

## BRUCELLOSE PORCINE

---

### RÉSUMÉ

*La brucellose du porc due à Brucella suis, est une infection bactérienne qui, après une bactériémie initiale, induit des lésions inflammatoires chroniques des organes reproducteurs dans les 2 sexes, avec une localisation occasionnelle à d'autres tissus. L'espèce Brucella suis comprend 5 biovars, mais l'infection du porc est due aux biovars 1, 2 ou 3 de B. suis. Les biovars 1 et 3 induisent une maladie identique. Le biovar 2 induit quant à lui une maladie différente quant à son spectre d'hôtes, sa distribution géographique limitée et sa pathogénie. Le biovar 2 est rarement pathogène pour l'homme, alors que les biovars 1 et 3 sont fortement pathogènes et sont à l'origine d'une maladie sévère. La brucellose porcine est très répandue ; sa prévalence est néanmoins faible, à l'exception de l'Amérique du Sud et l'Asie du Sud-Est où la prévalence est plus forte. Dans certaines régions, l'infection à B. suis s'est établie chez les sangliers ou les porcs sauvages – les méthodes de diagnostic recommandées dans ces espèces sont identiques à celles destinées au porc domestique. Plusieurs biovars de B. suis peuvent infecter d'autres espèces que les suidés, comme le renne, le caribou, le lièvre, diverses espèces de rongeurs, et occasionnellement les bovins et les chiens. Les infections à Brucella suis chez les animaux autres que le porc font l'objet d'une revue dans l'annexe à la fin de ce chapitre.*

*La symptomatologie chez la truie inclut l'avortement à n'importe quel stade de la gestation ainsi que la naissance de porcelets mort-nés ou chétifs. Chez le mâle, le signe le plus évident est une orchite, mais les organes sexuels secondaires peuvent aussi être atteints. Brucella suis peut être présente dans le sperme, parfois en l'absence de signes cliniques. La transmission au cours de l'accouplement est plus fréquente que dans la brucellose des ruminants. Dans les 2 sexes, les os, les articulations et les gaines tendineuses peuvent être touchés, induisant des boiteries, et parfois de véritables paralysies. Les porcs sont sensibles à l'infection expérimentale par B. abortus et B. melitensis mais la maladie naturelle liée à ces agents a été rarement rapportée. Chez l'homme, l'infection est généralement limitée aux personnes en contact professionnellement avec les porcs et aux personnels de laboratoire. B. suis est capable de coloniser la mamelle chez les bovins avec excrétion dans le lait, ce qui constitue un risque sanitaire potentiel très sérieux pour l'homme.*

**Identification de l'agent pathogène :** *Brucella suis est aisément isolée chez le porc vivant par mise en culture des produits du part et sur les carcasses, par mise en culture de nœuds lymphatiques et d'organes. Des milieux sélectifs sont disponibles pour la culture à partir d'échantillons contaminés. B. suis est naturellement en phase lisse – l'aspect des colonies sur milieu solide est typique d'une Brucella lisse. Les biovars d'origine porcine agglutinent avec le sérum monospécifique anti-A, mais pas avec l'anti-M. L'identification définitive de l'espèce et du biovar peut être obtenue par la lysotypie couplée à divers tests biochimiques, lesquels sont préférentiellement mis en œuvre par des laboratoires spécialisés.*

**Épreuves sérologiques :** *jusqu'à présent, aucune des épreuves sérologiques conventionnelles n'est véritablement fiables en diagnostic de routine au niveau individuel. Elles sont plutôt utilisées pour un diagnostic de cheptel. Les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) indirectes ou de compétition sont les épreuves prescrites pour les échanges internationaux. Les épreuves à l'antigène tamponné (EAT), c'est-à-dire le Rose Bengale (RB) et le BPAT (Buffered Plate Agglutination Test) sont suggérées comme épreuves alternatives pour le dépistage, de cheptels entiers notamment. Une épreuve de polarisation de fluorescence a également été développée. L'épreuve cutanée allergique à la brucelline est également utile pour l'identification des cheptels infectés.*

**Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique :** le vaccin « souche 2 » de *Brucella suis* a été utilisé pour l'immunisation des porcs en Rép. Populaire de Chine. Une confirmation des résultats obtenus en Chine est néanmoins nécessaire avant qu'on puisse recommander son utilisation. Des travaux expérimentaux ont par ailleurs montré la supériorité du vaccin Rev.1 sur le vaccin *Brucella suis* S2 pour la protection du mouton contre *B. melitensis*. Les données concernant le vaccin RB51 de *B. abortus* sont encore insuffisantes pour démontrer son efficacité dans la protection du porc contre une exposition à *B. suis*. En pratique, aucun produit n'est acceptable actuellement. La préparation, le contrôle et l'utilisation d'un allergène établi, « *Brucellysate* » (ou *Brucelline fraction F*) sont décrits.

## A. INTRODUCTION

La brucellose porcine est une infection due aux biovars 1, 2 ou 3 de *Brucella suis*. Elle est présente dans de nombreux pays où le porc fait l'objet d'un élevage. En général, la prévalence est faible, mais dans certaines régions, comme en Amérique du Sud ou en Asie du Sud-Est, la prévalence est bien plus forte. La brucellose porcine serait un sérieux problème dans certains pays, même s'il n'est pas encore reconnu. Les infections liées au biovar 1 de *B. suis* ont été rapportées chez les porcs sauvages dans certains États du sud des États-Unis d'Amérique (USA) et au Queensland en Australie. Au Queensland, on a rapporté un grand nombre d'infections humaines touchant des personnes chassant ou manipulant des produits issus de porcs sauvages (16).

L'infection est généralement contractée par consommation de nourriture contaminée par les produits du part et/ou de l'avortement ou par les sécrétions utérines. Les porcs ingèrent volontiers les avortons et leurs membranes. La transmission lors de la saillie est également fréquente et ceci n'est pas sans conséquence pour l'insémination artificielle.

Chez le porc, comme chez les ruminants, *B. suis*, après une première phase de bactériémie, colonise les cellules du tractus génital dans les 2 sexes. Chez la femelle, le placenta et les fœtus sont envahis. Chez le mâle, les organes suivants sont touchés : testicule, épидidyme, vésicules séminales et/ou glandes bulbo-urétrales (glandes de Cowper). Chez le mâle, les lésions, qui sont généralement unilatérales, débutent par une hyperplasie pouvant progresser vers la formation d'abcès ; le stade final est caractérisé par une sclérose et une atrophie. Des arthrites peuvent apparaître avec parfois une spondylite.

La manifestation classique de la brucellose chez la femelle est l'avortement, qui peut apparaître très précocement mais aussi à n'importe quel stade de la gestation. La décharge vaginale n'est pas souvent visible et les problèmes rapportés sont plutôt des infertilités que des avortements. Chez le mâle, la brucellose est souvent persistante, avec des lésions du tractus génital avec une incidence temporaire ou permanente sur l'activité sexuelle. Le verrat peut excréter des *Brucella* dans le sperme, sans anomalie apparente des organes sexuels ni incidence sur l'ardeur génésique.

Dans les 2 sexes, on peut observer un gonflement des articulations et des gaines tendineuses, des boiteries et, occasionnellement, des paralysies postérieures. Une proportion importante des mâles et femelles guérit de l'infection, souvent dans les 6 mois, mais certains demeurent infectés de manière permanente.

La brucellose due au biovar 2 de *B. suis* diffère de celle dues aux biovars 1 et 3 dans son spectre d'hôtes, sa distribution et sa pathogénie. Dans les foyers d'infection par le biovar 2 du porc de plein air, récemment observés en Europe, les sangliers sont considérés comme la source de l'infection (7). En plus du sanglier sauvage, le lièvre brun européen (*Lepus capensis*) est également un réservoir du biovar 2 de *B. suis* et est considéré comme une source possible pour l'élevage domestique (1, 7). La distribution géographique du biovar 2 est historiquement constituée d'une large zone allant de la Scandinavie aux Balkans (1). Le biovar 2 de *B. suis* induit des lésions miliaires à purulentes des organes, notamment des organes reproducteurs. Jusqu'à présent, un seul cas de brucellose humaine due au biovar 2 a été rapporté.

Les biovars courants de *B. suis* (1 et 3) sont des agents pathogènes sérieux pour l'homme et des précautions doivent être prises pour la manipulation et l'élimination des produits potentiellement infectieux. Ceci est particulièrement vrai pour le laboratoire où la mise en culture amplifie le risque. Aussi, les manipulations au laboratoire de cultures ou de produits contaminés provenant d'animaux infectés doivent-elles être effectuées en conditions strictes de biosécurité pour se protéger de cet agent zoonotique dangereux. On recommande ainsi un niveau 3 ou supérieur de sécurité biologique, tel que décrit au Chapitre I.1.6., « La biosécurité au laboratoire de microbiologie vétérinaire »).

## B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

En brucellose porcine, les méthodes de culture sont au moins aussi sensibles que la sérologie (4). Dans la mesure où les produits de l'industrie porcine passent presque tous en abattoir, des méthodes de surveillance (sérologie et culture) peuvent être appliquées efficacement à ce niveau. Dans de nombreuses régions, l'élevage porcin familial traditionnel est remplacé ou accompagné par le développement de plus grandes unités commerciales, impliquant une utilisation accrue de l'insémination artificielle. Aussi, l'insémination artificielle à partir de verrats indemnes de brucellose est-elle d'un apport important dans le contrôle de la brucellose porcine, l'utilisation malencontreuse de sperme contaminé pouvant à l'inverse causer des dommages incalculables.

### 1. Identification de l'agent pathogène

Les prélèvements de choix pour la bactériologie et leur traitement sont semblables à ceux décrits au Chapitre 2.3.1., « Brucellose bovine ». Les milieux de base et les milieux sélectifs utilisés pour les autres espèces de *Brucella* conviennent à *B. suis* (voir le Chapitre 2.3.1.). L'addition de sérum n'est pas indispensable, mais un milieu de base contenant 5% de sérum convient tant pour l'isolement que pour l'entretien des cultures et le typage. L'addition de CO<sub>2</sub> à l'atmosphère d'incubation n'est pas nécessaire.

*Brucella suis* est naturellement en phase lisse et les colonies sont en tout point semblables à celles des autres *Brucella* lisses, décrites au Chapitre 2.3.1.

Les biovars 1, 2 et 3 de *B. suis* ont tous un antigène majeur de surface de type A, et leur identification présomptive peut être réalisée par l'agglutination des colonies par le sérum monospécifique anti-A. L'identification définitive de l'espèce et du biovar doit être réalisée par un Laboratoire de référence spécialisé. Les Laboratoires de référence de l'OIE sont donnés dans la liste en partie 3 de ce *Manuel terrestre*.

La confirmation de l'espèce et du biovar est permise par la mise en oeuvre des tests de lysotypie, de production d'H<sub>2</sub>S (seul le biovar 1 en produit), et de croissance en présence de colorants. Certaines souches du biovar 1 de *B. suis* sont atypiques et poussent sur un milieu renfermant 20 µg/ml de fuchsine basique. La plupart des souches de *B. suis* sont inhibées par la safranine O à la concentration du 1/10 000 et *B. suis* réagit plus rapidement que *B. abortus* et *B. melitensis* au test de l'uréase. Les tests de mesure du métabolisme oxydatif permettent également la différenciation de *B. suis* des autres espèces de *Brucella* lisses.

Des techniques moléculaires, utilisant la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) et des amorces spécifiques, sont disponibles et permettent la distinction de *B. suis* des autres espèces de *Brucella* lisses (3, 18). Cependant, ces techniques ne permettent pas la distinction des biovars entre eux et n'ont pas été complètement validées ni standardisées. La séquence complète de 3,3 Mb du génome de la souche 1330 de *B. suis* a été déterminée. Sa structure chromosomique et le contenu génomique sont similaires à ceux de la souche 16M de *B. melitensis* (14). La connaissance de la séquence génomique est d'un grand intérêt pour les futures recherches fondamentales sur la taxonomie, la virulence et les antigènes protecteurs de *B. suis* et peut s'avérer utile pour le développement de nouvelles épreuves de diagnostic.

### 2. Épreuves sérologiques

Aucune des épreuves sérologiques classiques utilisées pour le diagnostic de la brucellose porcine n'est fiable au niveau individuel. Les porcs sevrés de 2 à 3 mois, notamment, ne développent qu'une très faible réponse sérologique alors qu'ils sont parfaitement sensibles à l'infection par *B. suis*.

Ces épreuves sérologiques classiques reposent sur des antigènes du lipopolysaccharide lisse (LPS). De tels antigènes, réagissent également avec les anticorps dirigés contre LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9, du fait de la communauté antigénique de la chaîne « O » polysaccharidique et ne peuvent différencier les anticorps des 2 infections. L'infection à *Yersinia enterocolitica* O:9 du porc n'est pas rare dans certaines régions (21). Divers travaux ont suggéré que les sensibilités et spécificités de l'épreuve « *Buffered Acidified Plate Antigen Assay* », de l'épreuve au 2-mercaptoéthanol, des méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) indirect (I-ELISA) et de compétition (C-ELISA) ou de l'épreuve de polarisation de fluorescence (FPA) sont similaires (13). Les sérums porcins peuvent également contenir des anticorps non-spécifiques, supposés être des IgM, ce qui réduit encore la spécificité de la sérologie classique, notamment l'épreuve de séro-agglutination lente (SAT). De plus, le complément porcin interagit avec le complément de cobaye et produit une activité anti-complémentaire qui réduit la sensibilité du test de fixation du complément (FC). Des sensibilités aussi faibles que 38% (15) ou 49% (17) ont été rapportées pour la FC ; aussi, n'est-il pas possible de recommander ce test pour le diagnostic individuel de la brucellose porcine. Pour les échanges internationaux et le commerce en général, l'achat de verrats notamment, le statut sanitaire du cheptel et la zone dans laquelle est situé le cheptel sont ainsi plus importants que les tests individuels. Malgré cela, l'Union Européenne et d'autres pays continuent d'accepter uniquement des porcs dont le sérum donne un

titre inférieur à 30 Unités Internationales (UI) par ml en séro-agglutination et un titre en FC de moins de 20 UIFC (Unités internationales de FC) pour le franchissement des frontières internationales.

- **Sérums étalons de référence**

Les sérums étalons (de référence) primaire sont ceux par rapport auxquels tous les autres étalons doivent être comparés et calibrés. Ces étalons sont en cours de développement et seront disponibles pour les laboratoires nationaux de référence lorsqu'ils seront validés. Des réactifs biologiques pour le C-ELISA et l'I-ELISA sont disponibles en petites quantités à des fins de recherche ou de standardisation<sup>1</sup>.

- a) **Méthodes immuno-enzymatiques (Épreuves prescrites pour les échanges internationaux)**

- **ELISA Indirect**

Des ELISA indirects ou de compétition ont été développés pour le diagnostic individuel et pour le dépistage de grands nombres d'échantillons de sérums. Ces techniques promettent d'être plus efficaces que toutes les autres épreuves mentionnées plus haut, et le C-ELISA semble meilleur pour la différenciation entre les réponses anticorps liées à une infection par *Y. enterocolitica* O:9 et celles dues à une infection par *Brucella* sp. La méthode l'I-ELISA est décrite en détail au Chapitre 2.3.1., mais on devra utiliser un anticorps monoclonal spécifique des IgG porcines conjugué à la peroxydase de raifort.

- **ELISA de compétition**

Les procédures de C-ELISA pour la détection des anticorps porcins contre *Brucella* sp. (11) sont identiques à celles décrites pour les anticorps bovins contre *B. abortus* au Chapitre 2.3.1. Ce test est capable d'éliminer une partie des réactions dues à *Y. enterocolitica* O:9 et d'autres anticorps présentant des réactions croisées, tels que les IgM, qui ont une plus faible affinité pour les épitopes de *Brucella* que l'anticorps monoclonal utilisé dans le test. Le C-ELISA est recommandé comme test de confirmation car sa sensibilité et sa spécificité sont supérieures à celles des épreuves d'agglutination.

- b) **Épreuve de polarisation de fluorescence (Épreuve alternative pour les échanges internationaux)**

Le FPA utilisé pour la détection des anticorps porcins contre *Brucella* sp. est à peu près identique à celui décrit pour les bovins (pour plus de détails cf. Chapitre 2.3.1.) ; la dilution du sérum varie selon la validation effectuée sur des sérums locaux, mais c'est souvent le 1/25 qui est utilisé pour l'épreuve en tube et le 1/10 en plaque (11). C'est une technique simple pour la mesure des interactions antigène/anticorps et qui peut être mise en œuvre au laboratoire comme sur le terrain. Cette épreuve peut aider à éliminer la réactivité liée aux expositions à *Y. enterocolitica* O:9 et d'autres anticorps présentant des réactions croisées. Les sérums lyophilisés ont tendance à augmenter le bruit de fond dans cette épreuve. Le FPA peut être utilisé comme épreuve de dépistage et/ou comme épreuve de confirmation.

- c) **Épreuves à l'antigène tamponné de *Brucella* (Épreuve alternative pour les échanges internationaux)**

Les épreuves à l'antigène tamponné de *Brucella* (BBAT), c'est-à-dire le card test, l'épreuve à l'antigène tamponné ou Rose Bengale (EAT) ou le « *Buffered Plate Agglutination Test* » (BPAT), sont recommandés comme épreuves alternatives pour le dépistage, de cheptels entiers notamment. La préparation et la standardisation des antigènes de BBAT et les procédures de mise en œuvre des épreuves sont décrites au Chapitre 2.3.1. Tous les biovars de *B. suis* touchant les porcins ont le même antigène A, comme la plupart des biovars de *B. abortus*. Les antigènes de *B. abortus* sont donc appropriés pour tester les sérums porcins.

### 3. Autres épreuves

- a) **Épreuves cutanées allergiques (hypersensibilité)**

L'épreuve cutanée allergique (ECA) a été largement utilisée pour le diagnostic de la brucellose porcine en Europe de l'Est, dans les pays de l'ex-URSS et en République Populaire de Chine. Sa spécificité est très élevée, mais sa sensibilité est analogue à celle des épreuves sérologiques (BBAT) et n'est pas suffisante pour le diagnostic individuel chez le porc. Certains animaux infectés non réagissants en sérologie sont positifs à l'ECA, et vice-versa. Ainsi, lorsque c'est possible pratiquement, il convient de réaliser les 2 types d'épreuve. Le principe actif de l'épreuve est protéique. Il ne devrait donc, théoriquement, ne pas y avoir de réactions croisée avec *Y. enterocolitica* O:9 et aucun auteur ne mentionne cette réactivité croisée.

<sup>1</sup> Disponible auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la Brucellose : Animal Diseases Research Institute, 3851 Fallowfield Road, Nepean, Ontario K2H 8P9, Canada.

De nombreux allergènes différents ont été utilisés pour le diagnostic, mais l'un d'eux, simple à préparer, a été employé pour le diagnostic de troupeau. Il est encore utilisé dans certains pays, bien qu'il contienne du polyoside O dans le surnageant, ce qui n'aide pas à la différenciation entre infections liées à *Yersinia* et *Brucella*. C'est un hydrolysate acide parfois dénommé « Brucellysate » ou « Brucelline Fraction F ». Cette préparation, bien que contenant certains polysaccharides, ne stimule pas les agglutinines ou les anticorps fixant le complément, ni ne sensibilise les animaux (9). Une méthode de préparation est donnée en Section C2. Pour effectuer l'épreuve, on injecte par voie intradermique 0,2 ml de l'allergène dans la peau de la base de l'oreille. La réaction est lue après 48 h. Une réaction positive se manifeste par un érythème sur la peau non-pigmentée et par un épaissement œdémateux. Dans les fortes réactions, on peut aussi observer une nécrose.

La Brucelline-INRA a été développée plus récemment pour une utilisation chez les ruminants. Aucune publication ne rapporte son utilisation chez le porc. Une souche rugueuse est utilisée pour sa préparation, ce qui évite par là même la présence de LPS lisse. La préparation, le contrôle et l'utilisation de la Brucelline-INRA sont décrits en détail au Chapitre 2.3.1.

## C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

On compte de nombreuses tentatives de développement d'un vaccin permettant d'immuniser les porcs contre *B. suis*. Un seul produit a été considéré comme acceptable pour une utilisation sur le terrain – la souche S2 de *B. suis* a été utilisée largement dans le sud de la Rép. Populaire de Chine. À ce jour, il ne semble pas avoir été utilisé ailleurs sur le porc, probablement du fait de la protection plus faible qu'il confère au mouton contre l'infection à *B. melitensis* en comparaison avec le vaccin Rev.1 (20). Les données ne sont par ailleurs pas suffisantes actuellement pour conclure à l'efficacité du vaccin RB51 de *B. abortus* dans la protection des porcs contre une exposition à *B. suis*.

### C1. Vaccin *Brucella suis* souche S2

La souche S2 est une souche lisse, stable et naturellement atténuée du biovar 1 de *B. suis*. Aucune des importantes études, menées à ce sujet, n'ont permis d'identifier une caractéristique permettant la différenciation de S2 des souches sauvages du biovar 1, à l'exception du degré de virulence. Celui-ci, à en juger par sa persistance chez le cobaye et la souris, est plus faible que celui observé en moyenne chez la souche sauvage. Le faible degré de virulence et la stabilité de cette souche ont été vérifiés par passage sur truie gestantes et sur verrats (22).

Le vaccin S2 peut être administré par voie orale. Par exemple, en Rép. Populaire de Chine, il est fréquemment mélangé à l'aliment. L'utilisateur est néanmoins averti de l'inactivation du vaccin produite par la fermentation. La vaccination orale est séduisante pour le contrôle de la brucellose des porcs sauvages. Des infections expérimentales dans les 2 sexes ont permis de démontrer un niveau d'infection significativement plus faible chez les animaux vaccinés que chez les témoins, même pour des truies testées avec du sperme infecté. Pour la vaccination orale, des doses de l'ordre de  $2 \times 10^{10}$  sont nécessaires et, en général, on administre le vaccin 2 fois à environ 2 mois d'intervalle. Les anticorps produits en réponse à la vaccination sont dits disparaître en 6 mois. Liang Xingxian (10) rapporte que dans la province du Guangdong en Chine du sud, on a pu contrôler la brucellose porcine par l'association d'un dépistage sérologique du cheptel d'élevage avec élimination des animaux séropositifs et d'une vaccination des animaux séronégatifs. Le taux d'animaux réagissants, 10% en 1985, serait tombé à 1,2% en 1987 et aucun animal réagissant n'aurait été identifié dans les 4 années suivantes. Avant que le vaccin S2 ne soit accepté pour un usage généralisé, son innocuité et son immunogénicité doivent faire l'objet de recherches approfondies dans des conditions adaptées à chaque pays.

#### 1. Gestion des semences bactériennes

Des cultures lyophilisées de la semence mère de S2 sont disponibles pour une production expérimentale de vaccin auprès d'organismes reconnus<sup>2</sup>. Ce matériel lyophilisé peut être mis en culture sur gélose nutritive ou gélose trypticase-soja pendant 2 à 3 jours de manière à produire des lots de semence n'ayant pas subi plus de 3 passages depuis la semence initiale.

2 Disponible auprès du National Institute for the Control of Veterinary Products and Pharmaceuticals, Ministry of Agriculture, 30 Baishiqiao Road, Beijing 100081, Chine (Rép. Populaire de), ou auprès de VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, Royaume-Uni. L'acquisition auprès du laboratoire de Weybridge nécessite une autorisation préalable de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

Tout pays intéressé par l'introduction de ce vaccin doit organiser les infections expérimentales et les essais terrain sur porc.

## 2. Méthode de fabrication

Le vaccin S2 est produit en fermenteur selon les mêmes procédures et avec les mêmes milieux que ceux décrits pour la souche B19 de *B. abortus* (cf. Chapitre 2.3.1.). Cependant, pour la propagation du vaccin S2 sur milieu solide, la gélose nutritive ou la gélose trypticase-soja est préférable à la gélose pomme de terre.

## 3. Contrôle en cours de fabrication et contrôles ultérieurs

Les contrôles en cours de fabrication, les contrôles de lots et les contrôles du produit final sont identiques à ceux décrits pour le B19 de *B. abortus*. En ce qui concerne la durée de l'immunité, on recommande une revaccination annuelle.

## C2. Brucellysate (brucellin fraction F)

### a) Préparation

- i) Préparer une culture de *Brucella* lisse (par exemple *B. suis*) sur milieu gélosé ou en fermenteur ;
- ii) Récolter les cellules en soluté salin normal (NaCl 0,15 M) ;
- iii) Centrifuger et reprendre le culot en soluté salin normal à une concentration de 50 à 100 × 10<sup>9</sup> cellules/ml ;
- iv) Ajouter de l'acide chlorhydrique 1 N et ajuster le pH à 1,2-2. Laisser à température ambiante pendant 90 min ;
- v) Autoclaver à 120°C pendant 25 min et laisser la nuit dans l'autoclave ;
- vi) Séparer les cellules par centrifugation ;
- vii) Ajuster le pH de l'hydrolysate surnageant à 6,8-7. Réchauffer en bain-marie à 80°C pendant 30 min.
- viii) Stériliser par filtration ;
- ix) Estimer le contenu en azote de l'hydrolysate concentré et ajuster le contenu en azote protéique à 25-30 mg/100 ml ;
- x) Vérifier la stérilité. Vérifier l'absence de toxicité en inoculant 0,5 ml par souris à 5 souris.

L'activité peut être contrôlée chez des cobayes sensibilisés en parallèle avec un produit d'activité connue. Les cobayes peuvent être sensibilisés par des injections répétées de *B. suis* tuées en présence d'adjuvant incomplet de Freund (2).

### b) Utilisation sur le terrain

Pour le diagnostic chez le porc, on injecte 0,2 ml de l'allergène par voie intradermique dans la peau de la base de l'oreille. La réaction est lue après 48 h. Une réaction positive se manifeste par un érythème sur la peau non-pigmentée et un épaissement œdémateux. On peut aussi observer des nécroses lors de réaction très forte.

## ANNEXE : INFECTIONS À BRUCELLA SUIS DANS LES ESPÈCES ANIMALES AUTRES QUE LE PORC

### 1. Brucellose du Renne

Le biovar 4 de *B. suis* est à l'origine d'une maladie sérieuse chez le renne et le caribou (*Rangifer tarandus* et ses diverses sous-espèces) sur l'ensemble de la région arctique, en Sibérie, Canada et Alaska (12). Certains de ces animaux sont domestiqués, d'autres sont sauvages et migrants. *Rangifer tarandus* est particulièrement sensible à l'infection par *B. suis*, qui cause, dans cette espèce, de la fièvre, une asthénie et divers signes locaux, tels qu'avortement, rétention placentaire, métrite, avec parfois une décharge vaginale sanguinolente, mammites, bursites et orchites. En région arctique, *B. suis* biovar 4 induit des infections sévères chez l'homme (5). La transmission à l'homme peut être directe par contact ou par consommation de lait et autres produits du renne

insuffisamment chauffés. La moelle osseuse, qui est considérée comme un mets délicat dans cette région, est également une source d'infection pour l'homme.

Les méthodes précédemment décrites pour l'isolement et l'identification de *B. suis* à partir des prélèvements porcins sont applicables pour *B. suis* biovar 4 à partir de prélèvements de renne. Le biovar 4 pousse bien sur tous les milieux usuels pour la culture des *Brucella*. Il agglutine les 2 sérums monospécifiques anti-A et -M. Pour la sérologie, l'agglutination en tubes a été décrite comme satisfaisante, le seuil de positivité se situant à la dilution du 1/20. La FC a également été utilisée, mais le mode d'interprétation chez le renne n'a pas été défini.

La vaccination du renne au moyen du vaccin *B. abortus* B19 ou du vaccin adjuvé *B. abortus* 45/20 ont fait l'objet d'essais expérimentaux. Dans le cas du B19, la réaction au vaccin est plutôt sévère et l'immunité n'est réelle que pour de très faibles doses de *B. suis* biovar 4. Gall *et al.* (6) ont comparé plusieurs épreuves sérologiques et ont trouvé que les valeurs de spécificité du BPAT et de la FC étaient plus faibles chez le renne/caribou que celle de l'I-ELISA, du C-ELISA et du FPA, alors que la sensibilité était analogue pour toutes les épreuves.

## 2. Infection par *Brucella suis* dans d'autres espèces non porcines

Différents types de situations épidémiologiques peuvent se présenter concernant l'infection par *B. suis* des autres espèces non porcines.

Dans un premier cas, l'infection à *B. suis* concerne des animaux qui ne sont pas ses hôtes naturels spécifiques et qui s'infectent par ingestion de produits contaminés ou par cohabitation avec les hôtes naturels infectés. Par exemple les renards et loups de l'Arctique peuvent contracter une infection à *B. suis* biovar 4 à partir des rennes ; les chiens et les rongeurs, rats et souris par exemple, peuvent également s'infecter avec d'autres biovars de *B. suis* par cohabitation avec les hôtes naturels. Les bovins peuvent s'infecter auprès de porcs sauvages. Les bactéries infectantes correspondent invariablement aux biovars parfaitement décrits pour l'espèce hôte naturelle.

Dans un second cas, ce sont des espèces sauvages, hôtes naturels de *B. suis*, qui s'infectent. Un exemple en est la brucellose dite murine dans l'ex-URSS, où de petits rongeurs sont infectés par le biovar 5 de *B. suis*. D'autres situations semblables ont été rapportées en Australie au Queensland ou au Kenya. Dans les 3 cas, les souches de *B. suis* impliquées présentaient des caractéristiques différentes et au moins l'une d'elles était difficile à classer.

La brucellose due à *B. suis* biovar 2 est sans doute un cas particulier. Le réservoir de l'infection est le sanglier sauvage (*Sus scrofa*) (7, 8) ou le lièvre brun européen (*Lepus capensis*) (19) voire les 2 espèces. L'infection par le biovar 2 est historiquement confinée à une zone allant de la Scandinavie aux Balkans. Les porcs domestiques élevés en plein air de cette zone sont exposés à un risque élevé de contamination par le biovar 2 à partir du réservoir sauvage. Après entrée dans les élevages de porcs domestiques, le biovar 2 peut s'étendre aussi rapidement que les biovars 1 et 3. La maladie chez le lièvre se caractérise par la formation de nodules, d'une taille allant de celle d'une graine de millet à celle d'une cerise, voire plus gros. De tels nodules, qui ont tendance à devenir purulents, peuvent être localisés un peu partout sur le corps de l'animal. Parfois sous-cutanés ou intramusculaires, ils peuvent aussi concerner le foie, le poumon ou l'appareil génital dans les 2 sexes. L'aspect général du cadavre de lièvre est étonnamment mauvais.

Des enquêtes de surveillance sérologique sont régulièrement menées dans les espèces non porcines. Dans de telles enquêtes, la spécificité des épreuves utilisées prime sur la sensibilité. Aussi la FC est-elle recommandée, bien que le BPAT soit utile du fait de sa simplicité de réalisation. Dans de nombreuses enquêtes anciennes, on a utilisé la séro-agglutination en tubes, apparemment avec satisfaction. Cependant dans les espèces non porcines, l'interprétation des résultats sérologiques peut poser problème. Lors de résultats supposés positifs, les enquêtes sérologiques doivent donc être complétées par des investigations bactériologiques.

Dans de telles situations, où par ailleurs l'agent infectieux peut présenter des caractéristiques inhabituelles, on recommande de doubler la culture sur milieu sélectif, par un ensemencement sur milieux ordinaires additionnés de 5% de sérum et d'incuber ces cultures à la fois en atmosphère normale et en atmosphère contenant 10% de CO<sub>2</sub>. Les colonies évocatrices peuvent être pré-identifiées par coloration de Gram, agglutination sur lame par les sérums monospécifiques anti-A et -M et sérum anti-*Brucella* R (cf. Chapitre 2.3.1.). Le biovar 5 de *B. suis* est inhabituel car il réagit avec le sérum monospécifique anti-M mais pas avec le sérum anti-A. L'identification complète est, de préférence, réalisée par un laboratoire spécialisé.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALTON G.G. (1990). *Brucella suis*. In: Animal Brucellosis, Nielsen K. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boston, USA.

2. ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D. & VERGER J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris, France.
3. BRICKER B.J. & HALLING S.M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2660–2666.
4. FERRIS R.A., SCHOENBAUM M.A. & CRAWFORD R.P. (1995). Comparison of serologic tests and bacteriologic culture for detection of brucellosis in swine from naturally infected herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **207**, 1332–1333.
5. FORBES L.B. (1991). Isolates of *B. suis* biotype 4 from animals and humans in Canada, 1982–1990. *Can. Vet. J.*, **32**, 686–688.
6. GALL D., NIELSEN K., FORBES L., COOK W., LECLAIR D., BALSEVICIUS S., KELLY L., SMITH P. & MALLORY M. (2001). Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *J. Wildl. Dis.*, **37**, 110–118.
7. GODFROID J. & KASBOHRER A. (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet. Microbiol.*, **90**, 135–145.
8. GODFROID J., MICHEL P., UYTTERHAEGEN L., DE SMEDT C., RASSENEUR F., BOELAERT F., SAEGERMAN C. & PATIGNY X. (1994). Brucellose enzootique a *Brucella suis* biotype 2 chez le sanglier (*Sus scrofa*) en Belgique. *Ann. Med. Vet.*, **138**, 263–268.
9. JOINT FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)/WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) EXPERT COMMITTEE ON BRUCELLOSIS (1986). Sixth Report. Technical Report Series 740. WHO, Geneva, Switzerland.
10. LIANG XINGXIAN (1991). The prevalence, prevention and control of swine brucellosis in Guangdong Province, China. Document AGU/BRU/92/21 Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
11. NIELSEN K., GALL D., SMITH P., VIGLIOCCO A., PEREZ B., SAMARTINO L., DAJER A., ELZER P. & ENRIGHT F. (1999). Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, **68**, 245–253.
12. ORLOW E.S. (1963). Brucellosis in reindeer. Proceedings of the 17<sup>th</sup> World Veterinary Congress, Hanover, Germany, 1, 585–588.
13. PAULO P.S., VIGLIOCCO A.M., RAMONDINO R.F., MARTICORENA D., BISSI E., BRIONES G., GORCHS C., GALL D. & NIELSEN K. (2000). Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7**, 828–831.
14. PAULSEN I.T., SESHADRI R., NELSON K.E., EISEN J.A., HEIDELBERG J.F., READ T.D., DODSON R.J., UMayAM L., BRINKAC L.M., BEANAN M.J., DAUGHERTY S.C., DEBOY R.T., DURKIN A.S., KOLONAY J.F., MADUPU R., NELSON W.C., AYODEJI B., KRAUL M., SHETTY J., MALEK J., VAN AKEN S.E., RIEDMULLER S., TETTELIN H., GILL S.R., WHITE O., SALZBERG S.L., HOOVER D.L., LINDLER L.E., HALLING S.M., BOYLE S.M. & FRASER C.M. (2002). The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 13148–13153.
15. PRIADI A., CHASANAH U., HIRST R.G., EMMINS J.J., VAN DER GIESSEN J. & SEOROSO M. (1995). Development of an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for detecting antibody to *Brucella suis* in porcine sera. *Penyakit Hewan.*, **17**, 66–70 (*Vet. Bull.*, **56**, abstract 7528).
16. ROBSON J.M., HARRISON M.W., WOOD R.N., TILSE M.H., MCKAY A.B. & BRODRIBB T.R. (1993). Brucellosis: reemergence and changing epidemiology in Queensland. *Med. J. Aust.*, **159**, 153–158.
17. ROGERS R.J., COOK D.R., KETTERER P.J., BALDRODCK, F.C., BLACKALL P.J. & STEWART R.W. (1989). An evaluation of three serological tests for antibody to *Brucella suis* in pigs. *Aust. Vet. J.*, **66**, 77–80.
18. SIFUENTES-RINCON A.M., REVOL A. & BARRERA-SALDANA H.A. (1997). Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. *Mol. Med.*, **3**, 734–739.

19. SZULOWSKI K., IWANIAK W., PILASZEK J., TRUSZCZYNSKI M. & CHROBOCINSKA M. (1999). The ELISA for the examination of hare sera for anti-Brucella antibodies. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **22**, 33–40.
20. VERGER J.M., GRAYON M., ZUNDEL E., LECHOPIER P. & OLIVER-BERNARDIN V. (1995). Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev.1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*, **13**, 191–196.
21. WRATHALL A.E., BROUGHTON E.S., GILL K.P.W. & GOLDSMITH G.P. (1983). Serological reactions to *Brucella* species in British pigs. *Vet. Rec.*, **132**, 449–454.
22. XIE XIN (1986). Orally administrable brucellosis vaccine: *Brucella suis* strain 2 vaccine. *Vaccine*, **4**, 212–216.

\*  
\* \*

**NB** : Il existe des Laboratoires de référence de l'OIE pour la brucellose porcine (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : [www.oie.int](http://www.oie.int)).