tryptone soya broth or *Brucella* broth supplemented with an antibiotic mixture of amphotericin B (1 µg/ml), bacitracin (25 µg/ml), polymyxin B (6 µg/ml), and vancomycin (20 µg/ml) (all final concentrations). The enrichment medium should be incubated at 37°C in air supplemented with 10% (v/v) CO₂ for up to 6 weeks, with weekly subcultures onto solid selective medium. If preferred, a biphasic

system of solid and liquid selective medium in the same bottle (Castañeda technique) may be used to minimise subculture. All culture media should be subject to quality control and must support the growth of fastidious strains, such as *B. abortus* biovar 2, from small inocula.

Any colonies of *Brucella* type (raised, convex, circular outline, transparent, smooth surface, slow growing) should be checked by examining a Gram-stained or Stamp's stained smear. If organisms of *Brucella* morphology (small Gram negative or Stamp's positive coccobacilli or short rods with rounded ends and slightly convex sides) are seen, the colonies should be tested for agglutination with *Brucella*-specific antiserum after checking for dissociation. The latter is most easily tested by suspending colonies in 0.1% (w/v) aqueous acriflavine: smooth colonies form a uniform suspension, nonsmooth colonies form agglutinates. If the colonies are smooth, they should be checked against antiserum to smooth *B. abortus*, or preferably antisera monospecific for the A and M surface antigens. In the case of nonsmooth colonies, isolates should be checked with antiserum to *Brucella* R antigen.

Positive agglutination with a *Brucella* antiserum provides presumptive identification of the isolate as *Brucella*. Subsequent full identification is best performed by a reference laboratory (see Table pages 707-721). Additional identification should be done by using either oxidative metabolism tests (quantitative measurement by Warburg manometry or Gilson respirometry, or qualitative measurement by thin layer chromatography) or phage lysis tests to identify the species (in the latter case the phage lysis pattern is dependent on the colonial phase of the isolate and it is essential that this be determined correctly) (8). Identification to biovar level depends on examination for growth in the presence of basic fuchsin (pararosaniline) and thionin at final concentrations of 20 µg/ml, production of H₂S (detected by lead acetate papers), requirement of CO₂ for growth, and agglutination pattern with A-, M- or R-specific antisera. Reference strains should be included in each series of tests to control the quality of reagents and techniques.

Identification of the vaccine strains *B. abortus* strain 19 or *B. melitensis* strain Rev. 1, depends on further tests. In the first case, lack of requirement for CO₂, inhibition of growth by benzylpenicillin (3 µg/ml = 5 international units [IU]/ml), thionin blue (2 µg/ml), and *D*-erythritol (2 mg/ml) (all final concentrations), a high utilisation of L-glutamate (1), and a low residual virulence for guinea pigs, are characteristic of *B. abortus* strain 19. In the second case, *B. melitensis* strain Rev. 1 has the normal properties of a biovar 1 strain of *B. melitensis*, but grows much more slowly on ordinary media, does not grow in the presence of basic fuchsin or thionin (20 µg/ml) or benzylpenicillin (3 µg/ml) (final concentrations), but does grow in the presence of streptomycin at 2.5 or 5 µg/ml, has very weak urease activity, and shows a reduced virulence for guinea pigs and mice. (For further details see refs 1, 7 and 8.)

Antigen detection methods based on latex agglutination, haemagglutination and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) have been described. These have not been standardised and cannot be recommended for general use.

The use of DNA probes or the PCR, based on selected sequences of the *Brucella* genome, is under experimental evaluation and methods suitable for general use are being developed (13, 14).

B. abortus biovar 1 is the type most frequently isolated from cattle worldwide, biovars 3 and 6 are common in Africa and some Asian countries, biovars 2 and 4 occur in addition to biovar 1 in North and South America, and biovars 5 and 9 are rare, but have been locally important in some countries in the past, e.g. Britain and Germany. In South Africa, 90% of *B. abortus* isolates are biovar 1, biovar 2 constitutes most of the remaining 10%, and biovar 3 is rare. In western Europe, *B. abortus* biovars 1 and 3 are the most frequently isolated.

2. Serological tests

For purposes of international trade, many countries, including those of the European Union (EU), still require that individual animals should not react in the serum agglutination test (SAT) to a level exceeding 30 IU. The EU also specifies an upper limit for the complement fixation (CF) test of 20 ICFTU (international complement fixation test units). It should be stressed that the SAT is unsatisfactory for the detection of bovine brucellosis, and its use for the purposes of international trade should be discouraged. The CF test is more sensitive and specific, and has a standardised system of unitage. Its use should be encouraged. The performance of ELISAs is comparable with that of the CF test, and as they are technically simpler to perform and more robust, their use may be preferred in many laboratories. Although full international agreement about standardisation has not been reached, it is being actively pursued. For control of brucellosis at the national or local level, it is usually necessary to follow screening using a rapid and simple test with a more specific confirmatory test performed on positively reacting samples.

The buffered *Brucella* antigen tests (BBAT) (rose bengal plate agglutination test and buffered plate agglutination test) are suitable for screening herds and individual animals. Positively reacting samples should be retested using the CF test or an ELISA. The latter may be used for both screening and confirmation. Infection with *B. melitensis* might be overlooked by this test in the early stages of the establishment of the disease in the herd.

The milk ring test performed on bulk milk samples is effective for screening and monitoring dairy cattle for brucellosis, but is less reliable in large herds. ELISAs are a more sensitive alternative. Beef cattle cannot be diagnosed by this method. An alternative immunological test is the brucellin skin test, which

can be used for screening unvaccinated herds, including beef cattle, provided that a purified, standardised antigen preparation (e.g. brucellin INRA, see Chapters 3.3.1. or 3.3.2. for address) is used.

In buffaloes (*Bubalus bubalus*), bison (*Bison bison*), yaks (*Bos grunniens*) and elk (*Cervus canadensis*), *B. abortus* infection follows a course similar to that in cattle. The same diagnostic procedures may be used for these species. The rose bengal plate agglutination test is suitable for screening, and the CF test is the most satisfactory for confirmation. If the milk ring test is used for herd monitoring, the milk should be diluted in an equal volume of 10% sodium chloride solution before the test, to counteract the high fat content.

In camels (*Camelus bactrianus* and *C. dromedarius*), the rose bengal plate agglutination test, SAT, CF test and milk ring test can be applied. The CF test is more sensitive than agglutination procedures for detecting reactors. The serum for this test should be inactivated by heating at 60-62°C for 30 minutes.

• Preparation of the antigens

Antigen preparations made from smooth *B. abortus* strains 99 or 1119-3 are used as whole-cell suspensions in the various agglutination tests and in the CF test. Similar preparations, but stained with haematoxylin, rose bengal, or brilliant green/crystal violet, are used in the milk ring, rose bengal and buffered plate agglutination tests, respectively.

B. abortus strain 99 (Weybridge) or *B. abortus* strain 1119-3 (USDA) should be used for diagnostic antigen production². The strains must be completely smooth and nonagglutinable in saline and 0.1% (w/v) acriflavine. They must be pure cultures and conform to the characteristics of CO₂-independent strains of *B. abortus* biovar 1. The original seed cultures should be propagated to produce a seed lot that must conform to the properties of these strains, and should be preserved by lyophilisation or by freezing at liquid nitrogen temperature.

For antigen production, the *B. abortus* strain 99 or 1119-3 seed culture is used to inoculate a number of potato-infusion agar slopes that are then incubated at 37°C for 48 hours. Serum-dextrose agar, and Trypticase soy agar, to which 5% equine serum or 0.1% yeast extract may be added, are satisfactory solid media provided a suitable seed is used as recommended above. The growth is checked for purity, resuspended in sterile phosphate buffered saline (PBS), pH 6.4, and used to seed layers of potato-infusion agar or glycerol-dextrose agar in Roux flasks. These are then incubated at 37°C for 72 hours with the inoculated surface facing downwards. Each flask is checked for purity by Gram

staining samples of the growth, and the organisms are harvested by adding 50-60 ml of phenol saline (0.5% phenol in 0.85% sodium chloride solution) to each flask. The flasks are gently agitated, the suspension is decanted, and the organisms are killed by heating at 95°C for 1 hour. Following a viability check, the antigen is stored at 4°C.

Alternatively, the cells may be produced by batch or continuous culture in a fermenter, using a liquid medium containing (per litre of distilled water) D-glucose (30 g), a high-grade peptone (30 g), yeast extract (Difco) (10 g), sodium dihydrogen phosphate (9 g), and disodium hydrogen phosphate (3.3 g). The initial pH is 6.6, but this tends to rise to pH 7.2-7.4 during the growth cycle. Care should be taken to check batches of peptone and yeast extract for capacity to produce good growth without formation of abnormal or dissociated cells. Vigorous aeration and stirring is required during growth, and pH adjustment by the addition of sterile 0.1 M HCl may be necessary. The seed inoculum is prepared as described above. The culture is incubated at 37°C for 48 hours in the case of batch culture; continuous culture runs can be operated for much longer periods, but more skill is required to maintain them. The culture is harvested by centrifugation to deposit the organisms, which are then resuspended in phenol saline. The organisms are then killed by heating at 80°C for 90 minutes and, following a viability check, are stored at 4°C. In-process checks should be made on the growth from either solid or liquid medium to ensure purity, an adequate viable count and freedom for dissociation to rough forms. The packed cell volume of the killed suspensions can be determined by centrifuging 1-ml volumes in Wintrobe tubes at 3,000 g for 75 minutes.

CF test antigen (Weybridge) is prepared from killed *B. abortus* strain 99 or 1119-3 concentrate by dilution in phenol saline to a packed cell concentration of 2%. This is then diluted in phenol saline and titrated against the International Standard *B. abortus* serum (ISABS, obtainable from the OIE Reference Laboratory for Brucellosis, CVL Weybridge [see footnote 2]) or an equivalent standard serum, and the cell concentration is adjusted to give the right sensitivity. After incubation at 37°C for 18 hours, it should produce a stable greyish white suspension with no visible aggregation or deposit. The antigen used in the EU is standardised against the ISABS so as to give 50% fixation at a dilution of 1/200 of this serum. This dilution must also show complete fixation at the lower serum dilutions, because too weak (or too strong) a concentration of antigen may not produce 100% fixation at the lower dilutions of serum. When two dilutions of antigen are suitable, the most concentrated antigen suspension must be chosen in order to avoid prozone occurrence. The antigen is generally issued as a concentrate and is diluted in CF diluent before each use. The antigen should not be frozen.

Cells for use in the preparation of milk ring, rose bengal plate agglutination, buffered plate agglutination, agglutination or CF test antigens should be checked for purity and smoothness at the harvesting

² Original seed should be obtained from the OIE Reference Laboratory for Brucellosis at CVL Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, United Kingdom (UK), or the NVSL of the USDA (see footnote 1).

stage. After killing, they must form stable suspensions in physiological saline solutions and show no evidence of autoagglutination. A viability check must be performed on the suspensions after killing, and no growth must be evident after 10 days' incubation at 37°C.

a) **Buffered *Brucella* antigen tests (prescribed tests for international trade)**

i) *Rose bengal plate agglutination test*

Antigen for the rose bengal plate agglutination test is prepared by depositing killed *B. abortus* strain 99 or 1119-3 cells by centrifugation at, for example, 23,000 g for 10 minutes at 4°C, and uniformly re-suspending in phenol saline at the rate of 1 g to 22.5 ml. (Note: if sodium carboxymethyl cellulose is used as the sedimenting agent during preparation of the cell concentrate insoluble residues must be removed by filtering the suspension through an AMF-CUNO Zeta-plus pre-filter [Type CPR 01A] before staining.) To every 35 ml of this suspension, 1 ml of 1% (w/v) rose bengal (CI No. 45440) in distilled water is added, and the mixture is stirred for 2 hours at room temperature. The mixture is filtered through cotton wool, and centrifuged to deposit the stained cells which are then uniformly resuspended at the rate of 1 g cells to 7 ml of diluent (21.1 g of sodium hydroxide dissolved in 353 ml of phenol saline, followed by 95 ml of lactic acid, and adjusted to 1,056 ml with phenol saline). The colour of this suspension should be an intense pink and the supernate of a centrifuged sample should be free of stain; the pH should be 3.65±0.05. After filtration through cotton wool, the suspension is filtered twice through a Sartorius No. 13430 glass fibre prefilter, adjusted to a packed cell volume of 8% pending final standardisation against standard sera, and stored at 4°C in the dark. The antigen should never be frozen.

When used in the standard test procedure, the rose bengal plate agglutination test antigen should give a clearly positive reaction with 1/45 and 1/47.5 dilutions, but not 1/55 dilutions, of the ISABS in saline. It should also give a pattern of positive and negative reactions with a panel of sera similar to that produced by a previously standardised batch.

• **Test procedure**

Serum samples may be screened using the rose bengal plate agglutination test or card test. Serum (0.03 ml) is mixed with an equal volume of antigen on a white tile or enamel plate to produce a zone approximately 2 cm in diameter. The mixture is agitated gently for 4 minutes at

ambient temperature, and then observed for agglutination (1). Any visible reaction is considered to be positive. The test is very sensitive, especially in vaccinated animals, and positive samples should be checked by the CF test or by an IgG1-specific procedure. False-negative reactions occur and can be detected by retesting animals at intervals over at least 3 months.

ii) *Buffered Brucella plate agglutination test*

Antigen for the buffered *Brucella* plate agglutination test is prepared from *B. abortus* strain 1119-3 according to the procedure described by Angus & Barton (2). The following description has been summarised from ref. 1 (Chapter 2).

Two staining solutions are required: a solution of brilliant green certified biological stain in distilled water (2 g/100 ml) and a solution of crystal violet certified biological stain in distilled water (1 g/100 ml). Once prepared, the two solutions should be stored separately for a period of 24 hours, and then mixed together in equal volumes in a dark bottle and stored in a refrigerator for a period of no fewer than 6 months before use. The mixed stain may be used between 6 and 12 months after initial preparation, after which it should be discarded.

Buffered diluent is prepared by slowly dissolving 150 g of sodium hydroxide in 3-4 litres of sterile phenol saline. Lactic acid (675 ml) is added to this solution, and the final volume is adjusted to 6 litres by adding sterile phenol saline. The pH of the solution should be 3.63-3.67.

B. abortus packed cells are diluted to a concentration of 250 g/litre in phenol saline; 6 ml of stain are added per litre of the cell suspension, and the mixture is shaken thoroughly before being filtered through sterile absorbent cotton. The cells are spun down using a refrigerated centrifuge, and the packed cells are then resuspended at a concentration of 50 g/100 ml in buffered diluent (as described above). This mixture is shaken thoroughly for 2 hours, and is then further diluted by the addition of 300 ml of buffered diluent per 100 ml of suspended cells (i.e. final concentration of 50 g packed cells/400 ml buffered diluent). The mixture is stirred at room temperature for 20-24 hours before the cell concentration is adjusted to 11% (w/v) in buffered diluent. This suspension is stirred overnight before testing. Pending final quality control tests, the antigen is bottled, labelled with an expiry date of 1 year, and stored at 4°C until required for use. The preparation should not be frozen.

The pH of the buffered plate antigen should be 3.7 ± 0.03 , and the pH of a serum:antigen mixture of ratio 8:3 should be 4.02 ± 0.04 . The 11% stained-cell suspension should appear blue-green. Each batch of buffered plate antigen should be checked by testing at least ten weakly reactive sera and comparing the results with one or more previous batches of antigen. If possible, the antigen batches should be compared with the standard antigen prepared by the NVSL of the USDA (see footnote 1).

- **Test procedure**

Serum samples may also be screened using the buffered plate agglutination test. Serum (0.08 ml) is mixed with a 0.03-ml volume of antigen on a glass plate marked in 4 x 4 cm squares. After the initial mixing, the plate should be rotated three times in a tilting motion to ensure even dispersion of the reagents, and then incubated for 4 minutes in a humid chamber at ambient temperature (20-25°C). The plate should be removed and rotated as above, and then returned for a second 4-minute incubation. At this point, the plate should be removed and rotated and observed for agglutination (1). Any visible reaction is considered to be positive. Like the rose bengal plate agglutination test, the test is very sensitive, especially in vaccinated animals, and positive samples should be checked by the CF test or by an IgG1-specific procedure. False-negative reactions occur and can be detected by retesting animals at intervals over at least 3 months.

- b) **Complement fixation test (a prescribed test for international trade)**

The most widely accepted confirmatory test is the CF test. Numerous variations of it exist but, whichever procedure is selected, the test must use an antigen that has been prepared from an approved smooth strain of *B. abortus*, such as strain 99 or 1119-3, and standardised against the second ISABS. Antigen for the CF test can be prepared by special procedures (1, 12) or antigen that has been prepared for the standard agglutination test can be used after diluting the stock suspension 1 in 200 in CF test buffer before standardisation. The packed cell volume of the concentrated antigen suspension for CF test should approximate 2% before standardisation against the second ISABS, as described below. The phenol concentration must not exceed 0.5%. The appearance of the antigen when diluted 1 in 10 in phenol saline must be that of a uniform, dense, white suspension with no visible aggregation or deposit after incubation at 37°C

for 18 hours. It must not produce anti-complementary effects at the working strength for the test. The antigen should not be frozen.

A convenient procedure is the microtitration method (see Chapter 3.3.2. Caprine and ovine brucellosis [excluding *B. ovis* infection] for other procedures). All dilutions are made in a buffer prepared from a stock solution of sodium chloride (42.5 g), barbituric acid (2.875 g), sodium diethyl barbiturate (1.875 g), magnesium sulphate (1.018 g), and calcium chloride (1.147g) in 1 litre of distilled water and diluted by addition of four volumes of 0.04% gelatin solution before use (CF test buffer). The indicator system is a 3% suspension of fresh sheep red blood cells (SRBC) sensitised with an equal volume of rabbit anti-sheep RBC serum diluted to contain five times the minimum concentration required to produce 100% lysis of the SRBC in the presence of a 1/30 dilution of fresh guinea pig complement. The latter is independently titrated to determine the minimum concentration required to produce 100% lysis of a sensitised SRBC suspension; this is defined as the unit of complement. The standard *B. abortus* agglutination test antigen should be diluted in a CF test buffer to a concentration that gives 50% fixation of complement (1.25 units) at a dilution of 1/200 of the second ISABS (obtainable from the OIE Reference Laboratory for Brucellosis, CVL Weybridge [see footnote 2]). The test sera are diluted in equal volumes of CF test buffer and inactivated by heating at 58°C for 50 minutes.

- **Test procedure**

- i) Using standard 96-well U-bottom microtitre plates, volumes of 25 μ l of diluted test serum are placed in the wells of the first and second rows, and 25- μ l unit volumes of CF test buffer are added to all wells except those of the first row.
- ii) Serial doubling dilutions are then made by transferring 25- μ l volumes of serum from the second row onwards.
- iii) Volumes of 25 μ l of antigen, diluted to working strength, and 25 μ l of complement at 1.25 units strength, are added to each well. Control wells containing diluent only, serum + complement + diluent, antigen + complement + diluent, complement + diluent, are set up to contain 75 μ l total volume in each case.
- iv) The plates are incubated at 37°C for 30 minutes with agitation for the initial 10 minutes, or at 4°C overnight.
- v) Volumes of 25 μ l of sensitised SRBC suspension are added to each well, and the plates are reincubated at 37°C for 30 minutes with occasional agitation for the first 10 minutes.

- vi) The results are read after the plates have been left to stand at 4°C for 2-3 hours to allow unlysed cells to settle.

The degree of haemolysis is compared with standards corresponding to 0, 25, 50, 75 and 100% lysis. Results should always be expressed in IUs, calculated in relation to those obtained in a parallel titration with a standard serum calibrated against the ISABS. In general, sera giving positive fixation at a titre equivalent to 20 ICFTU/ml or greater, are considered to be positive. False-positive reactions may arise in the testing of vaccinated animals. Females that have been vaccinated with strain 19 vaccine at the age of between 3 and 6 months, are considered to be positive if the sera give a positive fixation at a titre of 30 ICFTU/ml when the animals are tested at an age of 18 months or older. False-positive reactions may also occur in animals infected with organisms antigenically related to *Brucella*. These usually cause far fewer problems in the CF test than in agglutination-based tests.

c) **Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (a prescribed test for international trade)**

Numerous variations of this indirect ELISA have been described. Commercial tests are available. Only those ELISAs that use *B. abortus* smooth lipopolysaccharide (LPS) should be recommended. The range of bovine immunoglobulin isotypes and subclasses detectable by ELISA is dependent on the specificity of the anti-immunoglobulin (or secondary antibody) conjugate used. An indirect ELISA specific for IgG1 antibody detection gives results closely equivalent to the CF test, and may be used for testing either milk or serum samples. The use of conjugates specific for both heavy and light chains of the immunoglobulin molecule may provide somewhat greater diagnostic sensitivity than does the CF test, but with some loss of diagnostic specificity. Like all other conventional tests used in bovine brucellosis serology, the indirect ELISA is not capable of differentiating antibodies elicited by infection from those resulting from vaccination with strain 19.

ELISA tests may be used as screening procedures or as confirmatory tests. However, the performance of the ELISA in terms of diagnostic sensitivity and specificity will depend on the immunoglobulin specificity of the conjugate (see above), as well as the dilution factor chosen for the test samples. Broad specificity conjugates and lower test dilutions will result in a screening assay of higher diagnostic sensitivity. Narrow specificity conjugates (e.g. anti-IgG1) and higher test dilutions will result in a confirmatory assay of higher diagnostic specificity.

Tests are performed in 96-well, flat-bottomed, polystyrene microplates. The choice of microplate will have a slight effect on assay performance in terms of background activity observed. Low to medium protein-binding microplates give the lowest background activity using LPS antigen.

The antigen-coating buffer is 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, composed of NaHCO₃ (2.93 g), Na₂CO₃ (1.59 g), and NaN₃ (0.2 g) in 1 litre distilled or deionised water. The conjugate and test sera diluent buffer is 0.01 M PBS, pH 7.2, + 0.05% (v/v) Tween 20 composed of Na₂HPO₄ (1.21 g), KH₂PO₄ (0.20 g), NaCl (8.00 g), and KCl (0.20 g) in 1 litre distilled or deionised water + the addition of 0.50 ml Tween/litre. The wash buffer is 0.002 M PBS, pH 7.4, + 0.05% Tween 20.

The conjugate used should be a polyclonal antibody specific for both heavy and light chains of bovine IgG1 and conjugated to horseradish peroxidase. The substrate system is 4.4 mM H₂O₂ and 3.6 mM 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) in 0.05 M phosphate/citrate buffer, pH 4.5, composed of 0.2 M Na₂HPO₄ (25.7 ml), 0.1 M citric acid (24.3 ml), and distilled/deionised water (50 ml) (adjust the pH if necessary). The enzymatic reaction-stopping solution is 4% sodium dodecyl sulphate or 0.1 M NaN₃ in distilled/deionised water.

• **Antigen production**

Smooth LPS may be extracted from heat-killed cells of *B. abortus*, by the hot water/hot phenol method. *Brucella* differs from most other Gram-negative bacteria in that its LPS partitions into the phenol phase rather than the water phase after extraction.

For the extraction, either 5 g of lyophilised cells or 50 g of packed wet cells of *B. abortus* strain 99 are suspended in 170 ml of distilled water and heated to 66°C. An equal volume of 90% (w/v) phenol in distilled water, also heated to 66°C, is added, and the solution is stirred continuously for 20 minutes. The mixture is then cooled to 4°C and centrifuged at 12,000 g for 20 minutes at 4°C. The supernatant, which contains the LPS, is left to stand in a separating funnel for 24 hours at room temperature. The phenol phase (bottom layer) is recovered and filtered (Whatman #3), and three volumes of methanol containing 1% methanol saturated with sodium acetate is added. The solution is left to precipitate at 4°C for 2 hours. The precipitate is resuspended in the minimum workable volume of distilled water, and centrifuged at 6,000 g for 20 minutes. The pellet is resuspended in 80 ml of distilled water and stirred at 4°C overnight.

The solution is then centrifuged at 10,000 g for 15 minutes at 4°C, and the supernatant is

decanted. Another 80 ml of distilled water are added to the pellet, which is then stirred for 1 hour and centrifuged as before. The supernatants are pooled, filtered (0.3- μ m membrane filter), and 50-100 μ g each of ribonuclease, deoxyribonuclease and proteinase K, are added. This mixture is incubated for 18 hours at 20°C, after which it is reprecipitated with methanol and resuspended as above. The solution is dialysed against distilled water until free of phenol (the distilled water may be tested with ferric chloride until the usual purple colour is not produced). The resultant antigen is then lyophilised in volumes that contain 1-mg quantities of LPS.

• **Test procedure**

- i) LPS antigen is diluted in coating buffer to a concentration determined by checker-board titration, and usually approximately 1 μ g/ml, and dispensed to all microwells in 100- μ l volumes. The microplates are then incubated at 37°C for 2 hours or at 4°C overnight.

As this is a solid-phase ELISA technique, the microplate wells require intervening washes between each assay step to remove unbound or unreacted reagents. From three to four wash cycles using the washing buffer, are sufficient. Prior to addition of the next reagent, the plates should be inverted and slapped onto a lint-free absorbent surface to discharge any residual contents.

- ii) Test sera and controls are diluted 1/200 in diluent buffer and applied to appropriate wells in 100- μ l volumes. The plates are covered or sealed and placed on an orbital plate shaker and incubated at 37°C for 1 hour with continuous shaking.

Wash the plate as above.

- iii) The enzyme conjugate is diluted in diluent buffer and applied to all wells in 100- μ l volumes. The plates are covered or sealed and placed on an orbital plate shaker and incubated at 37°C for 1 hour with continuous shaking.

The optimal dilution of conjugate should be such that when reacted with the strong positive control under standard conditions, it will result in an average absorbance value of between 1.0 and 1.4 absorbance units (see step vi). The International Standard Serum should be used, when available (see below).

Wash the plate as above.

- iv) Fresh substrate/chromogen solution is prepared by adding 60 μ l of a 3% H₂O₂ stock solution to 12 ml of phosphate/citrate buffer containing 3.6 mM ABTS. The substrate/chromogen solution is applied to all wells in 100- μ l volumes. The

plates are transferred to an orbital plate shaker and incubated at 37°C for precisely 15 minutes with continuous shaking.

After 15 minutes' incubation, the stopping solution is applied to all wells in 100- μ l volumes and the plate is shaken briefly on the plate shaker to ensure thorough mixing. All wells now contain a total volume of 200 μ l.

- v) The colour development is read with a microplate photometer using a 405 or 414 nm interference filter.
- vi) The data may be expressed in a number of different ways, but it is recommended that test serum reactivity be expressed as per cent positivity of a standardised strong positive control serum (19).

The strong positive control serum should be such that when prediluted in negative serum, it should exhibit an antibody activity that lies on the linear portion of the dose/response curve of the original high-titred serum, just below the plateau phase. Work is underway at present to prepare a primary standard serum in this manner for international use in calibrating indirect ELISAs. This should be available soon.

Using this indirect ELISA protocol under optimal laboratory conditions, the positive/negative threshold (or cut-off) should fall between 10 and 15% positivity. In this range, the diagnostic sensitivity should be equal to or greater than the BBAT in the testing of infected cattle, and the diagnostic specificity should be equivalent to the CF test in the testing of unvaccinated cattle. It can be expected that the diagnostic specificity in the testing of vaccinated groups will be somewhat lower than for the CF test.

Under conditions of suboptimal water quality, or if any of the assay parameters are changed, the threshold may have to be altered upward to obtain appropriate diagnostic performance.

d) **Competitive enzyme-linked immunosorbent assay**

There is increasing evidence that these monoclonal antibody (MAb)-based ELISAs may offer distinct advantages over the indirect ELISA and all other conventional tests used in brucellosis serology. These advantages include: detection of animals at an earlier stage of infection; differentiation between antibody responses due to infection and those due to strain 19 vaccination; and elimination of false-positive reactions due to exposure to organisms bearing cross-reacting antigens.

These assays are based on standard competitive or inhibition ELISA techniques. The MAbs used in these techniques are specific for

epitopes residing on the smooth LPS molecule; more specifically, the O-chain polysaccharide portion. In classic terms, the A, M and common antigens of *Brucella*, as characterised by polyclonal antibody reagents, are found on the O-chain polysaccharide. However, using MAbs, these antigens are further subdivided into related epitopes, some of which may be repeated along the length of the chain and others may occur only once at the terminal portion of the chain. Some of these epitopes are strongly immunogenic, while others are only weakly immunogenic. This type of assay could be standardised by the same International Standard Serum proposed for the indirect ELISA. However, some authorities believe that the choice of MAb and its unique specificity will have a definite influence on the diagnostic performance characteristics of the assay. As with any MAb-based assay of this type, the global availability of the antibody will be of utmost importance with respect to international acceptance and use.

e) Milk ring test

In lactating animals, the milk ring test can be used for screening for brucellosis on a herd or individual basis. In large herds (>100 lactating cows), the sensitivity of the test becomes less reliable.

Milk ring test antigen is prepared from concentrated, killed *B. abortus* strain 99 or 1119-3 cell suspension by depositing the cells, grown as described for the buffered *Brucella* antigens, at for example, 23,000 g for 10 minutes at 4°C, followed by resuspension in haematoxylin-staining solution. This is prepared by adding 100 ml of 4% (w/v) haematoxylin (CI No. 75290) in 95% ethanol to a solution of 5 g ammonium aluminium sulphate in 100 ml of distilled water + 48 ml of glycerol followed by 2 ml of freshly prepared 10% (w/v) sodium iodate solution. After standing for 30 minutes at room temperature (some laboratories prefer to heat at 80°C), the deep purple solution is added to 940 ml of 10% (w/v) ammonium aluminium sulphate in distilled water. The pH of this mixture is adjusted to 3.1, and the solution is stored at room temperature in the dark for 3 months.

Before use, the staining solution is shaken and filtered through cotton wool. The packed cells are suspended in the staining solution at the rate of 1 g per 30 ml stain, and held at room temperature for 48 hours. The stained cells are then deposited by centrifugation, and washed three times in a solution of sodium chloride (6.4 g), 85% lactic acid (1.5 ml), and 10% sodium hydroxide (4.4 ml), in 1.6 litres of distilled water, final pH 3.0. The washed cells are resuspended at the rate of 1 g in 27 ml of a diluent consisting of phenol saline, adjusted to pH 4.0 by the addition of 0.1 M citric acid (approximately 2.5 ml) and 0.5 M disodium

hydrogen phosphate (approximately 1 ml), and held at 4°C for 24 hours. The mixture is filtered through cotton wool, the pH is checked, and the packed cell volume is determined and adjusted to 4%. The sensitivity of the antigen is then checked against that of a previously standardised batch using *Brucella*-negative milk in which the ISABS has been diluted (15). The antigen must be stored at 4°C and not frozen. Variations on this manufacturing procedure (1, 12) yield a similar product.

The pH of the milk ring test antigen should be between 3.3 and 3.7, its colour should be dark blue, appearing almost black in bulk, and the packed cell volume must be 4%. There must be no free stain in the supernatant of a centrifuged sample. When diluted in milk from a brucellosis-free animal, the antigen must produce a uniform colouration of the milk layer with no deposit and no colouration of the cream layer. It must react to the appropriate level of sensitivity with 'positive' milk prepared by diluting the ISABS in negatively reacting milk. Samples plated onto *Brucella* culture media and incubated aerobically at 37°C for 10 days, must not produce any growth.

• Test procedure

The test is performed by adding one drop (0.03 ml) of standard *B. abortus* milk ring test antigen to a 1-ml volume of whole milk that has been stored for at least 24 hours at 4°C. The height of the milk column in the tube must be at least 25 mm. If bulk tank samples from large herds are to be examined, the volume of milk is increased to 3 ml. The milk samples must not have been frozen, heated or subjected to violent shaking. Abnormal milk should not be included. The milk/antigen mixtures are incubated at 37°C for 1 hour, together with positive and negative control samples. A strongly positive reaction is indicated by formation of a dark blue ring at the top of the tube. The test is considered to be negative if the colour of the underlying milk exceeds that of the cream layer. False-positive reactions may occur in recently vaccinated cattle or in samples containing abnormal milk (colostrum, mastitis). Positive reactions to the milk ring test should be checked by carrying out confirmatory serological tests on blood samples from all the animals in the herd. (For further details, see ref. 11.)

f) Serum agglutination test

The SAT is inferior to other tests in specificity and sensitivity, and is not recommended if other procedures are available. However, this test is still widely used for the diagnosis of bovine brucellosis.

Standard antigen suspension for the SAT is prepared from killed *B. abortus* strain 99 or 1119-3 concentrate produced as described for

buffered *Brucella* antigens, by dilution in phenol saline to a packed cell concentration of 2%. This is then diluted in phenol saline and titrated against the ISABS or an equivalent standard serum, and the cell concentration is adjusted to give the appropriate sensitivity. Currently, the Weybridge antigen at working strength is adjusted to give 50% agglutination with a 1 in 650 dilution of the ISABS. The stock bulk suspension is stored at ten times the working strength at 4°C pending distribution into its final containers.

The packed cell volume of the concentrated antigen suspension for the agglutination should be 2%. The phenol concentration must not exceed 0.5%, and the pH should be between 6 and 7. The appearance of the antigen when diluted 1 in 10 in phenol saline must be that of a uniform, dense white suspension with no visible aggregation or deposit after incubation at 37°C for 18 hours. It must produce no growth when plated onto *Brucella* culture media and incubated aerobically at 37°C for 10 days.

The standard SAT antigen should show an appropriate level of sensitivity when it is calibrated against the ISABS or a standard serum. The same antigen can also be used for the CF test after checking that it does not produce anti-complementary effects at the working strength for this test.

- **Test procedure**

The test is performed in clear glass or plastic tubes of approximately 1-2 ml total volume by placing 0.8 ml of phenol saline (0.5% [w/v] phenol in 0.15 M sodium chloride) in to the first tube and 0.5-ml volumes of phenol saline in the remaining tubes of a series of five or ten tubes. A volume of 0.2 ml serum is added to the first tube, mixed, and then 0.5 ml is transferred to the next tube. Further volumes of 0.5 ml are transferred to subsequent tubes to give a series of doubling dilutions. An equal volume of standard *B. abortus* agglutination suspension, diluted to working strength in phenol saline, is then added to each tube, and the tubes are incubated at 37°C for 20 hours.

The tests are read against opacity standards prepared by diluting the working strength antigen 1 in 4, 2 in 4, and 3 in 4, to correspond to 25%, 50% and 75% agglutination. Phenol saline is used as the 100% control, and the undiluted working strength antigen as the 0% control. The results are scored as the degree of agglutination (1+ = 25%, 2+ = 50%, 3+ = 75%, 4+ = 100%) over the serum dilution. In each set of tests, a positive control serum calibrated against ISABS must be included. This enables the results to be expressed in IUs and permits tests that have been performed in different laboratories to be compared (10). Titres equivalent to 50 IU or more for unvaccinated

cattle, and 100 IU or more for vaccinated animals, are regarded as indicative of infection. In the EU, titres equivalent to 30 IU or more are regarded as unacceptable. Micro-agglutination procedures may be used in place of the tube method (3).

The SAT is unsatisfactory because it fails to detect many animals in the incubation stage of the disease, as well as many in the chronic phase, when the predominant antibodies belong to isotypes with weak agglutinating activity at a neutral pH. The test is also subject to false-positive reactions caused by non-specific agglutinins which bind to *B. abortus* cells via the Fc region of their immunoglobulin heavy chain structure, and by cross-reacting antibodies evoked by unrelated bacteria, especially those containing perosamine (4-formamido-4,6-dideoxymannose)-based epitopes. The former (nonspecific agglutinins) accounts for about 70-80% of false-positive agglutination reactions and can be eliminated by performing the test in a diluent containing 10 mM ethylene diamine tetra-acetic acid in PBS, pH 7.2, instead of phenol saline.

Various modifications to the agglutination test have been used as alternatives to the CF test. The 2-mercapto-ethanol test is carried out by diluting 0.1 ml of serum in 0.4 ml of 0.15 M sodium chloride (physiological saline) and adding 0.5 ml of 0.2 M 2-mercapto-ethanol in saline. The serum is then reduced by incubation at 37°C for 1 hour, followed by serial doubling dilutions in saline. Volumes of 0.5 ml of standard SAT antigen diluted to working strength in saline (without phenol) are then added to each tube, and the test is subsequently performed as for the standard test. It is more specific, but no more sensitive, than the standard SAT.

Other modifications to the agglutination test include the Coombs antiglobulin test, the heat inactivation test, and the Rivanol (ethacridine) agglutination test. The first two do not provide diagnostically accurate information when applied to bovine sera. The Rivanol test, which is widely used in the USA, gives results that are very similar to those produced by the 2-mercapto-ethanol test. It is reported to be the most specific test for examining buffalo sera (16).

- g) **Brucellin test**

The low sensitivity of the brucellin test limits the detection of individual infected animals. Therefore this test alone cannot be recommended as an official diagnostic test. It is not suitable as a test for the purposes of international trade, but it may have a role as a screening test for epidemiological purposes. It is essential to use a standardised, defined brucellin preparation that does not contain LPS

antigen as this may provoke nonspecific inflammatory reactions or interfere with subsequent serological tests. One such preparation is Brucellin INRA prepared from a nonsmooth strain of *B. melitensis*. The requirements for its production are detailed in Section B.

- **Test procedure**

A 0.1-ml volume of brucellin is injected intradermally into the caudal fold, the skin of the flank, or the side of the neck. The test is read after 48-72 hours, and a positive reaction is indicated by local swelling and induration. It

is recommended that the skin thickness at the injection site should be measured with vernier calipers before injection and at re-examination 48 hours later. Strong reactions are easily recognised, but borderline reactions require careful interpretation. The diagnosis should not be made solely on the basis of positive intradermal reactions given by a few animals in the herd, but should be confirmed by a reliable serological test, such as the CF test. Poorly defined brucellin preparations which may contain LPS antigen should not be used for the intradermal test as these will interfere with subsequent confirmatory serological tests.

B. REQUIREMENTS FOR VACCINES AND DIAGNOSTIC BIOLOGICALS

- ***B. abortus* strain 19 vaccine**

The most widely used vaccine for the prevention of brucellosis in cattle is prepared from *B. abortus* strain 19. It is used as live vaccine and is normally given to female calves aged between 3 and 6 months as a single subcutaneous dose of $5-8 \times 10^{10}$ viable organisms. A reduced dose of from 3×10^8 to 3×10^9 organisms can be administered to beef or dairy cattle aged between 4 and 12 months, but 5-10% of the animals will develop persistent antibody titres. Alternatively, it can be administered to cattle of any age as two doses of $5-10 \times 10^9$ viable organisms, given by the conjunctival route; this produces protection without a persistent antibody response. Requirements for strain 19 vaccine have been defined by WHO (18).

B. abortus strain 19 vaccine induces good immunity to moderate challenge by virulent organisms. The vaccine must be prepared from USDA-derived seed (see footnote 1) and each batch must be checked for purity, viability, smoothness, and absence of toxicity or virulence. Other *Brucella* strains, including the rough strain *B. abortus* 45/20, have been used as vaccines. *B. abortus* strain 45/20 vaccine is prepared by suspending killed cells in an oil adjuvant. It is normally administered as two doses, given 6-12 weeks apart, followed by an annual booster to maintain immunity. The degree of protective immunity conferred by strain 45/20 vaccine is probably less than that conferred by strain 19 vaccine. Batch variation in immunogenicity and a tendency to stimulate antibodies reactive with smooth *Brucella* antigens are major problems, and careful control of these factors is required. No international standards have been developed for this vaccine, although recommendations have been made for its preparation and testing (4, 6, 11). In most countries where herd vaccination appears to be useful, reduced doses of strain 19 are now used instead of Strain 45/20 vaccine.

1. Seed management

a) Characteristics of the seed

B. abortus strain 19 original seed for vaccine production must be obtained from the USDA

(see footnote 1), and used to produce a seed lot that is preserved by lyophilisation or by freezing at liquid nitrogen temperature. The properties of this seed lot must conform to those of a pure culture of a CO₂-independent *B. abortus* biovar 1 that is also sensitive to benzylpenicillin, thionin blue and *D*-erythritol at recommended concentrations, and that displays minimal pathogenicity for guinea pigs.

b) Method of culture

B. abortus strain 19 for vaccine production is grown on medium free of serum or other animal products, under conditions similar to those described for *B. abortus* strain 99 or 1119-3.

c) Validation as a vaccine

Numerous independent studies have confirmed the value of *B. abortus* strain 19 as a vaccine for protecting cattle from brucellosis. The organism behaves as an attenuated strain when given to sexually immature cattle. In rare cases, it may produce localised infection in the genital tract. Antibody responses persisting for 6 months or longer are likely to occur in a substantial proportion of cattle that have been vaccinated with the standard dose as adults. Some of the cattle vaccinated as calves may later develop arthropathy, particularly of the femorotibial joints (5, 9). The vaccine is safe for most animals if administered to calves between 3 and 8 months of age. It may also be used in adult animals at a reduced dose. It produces lasting immunity to moderate challenge with virulent strains, but the precise duration of this is unknown. The vaccine strain is stable and reversion to virulence is extremely rare. It has been associated with the emergence of *D*-erythritol-utilising strains when inadvertently administered to pregnant animals. The organism behaves as an attenuated strain in the guinea pig, and even large inocula are rapidly cleared from the tissues. It has some virulence for humans, and infections have occasionally followed accidental inocu-

lation with the vaccine. Care should be taken in its preparation and handling, and a hazard warning should be included on the label of the final containers.

2. Method of manufacture

For production of *B. abortus* strain 19 vaccine, the procedures described above (in Section A.2.) can be used, except that the cells are collected in PBS, pH 6.3, and deposited by centrifugation or by the addition of sodium carboxymethyl cellulose at a final concentration of 1.5 g/litre. The yield from one fermenter run, or the pooled cells from a batch of Roux flask cultures that have been inoculated at the same time from the same seed lot, constitutes a single harvest. More than one single harvest may be pooled to form a final bulk, which is used to fill the final containers of a batch of vaccine. Before pooling, each single harvest must be checked for purity, cell concentration, dissociation, and identity. A similar range of tests must be done on the final bulk, which should have a viable count of between 8 and 24×10^9 colony forming units/ml. Adjustments in concentration are made by the addition of PBS for vaccine to be dispensed in liquid form, or by the addition of stabiliser for freeze-dried vaccine. If stabiliser is to be used, loss of viability on freeze-drying should be taken into account, and should not be much in excess of 50%. The final dried product should not be exposed to a temperature exceeding 35°C during drying, and the residual moisture content should be 1-2%. The contents must be sealed under vacuum or dry N_2 immediately after drying, and stored at 4°C .

3. In-process control

Strain 19 vaccine should be checked for purity and smoothness during preparation of the single harvests. The cell concentration of the bulks should also be checked. This can be done by opacity measurement, but a viable count must be performed on the final filling lots. The identity of these should also be checked by agglutination tests with anti-serum to *Brucella* A antigen. The viable count of the final containers should not be less than 50×10^9 per dose after freeze-drying, if this is to be done, and at least 95% of the cells must be in the smooth phase.

4. Batch control

a) Sterility

Tests for sterility and freedom from contamination of biological materials may be found in Chapter I.4.

b) Safety

A safety test on strain 19 vaccine may be performed in guinea pigs. Groups of at least ten animals are given intramuscular injections of doses of vaccine diluted in PBS, pH 7.2, to contain 5×10^9 viable organisms. The animals

should show no obvious adverse effects and there must be no mortality. After 10 days, the animals are killed, and spleens and blood samples are collected. The spleen tissue must not contain more than 5×10^5 *Brucella* organisms/g, and the serum agglutinin titre with standard *B. abortus* antigen must not exceed 1,000 IU/ml. In practice, batches of vaccine that fail this test are encountered extremely infrequently.

c) Potency

The potency of strain 19 vaccine is determined routinely in guinea pigs or mice. Groups of guinea pigs are injected subcutaneously with 1/15 of the standard subcutaneous cattle dose of the test vaccine or a reference preparation, followed 6 weeks later with an intramuscular challenge of a virulent *B. abortus* strain, such as 544 or 2308. This can be given at the single dose level of 5,000 viable organisms, but it is preferable to use a graded challenge of 500, 5,000 and 50,000 organisms. After a further 6 weeks, the animals are killed and the spleen counts of viable *B. abortus* are determined. The protection index (organisms/g of spleen in vaccinated compared with unvaccinated animals) relative to the reference preparation is then calculated (17). The virulence and infectivity of the challenge strain must be such that the ID_{50} (50% infective dose) is fewer than 100 organisms, and that 5 weeks after inoculating guinea pigs with 5,000 organisms, the mean spleen:body weight ratio is not less than 0.30% and the mean serum agglutination titre is not less than 600 IU/ml.

In the mouse potency assay, graded doses of vaccine are injected into 5-week-old mice (preferably CD1) weighing 21-25 g. The mice are challenged 30 days later by the intraperitoneal injection of 200,000 viable *B. abortus* strain 544 organisms, and, 15 days later, the spleen counts are determined. Parallel tests are conducted with a reference vaccine and the protection index is calculated.

There is some dispute as to the validity of mouse or guinea pig assays for determining the potency of *Brucella* vaccines. However, provided that statistically valid numbers of animals are used (at least 30 per group) and simultaneous comparison is made with a reference vaccine, the results appear to differentiate between effective and ineffective vaccines.

d) Duration of immunity

Vaccinating calves with a full dose of strain 19 vaccine is considered to give long-lasting immunity, and subsequent doses are not recommended. Use of reduced doses, whether given by the intradermal or conjunctival routes, produces less durable immunity, and repeated

doses may need to be given annually. This can lead to antibody responses that may interfere with serological tests.

e) **Stability**

Strain 19 vaccine prepared from seed stock from appropriate sources is stable in characteristics and shows no tendency to reversion to virulence. The freeze-dried vaccine shows a gradual loss of viable count, but should retain its potency for the recommended shelf life. Allowance for this phenomenon is normally made by ensuring that the viable count immediately following freeze-drying is well in excess of the minimum requirement. Maintenance of a cold chain during distribution of the vaccine will ensure its viability.

f) **Preservatives**

Antimicrobial preservatives must not be used in live strain 19 vaccine. For preparation of the freeze-dried vaccine, a stabiliser containing 2.5% casein digest e.g. Tryptone (Oxoid), 5% sucrose and 1% sodium glutamate, dissolved in distilled water and sterilised by filtration is recommended.

g) **Precautions (hazards)**

B. abortus strain 19, although an attenuated strain, is still capable of causing disease in humans. The cell cultures and suspensions must be handled under appropriate conditions of biohazard containment. Reconstitution and subsequent handling of the reconstituted vaccine should be done with care to avoid accidental injection or eye or skin contamination. Vaccine residues and injection equipment should be decontaminated with a suitable disinfectant (phenolic, iodophor or aldehyde formulation) at recommended concentration. Medical advice should be sought in the event of accidental exposure.

5. **Tests on the final product**

a) **Safety**

See Section B.4.b.

b) **Potency**

For the freeze-dried vaccine, potency must be determined on the final product. The procedure is as described in Section B.4.c.

• **Brucellin INRA**

See Chapter 3.3.2. Caprine and ovine brucellosis (excluding *B. ovis* infection).

REFERENCES

1. ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D. & VERGER J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
2. ANGUS R.D. & BARTON C.E. (1984). The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Dev. Biol. Stand.*, 56, 349-356.
3. BAUM M., ZAMIR O., BERGMAN-RIOS R., KATZ E., BEIDER Z., COHEN A. & BANAI M. (1995). Comparative evaluation of microagglutination test and serum agglutination test as supplementary diagnostic methods for brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 2166-2170.
4. BOSSERAY N. & PLOMMET M. (1984). Propositions pour une méthode générale de contrôle d'activité des vaccins antibrucelliques. *Dev. Biol. Stand.*, 56, 247.
5. BRACEWELL C.D. & CORBEL M.J. (1980). An association between arthritis and persistent serological reactions to *B. abortus* in cattle from apparently brucellosis-free herds. *Vet. Rec.*, 106, 99.
6. BRITISH PHARMACOPOEIA (VETERINARY) (1993). Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
7. CORBEL M.J., BRACEWELL C.D., THOMAS E.L. & GILL K.P.W. (1979). Techniques in the Identification of *Brucella* species. In Identification Methods for Microbiologists, 2nd edition. Skinner F.A. & Lovelock D.W., eds. Academic Press, London, UK and New York, USA, 86-89.
8. CORBEL M.J. & HENDRY D.M.F.D. (1983). Methods for the identification of *Brucella*. Booklet 2085. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Lion House Alnwick, Northumberland, UK.
9. CORBEL M.J., STUART F.A., BREWER R.A., JEFFREY M. & BRADLEY R. (1989). Arthropathy associated with *Brucella abortus* Strain 19 vaccination in cattle. 1. Examination of field cases. *Br. Vet. J.*, 145, 337.
10. DAVIDSON I. & HEBERT C.N. (1978). International standard for anti-*Brucella abortus* serum: comparison of the complement-fixing activity of the first and second International Standards and the EEC standard. *Bull. WHO*, 56, 123-127.

11. FAO/WHO (1986). Report 1986. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 6th Report. *WHO Technical Report Series*, No. 740.
12. HENDRY D.M.F.D., CORBEL M.J., BELL R.A. & STACK J.A. (1985). *Brucella* antigen production and standardisation. Booklet 2499. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Lion House Alnwick, Northumberland, UK.
13. MATAR G.M., KHNEISSER I.A. & ABDELNOOR A.M. (1996). Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 477-478.
14. MAYFIELD J.E., BANTLE J.A., EWALT D.R., MEADOR V.P. & TABATABAI L.B. (1990). Detection of *Brucella* cells and cell components. Chapter 5. *In* Animal Brucellosis. Neilsen K. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, USA, 97-120.
15. MORGAN W.J.B., MACKINNON D.J., LAWSON J.R. & CULLEN G.A. (1969). The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet. Rec.*, 85, 636-641.
16. NICOLETTI P. (1992). An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Trop. Anim. Health Prod.*, 24, 40-44.
17. THORNTON D.H. & MUSKETT J.C. (1972). The use of laboratory animals in the potency test of *Brucella abortus* S19 vaccine. *J. Comp. Pathol.*, 82, 201-208.
18. WHO (1970). Report 1970. WHO Expert Committee on Biological Standardisation. Annex 2. Requirements for *Brucella abortus* Strain 19 vaccine (Live – for veterinary use). (Requirements for biological substances No. 20.) *WHO Technical Report Series*, No. 464, 58.
19. WRIGHT P.F., NILSSON E., VAN ROOIJ E.M.A., LELENTA M. & JEGGO M.H. (1993). Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 12, 435-450.

*

* *

Annexe 2

PROJET 04/98

TEXTE FRANCAIS DE REFERENCE D'UNE TECHNIQUE D'ANALYSE

Recherche
d'anticorps
contre la brucellose
par la technique de
l'épreuve à l'antigène tamponné

Immunosérologie animale
Pr 109/02/IS 60/00

Décembre 1997

**GROUPE DE TRAVAIL IMMUNO-SEROLOGIE ANIMALE DE LA COMMISSION SECTORIELLE
D'ACCREDITATION SANTE, PROTECTION ET QUALITE ANIMALES DU COFRAC**

Président :
M. Bernard Toma
ENVA - 7. avenue du Général-de-Gaulle
94704 Maisons-Alfort Cedex

M. Hugues Damour
CNIEL
75382 Paris Cedex 08

M. Bruno Garin-Bastuji
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

M. Bernard Guérin
ACSEDIATE - Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs
BP 65 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

Mme Géraldine Harly-Gerster
Laboratoire Départemental de la Côte-d'Or
BP 678 - 21017 Dijon Cedex

Mme Anne-Marie Hattenberger
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

M. Maurice Lambert
CNEVA Sophia Antipolis
BP 111 - 06902 Sophia Antipolis Cedex

M. Olivier Lecointre
Merial
BP 7009 - 69342 Lyon Cedex 07

Mme Marie-Frédérique Le Potier
CNEVA Ploufragan
BP 53 - 22440 Ploufragan

M. Damien Martin
Bio-Chêne Vert
70 bis, rue de Paris, 35220 Chateaubourg

M. Luc Miéli
Laboratoire de Développement et d'Analyses
BP 54 - 22440 Ploufragan

M. Gérard Perrin
CNEVA Station Régionale de Pathologie Caprine
BP 3081 - 79012 Niort Cedex

M. Bernard Perrin
CNEVA Lyon
BP 7033 - 69 342 Lyon Cedex 07

M. Jean-Paul Picault
CNEVA Ploufragan
BP 53 - 22440 Ploufragan

M. Jacques Raverdy
Laboratoire Vétérinaire Départemental
1, bd du Port - 80039 Amiens Cedex

M. Claude Soulé
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

Mme Marie-Françoise Thorel
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

Mme Viviane Tkczuk-Mocquay
Laboratoire Vétérinaire Départemental
BP 87 - 31140 Aucamville

M. Stéphan Zientara
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

LISTE DES COORDINATEURS DES TEXTES PAR TECHNIQUE

M. Bruno Garin-Bastuji	: Fixation du complément et séroagglutination
M. Bernard Guérin	: Neutralisation virale
M. Jean-Paul Picault	: Inhibition de l'hémagglutination
M. Bernard Toma	: Immunodiffusion en gélose

B. GARIN-BASTUJI

Laboratoire de Référence OIE pour la Brucellose
Laboratoire National de Référence pour la Brucellose
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex
Tél. : 01 49 77 13 00 - Fax : 01 49 77 13 44
E.mail : vaal20@calva.net

Recherche d'anticorps contre la brucellose par la technique de l'épreuve à l'antigène tamponné

PROGRAMME D'ACCREDITATION N°109 DU COMITÉ FRANÇAIS D'ACCREDITATION

INTRODUCTION

Sans objet.

PRECAUTIONS DE SECURITE

Sans objet.

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette technique est destinée à la recherche dans le sérum des ruminants, équidés, suidés, camélidés et carnivores, domestiques et sauvages, des anticorps dirigés contre les bactéries du genre *Brucella* naturellement en phase lisse (*B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis*) par l'épreuve à l'antigène tamponné.

2 - REFERENCES

- GARIN-BASTUJI B. et TRAP D., Brucelloses animales, Techniques de laboratoire, 1990, CNEVA Edit.

3 - DEFINITIONS

3.1 - Série d'épreuves

Opération réalisée en continu par le même opérateur dans le même lieu avec le même matériel et les mêmes réactifs.

4 - PRINCIPE ET REACTION

4.1 - Principe

L'épreuve à l'antigène tamponné (EAT), dénommée également épreuve au Rose Bengale, appartient à la famille des épreuves à l'antigène de *Brucella* tamponné (*en anglais* : buffered *Brucella* antigen tests). C'est une épreuve de séroagglutination rapide. Le mélange réactionnel contient pour moitié le sérum et pour moitié l'antigène constitué d'une suspension phénolée à 0,5 p. cent de *Brucella abortus* biovar 1, souche 99, inactivée, colorée au rose bengale et tamponnée à $\text{pH} = 3,65 \pm 0,05$.

4.2 - Réaction

4.2.1 - Méthode

La méthode utilisée est une méthode de séroagglutination rapide sur plaque.

4.2.2 - Antigène

L'antigène est utilisé sous un volume de 25 μl ou de 30 μl .

4.2.3 - Sérums à tester

Les sérums sont testés purs sous un volume identique de 25 μl ou 30 μl .

4.2.4 - Sérums de contrôle

Les sérums de contrôle négatif et positif sont utilisés purs sous un volume de 25 µl ou 30 µl.

4.3 - Contrôles

4.3.1 - Sérums de contrôle

Des sérums de contrôle négatif et positif sont inclus dans chaque série d'épreuves.

5 - DILUANTS, MILIEUX DE CULTURE, REACTIFS ET AUTRES PRODUITS

5.1 - Diluants

Sans objet.

5.2 - Milieux de culture

Sans objet.

5.3 - Réactifs

5.3.1 - Antigène

L'antigène est un antigène du commerce, à usage vétérinaire, agréé par le ministère de l'agriculture exclusivement, à conserver selon les indications du fabricant. Cet antigène ne doit en aucun cas être exposé à une température $\leq 1^{\circ}\text{C}$.

5.3.2 - Sérums de contrôle

5.3.2.1 - Sérum de contrôle positif (du commerce ou préparé par le laboratoire). Il est recommandé d'utiliser un sérum faiblement positif comme sérum de contrôle positif.

A défaut, on diluera le sérum du commerce dans du sérum négatif de manière à obtenir un sérum faiblement positif.

5.3.2.2 - Sérum de contrôle négatif (du commerce ou préparé par le laboratoire).

5.3.3 - Autres produits

Sans objet.

6 - APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant du laboratoire d'immunosérologie et notamment :

6.1 - Enceinte réfrigérée thermostatée à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

6.2 - Centrifugeuse réfrigérée si possible et permettant d'obtenir une accélération de 5 000 à 15 000 m.s^{-2} .

6.3 - Système de distribution et de dilution à volumétrie et précision adaptées.

6.4 - Plaque blanche (verre, opaline, plastique, céramique)

6.5 - Agitateur de plaque adapté, à mouvement basculant ou tridimensionnel.

6.6 - Dispositif de mélange (baguette ou peigne, en verre ou plastique).

6.7 - Minuteur ou chronomètre.

7 - ECHANTILLONNAGE

Sans objet.

8 - PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ANALYSE

Dès réception, les prélèvements sanguins sont centrifugés à 7 500-15 000 m.s^{-2} , si possible après avoir été débarrassés de leur caillot. Les sérums sont prélevés et identifiés. Ces derniers seront conservés 72 h maximum à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Pour des conservations plus longues, les sérums seront congelés à une température $\leq -16^{\circ}\text{C}$.

9 - MODE OPERATOIRE

9.1 - Epreuve

9.1.1 - Préparation de l'antigène

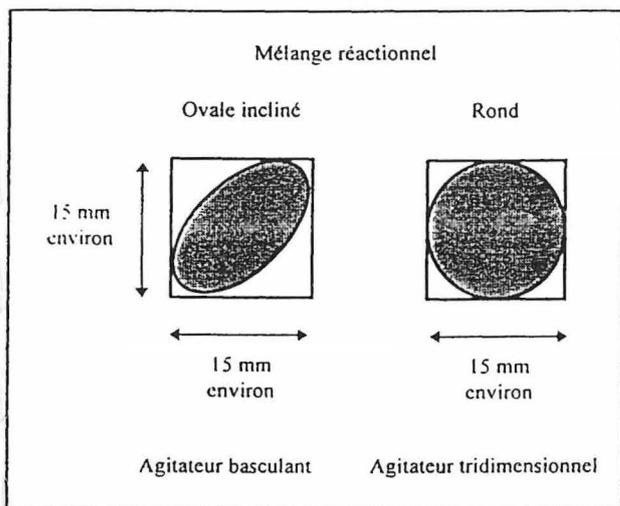
L'antigène (5.3.1) est laissé à température ambiante pendant 30 min avant emploi, puis agité doucement de manière à obtenir une suspension homogène. L'antigène étant sensible aux changements répétés de température et aux séjours prolongés à température ambiante, il est recommandé de ne pas en réchauffer une quantité excessive.

9.1.2 - Sérums à tester et sérums de contrôle

Les sérums à tester et les sérums de contrôle (5.3.2), une fois décongelés si nécessaire, sont laissés à température ambiante pendant 30 min avant emploi.

9.1.3 - Épreuve

Déposer côte à côte sur la plaque le même volume, 25 µl ou 30 µl, de sérum pur (non décomplémenté) et d'antigène. Mélanger rapidement le sérum et l'antigène. Agiter doucement la plaque pendant 4 min. Lorsque les mélanges réactionnels sont effectués selon une forme ovale dont l'axe est incliné par rapport aux axes de la plaque, l'agitation doit être réalisée sur un agitateur de type basculant. Lorsque les mélanges réactionnels sont effectués selon une forme ronde, l'agitation doit être réalisée sur un agitateur de type tridimensionnel. L'utilisation d'un agitateur orbital est à proscrire (l'antigène est alors centrifugé à la circonférence du mélange réactionnel). La taille du mélange réactionnel doit être telle que son épaisseur soit suffisamment faible pour permettre une lecture facile de la réaction et suffisamment importante pour limiter l'évaporation pendant le temps de réaction. Il est ainsi recommandé que le mélange s'inscrive dans un carré de 15 mm de côté (voir schéma suivant).



9.2 - Lecture

Effectuer la lecture immédiatement, sous un bon éclairage et à l'oeil nu. Ne pas tenir compte des agglutinats apparaissant après 4 min.

9.3 - Interprétation

Les résultats sont interprétés de la manière suivante :

- Absence d'agglutinat : négatif
- Présence d'agglutinats (même très fins) : positif.

10 - CONDITIONS DE CONSERVATION ET D'ELIMINATION DES ECHANTILLONS

Pour des conservations supérieures à 72 h, les sérums seront conservés congelés à une température $\leq -16^{\circ}\text{C}$. Leur destruction sera réalisée par autoclavage ou par toute autre méthode retenue dans les exigences générales.

11 - EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés de la façon suivante : positif ou négatif.

12 - FIDELITE

Des variations de résultats peuvent être observées avec des antigènes agréés de fabrications différentes. Ces variations apparaissent notamment sur les sérums renfermant un titre faible en anticorps spécifiques.

13 - RAPPORT D'ANALYSE

Le rapport d'analyse doit être conforme aux exigences du COFRAC.

Annexe 3

PROJET 04/94

TEXTE FRANCAIS DE REFERENCE D'UNE TECHNIQUE D'ANALYSE

Recherche
d'anticorps
contre la brucellose
dans le lait
par la technique de
l'épreuve de l'anneau

Immunosérologie animale
Pr 109/02/IS 90/01

Décembre 1997

**GROUPE DE TRAVAIL IMMUNO-SEROLOGIE ANIMALE DE LA COMMISSION SECTORIELLE
D'ACCREDITATION SANTE, PROTECTION ET QUALITE ANIMALES DU COFRAC**

Président :
M. Bernard Toma
ENVA - 7, avenue du Général-de-Gaulle
94704 Maisons-Alfort Cedex

M. Hugues Damour
CNIEL
75382 Paris Cedex 08

M. Bruno Garin-Bastuji
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

M. Bernard Guérin
ACSEDIATE - Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs
BP 65 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

Mme Géraldine Harly-Gerster
Laboratoire Départemental de la Côte-d'Or
BP 678 - 21017 Dijon Cedex

Mme Anne-Marie Hattenberger
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

M. Maurice Lambert
CNEVA Sophia Antipolis
BP 111 - 06902 Sophia Antipolis Cedex

M. Olivier Lecointre
Merial
BP 7009 - 69342 Lyon Cedex 07

Mme Marie-Frédérique Le Potier
CNEVA Ploufragan
BP 53 - 22440 Ploufragan

M. Damien Martin
Bio-Chêne Vert
70 bis, rue de Paris, 35220 Chateaubourg

M. Luc Miéli
Laboratoire de Développement et d'Analyses
BP 54 - 22440 Ploufragan

M. Gérard Perrin
CNEVA Station Régionale de Pathologie Caprine
BP 3081 - 79012 Niort Cedex

M. Bernard Perrin
CNEVA Lyon
BP 7033 - 69 342 Lyon Cedex 07

M. Jean-Paul Picault
CNEVA Ploufragan
BP 53 - 22440 Ploufragan

M. Jacques Raverdy
Laboratoire Vétérinaire Départemental
1, bd du Port - 80039 Amiens Cedex

M. Claude Soulé
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

Mme Marie-Françoise Thorel
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

Mme Viviane Tkcazuk-Mocquay
Laboratoire Vétérinaire Départemental
BP 87 - 31140 Aucamville

M. Stéphan Zientara
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

LISTE DES COORDINATEURS DES TEXTES PAR TECHNIQUE

M. Bruno Garin-Bastuji	: Fixation du complément et séroagglutination
M. Bernard Guérin	: Neutralisation virale
M. Jean-Paul Picault	: Inhibition de l'hémagglutination
M. Bernard Toma	: Immunodiffusion en gélose

B. GARIN-BASTUJI

Laboratoire de Référence OIE pour la Brucellose
Laboratoire National de Référence pour la Brucellose
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex
Tél. : 01 49 77 13 00 - Fax : 01 49 77 13 44
E.mail : vaal20@calva.net

Recherche d'anticorps contre la brucellose dans le lait par la technique de l'épreuve de l'anneau

PROGRAMME D'ACCREDITATION N°109 DU COMITÉ FRANÇAIS D'ACCREDITATION

INTRODUCTION

Sans objet.

PRECAUTIONS DE SECURITE

L'excrétion de *Brucella* dans le lait est fréquente chez les bovins infectés de brucellose. La brucellose étant une maladie transmissible à l'homme, on manipulera avec précaution les prélèvements de lait, en évitant notamment tout contact direct du lait avec la peau et les muqueuses. Les opérations productrices d'aérosol, agitations notamment, seront effectuées dans les conditions de sécurité requises (cf Chapitre 14).

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette technique est destinée à la recherche dans le lait individuel ou de mélange, des anticorps dirigés contre les bactéries du genre *Brucella* naturellement en phase lisse (*B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis*) par l'épreuve de l'anneau.

2 - REFERENCES

- GARIN-BASTUJI B. et TRAP D., Brucelloses animales, Techniques de laboratoire, 1990, CNEVA Edit.

3 - DEFINITIONS

3.1 - Série d'épreuves

Opération réalisée en continu par le même opérateur dans le même lieu avec le même matériel et les mêmes réactifs.

4 - PRINCIPE ET REACTION

4.1 - Principe

L'épreuve de l'anneau, dénommée également ring-test (RT), est une épreuve d'agglutination lente. Les anticorps produits dans le lait à la suite d'une infection brucellique chez la vache sont majoritairement adsorbés sur les globules gras du lait. Lorsqu'un antigène figuré et coloré est mis en présence d'un lait renfermant des anticorps spécifiques, la réaction antigène-anticorps se manifeste par une coloration de l'anneau de crème remonté à la surface du lait pendant la période d'incubation.

4.2 - Réaction

4.2.1 - Méthode

Un antigène figuré, constitué d'une suspension phénolée à 0,5 p. cent de *Brucella abortus* biovar 1, souche 99, inactivée, colorée à l'hématoxyline, est mis en présence du lait à examiner en tube. Le mélange est incubé 1 h à

37°C ± 2°C puis 18-20 h à 5°C ± 3°C. La réaction est lue d'après la coloration relative de l'anneau de crème et de la colonne de lait sous-jacent.

4.2.2 - Antigène

L'antigène est utilisé sous un volume de 50 µl.

4.2.3 - Lait à tester

Les laits sont testés sous un volume de 1 ml, purs lorsqu'il s'agit de laits de mélange, dilués à 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16 en lait cru, préalablement reconnu négatif, lorsqu'il s'agit de laits individuels.

4.2.4 - Lait de contrôle

Les laits de contrôle négatif et positif sont utilisés purs sous un volume de 1 ml.

4.3 - Contrôles

4.3.1 - Lait de contrôle

Un lait de contrôle positif, constitué d'une dilution de sérum positif dans du lait négatif, est inclus dans chaque série d'épreuves.

Un lait de contrôle négatif, constitué d'un lait préalablement reconnu négatif et provenant d'une exploitation officiellement indemne de brucellose, est inclus dans chaque série d'épreuves.

Ces laits de contrôle permettent de valider la série d'épreuves.

5 - DILUANTS, MILIEUX DE CULTURE, REACTIFS ET AUTRES PRODUITS

5.1 - Diluants

5.1.1 - Tampon

Sans objet. Toutes les dilutions s'effectuent en lait négatif.

5.2 - Milieux de culture

Sans objet.

5.3 - Réactifs

5.3.1 - Antigène

L'antigène est un antigène du commerce, à usage vétérinaire, agréé par le ministère de l'agriculture

exclusivement, à conserver selon les indications du fabricant. Cet antigène ne doit en aucun cas être exposé à une température ≤ 1°C.

5.3.2 - Sérums et laits de contrôle

5.3.2.1 - Sérum de contrôle positif

Sérum, du commerce ou préparé par le laboratoire, dilué dans du lait cru, préalablement reconnu négatif, à une dilution permettant d'obtenir une réaction positive d'intensité moyenne, c'est-à-dire avec un anneau de crème légèrement plus coloré que le lait sous-jacent. Un sérum positif dans l'épreuve à l'antigène tamponné et en fixation du complément est recommandé. On notera que le titre utilisé en final n'est pas nécessairement lié au titre du sérum en séroagglutination lente ou en fixation du complément. Le volume du sérum utilisé doit être inférieur ou égal à 50 µl pour 1 ml de lait (en volume final). Le sérum de contrôle positif est conservé en parties aliquotes, congelé à une température ≤ -16°C et le lait de contrôle positif est préparé extemporanément.

5.3.2.2 - Lait de contrôle négatif

Lait, du commerce ou préparé par le laboratoire, préalablement reconnu négatif et provenant d'une exploitation officiellement indemne de brucellose. Ce lait est conservé en parties aliquotes, congelé à une température ≤ -16°C.

5.3.3 - Autres produits

Sans objet.

6 - APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant du laboratoire d'immunosérologie et notamment :

6.1 - Etuve à 37°C ± 2°C.

6.2 - Enceinte réfrigérée thermostatée à 5°C ± 3°C.

6.3 - Système de distribution et de dilution à volumétrie et précision adaptées.

6.4 - Tubes et portoirs. Les tubes doivent être transparents et tels que la colonne de lait sous 1 ml soit d'au moins 25 mm de hauteur. Les portoirs doivent être conçus de manière à favoriser une mise en température rapide et correcte des tubes et de leur contenu.

6.6 - Minuteur ou chronomètre.

7 - ÉCHANTILLONNAGE

7.1 - Lait de mélange : l'échantillon est prélevé à partir d'un conteneur réfrigéré à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ muni d'un système d'agitation permettant une bonne homogénéisation du mélange de lait.

7.2 - Lait individuel : prélever et tester le lait de chaque quartier.

8 - PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON POUR ANALYSE

Dès réception, les prélèvements de lait sont conservés 48 h maximum à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Pour améliorer la conservation des échantillons de lait, du bronopol (2-bromo-nitro-1,3 propanediol, 98 p. cent) peut être ajouté au lait à la concentration de 0,02 p. cent (soit 0,05 ml d'une solution aqueuse à 120 g par l de bronopol pour 30 ml de lait). La conservation du lait à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ peut ainsi être prolongée de 48 h. L'addition de ce produit ne nuit généralement pas à la technique ELISA. Pour des conservations plus longues, les laits seront congelés à une température $\leq -16^{\circ}\text{C}$.

9 - MODE OPÉRAIRE

9.1 - Épreuve

9.1.1 - Préparation de l'antigène

L'antigène (5.3.1) est laissé à température ambiante pendant 1 h avant emploi, puis agité doucement de manière à obtenir une suspension homogène. L'antigène étant sensible aux changements répétés de température et aux séjours prolongés à température ambiante, il est recommandé de ne pas en réchauffer une quantité excessive.

9.1.2 - Laits à tester et laits de contrôle

Les laits à tester et les laits de contrôle (5.3.2), une fois décongelés si nécessaire, sont laissés à température ambiante pendant 1 h avant emploi. Ils sont homogénéisés et répartis en tubes sous 1 ml. Les laits individuels sont dilués en lait négatif de 1/1 à 1/16.

9.1.3 - Épreuve

Ajouter 50 μl d'antigène à l'échantillon de lait. Mélanger soigneusement le lait et l'antigène jusqu'à obtention d'une couleur uniforme du mélange. Incuber 1 h à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ puis 18-20 h à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

9.2 - Lecture

Effectuer la lecture immédiatement, sous un bon éclairage et à l'oeil nu. Noter la coloration relative de l'anneau de crème et de la colonne de lait sous-jacent.

9.3 - Interprétation

Les résultats sont interprétés de la manière suivante :

- Anneau de crème moins coloré
que le lait sous-jacent : négatif
- Anneau de crème au moins aussi coloré
que le lait sous-jacent : positif

Pour un lait individuel, le résultat est positif si une réaction positive est encore observée à la dilution du 1/8.

10 - CONDITIONS DE CONSERVATION ET D'ÉLIMINATION DES ÉCHANTILLONS

Pour des conservations supérieures à 48 h et inférieures à 96 h, les laits pourront être additionnés de bronopol (8.) Pour des conservations supérieures à 48 h sans bronopol ou supérieures à 96 h avec bronopol, les laits seront conservés congelés à une température $\leq -16^{\circ}\text{C}$. Leur destruction sera réalisée par autoclavage ou par toute autre méthode retenue dans les exigences générales.

11 - EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés de la façon suivante : positif ou négatif. L'expression "positif limite" ou "douteux" peut

être utilisée pour les laits présentant une réaction très faible. De telles réactions ne doivent en aucun cas être classées comme négatives.

12 - FIDELITE

L'apparition de résultats faussement positifs n'est pas rare avec cette technique. Bien que leur origine soit mal connue, ils semblent plus fréquents sur des laits contenant du colostrum ou sur des laits de mammite (y compris mammite sub-clinique). Ils sont notablement augmentés lorsque l'épreuve est réalisée sur un lait de mélange en fin de saison de traite et contenant le lait d'animaux proches du tarissement, ou lorsque ce mélange est constitué d'un

faible nombre de laits individuels (≤ 10). On considérera donc avec précaution des résultats positifs observés sur de tels laits.

13 - RAPPORT D'ANALYSE

Le rapport d'analyse doit être conforme aux exigences du COFRAC.

14 - ANNEXES

14.1 - Règles de sécurité

Se référer à l'ouvrage : J. Simons et P. Sotty, Prévention en laboratoire de recherche - Risques biologiques, CNRS-INRA-INSERM, Paris, 1991.

1 flacon = 100 ml → 2000 tests / flacon -
≈ 200 FF

Annexe 4

PROJET 04/98

TEXTE FRANCAIS DE REFERENCE D'UNE TECHNIQUE D'ANALYSE

Recherche
d'anticorps
contre la brucellose
par la microméthode
de fixation du complément

Immunosérologie animale
Pr 109/02/IS 70/00

Décembre 1997

**GROUPE DE TRAVAIL IMMUNO-SEROLOGIE ANIMALE DE LA COMMISSION SECTORIELLE
D'ACCREDITATION SANTE, PROTECTION ET QUALITE ANIMALES DU COFRAC**

Président :
M. Bernard Toma
ENVA - 7. avenue du Général-de-Gaulle
94704 Maisons-Alfort Cedex

M. Hugues Damour
CNIEL
75382 Paris Cedex 08

M. Bruno Garin-Bastuji
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

M. Bernard Guérin
ACSEDIATE - Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs
BP 65 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

Mme Géraldine Harly-Gerster
Laboratoire Départemental de la Côte-d'Or
BP 678 - 21017 Dijon Cedex

Mme Anne-Marie Hattenberger
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

M. Maurice Lambert
CNEVA Sophia Antipolis
BP 111 - 06902 Sophia Antipolis Cedex

M. Olivier Lecointre
Meril
BP 7009 - 69342 Lyon Cedex 07

Mme Marie-Frédérique Le Potier
CNEVA Ploufragan
BP 53 - 22440 Ploufragan

M. Damien Martin
Bio-Chêne Vert
70 bis, rue de Paris, 35220 Chateaubourg

M. Luc Miéli
Laboratoire de Développement et d'Analyses
BP 54 - 22440 Ploufragan

M. Gérard Perrin
CNEVA Station Régionale de Pathologie Caprine
BP 3081 - 79012 Niort Cedex

M. Bernard Perrin
CNEVA Lyon
BP 7033 - 69342 Lyon Cedex 07

M. Jean-Paul Picault
CNEVA Ploufragan
BP 53 - 22440 Ploufragan

M. Jacques Raverdy
Laboratoire Vétérinaire Départemental
1, bd du Port - 80039 Amiens Cedex

M. Claude Soulé
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

Mme Marie-Françoise Thorel
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

Mme Viviane Tkcazuk-Mocquay
Laboratoire Vétérinaire Départemental
BP 87 - 31140 Aucamville

M. Stéphan Zientara
CNEVA Alfort
BP 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

LISTE DES COORDINATEURS DES TEXTES PAR TECHNIQUE

M. Bruno Garin-Bastuji	: Fixation du complément et séroagglutination
M. Bernard Guérin	: Neutralisation virale
M. Jean-Paul Picault	: Inhibition de l'hémagglutination
M. Bernard Toma	: Immunodiffusion en gélose

**Recherche
d'anticorps
contre la brucellose
par la microméthode de
de fixation du complément**

PROGRAMME D'ACCREDITATION N°109 DU COMITÉ FRANÇAIS D'ACCREDITATION

INTRODUCTION

Sans objet.

PRECAUTIONS DE SECURITE

Sans objet.

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette technique est destinée à la recherche dans le sérum des ruminants, équidés, suidés, camélidés et carnivores, domestiques et sauvages, des anticorps dirigés contre les bactéries du genre *Brucella* naturellement en phase lisse (*B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis*) par fixation du complément. La technique est réalisée en mode "qualitatif" ou "quantitatif".

2 - REFERENCES

- GARIN-BASTUJI B. et TRAP D., Brucelloses animales, Techniques de laboratoire, 1990, CNEVA Edit.

3 - DEFINITIONS

3.1 - Complément (C)

Complexe moléculaire sérique dont certains composants ont la propriété de se fixer aux complexes immuns antigène-anticorps spécifiques.

3.2 - Sérum hémolytique (SH)

Sérum d'animal hyperimmunisé contre des hématies hétérologues et renfermant un taux élevé d'anticorps induisant *in vitro* la lyse des hématies correspondantes en présence de complément.

3.3 - Système hémolytique

Mélange en quantités prédéterminées d'une suspension d'hématies et du sérum hémolytique spécifique.

3.4 - Série d'épreuves

Opération réalisée en continu par le même opérateur dans le même lieu avec le même matériel et les mêmes réactifs.

4 - PRINCIPE ET REACTION

4.1 - Principe

Du complément hétérologue est mis en présence du mélange antigène-sérum testé. Lors de la formation de complexes immuns antigène-anticorps spécifiques, le complément se fixe sur ces complexes. La réaction est révélée par l'adjonction d'un second système immun hématies-sérum hémolytique (système hémolytique). Le complément non utilisé par les premiers complexes se fixe au système hémolytique entraînant une lyse des hématies

d'ampleur proportionnelle à la quantité de complément resté libre. Le taux d'hémolyse observé, évalué d'après la coloration du milieu de réaction (surnageant après centrifugation), est ainsi inversement proportionnel aux taux d'anticorps spécifiques initialement présents dans le sérum. L'antigène consiste en une suspension phénolée à 0,5 p. cent de *Brucella abortus* biovar 1, souche 99, inactivées.

4.2 - Réaction

4.2.1 - Méthode

La méthode utilisée est une méthode de fixation du complément à froid, en plaques de microtitrage.

4.2.2 - Antigène

L'antigène est utilisé sous un volume de 25 µl.

4.2.3 - Sérums à tester

Les sérums sont testés, une fois décomplémentés, sous un volume de 25 µl à la dilution du 1/4 (cadre réglementaire français) ou à toute autre dilution selon les spécifications de la demande d'essai. Dans les cas où un phénomène de zone (prozone), lié à un très haut titre en anticorps du sérum, est redouté (diagnostic d'avortement, par exemple), il est recommandé de tester les sérums aux dilutions 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 et 1/64 (9.1.6). Inversement, s'il est nécessaire d'identifier des titres inférieurs à 20 U.CEE/ml, il est recommandé de tester les sérums à partir de la dilution 1/2.

4.2.4 - Sérums de contrôle

Les sérums de contrôle sont utilisés, une fois décomplémentés, sous un volume de 25 µl, à la dilution du 1/4 pour le sérum de contrôle négatif et à des dilutions entourant le titre indiqué par le fabricant pour le sérum de contrôle positif.

4.2.5 - Complément

Le complément est utilisé sous un volume de 25 µl contenant six unités hémolytiques 50 p. cent (H50).

4.2.6 - Système hémolytique

Le système hémolytique comprend une suspension d'hématies à 2,5 p. cent sous un volume de 25 µl et un sérum hémolytique de lapin sous un volume de 25 µl et contenant deux unités hémolytiques 100 p. cent.

4.3 - Contrôles

4.3.1 - Témoins sérums

L'absence de pouvoir anticomplémentaire du sérum testé est vérifiée par la réalisation d'un puits "témoin sérum" où l'épreuve est effectuée sans antigène, celui-ci étant remplacé par un volume identique de diluant. Ce contrôle est réalisé systématiquement pour chaque sérum testé.

4.3.2 - Témoin antigène

L'absence de pouvoir anticomplémentaire de l'antigène utilisé est vérifiée par la réalisation d'un puits "témoin antigène" où l'épreuve est effectuée sans sérum, celui-ci étant remplacé par un volume identique de diluant. Ce contrôle est réalisé une seule fois pour chaque série d'épreuves.

4.3.3 - Témoin complément

L'activité du complément sur le couple hémolytique est vérifiée par la réalisation d'un puits "témoin complément" où l'épreuve est effectuée uniquement avec le complément et le système hémolytique, l'antigène et le sérum étant remplacés chacun par un volume identique de diluant. Ce contrôle est réalisé une seule fois pour chaque série d'épreuves.

4.3.4 - Témoin système hémolytique

La qualité du système hémolytique (absence d'hémolyse en l'absence de complément) est vérifiée par la réalisation d'un puits "témoin système hémolytique" où l'épreuve est effectuée uniquement avec le système hémolytique, le complément, l'antigène et le sérum étant remplacés chacun par un volume identique de diluant. Ce contrôle est réalisé une seule fois pour chaque série d'épreuves.

4.3.5 - Gamme témoin d'hémolyse

Afin de faciliter la lecture de l'épreuve, une gamme-témoin d'hémolyse permettant d'apprécier correctement l'hémolyse observée dans les puits de réaction est réalisée de manière systématique pour chaque série d'épreuves.

4.3.6 - Sérums de contrôle

Des sérums de contrôle négatif et positif sont inclus dans chaque série d'épreuves.

5 - DILUANTS, MILIEUX DE CULTURE, REACTIFS ET AUTRES PRODUITS

5.1 - Diluants

5.1.1 - Tampon véronal calcium magnésium (TV)

Composition :

Chlorure de sodium	8,500 g
Diéthylmalonylurée.....	0,575 g
Diéthylmalonylurée sodée.....	0,185 g
Chlorure de magnésium, 6 H ₂ O	0,168 g
Chlorure de calcium	0,028 g
Eau distillée.....	q.s.p. 1 000 ml

5.2 - Milieux de culture

Sans objet.

5.3 - Réactifs

5.3.1 - Antigène

L'antigène (antigène du commerce, à usage vétérinaire, agréé par le ministère de l'agriculture exclusivement) est à diluer et à conserver selon les indications du fabricant. Cet antigène ne doit en aucun cas être exposé à une température $\leq 1^{\circ}\text{C}$.

5.3.2 - Complément de cobave lvophilisé (non stabilisé)

Complément (C) au 1/100 (par exemple) pour le titrage du complément ;

Complément au 1/10 (par exemple) en TV (5.1.1) pour le titrage du sérum hémolytique ; Le complément econstitué, non utilisé immédiatement, doit être conservé

à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, jusqu'à la mise en oeuvre de la série d'épreuves du jour, et à une température $\leq -16^{\circ}\text{C}$ pour le volume restant non utilisé.

- Pour l'épreuve de fixation du complément, diluer le complément selon le résultat du titrage du complément (9.1.4).

5.3.3 - Hématies de mouton à 50 p. cent

- Hématies de mouton à 50 p. cent à diluer au 1/20 (concentration finale : 2,5 p. cent) (9.1.1) en TV (5.1.1).

5.3.4 - Sérum hémolytique de lapin anti-hématies de mouton

- Sérum hémolytique de lapin anti-hématies de mouton à diluer selon titrage réalisé à chaque nouveau lot (14.1).

5.3.5 - Sérums de contrôle

5.3.5.1 - Sérum de contrôle positif de titre connu (du commerce ou préparé par le laboratoire).

5.3.5.2 - Sérum de contrôle négatif (du commerce ou préparé par le laboratoire).

5.3.6 - Autres produits

Sans objet.

6 - APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant du laboratoire d'immunosérologie et notamment :

6.1 - Etuve à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.2 - Bain-marie (à agitation si possible) thermostaté à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.3 - Bain-marie (à agitation si possible) thermostaté à $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.4 - Enceinte réfrigérée à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

6.5 - Centrifugeuse réfrigérée si possible et permettant d'obtenir une accélération de 5 000 à 15 000 m.s^{-2} .

6.6 - Système de distribution et de dilution à volumétrie et précision adaptées.

6.7 - Plaques de microtitrage à usage unique (fond en U) munies de couvercle. tubes de 5 ml et portoirs.

6.8 - Miroir de lecture de plaques (éventuellement).

6.9 - Minuteur ou chronomètre.

7 - ECHANTILLONNAGE

Sans objet.

8 - PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ANALYSE

Dès réception, les prélèvements sanguins sont centrifugés à $7\,500-15\,000 \text{ m.s}^{-2}$, si possible après avoir été débarrassés de leur caillot. Les sérums sont prélevés et identifiés. Ces derniers seront conservés 72 h maximum à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Pour des conservations plus longues, les sérums seront congelés à une température $\leq -16^{\circ}\text{C}$.

9 - MODE OPERATOIRE

9.1 - Epreuve

9.1.1 - Préparation des hématies

Les hématies (5.3.3) sont diluées à 2.5 p. cent (dilution finale) en TV (5.1.1). Préparer cette suspension en quantité suffisante pour le titrage du complément et les examens.

9.1.2 - Préparation du sérum hémolytique

Le sérum hémolytique (5.3.4) est dilué selon les résultats du titrage. Préparer cette solution en quantité suffisante pour le titrage du complément et pour les examens.

9.1.3 - Préparation de l'antigène

Diluer l'antigène (5.3.1) selon les indications du fabricant.

9.1.4 - Titrage du complément

9.1.4.1 - Préparer le complément (5.3.2) comme décrit au paragraphe 5.3.2.

9.1.4.2 - Répartir en tubes de la façon suivante :

														Témoins hémolyse	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	H0	H100
C à 1/100 (µl)	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	0	400
TV (µl)	360	350	340	330	320	310	300	290	280	270	260	250	240	400	0
Antigène dilué (µl)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

9.1.4.3 - Agiter les tubes. Les placer au bain-marie à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min.

9.1.4.4 - Préparer le système hémolytique. Mélanger 2 min avant l'emploi les quantités nécessaires pour le titrage du complément et laisser à la température du laboratoire. Conserver séparément le reste des éléments du système hémolytique à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ jusqu'au lendemain.

9.1.4.5 - Ajouter le système hémolytique à raison de 400 µl par tube.

9.1.4.6 - Agiter les tubes. Les placer au bain-marie à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min.

9.1.4.7 - Centrifuger immédiatement les tubes à la sortie du bain-marie à $5\,000-10\,000 \text{ m.s}^{-2}$ pendant 10 min.

9.1.4.8 - Lecture du titrage :

Préparer un témoin d'hémolyse à 50 p. cent. Mélanger à parties égales (500 µl) le surnageant du tube présentant une hémolyse 0 p. cent (en cas d'absence dans la gamme,

utiliser du tampon TV) et le surnageant d'un tube présentant une hémolyse 100 p. cent. En cas d'absence de tube présentant une hémolyse 100 p. cent dans la gamme, préparer le témoin d'hémolyse à 50 p. cent en réalisant une suspension renfermant 400 µl de système hémolytique et 1 600 µl d'eau distillée. Prendre comme unité H50 le tube de la gamme dont le surnageant présente la même coloration que le témoin d'hémolyse 50 p. cent ainsi préparé.

9.1.4.9 - Interprétation : calcul de la quantité de complément à préparer pour les épreuves.

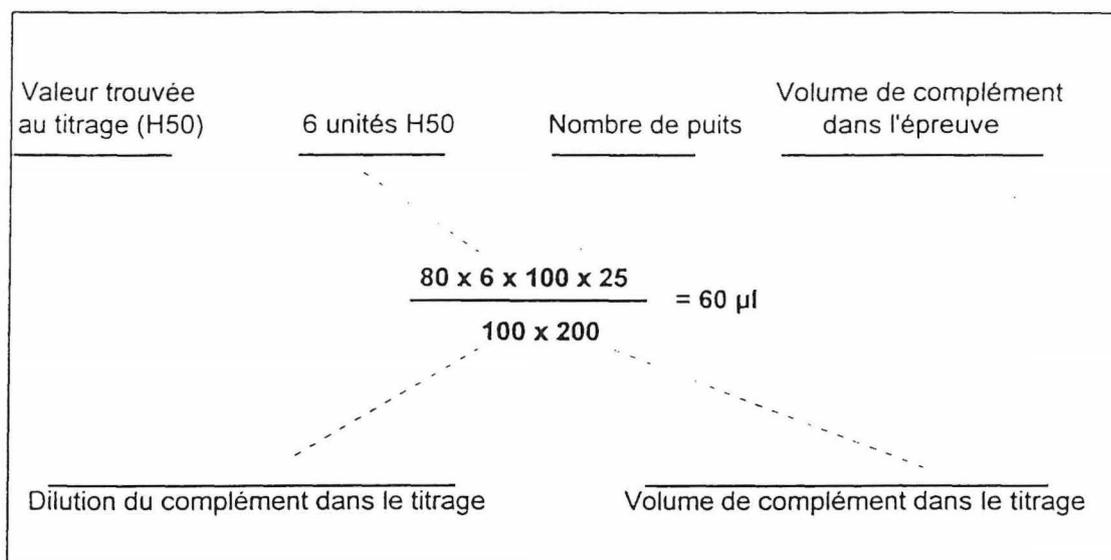
Exemple :

Nombre de puits = 100, chaque puits utilise 25 µl de complément dilué, soit :

$25 \mu\text{l} \times 100 = 2\,500 \mu\text{l}$ (volume total de complément dilué à préparer)

L'unité hémolytique 50 p. cent (H50) a été trouvée pour le tube n°5 (80 µl de complément au 1/100).

L'épreuve utilise 6 H50, soit :



Soit 60 µl de complément pur à diluer dans 2 440 µl de TV (5.1.1) pour obtenir un volume total de 2 500 µl.

9.1.5 - Décomplémentation des sérums à tester et des sérums de contrôle

Les sérums sont chauffés purs au bain-marie à $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min.

9.1.6 - Dilution des sérums à tester et des sérums de contrôle

Dilutions au 1/4 : 25 µl de chaque sérum à tester

décomplémenté sont mélangés à 75 µl de TV (5.1.1) dans une plaque intermédiaire. Vingt-cinq microlitres de ce mélange initial sont reportés dans un puits (puits "témoin sérum") et 25 µl sont reportés dans un autre puits (puits "examen") de la plaque d'épreuve. La même opération est réalisée avec les sérums de contrôle.

- Dilutions suivantes (sérum de contrôle positif et si nécessaire pour les sérums à tester) : 25 µl du mélange initial sont prélevés et mélangés à 25 µl de TV (5.1.1) (dilution au 1/8), et ainsi de suite, afin d'obtenir des dilutions successives de raison deux (dilutions au 1/16, 1/32, ...).

9.1.7 - Répartition

	Sérum dilué	TV	Antigène dilué	C 6H50
Puits témoin sérum dilution du 1/4	25 µl	25 µl		25 µl
Puits examen dilutions de 1/4 à 1/256	25 µl	-	25 µl	25 µl

9.1.8 - Répartition des témoins devant accompagner chaque série d'examens

	TV	Antigène dilué	C 6H50
Témoin antigène	25 µl	25 µl	25 µl
Témoin complément	50 µl		25 µl
Témoin système hémolytique	75 µl		

9.1.9 - Réaction

Agiter les plaques, les couvrir puis les placer au réfrigérateur à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ pendant 16 h à 20 h..

9.1.10 - Etape de révélation (le lendemain)

9.1.10.1 - Préparation du système hémolytique.

Mélanger à parties égales les solutions (9.1.1) et (9.1.2) préparées la veille et conservées séparées depuis à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

9.1.10.2 - Laisser le mélange à la température du laboratoire pendant 10 min.

9.1.10.3 - Placer ensuite les plaques d'épreuve à l'étuve à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 10 min, soit les unes à côté des autres,

soit les unes sur les autres en intercalant des plaques d'aluminium. Le système hémolytique demeure ainsi 20 min à la température du laboratoire.

9.1.10.4 - Ajouter dans chaque puits 50 µl de système hémolytique, agiter les plaques, les couvrir et les placer à l'étuve à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min.

9.2 - Lecture

Centrifuger les plaques d'épreuve à $5\,000\text{--}10\,000\text{ m.s}^{-2}$ pendant 10 min (centrifugeuse réfrigérée, si possible) ou les placer à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ pendant 1 h 30 min.

La lecture s'effectue en évaluant la coloration du surnageant par comparaison avec une gamme-témoin d'hémolyse préparée de la façon suivante :

Témoins d'hémolyse	0	+	++	+++	++++
TV (µl)	0	25	50	75	100
Surnageant hémolyse totale (µl) *	100	75	50	25	0

*Préparé à partir des puits à hémolyse totale

9.3 - Interprétation

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'hémolyse :

- ++++ : inhibition complète de l'hémolyse.
- +++ : 75 p. cent d'inhibition de l'hémolyse.
- ++ : 50 p. cent d'inhibition de l'hémolyse.
- +
- 0 : hémolyse totale.

La conversion des résultats en unités européennes de fixation du complément (U.CEE/ml) s'établit comme indiqué dans le tableau suivant.

Au sens de la réglementation européenne (et nationale) un résultat ≥ 20 U.CEE/ml est positif.

Dilution du sérum	Inhibition de l'hémolyse			
	25 % (+)	50 % (++)	75 % (+++)	100 % (++++)
1/2	8,3	10	11,6	13,3
1/4	16,6	20*	23,3	26,6
1/8	33,3	40	46,6	53,3
1/16	66,6	80	93,3	107
1/32	133	160	187	213
1/64	266	320	373	426
1/128	532	640	746	852
1/256	1065	1280	1492	1705

* seuil de positivité européen (20 U.CEE/ml)

10 - CONDITIONS DE CONSERVATION ET D'ELIMINATION DES ECHANTILLONS

Pour des conservations supérieures à 72 h, les sérums seront conservés congelés à une température $\leq -16^{\circ}\text{C}$. Leur destruction sera réalisée par autoclavage ou par toute autre méthode retenue dans les exigences générales.

11 - EXPRESSION DES RESULTATS

Lors d'essais réalisés dans le cadre de la réglementation nationale de la brucellose bovine, ovine, caprine et porcine, les résultats sont exprimés de la façon suivante : positif, négatif ou anticomplémentaire. Pour les essais réalisés dans un autre cadre, le mode d'expression du résultat est celui précisé dans la demande d'essai.

12 - FIDELITE

Toute hémolyse partielle ou nulle observée dans le puits "témoin sérum" doit amener à considérer comme anticomplémentaire le sérum correspondant.

Résultat du sérum de contrôle positif : une dilution d'écart par rapport au titre attendu est tolérée.

13 - RAPPORT D'ANALYSE

Le rapport d'analyse doit être conforme aux exigences du COFRAC.

14 - ANNEXES

14.1 - Titrage du sérum hémolytique

Ce titre est déterminé en microméthode dans les conditions opératoires de l'épreuve de fixation du complément : toutes les dilutions sont effectuées en TV (5.1.1).

	-	1/2	1/4	1/8	1/12	1/16	1/20	1/24	1/28	1/32	1/36
Dilution finale	1/250	1/500	1/1 000	1/2 000	1/3 000	1/4 000	1/5 000	1/6 000	1/7 000	1/8 000	1/9 000

14.1.2 - Préparer une dilution de complément (5.3.2) établie de manière à se trouver en excès de complément (au 1.10 par exemple).

14.1.1 - Effectuer une dilution initiale du sérum hémolytique (SH) au 1/250 puis, à partir de cette dilution, effectuer les dilutions suivantes :

14.1.3 - Préparer une suspension d'hématies à 2,5 p. cent (9.1.1).

14.1.4 - Répartir les différentes préparations en doublet dans une microplaque, de la façon suivante :

ruits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	TSH*											
Dilutions de SH	1/250	1/250	1/500	1/1 000	1/2 000	1/3 000	1/4 000	1/5 000	1/6 000	1/7 000	1/8 000	1/9 000
I dilué (µl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Hématies à 2,5% l)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
TV	75	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
au 1/10 (µl)	-	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

*TSH = témoin sérum hémolytique

14.1.5 - Agiter la plaque, la couvrir et la placer à l'étuve à 37°C ± 2°C pendant 30 min.

14.1.6 - Centrifuger la plaque à 5 000-10 000 m.s⁻² pendant 10 min (centrifugeuse réfrigérée, si possible).

14.1.7 - Résultats

Le témoin sérum hémolytique (TSH) ne doit présenter aucune hémolyse. La plus grande dilution de sérum

hémolytique entraînant une hémolyse totale détermine l'unité de sérum hémolytique 100 p. cent. Dans l'épreuve de fixation du complément, on utilise deux unités, soit une quantité double de celle déterminée par le titrage.

Exemple :

La dilution du 1/2 000 est la plus grande dilution qui donne dans le titrage une hémolyse totale (l'hémolyse est partielle pour la dilution du 1/3 000). La dilution à utiliser dans l'épreuve est donc de 1/1 000.

14.2 - Inhibition du pouvoir anticomplémentaire des sérums

Cette méthode permet d'inhiber le pouvoir anticomplémentaire de certains sérums.

14.2.1 - Préparer une solution à 5 p. cent de serumalbumine (fraction V) en tampon TV.

14.2.2 - Préparer la première dilution (1/4) du sérum à tester dans cette solution.

14.2.3 - Incuber cette dilution à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 45 min.

14.2.4 - Reprendre l'essai à partir du point 9.1.5.

Annexe 5

SITUATION ZOOSANITAIRE ET METHODES DE PROPHYLAXIE

ALADIE : Brucellose bovine

Année : 1996

PAYS	ESP	EPIDEMIOLOGIE			LUTTE CONTRE LA MALADIE				Note N°	
		FRÉQ.	Nombre de			MESURES DE PROPHYLAXIE	Nombre d'animaux			
			Foyers	Cas	Morts		Abattus	Vaccinés		Traités
AFRIQUE										
Zone 1										
Algérie	bov	++	1 451	1 568	...	* Pn S te	979			
Egypte	bov	+	...	2 009	...	* P Pn Qi S V	2 009	368 939		
Maroc	bov	+	2	10	...	* P Q S te V *	1			
Tunisie	bov	+	1	2	...	Pn Vp				
Zone 2										
Burkina Faso	bov	+	1	22	6	Qi *				
Cap-Vert	bov	te				
Côte d'Ivoire	bov	Cn T				
Gambie	bov	Sp te V		3 977		
Ghana	bov	+?					
Guinée	bov	+?					
Mali	bov	+					
Niger	bov	+					
Sénégal	bov	+					
Zone 3										
Angola	bov	+	...	2	0		2			
Centrafricaine (République)	bov	++					
Chad	bov	+	1	1	...					
Zone 4										
Erythrée	bov	+?	Pa tv				
Ethiopie	bov	+	Pa				
Kenya	bov	+	Pa V				
Maurice	bov			7 244		
Ouganda	bov	++	T te V				
Réunion (France)	bov	(1982)	* Pn Sp te Vp	4			
Seychelles	bov	* P				
Soudan	bov	+++	30	694	...	V				
Tanzanie	cml	+	2	6	...	V			20	
Zone 5										
Afrique du Sud	bov	+++	295	5 772	22	* Pn Q Sp tv V	1 196	42 759		
Botswana	bov	+	7	7	...	* Pn V				
Lesotho	bov	+	1	33	...	te tv	3			
Madagascar	bov	0000	Q				
Malawi	bov	(1978)	Pn Qf te V *				
Mozambique	bov	++	P te V *		126 231		
Namibie	bov	+	2	53	0			8 096		
Swaziland	bov	+	tv				
Zambie	bov	+	T V				
Zimbabwe	bov	+?	80	754	0	* Pa Sp te V				
AMERIQUES										
Zone 1										
Belize	bov	0000	Qf te Vp *				
Canada	bov	(1989)	Pn Q S te V *				
Costa Rica	bov	+	* Pn V		33 791	1	
Salvador	bov	++	18	30	...	* S te V				
Etats-Unis d'Amérique	bov	+	209	* P Pn Qi Sp te V				
Mexique	bov	(+)	866	* Pn te V				
Nicaragua	bov	++)(18	555	...	* P Qf S V	215			
Panama	bov	+	10	12	0	* Pn Q S te Vp	12			
Zone 2										
Bahamas	bov	0000	P				
Barbade	bov	0000	S te				
Cuba	bov	+	297	2 053	...	Pn S te V *				
Curaçao (Antilles néerlandaises)	bov	0000					
Dominicaine (République)	bov	++)(95	314	0	Pn Qi S te V *		28 312		
Guadeloupe (France)	bov	0000	* Pn Qi S te Vp				
Haïti	bov	+	P				
Iles vierges britanniques	bov	0000	Qf				
Martinique (France)	bov	0000	* P Qf tv Vp				
Saint-Kitts-et-Nevis	bov	0000					
Saint-Lucie-et-Tobago	bov	0000	* P te			2	
Zone 3										
Argentine	bov	++	* Pn Qf V			2	
Bolivie	bov	+	...	1 031	...	te				
Brésil	bov	++)(3 210	25 841	...	Pa Q Sp te V *				
Chili	bov	+	26	168	...	Q te V *				
Colombie	bov	+?	198	2 953	...	* Pn Qf te V		274 315		
Equateur	bov	++	3	636	...	* Pn Sp tv V			3	
Falkland (Iles)/Malvinas	bov	+	...	36	...	* Pn Sp tv V				
Guyane française	bov	+?	* Pn Sp te V		2 527		
Paraguay	bov	+	...	1 054	...	Qf te				
Prou	bov	(+)	...	37	...	* Pn Qi S te Vp		335 710		
Uruguay	bov	+	* Pn Qf te V	39			
Venezuela	bov	++)(1 805	6 141	...	* Pn Q Sp te Vp	6 141	241 773	4	

MALADIE : Brucellose bovine

PAYS	ESP	EPIDEMIOLOGIE			LUTTE CONTRE LA MALADIE				Note N°	
		FRÉQ.	Nombre de			MESURES DE PROPHYLAXIE	Nombre d'animaux			
			Foyers	Cas	Morts		Abattus	Vaccinés		Traités
ASIE										
<i>Zone 1</i>										4
Arabie saoudite	bov	+	...	59	...	P Pn Q Sp V				4
Bahreïn	bov	...								
Emirats arabes unis	bov	?								
Israël	bov	(1984)				Q te V *		65 325		
Jordanie	bov	0000				* P Q te				
Koweït	bov	++	...	24	...	* Pn Qf te V	24	1 854		5
Liban	bov	++	Pn T V		13 000		
Oman	bov	()								
Qatar	bov	...								
<i>Zone 2</i>										
Bhoutan	bov	+?				Qi te				
Corée (République de)	bov	+	162	620	...	* Pn Qf S te	620			...
Hong Kong	bov	...								
Inde	bov	-				Pa Qi te				
Mongolie	bov	++	129	3 196	...					
Pakistan	bov	+	T V				
Sri Lanka	bov	++()	...	21	0	* te V		327		
	buf	++()	...	6	0	* te V				
<i>Zone 3</i>										
Brunéi Darussalam	bov	+					
Japon	bov	(1992)				Qf S te *				
Malaysia (péninsulaire)	bov	...								
Malaysia (Sabah)	bov	0000				te				
Malaysia (Sarawak)	bov	+?				P S Vp *				
Myanmar	bov	+	1	2	...	Qi te				
Philippines	bov	+()	T te V				
Singapour	bov	0000								
Taïpei China	bov	(1990)				Pn Q S te Vp *				
Thaïlande	bov	+	25	81	...	P Qf te				
EUROPE										
<i>Zone 1</i>										
Albanie	bov	...								
Bosnie-Herzégovine	bov	...				te				
Bulgarie	bov	(1958)				* Pn te				
Croatie	bov	(1965)				P Q te Vp *				
Ex-Rép. youg. de Macédoine	bov	+	13	47	...	P Q Sp te Vp *				
Hongrie	bov	(1985)				* P Q S te Vp				
Pologne	bov	+?				Pn Q S te Vp *		11		
RY (Serbie et Monténégro)	bov	(+)	11	15	...	* P Qf Qi S te Vp		15		
Roumanie	bov	(1969)				* Pn Qi te				
Slovaquie	bov	(1964)				Q *				
Slovénie	bov	-				* P Qi te				
Tchèque (République)	bov	(1964)				Pn Qi Vp *				
<i>Zone 2</i>										
Allemagne	bov	(+)			0	* Pn Qf Sp te				
Autriche	bov	+?	2	2	0	* Pn Sp te		2		6
Belgique	bov	+	27	98	...	Pn Q S te Vp *		3 182		
Chypre	bov	(1932)								
Espagne	bov	+				Pn S te *		19 615		
France	bov	+	582	...		* Pn Qi S te Vp		15 902		
Grèce	bov	++()	561	3 796	6	Pn Q Sp te *		3 790		
Italie	bov	+()	274	2 094	0	* Pn Sp te Vp		2 497		
	buf	(+)								
Luxembourg	bov	(1995)				* Pn Q S te Vp				
Malte	bov	(+)				Pn				
Pays-Bas	bov	(+)	1	1	...	* Pn S te				
Portugal	bov	+	1 075	3 626	...	* Pn Q S te		3 315		
Suisse	bov	(+)	1	1	...	* Pn Q Sp te				
Turquie	bov	+	5	13	12	Pn Q S T V *		2 438 292		
<i>Zone 3</i>										
Danemark	bov	(1962)				Vp *				
Finlande	bov	(1960)				* Q S te Vp				
Groenland	bov	0000				* P				9
Irlande	bov	+	630	...		Pn Q S te Vp *		13 842		
Islande	bov	0000								
Norvège	bov	(1953)								
Royaume-Uni/Grande-Bretagne	bov	-				Pa S Vp *				
Royaume-Uni/Guernsey	bov	0000				Pn Q S te Vp *				
Royaume-Uni/Irlande du Nord	bov	(+)	4	12	0	Q S te *		446		
Royaume-Uni/Jersey	bov	0000				Q S te Vp *				
Royaume-Uni/Man (Ile de)	bov	(1978)								
Suède	bov	(1957)				P Q Sp te Vp *				
	bov					S Vp *				
<i>Zone 4</i>										
Azerbaïdjan	bov	+	49	557	...	* Pn Q te V		557	43 301	
Bélarus	bov	...				* P Q te				
Bosnie	bov	(1961)				* Q te Vp				
Géorgie	bov	+	16	816	...			848	192 590	10
Lettonie	bov	(1963)				* P Qi S te				
Lituanie	bov	(1992)				P Pn te Vp				
Moldavie	bov	(1974)				* Cr P Pn Q S te Vp		24		
Ouzbékistan	bov	+()	2	16	...			16	344 872	
Russie	bov	+	253	14 200	...	* Q te V		14 200	4 346K	
Tadjikistan	bov	+()	8	314	0	Pn Qi S te V		345	71 927	
Turkménistan	bov	(1995)								
Ukraine	bov	-				* Pn Qi S te Vp				

PAYS	ESP	EPIDÉMIOLOGIE			LUTTE CONTRE LA MALADIE				Note N°	
		FRÉQ.	Nombre de			MESURES DE PROPHYLAXIE	Nombre d'animaux			
			Foyers	Cas	Morts		Abattus	Vaccinés		Traités
OCEANIE										
<i>one 1</i>										
Australie	bov	(1989)				* Q Vp			11	
Cook (Iles)	bov	0000				Qf				
Fidji	bov	-				S				
Guam	bov	0000								
Kiribati	bov	...								
Nouvelle-Calédonie	bov	0000				Qf te				
Nouvelle-Zélande	bov	(1989)				Qf *				
Palau	bov	0000								
Polynésie française	bov	(1984)				Q te *				
Vanuatu	bov	(1992)				* Pn Qf Sp te				

otes

1. Costa Rica : 16 129 animaux testés, 280 ont donné des sérologies positives (1,74%).
2. Trinité-et-Tobago : importation d'animaux indemnes de la maladie. Epreuve pour l'exportation.
3. Colombie : 64 élevages positifs à l'épreuve de l'anneau.
4. Venezuela : 648 113 épreuves rapides de diagnostic : 6 141 animaux positifs ont été sacrifiés.
5. Koweït : tous les animaux positifs sont sacrifiés.
6. Autriche : 2 réactions positives.
7. Italie : données concernant les régions suivantes : Piemonte, Valle d'Aosta, Umbria, Marche, Trentino Alto Adige.
8. Italie : foyers = bov + buf.
9. Finlande : échantillons de lait de 3 773 élevages laitiers et de 276 élevages allaitants analysés avec des résultats négatifs.
10. Estonie : 134 085 bovins examinés avec des résultats négatifs.
11. Fidji : suivi permanent à l'abattoir.

CODES

ESPECE ANIMALE

bovins	bov
buffles	buf
camélidés.....	cml

FREQUENCE DE LA MALADIE

Jamais constatée	0000
Non constatée (année de dernière constatation inconnue).....	-
Année de dernière constatation	(année)
Suspectée mais non confirmée	?
Cas exceptionnels	(+)
Fréquence faible et sporadique.....	+
Enzootique	++
Fréquence élevée	+++
Evidence sérologique et/ou isolement de l'agent causal, pas de signes cliniques	+?
Maladie existe ; répartition et fréquence inconnues	+. .
Limitée à certaines régions	()
Répandue dans tout le pays.....)(
Reconnue pour la première fois dans le pays.....	!
Maladie affectant seulement les animaux importés (quarantaine).....	<=
Aucun renseignement disponible

MESURES DE PROPHYLAXIE

Abattage sanitaire	S
Abattage sanitaire partiel	Sp
Contrôle de réservoirs dans la faune sauvage	Cr
Contrôle de vecteurs invertébrés	Cn
Epreuve diagnostique	te
Epreuve diagnostique volontaire.....	tv
Maladie à déclaration obligatoire	*
Programme de lutte couvrant tout le pays	Pn
Programme de lutte limité à certaines régions ou à certaines catégories d'élevages	Pa
Prohibition d'importation des pays infectés	P
Quarantaine et autres précautions à la frontière	Qf
Quarantaine et contrôle des déplacements à l'intérieur du pays.....	Qi
Quarantaine, contrôle des déplacements et autres précautions à la frontière et à l'intérieur du pays	Q
Traitement	T
Vaccination	V
Vaccination interdite.....	Vp

Annexe 6

SITUATION ZOOSANITAIRE ET METHODES DE PROPHYLAXIE

MALADIE : Brucellose caprine et ovine (non due B. ovis)

Année : 1996

PAYS	ESP	ÉPIDÉMIOLOGIE				LUTTE CONTRE LA MALADIE				Note N°
		FRÉQ.	Nombre de			MESURES DE PROPHYLAXIE	Nombre d'animaux			
			Foyers	Cas	Morts		Abattus	Vaccinés	Traités	
AFRIQUE										
Zone 1										
Algérie	cap ovi	++	...	2 437	...	* Pn S te * te	1 787			
Egypte	cap ovi	+	...	142 285	...	P Pn Q S te P Pn Q S te V	285 1 973	160 974 206 112		
Maroc	cap ovi	-	...	1 973	...	P Q S te *				
Tunisie	cap ovi	?	Pn V		1 757 316		
Zone 2										
Burkina Faso	cap ovi	+..					
Cap-Vert	ovi	?	Qi te *				
Côte d'Ivoire	ovi	-					
Gambie	o/c					
Ghana	o/c					
Guinée	o/c					
Mali	o/c					
Niger	o/c	+..	T				
Sénégal	ovi					
Zone 3										
Angola	o/c					
Centrafricaine (République)	o/c					
Tchad	o/c					
Zone 4										
Erythrée	cap ovi	?					
Ethiopie	cap ovi	+..					
Kenya	o/c	+					
Maurice	o/c	0000					
Ouganda	ovi	+..					
Réunion (France)	o/c					
Seychelles	o/c	-					
Soudan	ovi	+	12	207	...	V				
Tanzanie	cap ovi	te *				
Zone 5										
Afrique du Sud	cap ovi	(+) (+)	2	31	1	* Q Sp tv Q Sp tv *	24			
Botswana	o/c	-					
Lesotho	o/c					
Madagascar	ovi	0000					
Malawi	o/c	0000					
Mozambique	o/c	+	Q Qf *				
Namibie	cap ovi	-					
Swaziland	cap ovi	+..					
Zambie	ovi	+..					
Zimbabwe	cap ovi	+	* P S te * P S te				
AMERIQUES										
Zone 1										
Belize	cap ovi	-	Qf Vp * Qf Vp *				
Canada	o/c	0000	Qf *				
Costa Rica	cap ovi	0000 0000					
El Salvador	o/c					
Etats-Unis d'Amérique	cap ovi	(1972) -	P Q S * P Q S *				
Mexique	cap ovi	+	te V te				
Nicaragua	cap ovi	(1993)	Qf S Vp * Qf S Vp *				
Panama	o/c	(1989)	* Q S te Vp				
Zone 2										
Bahamas	o/c	P				
Barbade	ovi	0000	P Qf *				
Cuba	cap ovi	0000 0000	Qf *				
Curaçao (Antilles néerlandaises)	ovi	0000					
Dominicaine (République)	cap ovi	0000 0000					
Guadeloupe (France)	o/c	0000	* Pn Qi S te V				
Haïti	cap ovi	+? -					
Iles vierges britanniques	o/c	0000	Qf				
Martinique (France)	o/c	-					
Saint-Kitts-et-Nevis	cap ovi	- -					
Trinité-et-Tobago	cap ovi	+? +?	P tv * P tv *				

PAYS	ESP	EPIDEMIOLOGIE				LUTTE CONTRE LA MALADIE				Note N°
		FRÉQ.	Nombre de			MESURES DE PROPHYLAXIE	Nombre d'animaux			
			Foyers	Cas	Morts		Abattus	Vaccinés	Traités	
AMERIQUES (suite)										
Zone 3										
Argentine	cap ovi	++()	* Pa tv * Pa Qf				
Bolivie	ovi	...				T te				
Brésil	o/c	0000				Qf *				
Chili	cap ovi	(1975)				Qf te *				
Colombie	cap ovi	- +	1	4	0	* P Qf S * P Qf S				
Equateur	ovi				
Falkland (Iles)/Malvinas	o/c	0000				Qf				
Guyane française	o/c	0000				* Pn Qi S te V				
Paraguay	o/c	...								
Pérou	cap ovi	++()	Pa tv V Pa tv V				
Uruguay	cap ovi	0000 0000	p * p *				
Venezuela	cap ovi	0000 0000	p * p *				
ASIE										
Zone 1										
Arabie saoudite	cap ovi	+ +	...	29 82	...					
Bahreïn	o/c	...								
Emirats arabes unis	o/c	+					
Israël	cap ovi	++ ++	5 24	7 33	...	* Pa Qi tv V * Pa Qi tv V		10 428 61 908		1
Jordanie	cap ovi	++ ++	* Pn Qi te V * Pn Qi te V		141 756 570 635		
Koweït	cap ovi	++ ++	...	45 931	...	* Pn Qi tv V * Pn Qi te V	45 726		992 000	2 3
Liban	o/c	(+)					
Oman	o/c	0					
Qatar	o/c					
Zone 2										
Bhoutan	cap ovi								
Corée (République de)	cap ovi	... -				Qf S * Qf S *				
Hong Kong	o/c	...								
Inde	cap ovi	... +			...	Qi S te Pn te V				
Mongolie	cap ovi	+ +	79 121	372 1 157	2 1	Pn te V Pn te V	217 635			
Pakistan	o/c	+	Qi T te				
Sri Lanka	o/c	-					
Zone 3										
Brunéi Darussalam	cap ovi	- -								
Japon	cap ovi	(1949) 0000				Qf S * Qf S *				
Malaysia (péninsulaire)	o/c	...								
Malaysia (Sabah)	cap ovi	0000 0000				tv tv				
Malaysia (Sarawak)	cap ovi	0000 0000				p p				
Myanmar	o/c	...								
Philippines	ovi	-				Qf T V				
Singapour	cap ovi	0000 0000								
Taipei China	cap ovi	0000 0000				Qf Vp * Qf Vp *				
Thaïlande	cap ovi								
EUROPE										
Zone 1										
Albanie	cap ovi	+ +	8 9	625 850	...	Pa S te Pa S te	625 850			
Bosnie-Herzégovine	ovi	(1985)				* P Pn Q S te Vp				
Bulgarie	ovi	(1941)				* Pn Q te				
Croatie	cap ovi	(1992) (1991)				P Pn Q S te Vp * P Pn Q S te Vp *				
Ex-République youg. de Macédoine	cap ovi	+ +	82 27	310 850	...	P Q S te Vp P Q S te Vp	560 2 439			
Hongrie	o/c	0000				* P Q S te Vp				
Pologne	cap ovi	0000 0000								
RFY (Serbie et Monténégro)	cap ovi	+ +	30 42	66 121	...	* P Qf Qi S te Vp	66 121			
Roumanie	o/c	0000				* P Qf				
Slovaquie	cap ovi	- -				O * O *				
Slovénie	o/c	0000				* P Q te				
Tchéque (République)	ovi	-				te *				

PAYS	ESP	FRÉQ.	EPIDEMIOLOGIE			LUTTE CONTRE LA MALADIE				Note N°
			Nombre de			MESURES DE PROPHYLAXIE	Nombre d'animaux			
			Foyers	Cas	Morts		Abattus	Vaccinés	Traités	
EUROPE (suite)										
Zone 2										
Allemagne	o/c	(1992)				* Qi S te				
Autriche	o/c	-				* Qf				
Belgique	ovi	-								
Chypre	cap	(1993)				* Pn Qi S te Vp				4
	ovi	(1993)				* Pn Qi S te Vp				5
	cap	+				* Pn S te V				
	ovi	+				* Pn S te V				
Espagne	cap	+				* Pn S te V	226 979			
	ovi	+				* Pn Qi S te V *	480			
France	cap	++ ()	39	* Pn Qi S te V *	17 008	...		
	ovi	++ ()	485	* Pn Qi S te V *	5 800	...		
Grèce	cap	++ ()	310	5 800	...	* Pn Q S te Vp *	10 739			
	ovi	++ ()	638	10 770	31	* Pn S te Vp *	5 518			
Italie	cap	+	171	3 533		* Pn Sp te Vp *	5 518			6
	ovi	+	171	3 533		* Pn Sp te Vp	5 518			
Luxembourg	o/c	0000				* Q S Vp				
Malte	o/c	(+)	* Pn S				
Pays-Bas	cap	0000				*				
	ovi	0000				*				
Portugal	cap	+	2 768	14 286	...	* Pn Q S te		14 430		
	ovi	+	6 510	74 255	...	* Pn Q S te		70 348		
Suisse	cap	(1963)				* Pn Q Sp te *				
	ovi	(1963)				* Pn Q Sp te *				
Turquie	ovi	++	52	506	165	* Pn Qi S T V *			2 438 292	
Zone 3										
Danemark	cap	0000				*				
	ovi	0000				*				
Finlande	cap	0000				*				
	ovi	0000				*				
Groenland	ovi	0000				* P				
Irlande	cap	0000				te *				
	ovi	0000				te *				
Islande	cap	0000				S *				
Norvège	ovi	0000				* Qf te				
Royaume-Uni/Grande-Bretagne	***	0000				Qi *				
Royaume-Uni/Guernesey	cap	0000				Qi *				
	ovi	0000				Q S te Vp *				
Royaume-Uni/Irlande du Nord	cap	0000				Q S te Vp *				
	ovi	0000								
Royaume-Uni/Jersey	o/c	0000								
Royaume-Uni/Man (Ile de)	cap	0000								
	ovi	0000								
Suède	ovi	0000				S *				
Zone 4										
Azerbaïdjan	o/c	0000				* Q Vp				
Bélarus	o/c	-				P *				
Estonie	cap	0000				P *				
	ovi	0000								
Géorgie	o/c	...								
Lettonie	o/c	0000				* P Qi S T				
Lituanie	cap	0000				P Q S te				
	ovi	0000				P Q S te				
Moldavie	cap	0000								
	ovi	(1985)				* Pn Q S te	47			
Ouzbékistan	o/c	-				* Pn Qi te V		500 934		
Russie	ovi	+()	10	1 000	...	* Q te V	1 000	5 616K		
Tadjikistan	ovi	+()	4	1 790	1 782	* Pn Qi S te V	1 782	6 698		
Turkménistan	ovi	(1995)								
Ukraine	o/c	-				* P Pn Q S te Vp				
OCEANIE										
Zone 1										
Australie	cap	0000				Qf *				
	ovi	0000				Qf *				
Cook (Iles)	o/c	0000				Qf				
Fidji	o/c	0000				P Qf				
Guam	cap	0000								
	ovi	...								
Kiribati	o/c	...								
Nouvelle-Calédonie	cap	0000								
	ovi	0000								
Nouvelle-Zélande	cap	0000				Qf *				
	ovi	0000				Qf *				
Palau	o/c	0000								
Polynésie française	cap	-				Qf				
	ovi	-				Qf				
Vanuatu	cap	0000				Qf *				
	ovi	0000				Qf *				

Notes

- Israël : vaccination, avec Rev. 1, des femelles âgées de 2 à 6 mois. Seuls les cas confirmés par la bactériologie sont signalés.
- Koweït : 63% des réagissants étaient des animaux indigènes.
- Koweït : plusieurs cas ont été détectés chez des ovins importés. 4,7% des cas sont des animaux indigènes. Vaccination = ovi + cap.
- Chypre : sérums ovi + cap + bov + sui analysés avec des résultats négatifs.
- Chypre : sérums ovi + cap + bov + sui analysés avec des résultats négatifs.
- Italie : données concernant les régions suivantes : Piemonte, Valle d'Aosta, Umbria, Marche, Trentino Alto Adige.

CODES

ESPECE ANIMALE

caprins	cap
ovins	ovi
ovins/caprins	o/c
toutes les espèces	***

FREQUENCE DE LA MALADIE

Jamais constatée	0000
Non constatée (année de dernière constatation inconnue)	-
Année de dernière constatation	(année)
Suspectée mais non confirmée	?
Cas exceptionnels	(+)
Fréquence faible et sporadique.....	+
Enzootique	++
Fréquence élevée	+++
Evidence sérologique et/ou isolement de l'agent causal, pas de signes cliniques	+?
Maladie existe ; répartition et fréquence inconnues	+. .
Limitée à certaines régions	()
Répandue dans tout le pays.....)(
Reconnue pour la première fois dans le pays.....	!
Maladie affectant seulement les animaux importés (quarantaine)	<=
Aucun renseignement disponible

MESURES DE PROPHYLAXIE

Abattage sanitaire	S
Abattage sanitaire partiel	Sp
Contrôle de réservoirs dans la faune sauvage	Cr
Contrôle de vecteurs invertébrés	Cn
Epreuve diagnostique	te
Epreuve diagnostique volontaire.....	tv
Maladie à déclaration obligatoire	*
Programme de lutte couvrant tout le pays	Pn
Programme de lutte limité à certaines régions ou à certaines catégories d'élevages	Pa
Prohibition d'importation des pays infectés	P
Quarantaine et autres précautions à la frontière	Qf
Quarantaine et contrôle des déplacements à l'intérieur du pays.....	Qi
Quarantaine, contrôle des déplacements et autres précautions à la frontière et à l'intérieur du pays	Q
Traitement	T
Vaccination	V
Vaccination interdite	Vp

Annexe 7

Code zoosanitaire international PARTIE 3 TITRE 3.2 CHAPITRE 3.2.1.

Table des
matières
? - Index

CHAPITRE 3.2.1.

BRUCELLOSE BOVINE *(B. abortus)*

Préambule: les normes agréées par l'OIE pour les épreuves diagnostiques et les vaccins figurent dans le *Manuel*.

Article 3.2.1.1.

Aux fins du présent *Code* :

Pays ou partie du territoire d'un pays indemnes de brucellose bovine

Un pays ou une partie du territoire d'un pays sont considérés comme indemnes de brucellose bovine lorsque:

1. la maladie ou la suspicion de la maladie sont à déclaration obligatoire;
2. tous les cheptels bovins de ce pays ou de cette partie du territoire sont placés sous contrôle vétérinaire officiel et qu'il a été établi que le taux d'infection brucellique ne dépasse pas 0,2% du nombre des troupeaux bovins du pays ou de la partie du territoire considérés;
3. chaque cheptel est soumis périodiquement aux épreuves sérologiques, associées ou non à l'épreuve de l'anneau, pour la recherche de la brucellose;
4. aucun animal n'a été vacciné contre la brucellose depuis au moins trois ans;
5. tous les animaux réagissants sont abattus;
6. les animaux introduits dans le pays ou la partie du territoire indemnes proviennent exclusivement de *cheptels officiellement indemnes* ou de *cheptels indemnes* de brucellose bovine. Cette condition peut ne pas être exigée pour des animaux non vaccinés qui auront été isolés et soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves sérologiques effectuées à 30 jours d'intervalle, avant leur introduction dans le troupeau. Chez les femelles gravides, la seconde épreuve sérologique doit être faite au moins 14 jours après la mise-bas.

Dans les pays où tous les cheptels bovins ont été reconnus officiellement indemnes de brucellose et où il n'a été trouvé aucun animal réagissant aux épreuves de dépistage de la brucellose depuis cinq ans, le pays concerné peut décider d'un système de contrôle différent.

Cheptel officiellement indemne de brucellose bovine

Pour être considéré comme officiellement indemne de brucellose bovine, un cheptel bovin doit satisfaire aux conditions suivantes:

1. être placé sous contrôle vétérinaire officiel;
2. ne comporter aucun animal ayant été vacciné contre la brucellose bovine depuis au moins trois ans;
3. ne comporter que des animaux qui, au cours des six derniers mois, n'ont pas été reconnus infectés de brucellose bovine, toute suspicion, à la suite notamment de mise-bas avant terme, devant donner lieu à la réalisation des examens de laboratoire appropriés;
4. tous les bovins âgés de plus de 12 mois (à l'exception des mâles castrés) doivent avoir été soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves sérologiques effectuées à 12 mois d'intervalle. Cette qualification est maintenue si la totalité du cheptel est contrôlée normalement selon une périodicité annuelle ou selon les autres modalités requises par l'*Administration vétérinaire* du pays intéressé;
5. les animaux introduits dans le troupeau doivent provenir de cheptels officiellement indemnes de brucellose bovine. Cette condition peut ne pas être exigée pour les animaux non vaccinés provenant d'un *cheptel indemne* de brucellose bovine, à la condition qu'une épreuve à l'antigène tamponné pour *Brucella* et une épreuve de fixation du complément effectuées dans les 30 jours précédant leur introduction fournissent des résultats négatifs. Ces épreuves doivent être renouvelées chez les femelles qui ont récemment vêlé ou qui sont sur le point de le faire, au moins 14 jours après le vêlage ; en effet, elles n'ont pas de valeur si elles sont effectuées au cours des 14 jours qui suivent la mise-bas.

Cheptel indemne de brucellose bovine

Pour être considéré comme indemne de brucellose, un cheptel bovin doit satisfaire aux conditions suivantes:

1. être placé sous contrôle vétérinaire officiel;
2. être soumis ou non à la vaccination;
3. dans le cas d'emploi d'un vaccin vivant sur les femelles bovines, la vaccination doit être pratiquée à un âge de trois à six mois, et dans ce cas les femelles vaccinées doivent être identifiées de façon permanente;
4. les bovins de plus de douze mois doivent être contrôlés dans les conditions prévues au paragraphe 4 de la définition du cheptel bovin officiellement indemne de brucellose, les bovins vaccinés avant l'âge de six mois avec un vaccin vivant et âgés de moins de trente mois pouvant toutefois présenter un résultat positif à l'épreuve à l'antigène tamponné pour *Brucella*, un résultat négatif étant obtenu à l'épreuve de fixation du complément;
5. tous les bovins introduits doivent provenir d'un cheptel officiellement indemne ou indemne de brucellose bovine, ou d'un pays ou d'une partie du territoire d'un pays indemnes de brucellose bovine. Cette condition peut ne pas être exigée si les animaux ont été isolés et soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves sérologiques effectuées à 30 jours d'intervalle avant leur introduction dans le troupeau. Chez les femelles gravides,

les épreuves sérologiques doivent être effectuées au moins 14 jours après la mise-bas.

Article 3.2.1.2.

Les *Administrations vétérinaires* des *pays importateurs* tiennent compte:

pour les bovins d'élevage ou de rente (à l'exception des mâles castrés),

de la présentation d'un *certificat zoosanitaire international* attestant:

1. qu'ils ne présentaient, le jour de leur chargement, aucun signe clinique de brucellose;
2. qu'ils proviennent d'un cheptel où aucun signe clinique de brucellose n'a été constaté officiellement pendant les six mois précédant leur chargement;
3. qu'ils proviennent d'un *pays* ou d'une *partie du territoire d'un pays indemnes* de brucellose bovine, ou d'un *cheptel officiellement indemne* de brucellose bovine, et qu'ils ont été soumis, avec résultat négatif, à une épreuve sérologique pour la recherche de la brucellose bovine pendant les 30 jours précédant leur chargement, ou
4. qu'ils proviennent d'un *cheptel indemne* de brucellose bovine et ont été soumis, avec résultat négatif, à une épreuve à l'antigène tamponné pour *Brucella* et à une épreuve de fixation du complément pour la recherche de la brucellose bovine au cours des 30 jours précédant leur chargement;

s'ils proviennent d'un cheptel autre que ceux mentionnés ci-dessus:

5. qu'ils ont été isolés et soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves sérologiques pour la recherche de la brucellose bovine effectuées à 30 jours d'intervalle, la seconde épreuve ayant été réalisée dans les 15 jours précédant leur chargement. Chez les femelles gravides, la seconde épreuve sérologique doit être effectuée au moins 14 jours après la mise-bas.

Article 3.2.1.3.

Les *Administrations vétérinaires* des *pays importateurs* tiennent compte:

pour les bovins de boucherie (à l'exception des mâles castrés),

de la présentation d'un *certificat zoosanitaire international* attestant:

1. qu'ils ne présentaient, le jour de leur chargement, aucun signe clinique de brucellose;
2. qu'ils ne sont pas éliminés dans le cadre d'un programme national de lutte contre la brucellose bovine;
3. qu'ils proviennent d'un *pays* ou d'une *partie du territoire d'un pays indemnes* de brucellose bovine, ou
4. d'un *cheptel officiellement indemne* de brucellose bovine, ou
5. d'un *cheptel indemne* de brucellose bovine, ou

6. qu'ils ont été soumis, avec résultat négatif, à une épreuve sérologique pour la recherche de la brucellose bovine dans les 30 jours précédant leur chargement.

Article 3.2.1.4.

Les Administrations vétérinaires des pays importateurs tiennent compte:

pour la semence de taureaux,

de la présentation d'un *certificat zoosanitaire international* attestant:

1. si la semence provient d'un *centre d'insémination artificielle*, que le protocole de contrôle comprend des épreuves à l'antigène tamponné pour *Brucella* et de fixation du complément pour la recherche de la brucellose bovine;
2. si la semence ne provient pas d'un centre d'insémination artificielle, que les géniteurs ayant fourni la semence:
 - a) proviennent d'un *pays* ou d'une *partie du territoire d'un pays indemnes* de brucellose bovine, ou
 - b) sont restés dans un *cheptel officiellement indemne* de brucellose bovine, ne présentaient, le jour du prélèvement de la semence, aucun signe clinique de brucellose bovine, et ont été soumis, avec résultat négatif, à une épreuve sérologique pour la recherche de la brucellose bovine au cours des 30 jours ayant précédé le prélèvement de la semence;
 - c) sont restés dans un *cheptel indemne* de brucellose bovine, ne présentaient, le jour du prélèvement de la semence, aucun signe clinique de brucellose bovine, et ont été soumis, avec résultat négatif, à une épreuve à l'antigène tamponné pour *Brucella* et à une épreuve de fixation du complément au cours des 30 jours précédant le prélèvement de la semence, ou
 - d) ne présentaient, le jour du prélèvement de la semence, aucun signe clinique de brucellose bovine, ont été soumis, avec résultat négatif, à une épreuve à l'antigène tamponné pour *Brucella* et à une épreuve de fixation du complément au cours des 30 jours précédant le prélèvement de la semence et que leur semence ne contenait pas d'agglutinines anti-brucelliques;
3. que la semence a été collectée, manipulée et stockée conformément aux dispositions des annexes 4.2.1.1. et 4.2.1.2.

Article 3.2.1.5.
(à l'étude)

Les Administrations vétérinaires des pays importateurs tiennent compte:

pour les ovules/embryons de bovins,

de la présentation d'un *certificat zoosanitaire international* attestant:

1. si les ovules/embryons proviennent d'une *unité de collecte*, que le protocole de contrôle comprend des épreuves à l'antigène tamponné pour *Brucella* et de fixation du complément pour la recherche de la brucellose;
2. si les ovules/embryons ne proviennent pas d'une unité de collecte, que les femelles donneuses:
 - a) proviennent d'un *pays* ou d'une *partie du territoire d'un pays indemnes* de brucellose bovine, ou
 - b) proviennent d'un *cheptel officiellement indemne* de brucellose bovine, ne présentaient, le jour de la collecte des ovules/embryons, aucun signe clinique de brucellose bovine, et ont été soumises, avec résultat négatif, à une épreuve à l'antigène tamponné pour *Brucella* pendant les 30 jours précédant la collecte, ou
 - c) proviennent d'un *cheptel indemne* de brucellose bovine, ne présentaient, le jour de la collecte des ovules/embryons, aucun signe clinique de brucellose bovine, et ont été soumises, avec résultat négatif, à une épreuve à l'antigène tamponné pour *Brucella* et à une épreuve de fixation du complément pour la recherche de la brucellose bovine;
3. que les ovules/embryons ont été collectés, manipulés et stockés conformément aux dispositions des annexes 4.2.3.1., 4.2.3.4. ou 4.2.3.5.

Retour vers les [Normes internationales](#) ou à la [Page d'accueil de l'OIE](#)

[Table des matières](#) | »»