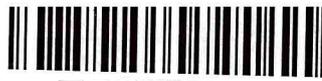


République Algérienne Dém
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahlab- Blida-
Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques
Département des Sciences Vétérinaires



750THV-1



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Docteur Vétérinaire

Thème

Evaluation de deux antigènes utilisés dans le diagnostic de la brucellose

Présenté par :

GHALEM DJIHAD

Membres du jury:

Président : M. Akloul K.	MAA	USDB
Examineur : Mme Djallata N.	MAB	USDB
Promotrice : Mme Dechicha A.	MAA	USDB

Promotion 2012 - 2013



REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord, Allah qui nous a donné la force et le courage pour terminer nos études et élaborer ce modeste travail.

Je remercie mon encadreur Mme Dechicha A. qui a bien voulu m'encadrer, pour ses efforts et conseils, ainsi que tout le personnel du laboratoire vétérinaire régional de Laghouat.

Je remercie également tous nos enseignants et les responsables de l'université SAAD DAHLAB pour l'effort fourni dans le cadre de notre formation universitaire.

Enfin, je tiens à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font de juger mon travail.



DEDICACES

A Dieu source de toute connaissance

A la mémoire de mes grands parents puisse Dieu les accueillir dans son infinie Miséricorde

A la mémoire de mon cher oncle G.ABDEERAHMAN

A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, la plus belle perle au monde, l'exemple du dévouement, qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite,ma tendre mère.

Au plus cher au monde, mon père, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger

Que dieu les gardes et les protège.

A mes adorables sœurs : Imane, Kaoutar.

A mes chers frères : Mohamed, Aboubaker, Ismail.

En lui souhaitant de réussir le chemin de ses ambitions toutes légitimes

A toute ma famille

A tous mes amis... Pour une sincérité si merveilleuse... jamais oubliable

A tous ceux qui me sont chères, A tous ceux qui m'aiment, A tous ceux que j'aime.

Je dédie ce modeste travail...

DJIHAD.....

Sommaire

Introduction	Page 01
---------------------------	---------

Partie bibliographique

Chapitre I: L'agent pathogène

1. Taxonomie.....	Page 02
2. Identification des Brucella.....	Page 02

Chapitre II: La pathologie

1. Etapes de l'infection.....	Page 05
1.1. Voies de pénétration.....	Page 05
1.2. Période primaire.....	Page 05
1.3. Période secondaire.....	Page 05
2. Réaction de l'organisme à l'infection.....	Page 06
2.1. Réponse humorale.....	Page 06
2.2. Réponse cellulaire.....	Page 06
3. Symptômes.....	Page 06
3.1. Incubation.....	Page 06
3.1.2. Symptômes généraux.....	Page 06
3.1.3. Symptômes locaux.....	Page 07
3.1.3.1. Symptômes génitaux.....	Page 07
3.1.3.2. Symptômes extra-génitaux.....	Page 08
3.2. Lésions.....	Page 08

Chapitre III: Epidémiologie

4.1. Épidémiologie analytique.....	Page 09
4.1.1. Source de contagion.....	Page 09
4.1.2. Mode de transmission.....	Page 09
4.1.2.1. Transmission horizontale.....	Page 09
4.1.2.2. Transmission verticale.....	Page 10
4.2. Épidémiologie synthétique.....	Page 10

Chapitre IV: Diagnostic et dépistage

5.1. Définition du diagnostic et du dépistage.....	Page 11
5.2. Diagnostic clinique.....	Page 11
5.3. Diagnostic expérimental.....	Page 11
5.3.1. Diagnostic direct.....	Page 11
5.3.1.1. Diagnostic bactériologique.....	Page 12
5.3.2. Diagnostic indirect.....	Page 13
5.3.2.1. Diagnostic sérologique.....	Page 13
5.3.2.1.1. Epreuves réalisées sur sérum.....	Page 13
5.3.2.1.2. Epreuve réalisé sur le lait.....	Page 16
5.3.2.2. Diagnostic allergique.....	Page 16
5.4. Evaluation des tests de diagnostic.....	Page 16
5.4.1. Caractéristiques intrinsèques d'un test.....	Page 16
5.4.2. Caractéristiques extrinsèques d'un test.....	Page 17
5.4.3. Autres caractéristiques du test.....	Page 18

Chapitre V: Traitement et prophylaxie

6.1. Traitement.....	Page 19
6.2. Prophylaxie.....	Page 19
6.2.1. Prophylaxie sanitaire.....	Page 19
6.2.1.1. Mesures offensives.....	Page 19
6.2.1.2. Mesures défensives.....	Page 19
6.2.2. Prophylaxie médicale.....	Page 20

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

1. Objectif.....	Page 22
2. Lieu et période de l'étude.....	Page 22
3. Protocole de l'étude.....	Page 22
4. Matériel.....	Page 22
4.1. Matériel pour l'Epreuve à l'Ag Tamponné (EAT) ou R.Bengale test.....	Page 22
4.2. Matériel pour la Fixation du complément.....	Page 24
5. Méthodes.....	Page 25
5.1. Méthode de l'Epreuve à l'Ag Tamponné ou R.Bengale test.....	Page 25
5.2. Méthode du test de Fixation du complément.....	Page 26
5.2.1. Titration du complément.....	Page 26
5.2.2. Couple hémolytique.....	Page 27
5.2.3. Calcul de la quantité de complément à préparer pour les examens.....	Page 28
5.2.4. Epreuve.....	Page 29

Résultats

1. Résultats obtenus par l'antigène "1".....	Page 33
1.1. Taux de réponse de l'antigène "1".....	Page 33
1.2. Calcul de la sensibilité et de la spécificité de l'Ag "1".....	Page 33
1.2.1. La sensibilité de l'Ag "1".....	Page 34
1.2.2. La spécificité de l'Ag "1".....	Page 34
1.3. Calcul des valeurs prédictives positives et négatives de l'Ag "1".....	Page 34
1.3.1. La valeur prédictive positive de l'Ag "1".....	Page 34
1.3.2. La valeur prédictive négative de l'Ag "1".....	Page 34
1.4. Calcul de l'indice de Youden.....	Page 34
2. Résultats obtenus par l'antigène "2".....	Page 35
2.1. Taux de réponse de l'antigène "2".....	Page 35

2.2. Comparaison des résultats obtenus par l'antigène "2" global et les antigènes spécifiques.....	Page 35
2.3. Calcul de la sensibilité et de la spécificité de l'Ag "2"	Page 39
2.3.1. La sensibilité de l'Ag 2.....	Page 39
2.3.2. La spécificité de l'Ag 2.....	Page 40
2.4. Calcul des valeurs prédictives positives et négatives de l'Ag "2"	Page 40
2.4.1. La valeur prédictive positive de l'Ag "2".....	Page 40
2.4.2. La valeur prédictive négative de l'Ag "2".....	Page 40
2.5. Calcul de l'indice de Youden.....	Page 40
3. Comparaison des deux antigènes.....	Page 41
Discussion	
- L'antigène"1"	Page 42
- L'antigène"2".....	Page 43
Conclusion	Page 45
Recommandations	Page 46

LISTES DES FIGURES

Figure 1: Hygromas des articulations des genoux.....	Page 08
Figure 2 : Epreuve à l'antigène tamponné.....	Page 14
Figure 3 : Réaction de fixation du complément en microplaque.....	Page 15
Figure 4 : Matériels et réactifs utilisés pour l'E.A.T.....	Page 23
Figure 5 : Antigène (Ag), complément (C') et Tampon véronal (TV).....	Page 24
Figure 6: Complément lyophilisé.....	Page 24
Figure 7: Distribution de l'antigène.....	Page 25
Figure 8: Sérums et antigènes cote à cote sur la plaque.....	Page 25
Figure 9: Plaque sur agitateur.....	Page 25
Figure 10: Résultat positif de l'EAT.....	Page 26
Figure 11: Résultat négatif de l'EAT.....	Page 26
Figure 12: Distribution des réactifs dans les tubes pour la méthode de fixation du complément.....	Page 27
Figure 13: Couple hémolytique préparé.....	Page 27
Figure 14: Méthode de dilution des sérums sur la plaque de microtitration.....	Page 29
Figure 15: Méthode de distribution de l'antigène, du tampon et du complément sur la plaque de microtitration	Page 30
Figure 16: Distribution des témoins sur la plaque de microtitration.....	Page 30
Figure 17: Résultat de fixation du complément sur plaque de microtitration.....	Page 32
Figure 18: Nombre d'unités CCE sensibilisatrices par rapport aux dilutions des sérums.....	Page 32

LISTES DES TABLEAUX

Tableau I: Différentes espèces et Biovars de <i>Brucella</i>	Page 02
Tableau II: tableau de contingence de confrontation des résultats entre le test à évaluer et le test de référence.....	Page 17
Tableau III: Caractéristiques des antigènes brucelliques utilisés dans l'étude.....	Page 23
Tableau IV : Taux de réponse de l'antigène "1" par rapport au test de fixation du complément.....	Page 33
Tableau V: Tableau de contingence de l'Antigène "1".....	Page 33
Tableau VI: Taux de réponse de l'antigène "2" par rapport au test de fixation du complément.....	Page 35
Tableau VII: Réponses des sérums à l'antigène "2" global, <i>B. abortus</i> et <i>B. Melitensis</i>	Page 35
Tableau VIII: Tableau de contingence de l'Antigène "2".....	Page 39
Tableau IX: Tableau comparatif des caractéristiques des deux antigènes.....	Page 41

LISTE DES ABREVIATIONS

Ag : Antigène

B : Brucella

B19 : BUCK 19(souche vaccinale)

EAT : Epreuve à L'antigène tamponné

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FC : Fixation du complément.

IgG : Immunoglobuline Classe G

IgM : Immunoglobuline classe M

IL : Interleukines.

J : Indice de Youden

LPS : Lipopolysaccharide.

ml : millilitres

Mn : minutes.

OIE : Office National des Epizooties

R : Souche rugueuse.

RB51 : Souche vaccinale chez les bovins.

RT: Ring test.

S: Souche lisse.

SAW: Séroagglutination de Wright.

Sen: Sensibilité

Sp : Spécificité

TNF- α : protéine cytokine.

TV : Tampon véronal

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

μ l: microlitres

Résumé :

La brucellose est l'une des pathologies les plus répandues dans le monde, avec une haute prévalence dans les pays méditerranéens. En Algérie la maladie bovine sévit à l'état enzootique, elle est dépistée par les services vétérinaires de wilayas et contrôlée au niveau des laboratoires vétérinaires régionaux par une méthode d'épreuve à l'antigène tamponné confirmée par un test de fixation du complément.

Notre étude vise à analyser deux antigènes commercialisés en Algérie, utilisés dans l'épreuve à l'antigène tamponné au niveau de différents laboratoires en les comparant avec la méthode de référence qui est la fixation du complément.

L'analyse de 159 sérums bovins a montré que l'antigène "1" présente un résultat de 0.34, 0.27, 0.38, 0.24 et -0.38 pour la sensibilité, la spécificité, la VPP, la VPN et l'indice de Youden respectivement.

Et l'antigène "2" présente un résultat de 0.62, 0.92, 0.91, 0.64 et 0.55 pour la sensibilité, la spécificité, la VPP, la VPN et l'indice de Youden respectivement.

Devant ces faibles performances, un contrôle rigoureux devrait être entrepris par les laboratoires compétents sur les réactifs importés avant de les commercialiser.

Mot clés: Brucellose, épreuve à l'antigène tamponné, sensibilité, spécificité.

Summary:

Brucellosis is a worldwide common disease spread in a very high prevalence in the Mediterranean countries. In Algeria, the bovine disease is enzootic. It is detected by the veterinary services of département and controlled at the regional veterinary laboratories by the buffered antigen test confirmed by complement fixation test.

Our study aims to analyze two antigens marketed in Algeria; it's used in the buffered antigen test at different laboratories and comparing them with the reference method which is the complement fixation.

The analysis of 159 bovine serums showed that antigen "1" has a score of 0.34, 0.27, 0.38, 0.24 and -0.38 for sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and Youden index respectively.

Antigen "2" shows a result of 0.62, 0.92, 0.91, 0.64 and 0.55 for sensitivity, specificity, PPV, NPV and Youden index respectively.

With these poor performances, a strict control should be preceded by a competent laboratory for imported reagents before marketing.

Key words: Brucellosis, buffered antigen test, sensitivity, specificity.

ملخص

داء البروسيلات هو واحد من أكثر الأمراض انتشارا في العالم، مع معدل انتشار عالي في بلدان البحر الأبيض المتوسط . . في الجزائر مرض البقر متوطن بالحيوانات ، يتم الكشف عنه من قبل المصالح البيطرية للولايات ومراقبته من طرف المخابر البيطرية الجهوية بطريقة اختبار الوردني البنغالي و التأكد منه بإختبار تثبيت متممة.

تهدف دراستنا لتحليل اثنين من مولدات الضد التي يتم تسويقهما في الجزائر، وتستخدم في اختبار مستضد مخزنة في مخابر مختلفة و مقارنتهما مع الطريقة المرجعية التي هي تثبيت المتممة.

وأظهر تحليل 159 مصل بقري أن المستضد "1" لديه نتيجة 0.34، 0.27، 0.38، 0.24 و -0.38 عن التحسسية، والتنوعية، القيمة التنبؤية الإيجابية (PPV) ، القيمة التنبؤية السلبية (NPV) ومؤشر يودن (youden) على التوالي.

والمستضد "2" يظهر نتيجة 0.62، 0.92، 0.91، 0.64 و 0.55 للتحسسية، والتنوعية، القيمة التنبؤية الإيجابية (PPV) ، القيمة التنبؤية السلبية (NPV) ومؤشر يودن (Youden) على التوالي.

ونظرا لهذه النتائج الضعيفة ، ينبغي القيام برقابة صارمة من قبل المخابر المؤهلة بشأن الكواشف المستوردة قبل تسويقها.

الكلمات الدالة : داء البروسيلات , اختبار الوردني البنغالي , التحسسية , التنوعية.

Introduction :

La brucellose est une maladie causée par une bactérie du genre *Brucella*, considérée comme l'une des zoonoses les plus répandues dans le monde, elle sévit dans les cinq continents, elle est en voie d'élimination dans plusieurs pays industrialisés mais reste cependant très active dans la plupart des pays en voie de développement [27].

Son importance est due à son impact financier sur les élevages, car elle entraîne de sérieux troubles de reproduction: avortements, mortinatalité, stérilité des adultes, pertes en lait et en viande d'une part, et d'autre part au danger qu'elle représente pour la santé humaine[66].

En Algérie, la brucellose sévit depuis le début du 19ème siècle jusqu'à aujourd'hui, elle continue à se propager dans nos élevages provoquant de lourdes pertes économiques et enregistrant de nombreux cas humains, en effet la prévalence de la brucellose bovine a été estimée à 0.7% par l'OIE(2009).

Depuis 1995, un programme national pluriannuel de lutte contre la brucellose a été lancé par les services vétérinaires, il est basé sur des opérations de police sanitaire et de prophylaxie sanitaire associant les opérations de dépistage, d'abattage et de contrôle du cheptel [49]

La maladie est de ce fait dépistée et analysée dans les laboratoires vétérinaires régionaux par des méthodes de référence telles que l'épreuve à l'antigène tamponné qui est confirmée par la fixation du complément. Cependant, il existe actuellement sur le marché Algérien plusieurs firmes pharmaceutiques commercialisant des réactifs de diagnostic utilisés aussi bien pour la brucellose humaine que animale sans que l'on soit sûr de la fiabilité de ces derniers.

Dans ce contexte, nous avons voulu par le biais de cette étude:

Etudier les caractéristiques de deux antigènes de provenance étrangère utilisés dans l'épreuve de l'antigène tamponné dans les laboratoires d'analyses en les comparant avec la méthode de référence qui est la fixation du complément.

La brucellose bovine est une maladie infectieuse et contagieuse, transmissible à l'homme et à de nombreuses espèces animales causée par une bactérie appartenant au genre *Brucella*.

La principale espèce affectant les bovins est *Brucella abortus* et l'infection peut également être consécutive à *B. melitensis* ou *B. suis* [32].

1. Taxonomie :

Le système actuel de la taxonomie du genre *Brucella* est fondé sur les recommandations formulées en 1993 par le sous-comité de la taxonomie des *Brucella* du comité international de nomenclature bactériologique [16]. La bactérie appartient à la famille des *Brucellaceae*, au genre *Brucella* [54]. Huit espèces sont reconnues actuellement dans le genre dont deux d'entre elles de classification récente (cf. tableau1).

Tableau I: Différentes espèces et Biovars de *Brucella* [58] [46]

Espèces	Biovars
<i>Abortus</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9
<i>melitensis</i>	1, 2, 3
<i>suis</i>	1, 2, 3, 4, 5
<i>canis</i>	
<i>ovis</i>	
<i>neotomae</i>	
<i>cetaceae</i> *	
<i>pinnipediae</i> *	

* espèces nouvellement décrites [46].

2. Identification des *Brucella* :

❖ Caractères morphologiques :

Les bactéries du genre *Brucella* sont des petits coccobacilles (0,5 à 1,5µm de longueur) à Gram négatif, sans flagelles ni pili, immobiles [48] et ne formant pas de spores [50]

Elles ne sont pas décolorées par l'acide acétique (coloration de Stamp), ce qui indique une acido-résistance relative, liée aux lipides de la paroi.

❖ Caractères culturels :

Les *brucella* sont des aérobies strictes, certaines souches se développent mieux en atmosphère contenant 5 à 10 % de CO₂, la température de croissance optimale est de 34°C, le pH optimal est de 6.6 à 7.4 ; elles nécessitent des temps d'incubation prolongés, de 2 à 3 semaines en moyenne et parfois plus [52].

L'isolement des *brucella* à partir des produits pathologiques nécessite des milieux spéciaux: en milieux liquides, la culture apparaît en 48 heures à 4 jours et donne un trouble homogène et

sur milieu solide, les colonies apparaissent en 2 à 3 jours avec un diamètre de 3 à 4 millimètres [48] . Elles peuvent avoir un aspect de type lisses (Smooth) blanches et convexes, ou rugueuses (Rough) jaunâtres, opaques et friables [71] .

❖ Caractères biochimiques :

Les *brucella* se caractérisent par un métabolisme plutôt oxydatif que fermentatif ; elles sont :

- Catalase positive.
- Oxydase positive (négative pour *B.ovis*, *B.neotomae* et quelques souches de *B.abortus*).
- La nitrate réductase est positive (sauf pour *B.ovis* et certaines souches de *B.canis*).
- L'uréase est positive (négative pour *B.ovis* et quelques souches de *B. abortus*).
- Les *brucella* oxydent divers acides aminés et glucides.
- Elles ne fermentent pas ou ne provoquent qu'une faible fermentation des glucides dans les milieux usuels.
- La production d' H₂S varie selon les espèces et les biovars.
- La réaction est négative avec : indole, rouge de méthyle, Voges-Proskauer, citrate de Simmons et liquéfaction de la gélatine [17] [18] .

❖ Caractères antigéniques et réaction croisées:

Les principaux antigènes identifiés sont les complexes lipopolysidiques lisses et rugueux (LPS-S et LPS-R), les deux polysaccharides apparentés : l'haptène natif (HN) et le polysaccharide B (poly B) et au moins 20 antigènes protéiques ou glycoprotéiques [19]

Des réactions sérologiques croisées ont été rapportées entre les LPS-S de *Brucella* avec d'autres bactéries gram négatif telles que: *Escherichia coli* O:116 et O:157, *Salmonella* groupe N(O:30), *Pseudomonas multophila*, *Vibrio cholerae* et *Yersinia enterocolitica* O:9. Ces bactéries induisent des taux d'anticorps considérables qui réagissent avec les LPS- S des antigènes brucelliques lors des tests diagnostiques [07] .

❖ Caractères différentiels des espèces et biovars :

La différenciation des espèces est basée principalement sur : L'exigence en CO₂, la production d'H₂S, la sensibilité à la thionine et à la fuchsine à des concentrations déterminées

ainsi qu'à la lysotypie en évaluant la sensibilité aux différents bactériophages (Wb, Tb, Bk,.....). [19].

❖ **Résistance et sensibilité des *Brucella* :**

Les *Brucella* sont sensibles à la chaleur (la pasteurisation les détruit dans le lait) et aux désinfectants usuels (composés iodés, ammoniums quaternaires) [26]

Cependant, elles résistent longtemps dans l'environnement:

- Jusqu'à 35 jours dans une pâture ombragée.
- Plus de huit mois dans un avorton à l'ombre ou dans des fosses à purin.
- Deux ou trois mois dans un sol humide.
- Trois ou quatre mois dans les fèces [39]

Les étapes de l'infection brucellique, la réponse de l'organisme infecté, les signes cliniques ainsi que les lésions sont décrites ci-dessous.

1. Etapes de l'infection :

1.1. Voies de pénétration :

Les bactéries pénètrent dans l'organisme par la muqueuse de tractus intestinal supérieur et des voies respiratoires supérieures, ou par des lésions cutanées [28].

Après cette contamination deux périodes sont distinguées:

1.2. Période primaire :

Elle suit la contamination et évolue en 3 étapes :

- **Etape de multiplication loco-régionale :** correspond à la multiplication des *Brucella* dans les nœuds lymphatiques de la porte d'entrée [31]
- **Etape de dissémination:** si *brucella* n'est pas éliminée, elle se propage par le sang, très certainement sous forme intracellulaire dans des neutrophiles et des macrophages. Il résulte de cette bactériémie une infection d'une grande variété de tissus [39].
- **Etape de localisation :** elle se traduit par la localisation et la multiplication des *Brucella* en certains sites électifs qui sont :
 - Les tissus lymphoïdes (notamment les nœuds lymphatiques de la sphère génitale et mammaire).
 - Le placenta chez les femelles gravides (les trophoblastes constituent une cible importante pour les *Brucella*).
 - Le testicule et ses annexes chez le mâle.
 - La glande mammaire et les bourses séreuses et synoviales (bourses carpiennes) et certaines articulations [31].

1.3. Période secondaire :

Elle est associée à un état de résistance de l'hôte plus ou moins prononcé, lié au développement d'une immunité (de type cellulaire). Deux issues sont possibles : la guérison (l'élimination totale des *brucella* est rare) ou la persistance des brucelles dans certains sites privilégiés notamment les ganglions lymphatiques (les *brucella* ont la capacité de résister à l'action des mécanismes immunitaires) [30]

2. Réaction de l'organisme à l'infection :

Les *Brucella* entraînent dans l'organisme infecté des réactions de défense à médiation cellulaire et humorale, mais à l'opposé d'autres bactéries intracellulaires, la production d'anticorps est importante et joue un certain rôle dans l'immunité. Les réactions immunitaires sont communes au genre *Brucella* ; c'est-à-dire qu'elles sont croisées entre *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis* [65]

2.1. Réponse humorale : Se définit par l'apparition d'anticorps post-infectieux présents dans le sérum et diverses sécrétions (lait, mucus vaginal et sperme) et décelables grâce à diverses réactions sérologiques.

Les macroglobulines IgM apparaissent les premières, et sont décelées 8 à 10 jours après le début clinique ; suivi par les IgG , les titres des deux s'élèvent ensemble pendant le premier mois de la phase aiguë de la maladie, peu à peu les IgG prédominent dans les phases plus tardives de l'infection ; dans la brucellose chronique les IgM ont disparu, tandis que les IgG persistent et on peut également ne trouver aucun anticorps décelable dans le sérum des malades atteints de brucellose chronique [65]

2.2. Réponse cellulaire : Les macrophages infectés par *Brucella* produisent plusieurs cytokines : le TNF- α ne joue un rôle que dans le contrôle précoce de l'infection et l'IL-12 semble être la cytokine-clé pour le déclenchement d'une immunité à médiation cellulaire [65]

3. Symptômes :

3.1. Incubation :

L'incubation peut durer de quelques jours à plusieurs mois [41]; lors d'une infection naturelle, comme il n'est pas possible de déterminer le moment où elle se produit, il est difficile d'évaluer le temps d'incubation de la maladie ; la période d'incubation est inversement proportionnelle au développement du fœtus chez la femelle gestante [01]

3.1.2. Symptômes généraux :

La brucellose chez les bovins est de caractère nettement chronique, les symptômes généraux sont discrets ou inexistant [40].

3.1.3. Symptômes locaux :

3.1.3.1. Symptômes génitaux

La brucellose se traduit par des troubles de la reproduction observés chez:

❖ Les femelles gestantes

Le symptôme prédominant est l'avortement ou la mise bas prématurée, ou à terme de veaux mort-nés ou affaiblis [10] [41] [01].

L'avortement peut survenir à n'importe quel moment de la gestation, mais le plus souvent, il se produit pendant la seconde moitié, entre le 5^{ème} et le 7^{ème} mois de gestation. Les vaches qui ont déjà avorté une fois avortent généralement beaucoup plus tardivement que celles qui avortent pour la première fois [39].

Après que la vache atteinte ait avorté ou mis bas normalement, l'agent pathogène ne reste pas localisé au niveau de l'utérus mais l'infection devient chronique et les brucelles colonisent les ganglions lymphatiques et le pis de la vache, les brucelles peuvent demeurer dans le pis durant des années [33].

La rétention placentaire et la métrite sont des suites fréquentes, des infections polymicrobiennes sont généralement la cause de la métrite qui peut être aiguë avec septicémie et mort, ou chronique conduisant à la stérilité [11].

Généralement, les animaux guérissent et réussiront à donner naissance à une descendance vivante après un premier avortement, mais ils peuvent continuer à excréter la bactérie [58]

Les femelles non gravides

Elles ne présentent pas de signes cliniques et si elles sont infectées avant d'être saillies, il est fréquent qu'elles n'avortent pas [01].

❖ Chez les mâles

La brucellose se manifeste par une orchite uni ou bilatérale et une épидидymite et une infection des vésicules séminales aiguë ou chronique car les *brucella* se localisent dans les testicules et les autres organes génitaux.

Dans les cas aigus, un ou les deux testicules sont hypertrophiés et douloureux, il y a tuméfaction des bourses et épaisissement de l'albuginée, ce qui entraîne la diminution de la libido et l'infécondité, parfois il y a rougeur et congestion du pénis par formation de papules [69] [30]

3.1.3.2. Symptômes extra-génitaux :

Parmi les autres symptômes de l'infection brucellique, on note des arthrites et des hygromas (uni ou bilatérales) des genoux, des jarrets, des grassets, de la pointe de la hanche, et entre le ligament nuchal et les premières vertèbres thoraciques [06](cf. figure 1).



Figure 1: Hygromas des articulations des genoux [06]

3.2. Lésions :

Des lésions de gravité variable sont retrouvées au niveau de:

- **L'utérus** : au fur et à mesure que l'infection progresse, l'endométrite évolue d'une forme aiguë à une forme chronique. La cavité utérine contient une quantité variable d'exsudat gris sale, consistant ou visqueux, chargé de flocons purulents de volume variable.
- **Les cotylédons**: sont nécrotiques et de couleur gris-jaunâtre, recouverts d'un exsudat collant, sans odeur, de couleur brunâtre. Des lésions vasculaires parfois accompagnées de thrombose se retrouvent dans le chorion [45].
- **Les avortons**: présentent un œdème sous-cutané important et les cavités splanchniques contiennent un exsudat sérosanguinolent, cependant certains fœtus ne présente pas de lésions macroscopique significatives.
- **Le pis**: il ne présente pas de lésions macroscopiques.
- **Les testicules**: ils peuvent présenter des lésions de nécrose multifocales ou diffuses atteignant le parenchyme testiculaire et l'épididyme [42].

4.1. Épidémiologie analytique :

Les espèces animales affectées par *B. abortus* sont surtout les bovins, mais d'autres ruminants domestiques et sauvages peuvent en être infecté aussi. Les bovins sont aussi infectés par *B. mélitensis* et peuvent développer une maladie comparable à celle induite par *B. abortus*, lorsque ceux-ci sont en contact avec des chèvres ou des moutons infectés [56]

4.1.1. Source de contagion :

L'élimination des *Brucella* par les animaux infectés peut être prolongée à l'origine d'une contamination du milieu extérieur, en particulier, le sol et les crudités [53]

Les matières virulentes les plus importantes sont le contenu de l'utérus gravide, expulsé pendant l'avortement ou la mise bas, avec une excrétion qui débute dès la liquéfaction du bouchon muqueux obturant le col et qui disparaît généralement deux ou trois semaines après l'expulsion du fœtus. Les sécrétions vaginales et l'urine peuvent également être virulentes. Et enfin, il existe une excrétion transitoire (quelques jours après la mise bas) et discrète de bactéries dans le lait et le colostrum (surtout importante après un avortement). [01]

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

4.1.2. Mode de transmission :

4.1.2.1. Transmission horizontale :

Ce mode de transmission correspond au passage des germes d'un animal à un autre d'une manière directe ou indirecte, il s'effectue par :

- La voie cutanée ou conjonctivale : la brucellose peut être transmise par pénétration à travers la peau (intacte ou avec excoriations) et la conjonctive. Par exemple la queue d'une vache hautement infectée peut être contaminante si elle entre en contact avec la peau ou la conjonctive d'une autre vache.
- La voie orale : permet la transmission de l'infection par le biais de l'eau et l'herbe de pâtures infectées et par le biais de l'allaitement au veau.
- La voie vénérienne : les taureaux sont parfois à l'origine d'une dissémination de *Brucella* par leur semence, mais ils ne transmettent d'ordinaire pas l'infection des vaches infectées aux vaches non infectées, en revanche, le risque est plus important

lors d'insémination artificielle de semence contaminée et lors de transfert embryonnaire dans le cas où les embryons sont issus de bovins provenant d'une exploitation devenue, depuis lors, un foyer de brucellose. [05]

- Les voies respiratoires supérieures : par formation d'aérosols de bactéries.
- La mamelle : de nombreuses formes de mammites brucelliques sont due à la contamination lors de la traite [36] [63]

4.1.2.2. Transmission verticale :

Ce mode de transmission correspond au passage des germes d'un adulte à son descendant .elle peut se réaliser in utéro ou lors du passage du veau dans la filière pelvienne [12]

4.2. Épidémiologie synthétique :

Les causes les plus fréquentes de la contamination d'un cheptel indemne sont l'introduction d'un animal infecté inapparent et les contaminations de voisinage (animaux et milieu contaminés).

La contamination de l'environnement (locaux d'élevage, pâturages) et la conservation de jeunes femelles nées de mères infectées (5 à 10% hébergent des brucelles) est aussi à l'origine d'une résurgence de la maladie dans les cheptels assainis. [13]

5.1. Définition du diagnostic et du dépistage:

- Le dépistage consiste en une recherche systématique dans une population, à l'aide des examens, des individus atteints par un trouble de santé donnée, passée juste là inaperçue.
- Le diagnostic correspond à l'identification de la maladie chez un sujet présentant des troubles.

Bien que leurs buts soient sensiblement différents, Le diagnostic et le dépistage peuvent faire appel au niveau du laboratoire aux mêmes testes biologiques. Ils mettent ainsi en jeu la recherche de l'agent par bactériologie et par les épreuves sérologiques et allergiques [70]

Le diagnostic de la brucellose se fait souvent par la combinaison de l'observation clinique et des techniques de laboratoire. Tous les pays, semblent posséder un laboratoire capable d'effectuer le diagnostic de brucellose. La sérologie est la technique de laboratoire la plus utilisée [09]

5.2. Diagnostic clinique :

La maladie peut être suspectée sur la base des signes cliniques tels que les avortements chez la femelle et les orchites ou épидидymites chez le mâle, d'autres éléments de suspicion peuvent être inclus comme les arthrites, hygromas, rétentions placentaires, mammites et métrites ou des troubles de la reproduction. Cependant, l'avortement n'est qu'un symptôme sans signification pathognomonique, surtout s'il est isolé ; il possède effectivement des étiologies de nature diverses. [63]

5.3. Diagnostic expérimental :**5.3.1. Diagnostic direct :**

Il vise à mettre en évidence les bacilles spécifiques dans le matériel suspect. Celui ci comporte :

- a) Les enveloppes fœtales et surtout les cotylédons altérés.
- b) Les organes de l'avorton ; principalement le contenu de la caillette et le poumon.
- c) Les lochies de la vache qui vient d'avorter ou de mettre bas
- d) Le lait
- e) Le sperme [40]

5.3.1.1. Diagnostic bactériologique :

❖ La bactérioscopie :

C'est une technique intéressante pour examiner les produits d'avortement. Les frottis réalisés à partir de cotylédons placentaires, du contenu de l'estomac du fœtus ou exsudat utérin, sont fixés à la chaleur puis colorés par une méthode de différenciation comme les méthodes de Stamp ou Koster.

Cette coloration élective mais, non spécifique, est suivie par un examen microscopique qui fait apparaître les *Brucella* en rouge sur fond bleu. Les éléments tissulaires et les autres bactéries, exception faite des acido-résistantes, sont colorés en bleu. [19] [40]

❖ Mise en culture, isolement et identification :

L'isolement des *Brucella* en culture est la technique de référence pour établir un diagnostic certain de brucellose. Les cultures se font sur milieu sélectif (milieu de Farrel) et sont incubées à 37°C en présence de 8% de CO₂. Après 3 à 4 jours d'incubation, les colonies de *Brucella* ont en général entre 1 et 2 millimètres de diamètre. Elles sont bombées, transparentes de couleur miel; lisses luisantes et présentant un contour régulier. Une culture sur milieu de Farell est considérée comme négative si aucune colonie suspecte n'est observée après 10 jours d'incubation [59] [03]

❖ Technique d'amplification génique (PCR : Polymerase Chain Reaction) :

La technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) récemment développée constitue un moyen additionnel de détection et d'identification des *Brucella* sp. C'est une technique sensible et spécifique réalisée à partir des tissus et des fluides. Le typage des *Brucella* et la distinction des diverses souches vaccinales peuvent être réalisés avec succès par PCR, mais celle-ci n'a été que partiellement validée pour une utilisation en tant que premier test de diagnostic [60]

Les gènes cibles utilisés dans le cadre du diagnostic direct des brucelles sont principalement le gène *bcbp31* codant pour une protéine de membrane externe de 31kDa et la séquence d'insertion IS711 dont plusieurs copies sont présentes dans le génome des *Brucella* [19] [52]

5.3.2. Diagnostic indirect :

Il est fondé sur la mise en évidence d'une réaction immunitaire spécifique.

5.3.2.1. Diagnostic sérologique :

Les tests sérologiques sont très utilisés en routine sur sérum ou lait, ils mettent en évidence les anticorps dirigés contre les épitopes du LPS, ce qui entraîne des problèmes de parenté entre *Brucella abortus* et d'autres bactéries: *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella urbana* et *Pseudomonas maltophilia* [20]

5.3.2.1.1. Epreuves réalisées sur sérum :

De nombreux tests sérologiques sont utilisés pour le diagnostic de la brucellose, nous nous limiterons à décrire ci dessous les plus importants et les plus utilisés en routine.

- **Séroagglutination de Wright ou séroagglutination lente en tube (SAW) :**

Cette technique mise au point par Wright en 1897, est la plus ancienne des épreuves de diagnostic, elle met en évidence les agglutinines (principalement IgM et IgG2) [34]

Elle peut donner des résultats erronés par excès, certains animaux indemnes de brucellose peuvent présenter des réactions positives à cette épreuve. C'est pour cette raison que elle n'a pas été recommandée pour la mise en œuvre de programme nationaux de lutte contre la brucellose, alors que cette épreuve a été prescrite pour le contrôle du bétail avant son exportation [04] [57]

- **Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) ou test au rose Bengale:**

Ce test qualitatif est une méthode simple et efficace de dépistage systématique de la brucellose bovine ; c'est une méthode d'agglutination rapide qui met en évidence les trois principaux isotypes d'immunoglobulines antibrucelliques (IgM, IgG1, IgG2), dirigés contre le lipopolysaccharide (LPS) bactérien. [04]

Le test au rose Bengale est le test de dépistage le plus couramment utilisé pour la brucellose, en raison de son apparente simplicité de lecture, cependant, l'interprétation des résultats peut être affectée par l'expérience personnelle. [15]

L'antigène utilisé est une suspension de *Brucella abortus* (souche 99 de Weybridge) inactivée par la chaleur et le phénol (0,5%), diluée en tampon acide habituellement $3,65 \pm 0,05$ puis colorée par le Rose Bengale. Il doit être conservé entre 2 et 8°C, à l'obscurité, et ne doit surtout pas être congelé. [58]

- Principe:

L'antigène et le sérum à analyser sont mélangés à volumes égaux, et après 4 minutes de contact, la présence d'anticorps se traduit par la formation d'agglutinants visibles à l'œil nu alors que leur absence se traduit par un mélange qui reste homogène (cf.figure 2). [04]

Il est recommandé de soumettre les sérums positifs au rose Bengale à une épreuve de confirmation telle que la fixation du complément ou ELISA. [24]

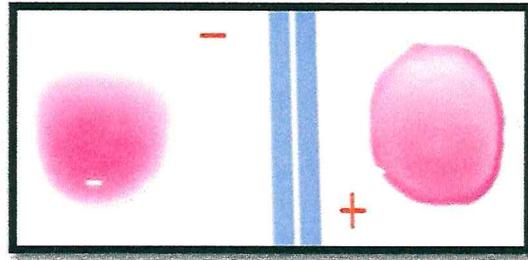


Figure 2 : Epreuve à l'antigène tamponné [43]

- **Réaction de fixation du complément (FC):**

Ce test quantitatif met en évidence les anticorps (non dirigés exclusivement contre le LPS bactérien) fixant le complément. Chez les ruminants, les principaux anticorps fixant le complément appartiennent à la classe des immunoglobulines IgG1 et les IgM (plus ou moins éliminées selon les modalités de chauffage du sérum) [04]

C'est un test très sensible (il détecte 98% des animaux à partir desquels *Brucella* est isolée) et spécifique (moins sensible aux séquelles vaccinales et aux réactions croisées que l'EAT). [57] [08]

- Principe :

Un antigène spécifique est ajouté au sérum à tester, si des anticorps spécifiques de l'antigène sont présents, des complexes immunitaires se forment. Un complément est ajouté, il est alors activé par ces complexes immunitaires, et ainsi consommé. Des érythrocytes sensibilisés sont par la suite ajoutés et une lyse des érythrocytes se produit lorsqu'il reste suffisamment de complément (c'est-à-dire lorsque aucun complexe immunitaire n'a été formé). Si le complément a été consommé, les érythrocytes restent intacts et donnent après centrifugation un petit bouton (inhibition d'hémolyse) sur la surface de la plaque de microtitrage (cf.figure 3). Une détermination semi-quantitative est rendue possible par le titrage du point final du sérum. Cette technique est très utilisée comme test de confirmation mais elle est compliquée à réaliser, demande un équipement de laboratoire sophistiqué et une équipe bien formée. [40]

La fixation du complément peut être réalisée à chaud (37°C pendant 30 minutes) ou à froid (4°C pendant 14-18 heures), avec des caractéristiques légèrement différentes, à adapter à la qualité des sérums testés. L'interprétation des résultats est standardisée car il existe un système d'unité pour la lecture, basé sur le sérum standard de l'Office International des Epizooties, qui contient 1000 ICFTU (International Complément Fixation Test Unit) par millilitre. Chaque laboratoire pratiquant ce test doit donc être agréé pour que ses résultats soient interprétables suivant les normes internationales. Ainsi, les sérums donnant un titre équivalent à 20 ICFTU/mL ou plus sont considérés comme positifs [58]

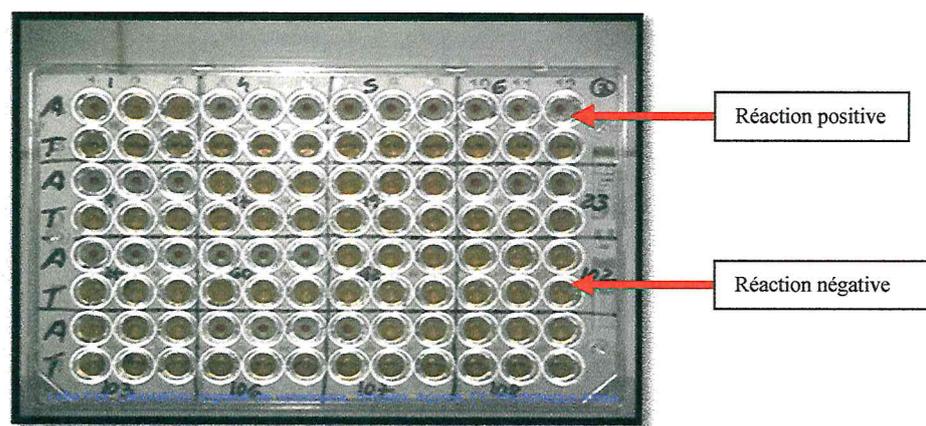


Figure 3 : Réaction de fixation du complément en microplaque [44]

- **Test immuno-enzymatique ou enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) :**

Le titrage immuno-enzymatique est un outil de recherche de grande valeur, pouvant utiliser des antigènes de *brucella* purifiés et des réactifs anti-immunoglobulines spécifiques et sensibles, ce qui permet de titrer les classes et les sous-classes d'anticorps anti-*brucella* à l'égard d'antigènes définis [38]

C'est un test très sensible mais il est moins spécifique que l'EAT et la fixation du complément, notamment dans les troupeaux vaccinés. Il ne fait pas l'objet d'une standardisation internationale et n'est donc pas reconnu comme test officiel.[35]

Son avantage par rapport à la fixation du complément est d'être automatisable, ce qui permet sa mise en route aisée pour confirmer un résultat négatif ou positif à L'EAT [72]

. Par ailleurs, la technique peut être réalisée sur sérum individuel ou sur mélanges de sérums .

5.3.2.1.2. Epreuve réalisé sur le lait :

- **Le Ring Test ou test de L'anneau (R.T.) :**

Il s'agit d'un test collectif, habituellement pratiqué sur lait de mélange, il permet le dépistage des troupeaux laitiers infectés avec l'avantage d'être pratique, rapide et peu coûteux, donc de pouvoir être facilement renouvelé. En revanche, il a l'inconvénients d'avoir un nombre élevé de réactions douteuses, d'erreurs par excès et d'erreurs par défaut [57]

5.3.2.2. Diagnostic allergique :

C'est une réaction d'hypersensibilité retardée qui consiste en la mise en évidence de l'immunité cellulaire suite à l'injection dans le derme de *Brucella*. La réaction est considérée positive lorsque l'épaississement du pli cutané, constaté 72h après l'injection, est supérieur à deux millimètres. [30]

Cette réaction est spécifique mais peu sensible (beaucoup de faux négatifs); elle est peu utilisée en routine; c'est un bon test complémentaire des approches sérologiques mais il ne permet pas non plus de différencier un infecté d'un vacciné [25]

5.4. Evaluation des tests de diagnostic :

Aucun des tests précédemment cités ne détecte à lui seul tous les animaux infectés car l'intensité et la durée de la réponse humorale sont très variables en fonction des individus et des doses infectieuses, avec aussi des variations qualitatives. Par ailleurs, la réalisation de ces tests doit suivre les standards internationaux définis par l'Office International des Epizooties, et les réactifs utilisés doivent avoir été produits en respectant les standards décrits [37]

Evaluer un test, c'est juger dans quelle mesure ce test sépare les malades des non malades et quels sont les facteurs qui font varier cette propriété. La valeur d'une méthode de diagnostic est toujours relative à une méthode de référence. [14]

5.4.1. Caractéristiques intrinsèques d'un test :

Définir la validité d'un test, c'est mesurer la capacité du test à séparer les sujets malades et non malades chez lesquels le diagnostic aura été établi auparavant avec certitude par un test de référence.

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

		Maladie (test de référence)	
		Oui	Non
Test à évaluer	Positif	VP	FP
	Négatif	FN	VN

Tableau II: tableau de contingence de confrontation des résultats entre le test à évaluer et le test de référence [47]

Où :

- VP (vrais positifs) : sujets effectivement malades pour lesquels le test est positif.
- VN (vrais négatifs) : sujets effectivement non malades pour lesquels le test est négatif.
- FP (faux positifs) : sujets en réalité non malades pour lesquels le test est positif
- FN (faux négatifs) : sujets en réalité malades pour lesquels le test est négatif.

Les deux principales qualités d'un test, qui définissent la validité interne, sont : la sensibilité et la spécificité.

- **La sensibilité** : la capacité du test à identifier les sujets atteints de la maladie, Probabilité d'avoir un test positif quand on est malade : c'est donc la proportion de vrais positifs parmi les malades. [14]

$$\text{Sensibilité} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FN})$$

- **la spécificité** : la capacité du test à identifier les sujets sains, Probabilité d'avoir un test négatif quand on est non malade C'est donc la proportion de vrais négatifs parmi les non malades. [14]

$$\text{Spécificité} = \text{VN}/(\text{VN}+\text{FP})$$

Un test diagnostique idéal discrimine bien malades et non-malades, il doit donc être à la fois sensible et spécifique : tous les sujets malades ont un test positif (sensibilité) et tous les sujets sains ont un test négatif (spécificité). Mais ce sont deux caractéristiques antagonistes : augmenter la sensibilité se fait au prix d'une diminution de la spécificité, et vice-versa. [23]

5.4.2. Caractéristiques extrinsèques d'un test :

- **Valeur prédictive positive** : le risque qu'un patient donné soit porteur de la maladie si son test est positif. [23]

$$\text{VPP} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FP})$$

- **Valeur prédictive négative :** est la probabilité de ne pas être malade quand on a un test négatif. [23]

$$VPN = VN / (VN + FN)$$

5.4.3. Autres caractéristiques du test :

- **Indice de Youden :**

Comme mesure de l'efficacité d'un test, Youden a suggéré un indice combinant la sensibilité et la spécificité en un nombre compris entre 0 et 1.

Cet indice est défini par :

$$J = [(sensibilité + spécificité) - 1]$$

L'indice prend la valeur zéro toutes les fois qu'un test diagnostique donne la même proportion de positifs pour les groupes des atteints et des non atteints. L'indice prend sa valeur maximale seulement si tous les cas de maladie et de contrôle sont identifiés correctement. [21]

6.1. Traitement :

Brucella abortus étant sensible aux antibiotiques, notamment à la tétracycline, le traitement est théoriquement possible. Mais il est interdit en raison de son coût très élevé, des risques d'apparition de résistance, et de l'absence de garantie quant au statut infectieux d'un animal traité [39]

6.2. Prophylaxie :

La prévention et le contrôle des zoonoses majeurs dépendent de la décision ferme des autorités nationales de faire face à ces maladies, sur leurs capacités de mobiliser des ressources dans les différents secteurs, d'établir la coordination des activités et de promouvoir la coopération intersectorielle au besoin, surtout entre services nationaux de santé vétérinaire et santé publique en association avec des campagnes d'éducation en santé publique avec participation de la communauté.

Il y'a plusieurs décennies que les pays méditerranées et du Moyen-Orient ont pris conscience que les zoonoses telles que la brucellose, la leishmaniose, la rage et salmonellose ne peuvent être combattues de manière efficace ou éliminées que si les différents pays mènent chacun de son côté, ses activités de prévention, de surveillance et de lutte en adoptant les mesures prophylactiques sanitaires et/ou médicales.

6.2.1. Prophylaxie sanitaire :

Elle consiste en un assainissement des cheptels bovins infectés et une protection des cheptels indemnes.

6.2.1.1. Mesures offensives:

Dans une zone ou un foyer déclaré, les mesures prophylactiques comprennent:

- Le dépistage des animaux infectés (persistance parfois toute la vie), leur isolement, puis leur élimination rapide vers la boucherie.
- L'élimination des jeunes femelles nées de mères infectées.
- le contrôle de toutes les espèces réceptives et élimination des infectés.
- L'utilisation de l'insémination artificielle pour limiter la transmission vénérienne.
- L'isolement strict des animaux infectés, surtout lors de mise bas, dans un local facile à désinfecter avec application des mesures de désinfections adaptées (destruction du placenta, traitement des fumiers...). [32]

6.2.1.2. Mesures défensives:

Afin d'éviter l'introduction de la maladie dans un élevage, les mesures suivantes doivent être adoptées:

- Introduction de bovins certifiés indemnes avec quarantaine et contrôle individuel par sérologie.
- Maintien du cheptel à l'abri des contaminations de voisinage.
- Hygiène de la reproduction : monte publique ou insémination artificielle.
- Désinfections périodiques des locaux.
- Isolement des parturientes et destruction des placentas.
- Contrôle régulier des cheptels. [32]

Dans tous les cas, pour une prophylaxie sanitaire efficace, il faut utiliser une méthode de dépistage qui est basé sur la mise en évidence indirecte de l'infection parce que la maladie est asymptomatique pendant longtemps [58]

6.2.2. Prophylaxie médicale:

La vaccination est recommandée par l'Office International des Epizooties pour le contrôle de la brucellose dans les zones où la prévalence de l'enzootie est élevée. Le principal objectif d'un programme de vaccination est de réduire le taux d'infection et de faire en sorte que les troupeaux soient résistants à la brucellose, pour que l'éradication de la maladie puisse ensuite être entreprise [58] Parmi les vaccins qui ont été largement employés dans le monde:

- **Le vaccin *Brucella abortus* B19 :**

C'est le plus utilisé à travers le monde, c'est un vaccin vivant fabriqué à partir de la souche B19 (souche *B. abortus* strain 19) qui appartient au biotype 1 [39]

Son efficacité est très bonne, mais il a quelques inconvénients majeurs. En effet, il induit une réponse humorale identique à celle qui se produit lors d'une infection (déterminant antigénique majeur porté par le LPS de la membrane externe), avec des anticorps résiduels dans le lait et le sérum posant problème pour le dépistage. De plus, il peut être abortif chez certaines vaches.

En réalité, la persistance des anticorps vaccinaux dépend plus de l'âge et de la dose de vaccin que de la voie d'administration. Lorsqu'on l'injecte à dose réduite, il y a moins d'interférences avec les tests sérologiques [68]

- **Le vaccin RB51:**

Il est devenu le vaccin officiel pour la prévention de la brucellose bovine dans plusieurs pays, ces derniers adoptent chacun un protocole de vaccination différent [58]

La souche vaccinale RB51 est la souche rugueuse mutante 2308 de *brucella abortus*, elle a remplacé le vaccin B19 en 1996, car il est moins virulent [39]

RB51 protège les souris, les ovins et les bovins lors d'injection expérimentale de *brucella abortus* [55] cependant, il a été rapporté qu'il induisait des placentites sévères chez la plupart des animaux, donc l'inoculation à des femelles gravides peut également provoquer des avortements [58].

Par ailleurs, une excrétion de bactéries dans le lait existait chez une part importante de la population vaccinée. Son utilisation à des doses réduites permet de supprimer ces problèmes, mais n'est alors efficace que chez des animaux adultes. Il permet une immunité durable mais d'une durée inconnue [68]

1. Objectif:

Notre étude a pour objectif de faire un essai d'évaluation de certaines caractéristiques intrinsèques et extrinsèques de deux antigènes brucelliques commercialisés en Algérie et utilisés dans le cadre du dépistage et du diagnostic de la brucellose.

2. Lieu et période de l'étude:

Notre étude s'est déroulée durant la période du 23/12/2012 au 03/01/2013 au niveau du laboratoire vétérinaire régional de Laghouat, en effet ce laboratoire reçoit des sérums bovins des élevages de la région Sud dans le cadre du dépistage de la brucellose bovine. Chaque sérum est testé par une méthode d'agglutination sur lame (test au Rose Bengale), et les sérums répondant positivement à ce test sont de nouveau analysés avec la méthode de fixation du complément.

3. Protocole de l'étude:

Nous avons voulu tester deux antigènes brucelliques utilisés dans une réaction d'agglutination sur lame et appliqués sur des sérums bovins (positifs et négatifs) en les comparant à une méthode de référence qui est la fixation du complément.

Ces sérums ont été préalablement testés par le laboratoire, classés en positifs et en négatifs et préservés par congélation.

Au total, 159 sérums bovins ont été testés par les deux antigènes dont 91 positifs en FC et 68 négatifs en FC.

4. Matériel:

4.1. Matériel pour l'Epreuve à l'Antigène Tamponné (EAT) ou Rose Bengale test:

- **Appareillage et consommable:** (cf.figure 2)

- Pipettes automatiques réglables.
- Cônes plastique à usage unique.
- Plaque blanche (plastique, opaline, bristol).
- Baguette fine (verre ou plastique).
- Agitateur à mouvement basculant.
- Minuteur ou chronomètre.
- Portoirs.



Figure 4 : Matériels et réactifs utilisés pour l'E.A.T.

- **Réactifs:**

Les réactifs utilisés dans cette épreuve sont les antigènes brucelliques dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau III: Caractéristiques des antigènes brucelliques utilisés dans l'étude

Caractéristiques	Antigène 1 (Ag 1)	Antigène 2 (Ag 2)
Origine	Espagne	Jordanie
Composante	Suspension de <i>Brucella abortus</i> souche S99	- <i>Brucella rose</i> Bengal reagent - <i>Brucella abortus</i> reagent - <i>Brucella melitensis</i> reagent
Présentation	- Antigène Rose Bengal - Control + - Control -	- Antigène rose Bengal - Antigène <i>Brucella abortus</i> - Antigène <i>Brucella melitensis</i> - Control +
Caractéristiques	- Sensibilité 100% - Spécificité 98%	Non précisées

L'antigène "2" se présentait en 3 flacons, le premier appelé Rose Bengal, le second et le troisième appelé *B. abortus* et *B. melitensis* respectivement. Il semble que le premier soit l'antigène global mettant en évidence *B. abortus*, *B. melitensis* et *B.suis* et les deux autres sont spécifiques de l'espèce. Aucune indication n'a été mentionnée sur le kit.

4.2. Matériel pour la Fixation du complément (Méthode en plaques de microtitration) :

- **Appareillage et consommable:**

- Plaque de microtitrage à fond en U.
- Pipettes automatique.
- Tubes à hémolyse.
- Pipettes graduées à 2 traits de 0,5 ml, 1 ml et 2 ml.
- Pipettes graduées à 2 traits de 5 ml et 10 ml.
- Bain-marie à 37°C et 60°C.
- Etuve à 37°C.
- Réfrigérateur à +4°C.
- Centrifugeuse.

- **Réactifs:** (cf. figure 3 et 4)

- Antigène pour la fixation du complément
- Sérums à tester
- Sérum(s) témoin(s) positif(s) de titre connu
- Sérum(s) témoin(s) négatif(s)
- Complément lyophilisé
- Hématies de mouton
- Sérum hémolytique
- Tampon véronal Calcium Magnésium (T V)

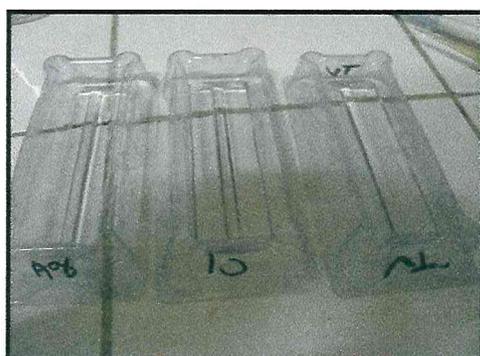


Figure 5 : Antigène (Ag), complément (C') et Tampon véronal (TV)



Figure 6: Complément lyophilisé

5. Méthodes:

5.1. Méthode de l'Epreuve à l'Antigène Tamponné ou Rose Bengale test :

- Prendre le sérum et l'antigène préalablement réfrigérés et laisser à température ambiante pendant 30 mn.
- Effectuer l'épreuve sur des sérums purs (naturels).
- Déposer 30 μ l d'antigène et un volume égale de sérum à tester (30 μ l) côte à côte sur la plaque (cf. figure 5 et 6).
- Faire de même pour le sérum témoin négatif et le sérum témoin positif.
- Mélanger le sérum et l'antigène avec une baguette.
- Placer la plaque pendant 4 mn sur l'agitateur (cf. figure 7).



Figure 7: Distribution de l'antigène

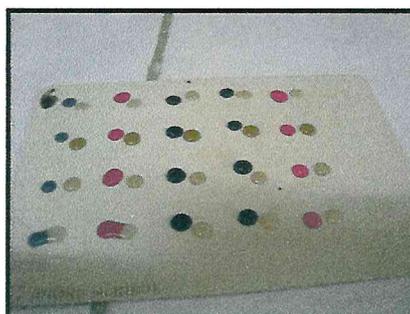


Figure 8: Sérums et antigènes côte à côte sur la plaque



Figure9: Plaque sur agitateur

- **Lecture :**

Effectuer la lecture immédiatement après 4mn d'agitation sous un bon éclairage et à l'oeil nu.

Ne pas tenir compte des agglutinas qui apparaissent après 4mn.

- **Interprétation:**

- Absence d'agglutination = **Sérum Négatif** (cf.figure 8)

- Présence d'agglutination = **Sérum Positif** (cf.figure 9)

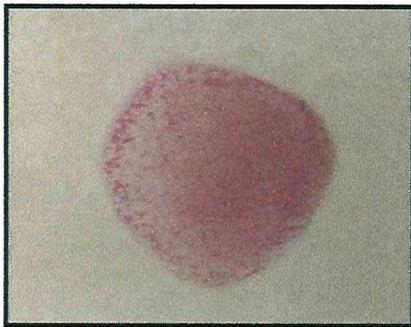


Figure 10: Résultat positif de l'EAT.



Figure 11: Résultat négatif de l'EAT

5.2. Méthode du test de Fixation du complément (Méthode en plaques de microtitration):

Préalablement à la réalisation de l'épreuve de fixation du complément, le complément doit être titré et sa quantité calculée, et le couple hémolytique doit être préparé.

5.2.1. Titrage du complément :

Effectuer le titrage en tubes comme pour la méthode de fixation du complément en tube soit :

- Reprendre le complément lyophilisé par la quantité de solvant indiquée.
- Faire une dilution à 1/100 en tampon (0,1 ml dans 9,9 ml de T.V.)
- Répartir en tube selon le schéma ci-dessous (cf.figure 12)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Témoins hémolyse	
														H0	H100
C à 1/100 (ml)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10	0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16	0	0,40
Tampon véronal (ml)	0,36	0,35	0,34	0,33	0,32	0,31	0,30	0,29	0,28	0,27	0,26	0,25	0,24	0,40	0
Antigène dilué selon titre (1unité) (ml)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Agiter les tubes- les placer au bain –marie à 37°C pendant 30 minutes															
Couple hémolytique (ml)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Agiter les tubes- les placer au bain –marie à 37°C pendant 30 minutes															

Figure 12: Distribution des réactifs dans les tubes pour la méthode de fixation du complément

5.2.2. Couple hémolytique :

- Préparer les éléments du couple hémolytique (suspension de globules rouges et solution de sérum hémolytiques) en quantité suffisante pour le titrage du complément et les examens.
- Mélanger à parties égales :
 - La suspension d'hématies à 2,5 % soit 0,5ml d'hématies (déjà diluées à 50%) plus 9,5ml de tampon véronal.
 - Sérum hémolytique dilué (cf. Figure 13)
- Mélanger les quantités nécessaires pour le titrage du complément et les laisser à la température du laboratoire 20 mn avant leur emploi.
- Garder à + 4°C jusqu'au lendemain et séparément le reste des éléments du couple.

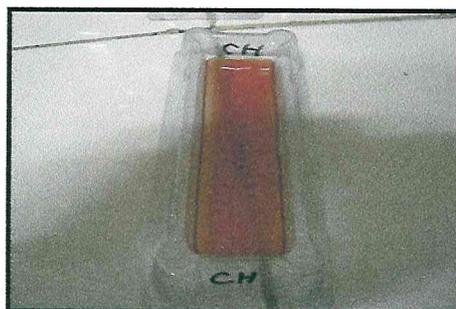


Figure 13: Couple hémolytique préparé

- Centrifuger immédiatement les tubes à la sortie du bain marie pendant 10 minutes à 500-1000g.
- Faire un témoin hémolyse H_{50} (0,50 ml du surnageant du témoin hémolyse H_0 et 0,50 ml du surnageant du témoin hémolyse H_{100}).
- Prendre comme unité H_{50} le premier tube de la gamme dont le surnageant présente la même coloration que le témoin H_{50} ainsi préparé.

5.2.3. Calcul de la quantité de complément à préparer pour les examens :

Nous présentons la méthode de calcul du complément à préparer sous forme d'un exemple

Exemple :

- Nombre de cupules = 100, chaque cupule reçoit 0,025 ml de complément dilué soit :

$$0,025 \times 100 = 2,5 \text{ (volume total de complément dilué)}$$

The diagram illustrates the calculation of the volume of complement to be prepared. The central formula is:

$$\frac{0,08 \times 6 \times 100 \times 0,025}{100 \times 0,2} = 0,060 \text{ ml}$$

Arrows point from the following labels to the corresponding parts of the formula:

- 6 (unités H_{50})** points to the number 6 in the numerator.
- Valeur trouvée au titrage (H_{50})** points to the value 0,08 in the numerator.
- Nombre de cupules** points to the number 100 in the numerator.
- Volume de complément dans l'épreuve** points to the value 0,025 in the numerator.
- Dilution du complément dans le titrage** points to the denominator 100 × 0,2.
- Volume d'antigène dans le titrage** points to the value 0,2 in the denominator.

- L'unité H_{50} a été trouvée pour le tube n° 5 (0,08 ml de complément à 1/100).
- L'épreuve utilise 6 unités H_{50} soit 0,060 ml de complément pur pour 2,44 ml de tampon véronal.

5.2.4. Epreuve :

- Inactiver les sérums par chauffage au bain-marie à 60° C pendant 30 minutes.
- Diluer les sérums à examiner et les sérums témoins à ¼ en tube ou en plaque et effectuer les dilutions suivantes sur plaque de microtitration (cf. Figure 14)

cupules	Tampo n (µl)	Sérum dilué A ¼ (µl)	dilutions	Dilutions finales	Volume final (µl)	
Témoins sérums		25		¼	25	
	B			¼	25	
	C	25	25	25	1/8	25
	D	25	←	25	1/16	25
	E	25	←	25	1/32	25
	F	25	←		1/64	25
	G					
	H			25		

Jeter

Figure 14: Méthode de dilution des sérums sur la plaque de microtitration

- Ajouter ensuite les différents réactifs selon le schéma suivant (cf. figure 15)

	Cupules	Antigène dilué (μl)	Tampon (μl)	Complément (μl)
Témoins sérums	A	-	25	25
	B	25	-	25
	C	25	-	25
	D	25	-	25
	E	25	-	25
	F	25	-	25

Figure 15: Méthode de distribution de l'antigène, du tampon et du complément sur la plaque de microtitration

- Chaque série d'examen comportera les témoins suivants : (cf. figure 16)

	Cupules	Sérum dilué (μl)	Antigène dilué (μl)	Tampon (μl)	Complément (μl)
Témoins antigène	1	-	25	25	25
	2	-	25	25	25
Témoins complément	3	-	-	50	25
	4	-	-	50	25
Témoins couple hémolytique	5	-	-	75	-
	6	-	-	75	-

Figure 16: Distribution des témoins sur la plaque de microtitration

- Agiter les plaques puis les couvrir
- Placer les plaques au réfrigérateur à +4° C pendant une nuit.
- **Le lendemain :**
 - Préparer le couple hémolytique (mélange à volumes égaux de la suspension de globules rouges et de solution de sérum hémolytique préparées la veille).
 - Laisser le mélange 10 minutes à la température du laboratoire.
 - Placer alors les plaques 10 minutes à l'étuve à 37° C.
Le couple hémolytique a été maintenu ainsi 20 minutes à température du laboratoire.
 - Ajouter dans toutes les cupules 50µl de couple hémolytique.
 - Agiter les plaques puis les couvrir.
 - Placer les plaques à l'étuve à 37° C pendant 30 minutes.

- **Lecture :**

- Centrifuger les plaques pendant 10 minutes à 500-1000g (centrifugeuse réfrigérée) ou les laisser 1 heure au réfrigérateur à + 4° C.
- Le degré d'hémolyse des hématies sensibilisées dans chaque cupule est noté de la façon suivante :
 - + + + + = inhibition complète de l'hémolyse.
 - + + + = 75 % d'inhibition d'hémolyse (soit 25 % d'hémolyse).
 - + + = 50 % d'inhibition d'hémolyse (soit 50 % d'hémolyse).
 - + = 25 % d'inhibition d'hémolyse (soit 75 % d'hémolyse)
 - 0 = hémolyse totale.

- **Interprétation :** (cf.figure 17)

- Moins de 50 % d'inhibition de l'hémolyse à la dilution 1/4= **SERUM NEGATIF.**
- 50 % ou plus d'inhibition de l'hémolyse à la dilution 1/4= **SERUM POSITIF.**

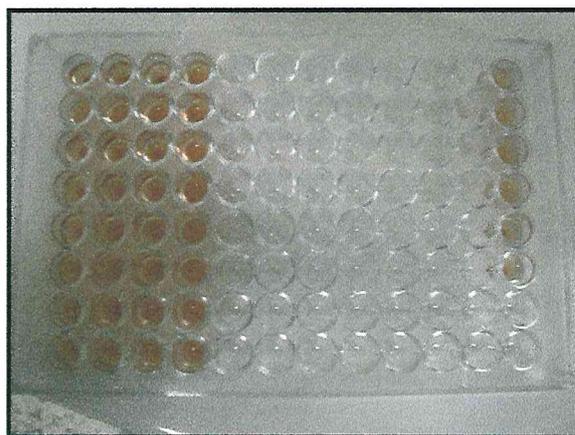


Figure 17: Résultat de fixation du complément sur plaque de microtitration

Le tableau de correspondance entre les dilutions du sérum et le nombre d'unités CCE sensibilisatrices est présenté dans la figure ci-dessous.

Dilution du sérum	1/2	1/4	1/6	1/8	1/16	1/32
Nombre d'unités CCE sensibilisatrices	10	20	30	40	80	160

Seuil de positivité

Figure 18: Nombre d'unités CCE sensibilisatrices par rapport aux dilutions des sérums

Les résultats obtenus par les deux antigènes (Ag 1 et Ag 2) employés dans l'épreuve de l'antigène tamponné sont comparés à un test de référence qui est la fixation du complément.

1. Résultats obtenus par l'antigène "1":

1.1. Taux de réponse de l'antigène "1":

Les taux de réponse de l'antigène "1" par rapport au test de fixation du complément sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV : Taux de réponse de l'antigène "1" par rapport au test de fixation du complément

Fixation du complément	Sérums positifs à l'Ag 1	%	Sérums négatifs à l'Ag 1	%
FC +	31	38.75	60	75.94
FC -	49	61.25	19	24.05
Total	80	100	79	100

On note que pour l'antigène "1" seulement 38.75% des sérums qui étaient positifs à la FC ont répondu positivement à l'Ag 1, par ailleurs 75,94% des sérums qui étaient positifs à la FC ont répondu négativement à cet antigène.

1.2. Calcul de la sensibilité et de la spécificité de l'Ag "1":

Pour le calcul de la sensibilité et de la spécificité, les résultats doivent être classés dans le tableau de contingence suivant.

Tableau V: Tableau de contingence de l'Antigène "1"

Ag 1	FC +	FC -
EAT +	VP= 31	FP= 49
EAT -	FN= 60	VN= 19
	91	68

- VP (vrai positifs) : sujets effectivement malades pour lesquels le test est positif

- VN (vrai négatifs) : sujets effectivement non malades pour lesquels le test est négatif.

– **FP** (faux positifs) : sujets en réalité non malades pour lesquels le test est positif

– **FN** (faux négatifs) : sujets en réalité malades pour lesquels le test est négatif.

1.2.1. La sensibilité de l'Ag "1":

$$\text{Sen} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FN})$$

$$\text{Sen} = 31/(31+60)= 0.34$$

La capacité du test à identifier les sujets atteints de la maladie est de 34.07%

1.2.2. La spécificité de l'Ag "1":

$$\text{Sp} = \text{VN}/(\text{VN}+\text{FP})$$

$$\text{Sp}= 19/(19+49)= 0,27$$

La capacité du test à identifier les sujets sains est de 27.94 %

1.3. Calcul des valeurs prédictives positives et négatives de l'Ag "1":

Le calcul des valeurs prédictives positives et négatives obéit à la même distribution des résultats présentés dans le tableau 4.

1.3.1. La valeur prédictive positive de l'Ag "1":

$$\text{VPP}= \text{VP}/(\text{VP}+\text{FP})$$

$$\text{VPP}= 31/(31+49)=0.38$$

La probabilité d'avoir la maladie quand le test est positif est de 38.75%

1.3.2. La valeur prédictive négative de l'Ag "1":

$$\text{VPN}= \text{VN}/(\text{VN}+\text{FN})$$

$$\text{VPN}= 19/(19+60)=0.24$$

La probabilité de ne pas avoir la maladie quand le test est négatif est de 24.05%

1.4. Calcul de l'indice de Youden:

$$J = [(\text{sensibilité} + \text{spécificité}) - 1]$$

$$J= [(0.34 + 0.27) - 1]= - 0.38$$

Un indice négatif signifie que le test est inefficace

2. Résultats obtenus par l'antigène "2":

2.1. Taux de réponse de l'antigène "2":

Pour le taux de réponse de l'antigène "2", nous avons calculé celui de l'antigène global c.a.d le flacon portant la mention " Antigene rose bengal". (cf. tableau 5)

Tableau VI: Taux de réponse de l'antigène "2" par rapport au test de fixation du complément

Fixation du complément	Sérums positifs à l'Ag 2	%	Sérums négatifs à l'Ag 2	%
FC +	57	91.93	34	35.05
FC -	5	8.06	63	64.94
Total	62	100	97	100

On remarque que 91.93% des sérums ayant répondu positivement à l'antigène "2" étaient positifs à la FC, par contre 35.05% des sérums qui ont répondu négativement à l'antigène étaient en réalité positifs à la FC.

2.2. Comparaison des résultats obtenus par l'antigène "2" global et les antigènes spécifiques:

Les 159 sérums ont été testés simultanément sur l'antigène "2" global et ses antigènes spécifiques (*B. abortus* et *B. melitensis*). Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

Tableau VII: Réponses des sérums à l'antigène "2" global, *B. abortus* et *B. melitensis*

N° de sérum	Ag "2" global	Ag "2" <i>B.abortus</i>	Ag "2" <i>B. melitensis</i>
Serum1	+	-	-
Serum2	+	-	-
Serum3	+	+	+
Serum4	-	+	+
Serum5	-	+	+
Serum6	-	+	-
Serum7	+	-	-
Serum8	-	+	+
Serum9	-	-	+
Serum10	-	+	+
Serum11	+	-	-
Serum12	-	+	+

Serum13	-	-	-
Serum14	-	-	-
Serum15	+	-	-
Serum16	+	-	-
Serum17	+	-	-
Serum18	+	-	-
Serum19	+	-	-
Serum20	+	+	+
Serum21	+	-	-
Serum22	+	-	-
Serum23	-	+	+
Serum24	+	-	-
Serum25	+	-	-
Serum26	-	+	+
Serum27	+	+	+
Serum28	+	+	+
Serum29	+	+	+
Serum30	+	+	+
Serum31	+	-	-
Serum32	-	-	-
Serum33	+	+	+
Serum34	+	-	-
Serum35	-	-	-
Serum36	+	-	-
Serum37	+	-	-
Serum38	+	+	+
Serum39	+	-	-
Serum40	+	-	-
Serum41	+	+	+
Serum42	+	-	-
Serum43	-	-	-
Serum44	+	-	-
Serum45	+	-	-
Serum46	+	-	-
Serum47	+	-	-
Serum48	+	-	-
Serum49	+	-	-
Serum50	+	-	-
Serum51	+	-	-
Serum52	-	-	-
Serum53	-	-	-
Serum54	+	+	+
Serum55	+	-	-
Serum56	+	-	-
Serum57	-	-	-
Serum58	-	+	+
Serum59	-	-	-
Serum60	-	-	-

Serum61	-	-	-
Serum62	+	-	-
Serum63	-	-	-
Serum64	-	+	+
Serum65	-	-	-
Serum66	+	-	-
Serum67	+	+	-
Serum68	+	-	-
Serum69	-	-	-
Serum70	+	-	-
Serum71	-	+	+
Serum72	+	-	-
Serum73	-	+	+
Serum74	-	-	-
Serum75	-	+	+
Serum76	+	-	-
Serum77	-	+	+
Serum78	+	-	-
Serum79	+	-	-
Serum80	-	-	-
Serum81	+	-	-
Serum82	+	-	-
Serum83	+	-	-
Serum84	-	+	+
Serum85	+	-	-
Serum86	+	-	-
Serum87	+	-	-
Serum88	+	-	-
Serum89	-	-	-
Serum90	+	-	-
Serum91	-	-	-
Serum92	-	+	+
Serum93	-	+	+
Serum94	-	-	-
Serum95	-	-	-
Serum96	-	+	-
Serum97	-	-	-
Serum98	-	+	-
Serum99	-	-	-
Serum100	-	-	-
Serum101	-	-	-
Serum102	-	-	-
Serum103	-	+	+
Serum104	-	+	+
Serum105	+	+	+
Serum106	-	-	-
Serum107	-	-	-
Serum108	-	+	+

Serum109	-	+	-
Serum110	-	+	+
Serum111	+	-	-
Serum112	-	-	-
Serum113	-	-	-
Serum114	-	-	-
Serum115	-	-	-
Serum116	-	+	-
Serum117	-	+	-
Serum118	-	-	-
Serum119	+	-	-
Serum120	-	+	+
Serum121	-	-	-
Serum122	-	+	+
Serum123	-	-	-
Serum124	+	-	-
Serum125	-	+	+
Serum126	+	-	-
Serum127	-	-	-
Serum128	-	-	-
Serum129	-	-	+
Serum130	-	-	-
Serum131	-	-	-
Serum132	-	+	+
Serum133	-	+	+
Serum134	-	-	-
Serum135	-	+	+
Serum136	-	+	-
Serum137	-	-	-
Serum138	-	+	+
Serum139	-	-	-
Serum140	-	-	-
Serum141	-	-	-
Serum142	-	-	-
Serum143	-	-	-
Serum144	-	-	-
Serum145	-	+	+
Serum146	-	-	-
Serum147	-	-	-
Serum148	-	+	+
Serum149	-	-	-
Serum150	-	-	-
Serum151	-	-	-
Serum152	-	-	-
Serum153	-	-	-
Serum154	-	-	-
Serum155	-	-	+
Serum156	-	-	-

Serum157	–	–	–
Serum158	–	–	–
Serum159	–	–	–

Nous résumons les résultats présentés dans le tableau 6 en :

- 1- 11 sérums ont donné un résultat positif aux trois variantes d'antigène.
- 2- 58 sérums ont donné un résultat négatif aux trois variantes d'antigène.
- 3- 28 sérums ont donné un résultat négatif à l'antigène global et un résultat positif aux deux antigènes spécifiques simultanément.
- 4- 49 sérums ont donné un résultat positif à l'antigène global et un résultat négatif aux deux antigènes spécifiques simultanément.
- 5- 1 sérum a donné un résultat positif à l'antigène global et un résultat positif à l'un des deux antigènes spécifiques.
- 6- 12 sérums ont donné un résultat négatif à l'antigène global et un résultat positif à l'un des deux antigènes spécifiques.

2.3. Calcul de la sensibilité et de la spécificité de l'Ag "2":

Nous avons calculé la sensibilité et de la spécificité de l'Ag "2" global, les résultats sont classés dans le tableau de contingence suivant.

Tableau VIII: Tableau de contingence de l'Antigène "2"

Ag 2	FC +	FC -
EAT +	VP= 57	FP=5
EAT -	FN= 34	VN= 63
	91	68

2.3.1. La sensibilité de l'Ag 2:

$$\text{Sen} = \text{VP}/\text{VP}+\text{FN}$$

$$\text{Sen} = 57/(57+34) = 0.62$$

La capacité du test à identifier les sujets atteints de la maladie est de 62.64%

2.3.2. La spécificité de l'Ag 2:

$$Sp = VN/(VN+FP)$$

$$Sp=63/(63+5)=0.92$$

La capacité du test à identifier les sujets sains est de 92.65%

2.4. Calcul des valeurs prédictives positives et négatives de l'Ag "2":

Le calcul des valeurs prédictives positives et négatives obéit à la même distribution des résultats présentés dans le tableau 7.

2.4.1. La valeur prédictive positive de l'Ag "2":

$$VPP = VP/(VP+FP)$$

$$VPP=57/(57+5)=0.91$$

La probabilité d'avoir la maladie quand le test est positif est de 91.94%

2.4.2. La valeur prédictive négative de l'Ag "2":

$$VPN = VN/(VN+FN)$$

$$VPN = 63/(63+34) = 0.64$$

La probabilité de ne pas avoir la maladie quand le test est négatif est de 64.95%

2.5. Calcul de l'indice de Youden:

$$J = [(sensibilité + spécificité) - 1]$$

$$J = [(0.62 + 0.92) - 1] = 0.55$$

Un indice se rapprochant de 1 signifie que le test est efficace.

3. Comparaison des deux antigènes:

Un tableau comparatif des caractéristiques des deux antigènes est présenté ci-dessous.

Tableau IX: Tableau comparatif des caractéristiques des deux antigènes

Caractéristiques	Antigène 1	Antigène 2
Sensibilité	0.34	0.62
Spécificité	0.27	0.92
VPP	0.38	0.91
VPN	0.24	0.64
Indice de Youden	- 0.38	0.55

Le tableau 8 montre que toutes les caractéristiques de l'antigène "1" sont inférieures à celle de l'antigène "2", donc l'Ag "2" est meilleurs que l'Ag "1".

La sérologie demeure la méthode la plus pratique pour la détection de la brucellose et parmi les différents tests sérologiques permettant le diagnostic et la surveillance de la brucellose, la coloration sur plaque au Rose bengale (RBT) est largement utilisée comme test de dépistage pour déterminer la prévalence dans les troupeaux. Cependant, malgré la simple utilisation de ce test, sa fiabilité est conditionnée par la qualité des antigènes employés et les conditions d'utilisation.

Dans notre étude, les deux antigènes testés ont montré des caractéristiques intrinsèques et extrinsèques assez faibles contrairement à une étude Algérienne de comparaison des tests sérologiques qui a rapporté une sensibilité et une spécificité de 96,3% et 94,1% respectivement, pour un test de rose bengale comparé à un test de fixation du complément [02]

En effet, nous constatons dans la présente étude que pour:

- L'antigène "1":

Seulement 38.75% des sérums répondant positivement à la FC ont répondu positivement à l'Antigène "1" ce qui est très faible, parallèlement 75,94% des sérums ont répondu négativement à cet antigène alors qu'ils étaient positifs à la FC. Ces valeurs montrent déjà la faible capacité de cet antigène à détecter des sérums positifs. En d'autres termes si cet antigène aurait été employé dans les conditions naturelles du dépistage des élevages, un grand nombre de sujets positifs ne serait pas révélé (des faux négatifs).

Par ailleurs, sa sensibilité et sa spécificité sont de 0.34 et de 0.27 respectivement, cela signifie que dans nos conditions d'expérimentation, la capacité du test à identifier les sujets atteints de la maladie est de 34.07% et sa capacité à identifier les sujets sains est de 27.94 %, ces valeurs sont très en dessous de ce qui est indiqué dans le prospectus du réactif mentionnant une sensibilité de 100% et une spécificité de 98%.

Le même constat a été observé pour les valeurs prédictives, en effet, la probabilité d'avoir la maladie quand le test est positif (VPP) est de 38.75% et la probabilité de ne pas avoir la maladie quand le test est négatif (VPN) est de 24.05%.

L'indice de Youden a donné une valeur négative (-0.38) pour cet antigène concluant à une inefficacité totale de ce test, sachant que cet indice classe un test comme étant efficace si sa valeur se rapproche de 1.

- L'antigène "2":

Pour cet antigène, 91.93% des sérums positifs à la FC ont répondu positivement à l'antigène "2" ce qui est relativement acceptable, par contre, 35.05% des sérums qui ont répondu négativement à l'antigène étaient en réalité positifs à la FC, donc nous sommes en présence d'un taux important de faux négatifs.

La sensibilité et la spécificité de cet antigène est de 0.62 et 0.92 respectivement, même si elles ne sont pas très bonnes surtout pour la sensibilité, elles sont meilleures que celles observées par l'antigène "1".

Les valeurs prédictives de l'antigène "2" représentées par 0.91 et 0.64 respectivement pour la VPP et la VPN sont également meilleures que celles de l'antigène "1".

Son indice de Youden a donné une valeur positive de 0.55 concluant que le test est plus ou moins efficace.

En revanche, ce que nous avons constaté dans l'antigène "2" c'est l'incohérence des réponses obtenues entre l'antigène global (que nous avons nommé global, il est appelé par le fabricant *Brucella* rose Bengal reagent) et ses deux antigènes spécifiques (*B.abortus* et *B.melitensis*), ainsi, nous avons constaté que:

- 28 sérums ont donné un résultat négatif à l'antigène global et un résultat positif aux deux antigènes spécifiques simultanément, par ailleurs, 12 sérums ont donné un résultat négatif à l'antigène global et un résultat positif à l'un des deux antigènes spécifiques. Ces résultats paraissent illogiques puisque l'antigène global est sensé contenir les 2 antigènes de *B.abortus* et *B.melitensis*, il devrait donner impérativement un résultat positif dans ce cas.

- 49 sérums ont donné un résultat positif à l'antigène global et un résultat négatif aux deux antigènes spécifiques simultanément, là aussi le résultat paraît illogique puisqu'on devrait avoir au moins un des deux antigènes spécifiques qui réagirait positivement si l'antigène global est positif.

Ces résultats nous incitent à avoir des doutes quant à la fiabilité de ce réactif surtout que le prospectus ne donne aucune indication sur la méthode d'emploi ou l'interprétation des résultats obtenus par les trois antigènes qui le composent (global, *B.abortus* et *B.melitensis*).

En réalité, mêmes après ces résultats non satisfaisants, nous ne pouvons pas juger ces réactifs et apporter des conclusions concrètes sur la base d'un seul lot et sur la base d'un échantillonnage aussi réduit.

Par ailleurs, dans ce genre d'expérimentations, il est important de vérifier les conditions dans lesquelles se sont déroulées les manipulations comme:

- Les conditions de conservation de l'antigène et des sérums: L'antigène doit être conservé à +4°C, et cette condition est difficile à vérifier depuis le fournisseur jusqu'au laboratoire d'analyse.
- La température des réactifs et du milieu ambiant lors de la manipulation: La quantité d'antigène utilisé doit être ramenée à température ambiante 30 mn avant emploi, chose qui n'est pas respecté à chaque manipulation, en effet Mc millan [51] a rapporté que la température de l'antigène et du milieu ambiant peu influencer sur la sensibilité et la spécificité du test.
- Les erreurs de manipulations et d'interprétation, en effet, il est a été rapporté par Cho et al., [15] que malgré que le test du rose bengale soit un test largement utilisé de par le monde, et qu'il soit considéré parmi les tests les plus faciles à réaliser, son interprétation demeure fortement liée à l'expérience du manipulateur.

En fin selon Gall et Nielsen [29], aucun test ne peut être fiable à lui seul et l'association de deux ou plusieurs tests s'avère parfois nécessaire pour pouvoir juger du statut sérologique d'un animal ou d'un troupeau.

En Algérie, malgré les efforts et les stratégies de lutte contre la brucellose, elle constitue toujours un problème de santé animale, qui a des répercussions sur l'économie nationale et sur la santé publique. La maladie humaine ne disparaîtra que lorsque la maladie animale aura été éliminée grâce à des moyens de prophylaxie médicale et sanitaire.

La stratégie de lutte dépendra donc fortement des moyens de dépistage et d'abattage, ainsi, le choix des tests sérologiques constitue un élément essentiel dans cette stratégie.

Dans notre étude qui est portée sur deux antigènes commercialisés et employés dans l'épreuve de l'antigène tamponné dans des laboratoires d'analyses, nous avons montré les limites de ces derniers. En effet, l'antigène "1" a montré des valeurs intrinsèques et extrinsèques complètement inacceptables, et l'antigène "2" a montré des valeurs intermédiaires avec des incohérences d'interprétation entre l'antigène global et les antigènes spécifiques.

En conclusion, les antigènes commercialisés peuvent ne pas être fiables en présentant beaucoup de résultats faussement négatifs ou faussement positifs entravant ainsi la fiabilité de détection des animaux positifs, et de ce fait permettant la pérennisation de la maladie dans les élevages. Il est nécessaire donc de les contrôler dans des conditions expérimentales adéquates avant de les mettre sur le marché et de confirmer les résultats positifs avec des techniques plus fiables telles que la fixation du complément et l'Elisa.

Recommandations :

A l'issu de notre étude, les recommandations qui en découlent portent sur:

- Le contrôle des réactifs à l'importation par les laboratoires compétents.
- L'établissement de règles d'acheminement, de conservation et d'utilisation des réactifs par les laboratoires.
- Le contrôle des bonnes pratiques d'hygiène et de manipulation dans les laboratoires.
- L'utilisation et la standardisation de tests plus fiables tels que l'Elisa dans le contrôle de la brucellose dans les laboratoires vétérinaires nationaux.

Références :

1. Acha, N.P., SZYFRES, B. (2005) : Zoonoses and communicable diseases common to Man and Animals – Volume1: Bacterioses and Mycoses. 3ème édition. Office International des Epizooties.
2. Aggad, H., Boukraa, L. (2006): Prevalence of bovine and human brucellosis in western Algeria: comparison of screening tests, Eastern Mediterranean Health Journal, Vol. 12, Nos 1/2
3. Alton, G.G., Jones, L.M, Angus, R.D, Verger, J.M.(1988) : Techniques for the Brucellosis Laboratory .1st edition . Institut National de la recherche Agronomique, Paris(France).
4. Alton, G.G., Carter, G.R., Kibor, A.C., Pesti, L. (1992) : Diagnostic sérologique de la brucellose In Diagnostic bactériologique vétérinaire : Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de certaines maladies du bétail, FAO.
5. André, H. Ir. (2012) : Risque de transmission de *Brucella abortus* via l'insémination artificielle et le transfert d'embryons, COMITÉ SCIENTIFIQUE DE L'AGENCE FÉDÉRALE POUR LA SÉCURITÉ DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE ; Bruxelles, le 07/05/2012.
6. Anonyme (2006): Bonne pratique pour l'industrie de la viande. Sous-division des politiques et de l'appui en matière de publications électroniques .Division de l'information Rome FAO
7. Anonyme 2001: Brucellosis in sheep and goat (*Brucella melitensis*). Scientific committee on Animal Health and animal Welfare. SANCO.C.2/AH/R23/2001
8. Aucher, P., Fauchère, J. L. (1997) : Sérodiagnostics bactériens, Technique en bactériologie clinique.53p-63p.
9. Ayayi, J. A., Assiongbon, T.A., Philippe, K. (2009) : L'IMPACT DE LA BRUCELLOSE SUR L'ÉCONOMIE ET LA SANTÉ PUBLIQUE EN AFRIQUE ; Ecole Inter-états des Sciences et Médecine Vétérinaire (EISMV), BP 5077, Dakar (Sénégal). Conf. OIE 2009, 71-84.
10. Bazin, S. (1991) : La Brucellose : les principales maladies réglementées in Maladies des bovins.
11. Blood, D.C., Henderson, J.A.(1976) : les maladies provoquées par les diverses Brucelles in Médecine vétérinaire 427-443pages.
12. Bosseray, N. (1982) : Mother to young transmission of *Brucella abortus* infection in mouse model ; Annale de recherches Vétérinaires ; 341p-359p.

13. Casao, M.A., Smits, H.L., Navarro, E., Solera, J. (2003): Clinical utility of a dipstick assay in patients with brucellosis: correlation with the period of evolution of the disease. *Clinical Microbiology Infection*; 301p-305p (PubMed: 12667240).
14. Catherine, A. (2011) : EVALUATION DES PROCEDURES DE DEPISTAGE, Faculté de Médecine de Toulouse Purpan et Toulouse Rangueil.63p-76p.
15. Cho D, Nam H, Kim J, Heo E, Cho Y, Hwang I, Kim J, Kim J, Jung S.(2010): Quantative Rose Bengal Test for diagnosis of bovine brucellosis. *J. Immunoassay Immunochem.*, 31 (2): 120-30.130p .
16. Cognault, C. (2001):Etude de phénomène « Brucellose Atypique » dans le département de la LOIRE de 1995 à 2000 ;190 pages
17. Comité mixte FAO/OMS d'expert de la brucellose (1964): quatrième rapport ; OMS, Genève, 70pages
18. Comité mixte FAO/OMS d'expert de la brucellose (1971): cinquième rapport ; OMS, Genève, 87pages
19. Comité mixte FAO/OMS d'expert de la brucellose (1986): sixième rapport ; OMS, Genève, 145pages
20. Corbel, M.J (1985): Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions, *Veterinary Bulltin*; 55,927p-942p.
21. Daigle, J.M. (2002) : L'utilisation des courbes ROC dans l'évaluation des tests diagnostiques de laboratoire clinique : Application a l'étude de la pneumonite d'hypersensibilité ; Essai présenté a la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de maître en sciences (M. Sc.), Département de mathématiques et de statistique, FACULTE DES SCIENCES ET DE GENIE UNIVERSITE LAVAL.
22. Dwight, C.H., Yuan, C. Z. (1999): *Veterinary Microbiology*, by Blackwell Science .463 pages .
23. Emmanuel, A., BLICKLE, J.F., Bernard, G., WEBER, J.C. (2007) : Raisonement et décision en médecine : Diagnostic.39p-73p.
24. Felten. A., Lgrange, P. (2002) : Sérodiagnostic Brucelloses in Guide des examens de laboratoire. 4^{ème} édition. 167p-186p
25. Fensterbank, R., Pardon, P. (1977): Diagnostic allergique de la brucellose bovine : condition d'utilisation d'un allergène protéique purifié : Brucelline., *Ann.Rech.Vét.*, 8, 2,187-193.

26. Florence, D. (2005) : la brucellose in Les zoonoses : transmission des maladies des animaux à l'homme 55-57p
27. François, J. (2003) : Brucellose : Animaux sauvages et domestiques : Zoonoses .547p-549p.
28. Fritz, H., Kayser, (2008) : Manuel de poche de microbiologie médicale, 11^{ème} edition 328p
29. Gall, D., Nielsen, K. (2004): Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Revue scientifique et technique Office International des Epizooties* 23:989-1002.
30. Ganière, J.P. (2004): la brucellose animale. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles Nationales Vétérinaire françaises, Merial (Lyon) 45pages
31. Ganière, J.P. (2009): la brucellose animale. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles Nationales Vétérinaire françaises, Merial (Lyon) 50pages
32. Ganière, J.P. (2012): la brucellose animale. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles Nationales Vétérinaire françaises, Merial (Lyon) 51pages
33. Garcia, C. , Lucero, C.N.E. (1993) : Brucellosis bovina : Zoonose et maladies transmissible commune à l'homme et aux animaux.
34. Garin, B., Trap, D., Gaumont, R. (1985): Assessment of the EDTA seroagglutination test for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Record* ; volume 117 issue 17 :444-445.
35. Garin, B. ,Blasco, J.M., Grayon, M., Verger, J.M. (1998): *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Veterinary Research* ;29(3-4):255-274
36. Garin, B. (1993) : Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. Le cas des sérologies atypiques en brucellose bovine. *Point Vétérinaire* ; 25 : 23-32.
37. Garin, B. (1993) : Brucellose bovine, ovine et caprine : contrôle et prévention. *Point Vétérinaire*, 25, 15-22.
38. Goidfoid, J., Kasbohrer, A.M. (2002): Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty –first century, *Veterinary Microbiology* , Vol 90, Issue 1-4, 135p-145p.
39. Goidfoid, J. , Al Mariri, A. , Walravens, K., Letesson, J.J. (2003) : Brucellose bovine Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail (Europe et Régions Chaudes) , tome 2, maladies bactériennes , mycoses, maladies parasitaires (Edition Iefévere, P.C ;Blancou, J.Chermette, R) Edition Lavoisier, London , Paris, New York.
40. Goidsenhoven, C., Schoenaers, F. (1999) : brucellose in maladies infectieuses des animaux domestiques .Ecole de médecine vétérinaire de Curghem-Bruxelles. 261p-291p

41. Gourreau, J.M., Bendali, F. (2008) : la brucellose in maladies des bovin(manuel pratique) 4^{ème} Edition (AFSSA).
42. Gyles, L.C., Prescoh, J.F., Songer, J.G., Thosen, C.O. (2004) : *Brucella* in Pathogenesis of bacterial infections in animals .3^{ed} edition
43. <http://microbesedu.org/professionel/brucel.html> consulté le 05/12/2012.
44. <http://theses.vet-alfort.fr> consulté le 02/03/2013.
45. Jubb, K.V.F., Kennedy, P. C., Palmer, N. (1993): Pathology of Domestic Animals.4th ed.
46. Kooh, R. L. (2006) : *Brucella* spp. Fiche de description de danger transmissible par les aliments ;(afssa) Agence Française de Sécurité Sanitaire des Alimentaire
47. labarere, J. (2011) : Evaluation des caractéristiques d'un test diagnostique. université Joseph fourier de Grenoble.
48. Leminor, L., Véron, M. (1989) : Brucella ; Bactériologie médicale .2^{ème} Edition 651p-670p
49. Ioune, N.(2009) :Dépistage des maladies contagieuses ,Receuil des ateliers d'épidémiologie animale , Université de Blida Faculté des Sciences Agro Vétérinaires , Département des Sciences Vétérinaires.
50. Loup, J. , DABERNAT, H., DENIS, F., MONTEIL ,H. (1992) : Bactériologie clinique . 2^{ème} Edition 511pages
51. Mac, M. A. (1990): Conventional serological tests. In: Nielson K, Duncan JR, eds. Animal brucellosis. Boston, CRC Press: 153–97, 206.
52. Maurin, M. (2007) : Brucella in précis de Bactériologie clinique sous direction de J.Frenray, F.Renaud, R.Leclercq et P.Riegel. 2^{ème} edition .1377p-1385p.
53. Maurin, M. (2005) : La brucellose à l'aube du 21^{ème} siècle. Méd Mal Infect; 35 : 6-16
54. Moreno, E., Cloeckart, A., Moriyon, I. (2002): Brucella evolution and taxonomy in Veterinary Microbiology. 209-227p
55. Moriyón, I., Grilló, M.J., Monreal, D., González, D., Marín, C., López-Goñi, I., Mainar-Jaime, R.C., Moreno, E., Blasco, J.M. (2004): Rough vaccines in animal brucellosis : structural and genetic basis and present status .Veterinary Research; 35(1):1-38. (PubMed : 1509950)
56. Nicolti, P.(1980):the epidemiology of bovine brucellosis.Advence in veterinary science and comparative medicine ; 24: 69-98 (PubMed: 6779513)
57. Nielsen, K. (2002): Diagnosis of brucellosis by serology, Veterinary Microbiology, Vol 90, Issues 1-4, 447-459.

58. Office International des Epizooties (OIE) (2005): Bovine brucellosis. In Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, Section 2.3, Chapitre 2.3.1.OIE,Paris
59. OIE (2000) manual of standards for diagnostic Tests and Vaccines. 4th édition , office international des epizooties, paris (France).
60. OIE (2008) manuel terrestre de l'OIE Section 2.3 Maladies bovine de la liste B, CHAPITRE 2.3.1.Brucellose bovine ., www.oie.int/eng/normes/manual/2008/pdf
61. OIE (2012) : Brucellose in fiches d'information générales sur les maladies www.oie.int.
62. Ouar Korichi, M.N., Senouri, H. Rahal, K ; (1998) : Diagnostic direct et sérologique de la brucellose, Direction de la prevention, Commission zoonoses
63. Radotestis, O.M., Gayc.C., Blood, D.C., Hinchleff, K.W.(2000) : Brucellosis caused by *Brucella abortus* (Bang's disease), in : Veterinary medicine - A t text book of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses 9th Ed., W.B. Saunders Company, London, 867-881.
64. Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., López-Goñi, I. (1995): Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 33(3), 615-617
65. Roux, J. (1989) : Brucella in LE MINOR L & VERON M. Bactériologie Médicale. Flammarion, Paris, édition 1989, p. 651-670.
66. Roux, J . (1979) : Bulltin de l'organisation mondiale de santé (OMS)
67. Schaether,M.,Ph.D., Medoff,G.,M.D;B.I.Eieshenstein (1999): Microbiologie et Pathologie infectieuse.
68. Schuring ,G.C.,Sriranganathan,N.,Corbel,M.J. (2002): Brucellosis vaccines: Past, present and future.Veterinary Microbiology. 90(1-4):479-496.
69. The center of food security and public health (CFSPH) ET OIE (2009): Brucellosis 13pages. www.cfshp.iastate.edu .
70. Toma, B., B. Dufour, M. Sanaa, J.J. Bénet, A. ShawF. Moutou et A. Louzà(1998) : Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures, AEEMA, Maisons- Alfort, France.551pages.
71. Walker, R.L . (1999) : *Brucella* in Veterinary Microbiology .482p.
72. Wright, P. F. (1992): Santé animale: importance du diagnostic des maladies infectieuses, AIEA BULLETIN, 34p-38p.