

Cours de microbiologie systématique
3^{ème} année docteur vétérinaire
Dr Boussena S.

BRUCELLA



Définition

- La **brucellose** est une **zoonose** touchant diverses espèces animales (mammifères domestiques, le plus souvent).
- Certaines professions étant particulièrement exposées tels: agriculteurs, éleveurs, vétérinaires et personnel d'abattoir, il s'agit d'une **maladie professionnelle à déclaration obligatoire**.
- Cette zoonose (anthropozoonose) a des répercussions importantes aussi bien pour la santé publique que pour l'économie de la plupart des pays en voie de développement. La maladie animale a été maîtrisée par une prophylaxie sanitaire et quelquefois médicale (vaccin).
- Enfin c'est un agent potentiel du **bioterrorisme** (agent biologique de la classe 3).

Habitat

- Les *Brucella* sont des **pathogènes intracellulaires facultatifs**, parasites du système réticulo-histiocytaire.
- Elles sont pathogènes pour de très nombreuses espèces de mammifères, **domestiques ou sauvages** telles **bovins, ovins, caprins, porcins, carnivores, lagomorphes, rongeurs** mais aussi **chevreuil, caribou, renne, bison** et même **mammifères marins** tels **dauphin, otarie..**

Habitat

- La brucellose est essentiellement une **maladie animale** (zoonose) avec l'existence **d'hôtes ou de réservoirs préférentiels.**

- ***B. melitensis***

chèvres, moutons

- ***B. abortus***

bovins

- ***B. suis***

porcs, lièvres

- ***B. canis***

Chiens, quelques canidés sauvages

Classification-Taxonomie

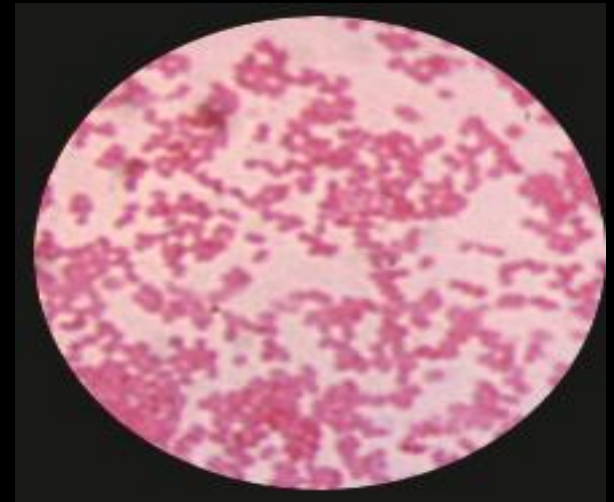
- Les bactéries du genre *Brucella* appartiennent au groupe alpha des *Proteobacteria* (sous-groupe a2) et maintenant à la famille des *Rhizobiaceae*. Les espèces bactériennes, phylogéniquement les plus proches, sont les *Bartonella*, autres bactéries responsables de zoonoses; des bactéries de l'environnement, d'autres rarement isolées chez l'homme comme *Ochrobactrum anthropi*, *Afipia felis...*); et enfin des bactéries pathogènes ou symbiotes de plantes comme *Rhizobium*, *Agrobacterium*.
- Ces bactéries appartiennent aux alpha-Proteobacteria, à l'ordre des Rhizobiales et enfin à la famille des *Rhizobiaceae* avec les genres *Brucella*, *Mycoplana*, *Ochrobactrum....*

Caractères bactériologiques

- La plupart de ces bactéries sont **aérobies strictes**, **catalase +**, **oxydase +**, **NO₃ +** et **uréase +**. L'ensemble des **autres caractères métaboliques** (hydrates de carbone, protéines, acides aminés, acides nucléiques) est **négatif** : germes non fermentaires mais oxydatifs, VP-, LDC-, ODC-, ADH-, indole -, lactose - ... On retiendra que l'utilisation de la galerie d'identification API NE peut conduire à une fausse identification (*Moraxella phenylpyruvica*).
- Ces bactéries sont sensibles à la chaleur en milieu liquide, d'où l'efficacité de la pasteurisation du lait ou d'une ébullition de courte durée.

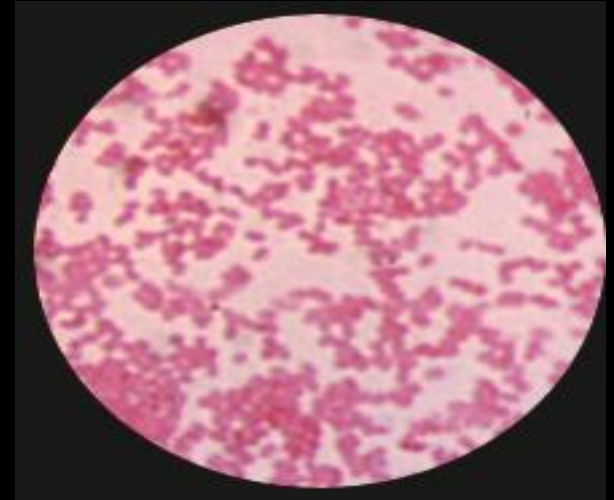
Caractères bactériologiques

Ceux sont de **petits coccobacilles à Gram négatif**, mesurant $0,6$ à $1,5 \mu\text{m}$ de long et de $0,5$ à $0,7 \mu\text{m}$ de diamètre, non capsulés, non sporulés. A l'état frais, ils sont animés de forts mouvements browniens pouvant conduire à détecter une **fausse mobilité**. Une caractéristique tinctoriale liée à l'**acidorésistance** de la paroi peut être révélée par certaines techniques colorimétriques (**Stamp**, par exemple) permettant un **diagnostic bactérioscopique** en médecine vétérinaire



Caractères bactériologiques

Leur culture exige l'usage de milieux enrichis tels gélose Columbia au sang frais ou chocolat, la gélose trypticase soja additionné de sérum... Les milieux commerciaux actuels conviennent bien. Certaines souches (certains biovars de *B. abortus*, *B. neotomae*, *B. ovis*...) se développent mieux en atmosphère contenant 5 à 10 % de CO₂. La température de croissance optimale est 34-35°C. L'isolement des *Brucella*, en particulier en primoculture, nécessite des temps d'incubation d'au moins 3 à 4 jours jusqu'à 2 à 3 semaines. Les colonies sont translucides, rondes à bords réguliers. La culture en milieu liquide présente un trouble léger.



Caractères antigéniques

- Le **lipopolysaccharide (LPS)**, antigène le plus immunogène est caractérisé par une variation de phase avec les phénotypes suivants: lisse ou "smooth" (S-LPS) et rugueux ou "rough" (R-LPS). Le S-LPS est retrouvé à l'état sauvage chez la plupart des espèces et biovars. Les chaînes latérales polysaccharidiques (antigène « O ») du S-LPS sont le support principal des réactions croisées entre *Brucella spp.*, *Yersinia enterocolitica* sérovar O : 9, *Francisella tularensis*, ou encore *Vibrio cholerae*.
- L'immunogénicité des protéines membranaires, périplasmiques ou cytoplasmiques est inférieure à celle du LPS.
- L'identification ultérieure en **espèce** et **biovar** fait appel aux caractères suivants: **exigence ou non en gaz carbonique (CO₂)**, **production d'H₂S**, la croissance ou non sur des milieux gélosés contenant des concentrations variables de **colorants inhibiteurs** tels thionine, fuschine basique ... sensibilité variable aux **bactériophages**.

Pouvoir pathogène naturel

Espèce	Biovars	Répartition	Hôte animal habituel
<i>B. abortus</i>	1 - 6, 9	Ubiquitaire	Bovins, ongulés sauvages
<i>B. melitensis</i>	1 - 3	Bassin méditerranéen, Moyen Orient	Ovins, caprins, ongulés sauvages
<i>B. suis</i>	1 et 3	Amérique, Asie, Océanie	Suidés
<i>B. suis</i>	2	Europe centrale et occidentale	Suidés, lièvres
<i>B. suis</i>	4	Amérique du Nord, Russie	Rennes
<i>B. suis</i>	5	Russie	Rongeurs sauvages
<i>B. canis</i>		Ubiquitaire (fréquence élevée en Amérique du sud)	Chiens
<i>B. ovis</i>		Bassin méditerranéen	Ovins
<i>B. neotomae</i>		Utah (États-Unis)	Rongeurs du désert
<i>B. cetaceae</i>		?	Cétacés (dauphins)
<i>B. pinnipediae</i>		?	Pinnipèdes (phoques, otaries)

Pouvoir pathogène naturel

- **La brucellose animale**, malgré de rares cas d'arthrite ou d'hygroma, est essentiellement une **maladie de la reproduction** se caractérisant:
 - chez le mâle: épididymites, orchites, stérilité,
 - chez la femelle: atteinte de l'utérus (métrite), infection du fœtus, mort puis **avortement**. L'infection mammaire (sub-clinique) est classique.
- **En-dehors de la gestation**, l'infection peut être **asymptomatique** malgré une éventuelle élimination de *Brucella* durant plusieurs mois par différentes voies: mammaire, vaginale, spermatique. La brucellose animale sera donc, souvent chronique et bien tolérée. L'avortement, la baisse de fertilité, voire l'infertilité ainsi que le risque sanitaire des mammifères domestiques rend compte de l'impact économique de cette zoonose non négligeable.
- La transmission chez l'homme se fait par contact direct, par ingestion et enfin par inhalation. Chez ce dernier, la brucellose (lorsqu'elle n'évolue pas sous une forme inapparent) s'extériorise par des symptômes très variés dont les principaux sont la fièvre, les sueurs et les douleurs articulaires.



Physio-pathogenie

Pénétration : cutanée, oculaire, digestive ou respiratoire

les bactéries gagnent par voie lymphatique, **le premier relais ganglionnaire.**



Multiplication

Elles se disséminent dans tout l'organisme par voie **lymphatique** et **sanguine** (bactériémie continue à la phase d'invasion).



Destruction et libération de toxines

Ainsi après une période d'incubation variable, la brucellose se caractérise dans sa phase aiguë par une septicémie. Ces germes sont **phagocytés** par les macrophages ou les monocytes, **puis détruits avec libération d'antigène et d'endotoxine.**

- Ce sont des **parasites intracellulaires facultatifs du système réticulo- histocytaire** (splénomégalie, hépatomégalie).
- Il y a réponse immunitaire par production d'anticorps permettant le sérodiagnostic de la maladie. Leur rôle protecteur semble réel mais secondaire par rapport à l'immunité cellulaire.
- L'immunité à médiation cellulaire est essentielle pour la défense de l'organisme contre l'infection. Les lymphocytes T renforcent l'activité bactéricide des macrophages qui détruisent les *Brucella* au sein d'un granulome spécifique. Leur persistance intramacrophagique entretient un état d'hypersensibilité retardée participant aux effets de la brucellose tertiaire ou chronique.

Diagnostic

- Si le diagnostic sérologique est le plus fréquent, seul le diagnostic bactériologique par culture et isolement de la souche apportera la certitude.
- Le **diagnostic de genre *Brucella*** est relativement simple. On peut y ajouter les caractères d'agglutination (**identification antigénique**) et de **sensibilité aux antibiotiques** dont les tétracyclines (TET) et la rifampicine (RIF).

Diagnostic direct

- L'**examen microscopique** de frottis d'écouvillons vaginaux ou de placentas ou foetus après **coloration de Stamp** constitue une méthode rapide de dépistage. Néanmoins, d'autres micro-organismes tels que *Chlamydomphila abortus* (agent de la Chlamydie) ou *Coxiella burnetii* (agent de la fièvre Q) peuvent être confondus avec *Brucella* par cette méthode qui s'avère également peu sensible.
- La **recherche** de *Brucella* par **culture** est donc très fortement utilisée. Les **prélèvements de choix** sur l'animal vivant sont les sécrétions génitales (écouvillonnage vaginal en zone péri-cervicale) et le lait, l'excrétion mammaire et génitale étant généralement prolongées dans ces espèces. L'avorton (contenu stomacal, poumon et rate) et les annexes placentaires constituent également un prélèvement potentiellement intéressant et sont généralement riches en *Brucella*. Ils sont néanmoins souvent contaminés par la flore de l'environnement et surtout dangereux tant pour le préleveur que pour le personnel chargé du transport et celui du laboratoire de diagnostic. Sur la carcasse, outre les testicules en cas d'orchite chez le mâle, la rate et les ganglions lymphatiques (rétro-mammaire, parotidien, mandibulaire et rétro-pharyngien voire les ganglions iliaques) représentent les prélèvements les plus intéressants.

Diagnostic direct

Au laboratoire, les recherches s'effectuent sur milieu sélectif.

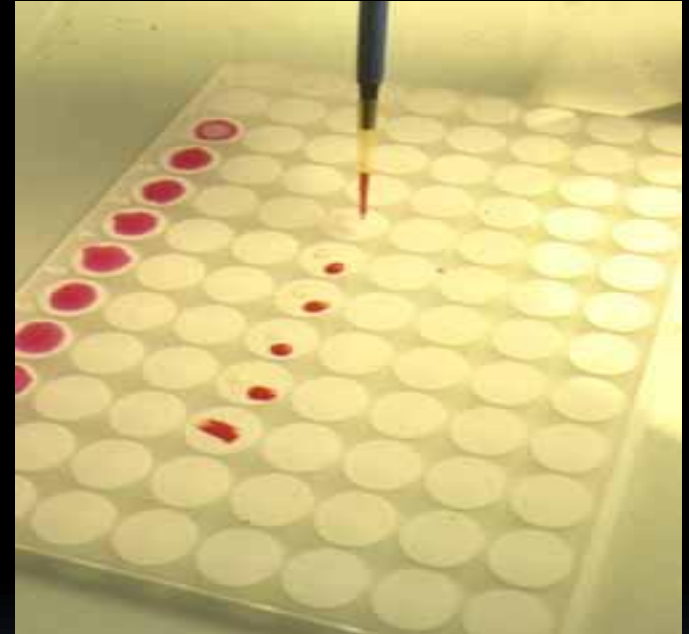
- La sensibilité de la bactériologie reste néanmoins limitée, et les prélèvements et ensemencements doivent parfois être multipliés pour mettre en évidence la bactérie. Ceci est particulièrement vrai chez les animaux préalablement vaccinés.
- La méthode PCR développée depuis une dizaine d'années reste encore peu sensible et son intérêt réside surtout dans sa capacité de détection de bactéries tuées ou dans des prélèvements très contaminés par la flore annexe. Elle est actuellement considérée comme un bon complément de la bactériologie classique mais ne peut aucunement la remplacer.

Diagnostic indirect

Le LPS-S constitue l'antigène majeur des *Brucella* en phase lisse et la majorité des anticorps produits chez l'hôte infecté sont spécifiques. L'épreuve à l'antigène tamponné (EAT ou Rose Bengale) et celle de Fixation du complément (FC) sont de longue date celles les plus employées pour le dépistage de la brucellose animale. L'utilisation conjointe des deux épreuves permet donc d'accroître la sensibilité du dépistage et d'assainir plus efficacement les cheptels infectés, si l'abattage concerne l'ensemble des animaux positifs à l'une au moins des deux épreuves.

Diagnostic indirect

- L' EAT est une épreuve très sensible, détectant précocement l'infection mais qui présente quelques défauts de spécificité (faux positifs en cheptel indemne). Ces propriétés en font une excellente méthode de surveillance compte tenu de sa capacité à la détection des cheptels infectés.
- La FC est quant à elle **plus spécifique** (moins de faux positifs), **plus tardive** et, d'une façon générale, **légèrement moins sensible** que l' EAT (plus de faux négatifs en cheptel infecté).



Diagnostic indirect

Cependant, la très faible prévalence de l'infection s'accompagne obligatoirement d'une proportion importante de résultats faussement positifs. Du fait de leurs spécificités respectives, ce phénomène concerne davantage l' EAT que la FC. Ces résultats faux positifs sont aujourd'hui fréquemment liés à des infections par des micro-organismes croisant au plan antigénique avec les *Brucella*, *Yersinia enterocolitica* O: 9 surtout. Ces réactions sont généralement fugaces et concernent un nombre souvent très réduit d'animaux dans le cheptel.

Diagnostic indirect

L'**ELISA** indirect est très sensible, il semble moins spécifique que les deux précédentes épreuves. Chez les bovins, le **Ring-test** et l'**ELISA** sont également utilisables sur le lait.


Epreuves d'immunité cellulaire

-L'**épreuve cutanée allergique** à la **brucelline**, validée chez les bovins, a été peu évaluée, chez les ovins et les caprins. Le **brucellergène** est actuellement le seul produit commercial dépourvu de LPS-S et donc utilisable sans risque d'induction d'anticorps ou de réaction inflammatoire pouvant interférer avec le diagnostic. Cette épreuve est **très sensible** et **très spécifique**, mais une vaccination préalable, y compris par voie conjonctivale, est susceptible d'induire des réactions positives pendant longtemps chez certains animaux.





Traitement

- Les *Brucella* sont **sensibles in vitro** à de **nombreux antibiotiques** dont les β -lactamines mais on aura à l'esprit qu'il s'agit de **parasites intracellulaires facultatifs**.
- 

Prophylaxie

- La réglementation de la brucellose des animaux domestiques met en oeuvre des mesures sanitaires (dépistage et abattage des animaux infectés).
- La prophylaxie de la maladie humaine passe nécessairement par celle de la maladie animale. Parmi les autres mesures, celles **hygiéniques** comme la protection par gants, lunettes de certaines professions exposées. Les **autres mesures** concernent le traitement thermique de certaines denrées alimentaires. Les vaccins proposés par le passé n'ont plus d'intérêt. Enfin l'**administration prophylactique** de tétracycline seule a été proposée lors d'exposition vaccinale accidentelle (éleveurs, vétérinaires).