

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Abou Bekr Belkaid
Tlemcen, Algérie



جامعة أبي بكر بلقايد

تلمسان الجزائر

Faculté De Médecine

Département



Pharmacie

Mémoire De Dtage De Fin D'Internat
Thème : La Brucellose Humaine

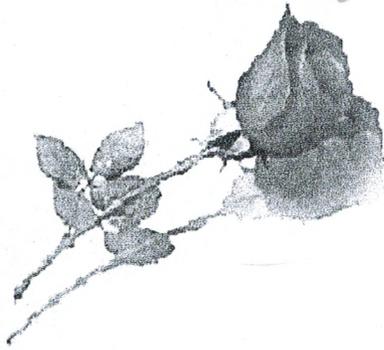
Realisée par :

- CHIRANI Fouzia
- HADJILA Amina
- GHEZRI Nassima
- DRAOU Mira
- HADJ-KADOUR Amina

Encadrées par:

- Mr BENABADJI Bakir

Année Universitaire : 2010-2011



Remerciements

Nous Tenons à Exprimer Notre Profonde Reconnaissance Et Sincère

Gratitude à :

Au Niveau Du Département de Pharmacie - Université Abou-Bekr-

BELOUAD - Tlemcen

Nous Tenons à Remercier Notre Encadreur Mr Benhadji Et Tous

Peux Qui Nous Ont Accordé D'énormes Facilités Pour Le Bon

Déroulement De Notre Stage Au Niveau Du Service De Microbiologie

P. E. U. TRÉCHIPON

Et Nos Vifs Remerciements S'adressent à :

Nos Parents

Qui Nous Ont Aidés à Arriver Là

Enfin Nous Remercions Tous Peux Ou Felles Qui Ont Contribué à Notre

Travail

Sommaire

| | |
|--|----|
| Introduction | 1 |
| Chapitre1 : Etude bibliographique | |
| I)-généralités | 2 |
| I-1) définition | 3 |
| I-2)Historique..... | 3 |
| I-3) épidémiologie | 4 |
| I-4) brucellose animale..... | 5 |
| I-5) brucellose humaine..... | 5 |
| I-6) Mode de transmission | 7 |
| I-6-a) Chez l'animal | 7 |
| I-6-b) chez l'homme..... | 7 |
| I-7)Symptomatologie | 9 |
| II) Etude bactériologique..... | 13 |
| II-1) Taxonomie | 13 |
| II-2)Morphologie-Antigènes de surface..... | 13 |
| II-3)Classification des espèces..... | 14 |
| II-4)Habitat et pouvoir pathogène..... | 16 |
| II-5)Résistance aux antibiotiques..... | 17 |
| III)Epidémiologie..... | 18 |
| III-1) En Algérie..... | 18 |
| III-2)ATlemcen | 19 |

| | |
|------------------------------------|----|
| IV) Traitement - prophylaxie | 20 |
| IV-1) Antibiothérapie..... | 20 |
| IV-2) Corticothérapie | 21 |
| IV-3) Chirurgie..... | 21 |
| IV-4) Antigénothérapie | 21 |
| IV-5) Prophylaxie..... | 21 |

Chapitre2 : Matériels et méthodes.

| | |
|--|----|
| 1) Introduction..... | 23 |
| 2) Physiopathologie de la brucellose..... | 23 |
| 3) Diagnostic de présomption | 24 |
| 4) Diagnostic bactériologique direct | 24 |
| 4-a) Les prélèvements à effectuer | 24 |
| 4-b) Caractérisation du genre brucella | 25 |
| 4-c) Caractérisation de l'espèce | 27 |
| 4-d) Détermination du biotype | 28 |
| 4-e) L'antibiogramme | 30 |
| 4-f) Diagnostic génomique..... | 31 |
| 5) Diagnostic bactériologique indirecte ou sérodiagnostic | 32 |
| 5-a) Epreuve à l'antigène tamponné E.A.T ou Rose bengale ou Card-test..... | 32 |
| 5-b) Séroagglutination de Wright ou méthode de référence..... | 33 |
| 5-c) Réaction du fixation du complément..... | 35 |
| 5-d) Intradermo-réaction ou IDR | 39 |
| 5-e) Immunofluorescence indirecte..... | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 6) Diagnostic différentiel | 41 |
| Chapitre 3 : Etude statistique | 45 |
| Conclusion générale | 51 |
| Bibliographie..... | 52 |
| Annexes..... | 54 |

INTRODUCTION

Les Brucelloses sont des zoonoses mondialement répandues, contagieuse, pouvant atteindre pratiquement tous les animaux domestiques et sauvages ; l'homme s'infecte au contact d'animaux d'élevage malades et de leurs produits, ou par ingestion d'aliments contaminés. Certaines professions ou certaines habitudes alimentaires sont donc à haut risque d'infection brucellienne : éleveurs, vétérinaires, ouvriers d'abattoir, amateurs de lait cru ou de fromage frais.

La brucellose est due à la présence et la multiplication dans l'organisme, de germes pathogènes appartenant au germe *Brucella*, chez les animaux la maladie entraîne des conséquences sérieuses dans les élevages : avortement, mortalité, stérilité des adultes, perte en lait et en viande ; donc le réservoir de *Brucella* est avant tout un réservoir animal, elle atteint avec une particulière fréquence l'homme, soit par contact direct, soit par contamination alimentaire.

Malheureusement, l'Algérie n'est pas à l'abri de ce grand fléau qui constitue un obstacle pour nos productions animalières, notamment ceux de la Wilaya de Tlemcen où la maladie sévit à l'état endémo-épidémique.

Dans ce mémoire, on va présenter deux volets :

1 / Etude bibliographique de la maladie.

2/ Etude statistique.

Chapitre 1 : Généralités

La brucellose, également appelée fièvre de Malte, fièvre sudoro-algique, fièvre ondulante, mélitococcie ou fièvre méditerranéenne est une des anthroponoses les plus fréquentes et aussi les plus ubiquitaires. Frappant essentiellement le bétail domestique (ruminants et suidés),

Son existence est mondiale avec une prédominance dans le pourtour du bassin méditerranéen et les pays en voie de développement où elle pose encore un problème de santé publique et représente un surcoût économique important.

La maladie animale a été maîtrisée dans de nombreux pays développés ayant entraîné une diminution du nombre de cas humains.

Sa survenue chez l'homme dépend en grande partie du réservoir animal. La plus forte incidence d'infection chez l'homme a lieu si l'infection existe chez le mouton et la chèvre.

La brucellose humaine, bien que devenue plus rare depuis la mise en place de mesures prophylactiques sévères, reste une maladie pouvant entraîner des complications graves si un traitement n'est pas rapidement mis en place. Comme pour toute maladie infectieuse, la prévention (surveillance et éradication de la maladie chez le bétail) reste le meilleur moyen de lutte.

I – Définition :

La brucellose est une maladie infectieuse, à déclaration obligatoire, commune à certains animaux et à l'homme : on parle d'anthropozoonose, due à des coccobacilles des trois germes du genre *Brucella* qui vit naturellement chez les animaux: *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*.

La contamination de l'homme étant accidentelle soit par voie cutanéomuqueuse (contact avec un animal infecté ou un objet contaminé) soit par voie digestive (ingestion d'aliments contaminés tels produits lactés, fromages...). La contagiosité est très importante.

Elle atteint essentiellement les sujets qui sont au contact du bétail : il s'agit donc d'une maladie professionnelle et rurale. Son évolution chez l'animal et chez l'homme se fait en plusieurs phases :

- La phase d'invasion
- La phase de septicémie ou brucellose aiguë
- La phase des localisations viscérales (ou secondaires) : brucellose subaiguë ou focalisée
- La phase des manifestations allergiques ou brucellose chronique.

En fait il est difficile de séparer ces deux dernières phases et certains auteurs les font entrer toutes deux dans le cadre des brucelloses chroniques.

II – Historique :

La maladie connue aujourd'hui sous le nom de brucellose attira pour la première fois l'attention de médecins militaires britanniques en **1861**, sous le nom de fièvre méditerranéenne à l'île de Malte, durant la guerre de Crimée.

En **1887**, le microbiologiste David Bruce la relation causale entre un micro-organisme et la maladie, en isolant la bactérie responsable de la maladie à partir de la rate d'un soldat britannique décédé. Le germe reçut le nom de *Micrococcus melitensis*.

En **1897**, la présence d'anticorps agglutinants dans le sérum des malades fut démontrée par Wright.

En **1905**, Themistocles Zamitt, en voulant étudier la maladie sur le modèle animal de la chèvre à Malte, découvrit qu'elles étaient toutes positives au test de Wright et que la brucellose était donc une anthroozoonose.

En **1908**, la première observation française a été rapportée par Danlos.

III – Epidémiologie :

L'épidémiologie humaine est directement liée à l'épidémiologie animale.

- Fréquence

La brucellose a augmenté de fréquence ces dernières années. Le nombre de cas déclarés chaque année, voisin de 1000, est très inférieur au nombre réel de malades.

- Répartition géographique

La brucellose a une répartition mondiale avec une prédominance dans le bassin méditerranéen, l'Asie de l'ouest, le Moyen-Orient, l'Amérique du sud, l'Amérique centrale et l'Afrique noire.

L'OMS estime l'incidence mondiale de la maladie à 500 000 cas par ans. En France, la brucellose est une maladie à déclaration obligatoire (23 cas déclarés en 2001) considérée comme maladie professionnelle chez les éleveurs, les vétérinaires, le personnel d'abattoir et de laboratoire, les bouchers et les bergers. En 2001, 4 cas étaient dus à une exposition professionnelle.

Les pays en développement restent les pays les plus touchés où l'on n'a pas réussi à maîtriser l'infection chez l'animal, où le traitement à la chaleur des produits laitiers (pasteurisation) n'est pas systématique et où certaines habitudes alimentaires telles que la consommation de lait cru et les mauvaises conditions d'hygiène favorisent la transmission à l'homme qui, en pareil cas, peut survenir fréquemment.

- Espèces sensibles

- Ruminants (réservoirs) : buffles, yaks, chameaux, dromadaires...
- Porcins
- Canidés (réservoirs selon espèces) : renards...
- Volailles, oiseaux sauvages
- Rats du désert
- Lièvres

- Dauphins
- Primates non humains:
- Babouin Papio spp : B. melitensis
- Hommes

Des sérologies positives à B. melitensis ont été retrouvées chez : babouins Papio spp, ouistitis Callithrix jacchus. Aucun anticorps brucellique n'a été mis en évidence chez le macaque Rhésus Macaca mulatta en particulier.

- **Réservoir animal**

Les principaux réservoirs animaux des Brucella sont les bovins (B. abortus), les ovins et caprins (B. melitensis) et les porcins (B. suis) domestiques.

Longtemps les ovins et les caprins ont été considérés comme le réservoir principal, si non exclusif (ce qui expliquait que la maladie soit observée dans les pays méditerranéens). Cette notion est fautive : le rôle des bovins en Europe est au moins aussi important que celui des ovins et caprins).

De nombreuses autres espèces sont susceptibles d'être atteintes et peuvent donc occasionnellement contaminer l'homme : animaux domestiques (chiens, chats), équidés, lièvres, volailles...etc., ainsi que certains insectes.

Au total, le réservoir est beaucoup plus vaste qu'il n'est classique de le dire

IV – Brucellose animale :

C'est une septicémie suivie de localisations viscérales secondaires diverses avec toute fois un tropisme génital marqué. Il s'agit donc d'une maladie de la reproduction :

- chez le mâle; épididymites, orchites, stérilité
- chez la femelle: localisations mammaires et utéro-placentaires.

Ces dernières localisations sont responsables, d'une part de l'élimination pendant des années du germe dans le lait, d'autre part d'avortements répétés.

V – Brucellose humaine :

La brucellose humaine apparaît où sévit la brucellose animale. C'est ainsi que dans certaines régions, jusqu'à 8% de la population exposée est atteinte.

La brucellose humaine est une maladie d'expression très polymorphe.

- **Les formes inapparentes :**

L'infection est totalement méconnue avant qu'un sérodiagnostic ne révèle l'existence d'anticorps spécifiques.

- **Les formes septicémiques :**

Après une incubation de 2 à 3 semaines et un début insidieux, la maladie est marquée par de la fièvre, des sueurs profuses, une asthénie, un amaigrissement, des arthralgies et myalgies : c'est la classique fièvre ondulante sudoro-algique accompagnée d'hépatosplénomégalie et d'adénopathies. On constate, malgré le tableau infectieux, une neutropénie. A ce stade et dans cette forme, l'hémoculture (ou la myéloculture) permet un isolement de la bactérie et les anticorps spécifiques apparaissent.

- **Les formes localisées :**

Elles surviennent après la forme septicémique ou après une forme inapparente est dans ce cas, paraissent primitives. Plusieurs localisations sont possibles mais ce sont surtout les os, les articulations qui sont atteints. Les manifestations ostéo-articulaires sont les plus typiques : spondylodiscite lombo-sacrée, sacro-iléite ou arthrites. Les autres troubles possibles sont des atteintes neuro-psychiques, méningo-encéphaliques d'allure pseudo-tuberculeuse, uro-génitales (orchite), pulmonaires, hépatiques, spléniques ou cutanées. Des endocardites survenant sur valves lésées sont possibles.

- **Les formes à rechute ou d'évolution prolongée :**

Les signes généraux et les atteintes locales persistent plus d'un an. Les antibiotiques n'y font rien. Il est bien difficile de distinguer les rechutes des formes traînantes si le risque professionnel de contamination persiste. Les hémocultures ou le sérodiagnostic sont souvent positifs.

- **La brucellose chronique:**

C'est la "patraquerie brucellienne" donnant lieu à des céphalées, des malaises, une asthénie d'allure psychosomatique. Les hémocultures et le sérodiagnostic sont négatifs mais l'intradermo-réaction à la mélitine est positive et témoigne de l'étiologie brucellienne des troubles.

VI – Mode de transmission :

Dans le cadre du bioterrorisme, la contamination pourrait se faire par inhalation d'un aérosol contenant le germe et, moins probablement par voie conjonctivale. La bactérie peut survivre jusqu'à deux ans dans le milieu extérieur si les conditions de l'environnement sont favorables (température basse, à l'abri de la lumière).

- **Chez l'animal :**

- * **Les sources de contamination :**

La contamination est surtout d'origine génitale, à partir des liquides excrétés au moment de l'avortement, des sécrétions génitales (au moment des chaleurs). Les quantités excrétées sont massives. Les matières virulentes sont constituées principalement par le placenta, l'avorton, mais aussi par : le lait, les urines, les selles et les aérosols que ces produits peuvent provoquer.

L'environnement souillé (locaux, abris, sols, murs, matériel, litière, mares et cours d'eau contaminés) constitue des sources d'infections également redoutables.

- * **Modes de transmission :**

La contamination inter-animale se fait donc essentiellement :

Par contact direct :

- Par transmission de la mère au fœtus ou au nouveau-né ;
- par voie génitale chez les animaux ;
- par absorption d'un aliment contaminé (lait, placenta)

Par contact indirect :

Contact avec un élément de l'environnement contaminé par les matières virulentes :
Aérosol, végétaux, terre.

- **Chez l'homme :**

- * **Les sources de contamination :**

La brucellose est transmise par le lait et les produits laitiers contaminés et non traités, ainsi que par contact direct avec des animaux infectés (bétail, moutons,

chèvres, porcs, chameaux, buffles, ruminants sauvages et, très récemment, phoques), carcasses d'animaux et produits d'avortement.

Des millions de personnes sont à risque dans le monde, en particulier dans les pays en développement où l'on n'a pas réussi à maîtriser l'infection chez l'animal, où le traitement à la chaleur des produits laitiers (pasteurisation) n'est pas systématique et où certaines habitudes alimentaires telles que la consommation de lait cru et les mauvaises conditions d'hygiène favorisent la transmission à l'homme qui, en pareil cas, peut survenir fréquemment.

Si plusieurs pays industrialisés ont réussi à maîtriser cette maladie chez l'animal, elle survient encore sporadiquement chez des sujets ayant contracté l'infection à l'étranger ou ayant ingéré des produits animaux contaminés, ainsi que dans certains groupes professionnellement exposés (par exemple, éleveurs, vétérinaires, personnels de laboratoire et des abattoirs).

* Modes de transmission :

2 types de contamination sont rapportés mais soulignons que 90% des contaminations restent asymptomatiques :

La contamination directe :

C'est par contact avec l'animal atteint que l'homme se contamine. C'est le cas le plus fréquent et celui pour lequel le caractère professionnel de la maladie est le plus marqué. Les sujets atteints (de sexe masculin le plus souvent) sont essentiellement les vétérinaires, éleveurs, agriculteurs, bergers, bouchers...etc. L'infestation se fait lors de la traite, lors de la manipulation de la litière des animaux, par contact avec les produits d'avortements (placenta) ou la viande d'animaux malades. La contamination est possible en laboratoire ou lors de la manipulation du vaccin vivant.

La contamination se fait habituellement par voie transcutanée, elle est favorisée par les excoriations. La pénétration du germe par voie conjonctivale ou respiratoire est cependant possible.

La contamination indirecte :

Elle se fait par voie alimentaire le plus souvent. La pénétration du germe est bucco-pharyngée (car le pH gastrique détruit le germe). Le lait, le beurre, les fromages d'origine bovine ou ovine n'ayant subi ni fermentation, ni pasteurisation, en sont les principaux responsables. Ce rôle n'est cependant pas exclusif puisque des légumes

consommés crus, les viandes insuffisamment cuites sont aussi des sources de contagion possible. Dans ce mode de contamination, favorisé par la mode du « retour à la nature » et des « produits naturels », la maladie perd son caractère professionnel. C'est dans ces formes que le diagnostic risque le plus d'être retardé. Il est parfois aidé par la survenue de plusieurs cas dans la même famille (la reconnaissance d'un cas de brucellose impose de pratiquer une enquête épidémiologique dans l'entourage).

VII – Symptomatologie :

La symptomatologie de la brucellose ressemble à celle de beaucoup d'autres maladies fébriles, mais avec des manifestations marquées au niveau ostéomusculaire, avec des douleurs généralisées associées à de la fatigue, à un état de prostration et de dépression profonde : classique fièvre ondulante sudoro-algique.

Chez certains malades, le tableau clinique est dominé par des symptômes génito-urinaires. Cette maladie a une durée variable, de quelques semaines à plusieurs mois et son diagnostic clinique doit être confirmé par des tests de laboratoire.

- Chez l'animal :

Variables selon les espèces animales et les *Brucella*. On distingue :

- * Forme génitale :

La plus fréquente (ruminants, suidés, carnivores) provoquant chez la femelle un avortement avec ou sans mammite, et chez le mâle une infection testiculaire. 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.

- * Forme plus rare :

Articulaire ou tendineuse

- Chez l'homme

Les formes les plus fréquentes (surtout avec *B. abortus*) sont des formes mineures ressemblant à une grippe.

Les formes symptomatiques de la maladie évoluent en 3 phases successives :

* Forme aiguë septicémique (fièvre de Malte) :

Après une incubation de 8-21 jours, fièvre ondulante surtout nocturne, avec sueurs et douleurs, pendant environ 15 jours.

On distingue :

1) Forme typique :

Le mode de début est insidieux: malaise, courbature, asthénie, ou plus rarement plaie minime et adénopathie satellite. La phase d'état se définit par une fièvre sudoro-algique.

a) Signes fonctionnels : Les sueurs sont fréquentes, habituellement profuses et à prédominance nocturne. Elles ont une odeur de paille mouillée caractéristique.

Des douleurs musculaires, articulaires ou névralgiques mobiles et fugaces les accompagnent.

b) Signes généraux : Classiquement, la fièvre est ondulante mais souvent découverte à son acmé: ascension par paliers de 0,5°C jusqu'à 39°C où elle se maintient pendant 10 à 15j, puis défervescence graduelle. Chaque clocher thermique est séparé du suivant par une période d'apyrexie d'environ une semaine.

En réalité, la fièvre prend plutôt un aspect rémittent, ou en plateau, ou pseudo-palustre.

c) Signes physiques: L'examen cherche à prouver l'existence de foyers viscéraux:

- en premier lieu, l'atteinte du système réticulo-endothélial: rate, foie, ganglions superficiels
- puis atteinte pulmonaire par la présence de râles bronchiques des bases, articulaire en particulier d'une sacro-iliaque, enfin orchite unilatérale.

2) Forme atypique :

La majorité des brucelloses s'expriment sur un mode mineur: formes écourtées ou limitées, formes pseudo-grippales.

Parfois cependant, le tableau réalisé est proche de celui de la typhoïde faisant parler de forme pseudo-typhoïdique.

3) Forme rare :

En dehors des localisations fréquentes à la phase aiguë déjà décrites, citons l'endocardite infectieuse brucellienne mutilante et l'insuffisance rénale brucellienne.

* Forme subaiguë ou localisée :

Affectant n'importe quel organe (testicules, cœur, poumons, articulations...).

Elles succèdent à la phase septicémique initiale lorsque celle-ci n'a pas été diagnostiquée ou qu'elle a été insuffisamment traitée. De plus, le traitement le mieux conduit ne supprime pas totalement le risque de brucellose subaiguë.

Dans de rares cas, elles peuvent être inaugurales. Nous ne citerons que les localisations les plus fréquentes et montrant bien le polymorphisme de l'affection:

1) Les localisations ostéo-articulaires :

La spondylodiscite ne diffère pas d'une spondylodiscite infectieuse banale et atteint avec prédilection la colonne lombaire. Les complications peuvent être un abcès migrant en avant du rachis du type abcès froid, une compression médullaire ou radiculaire.

Un tableau de sacro-iliite infectieuse peut s'accompagner d'une irradiation S1
Enfin, ce peut être une coxite appelée pseudo-coxalgie méditerranéenne.

2) La neuro-brucellose :

Ce peut être une méningo-myélo-radiculite, une méningo-encéphalite ou une simplement une méningite à liquide clair.

3) Les localisation hépatiques et spléniques :

Cliniquement, c'est la persistance des lésions au décours de la phase septicémique. L'hépatite est une hépatite granulomateuse.

* Forme chronique :

Sans fièvre, caractérisée par une grande fatigue, avec douleurs ostéo-articulaires.

L'évolution capricieuse de la maladie explique que cette phase peut succéder immédiatement ou de façon lointaine à une septicémie brucellienne, une brucellose focalisée ou encore être inaugurale. Elle touche avec prédilection les sujets soumis à des contacts antigénique fréquents.

La clinique associe des manifestations essentiellement fonctionnelles: c'est la 'patraquerie brucellienne' avec asthénie physique, psychique et sexuelle, troubles du caractère, douleurs musculaires, névralgiques ou ostéo-articulaires, sueurs au moindre effort. L'examen est normal en dehors d'une fébricule.

Il faut tout de même rechercher des foyers quiescents ou très peu évolutifs ou des manifestations récidivantes d'allergie: Erythème noueux, hypodermite, infiltrats pulmonaires labiles, iritis ou irido-cyclite, rhumatismes inflammatoires.

Chez la femme enceinte, la brucellose aiguë peut provoquer un avortement ou un accouchement prématuré.

Donc d'une façon générale, les symptômes de la maladie sont :

- Fièvre et frissons et sueurs profuses (fièvre ondulante sudoro-algique)
- Maux de tête
- douleurs généralisées avec des manifestations au niveau ostéomusculaire
- Perte de poids due à la perte d'appétit
- Fatigue
- Mal de tête
- Arthralgia, myalgie
- Dépression
- Foie agrandi
- symptômes génito-urinaires

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

I - Physiopathologie :

1. Diffusion du germe dans l'organisme :

Après leurs pénétration, cutané ou muqueuse, les brucelles par voie lymphatique jusqu'au premier relai ganglionnaire et le colonise en se multipliant. Cette phase correspond à l'incubation. Elle dure de une à trois semaines. La phase septicémique, début apparent de la maladie, est liée aux décharges de germe à partir du ganglion initialement envahi. Elle dure 15 jours en moyenne. Elle permet la dissémination du germe à tout l'organisme, avec colonisation des organes du système réticulo-endothélial : moelle osseuse, ganglion, foie, rate. La répétition des décharges lymphatico-sanguines de germes aboutit parfois à la colonisation d'autres organes : les os et les articulations, le système nerveux, les testicules, etc. Les localisations secondaires évoluent alors pour leur propre compte. Elles peuvent entraîner des manifestations cliniques immédiates (orchite par exemple) ou à distance de la septicémie (pseudomalle de Pott méltococcique par exemple). Ce sont ces localisations secondaires, évoluant pour leur propre compte qui, outre les difficultés diagnostiques qu'elles offrent par leur polymorphisme, font toute la gravité de la maladie (celle-ci n'est pas abortive chez la femme).

2. Relation hôte- Brucelles :

Elles sont complexes et expliquent certains aspects de la maladie humaine. L'organisme infecté produit des anticorps sériques. Ceux-ci sont décelables dans le sang à partir du quinzième jour (sérodiagnostic de Wright). Leur taux augmente rapidement, passe par un maximum, puis décroît. Cette décroissance est accélérée par un traitement efficace. Au bout de quelques années, les anticorps peuvent disparaître complètement du sang du sujet. Le rôle protecteur de ces anticorps est limité car les brucelles sont, au niveau des foyers secondaires en particulier, intracellulaires. Ce parasitisme intracellulaire, considéré par la plupart comme définitif, explique plusieurs faits : la difficulté du traitement radical de la brucellose, le réveil parfois tardif d'une localisation secondaire (après traitement), la persistance de l'allergie tissulaire vis-à-vis des antigènes spécifiques (intradermo-réaction de Burnet reste positive), les manifestations hyperergiques parfois observées (définissant la brucellose chronique) avec arthralgies, manifestations oculaires ou cutanées, apparaissant après chaque contact avec le germe (eczéma des vétérinaires).

II – Diagnostic de présomption :

La Brucellose se caractérise classiquement par l'absence d'hyperleucocytose et parfois la présence d'une neutropénie, d'une thrombopénie ou d'une élévation modérée des transaminases hépatiques. Un syndrome inflammatoire franc, avec élévation de la protéine C réactive sérique, est généralement présent. Au cours des arthrites, l'analyse du liquide synovial révèle habituellement un taux élevé de leucocytes ($>10000/\text{mm}^3$), avec prédominance de polynucléaires neutrophiles. L'analyse du LCR au cours des méningites brucelliennes révèle la présence de leucocytes (avec une prédominance habituelle de lymphocytes), d'une protéinorachie élevée, et parfois d'une hypoglycorrachie.

III – Diagnostic Biologique directe :

Malgré la facilité de la mise en œuvre du sérodiagnostic, l'isolement du germe ne doit pas être négligeable car il apporte la preuve de l'évolutivité du processus infectieux en plus, il est le diagnostic de certitude de cette maladie.

1. LES PRELEVEMENTS EFFECTUES :

- L'hémoculture est l'examen principal au début de la maladie (60 à 90% de positivité) mais, contrairement à une notion erronée, la recherche des Brucelles dans le sang est assez souvent positive en cas d'atteintes focales ou dans les formes d'évolution prolongée (25 à 45% de positivité) et lors des rechutes (50 à 80% de positivité). En revanche, aucun germe ne peut être isolé du sang au cours des brucelloses dites chroniques.
- La culture de moelle osseuse a les mêmes indications que l'hémoculture et pourrait augmenter la fréquence de l'isolement des germes.
- Les autres prélèvements visent à objectiver la présence des Brucelles dans un foyer infectieux.
- Les prélèvements doivent être réalisés avant tout traitement antibiotique. Le transport des prélèvements vers le laboratoire doit être rapide.
- Il est indispensable que le clinicien précise au laboratoire qu'il demande une recherche de Brucella car d'une part le risque de contamination du personnel technique est élevé et d'autre part pour que les conditions de culture appropriées soient mises en œuvre.
- Les manipulations des prélèvements et des cultures bactériennes doivent être impérativement réalisées sous un PSM ou mieux dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3(L3).

a) L'hémoculture :

Au cours de la brucellose, elle est :

Constamment positive pendant la phase aigue

Fréquemment positive pendant la phase subaigüe

Exceptionnellement positive pendant la phase chronique.

On réalise généralement deux hémocultures à 1 jour d'intervalle. Il est recommandé d'ensemencer le sang dans des flacons de Castaneda, flacon diphasiques (contenant un milieu gélosé et un bouillon) à 37°C car les colonies de Brucella sont parfois très lente à se développer en primo culture. Néanmoins, la croissance de la bactérie s'effectue le plus souvent en quelques jours.



b) Autres produits pathologiques :

La recherche de Brucella peut aussi se faire à partir de ganglions lymphatiques, moelle osseuse, liquide de ponction articulaire, liquide céphalo-rachidien, pus divers et ceci au cours de la phase subaigüe.

Les liquides sont ensemencés comme le sang, en flacon Castaneda. Les tissus sont broyés et ensemencés sur des milieux solides adéquats (Brucella agar , gélose albimi, gélose tryptocases soja) incubés à 37°C en atmosphère de 10% de CO₂.

2. Caractérisation du genre Brucella

a) La coloration de Gram :

La coloration de gram (nécessitant de dédoubler ou de tripler le temps de recoloration à la fuschine) objective des cocobacilles à Gram négatif, de petite taille (0.6-1.5µm de long ; 0.5-0.7µm de diamètre), immobile, isolés ou en paire, non capsulés non sporulés. A l'état frais, Brucella est animée de forts mouvements browniens pouvant conduire à détecter une fausse mobilité.



La lenteur de croissance à l'isolement est caractéristique : il faut toujours plus de 48 heures et même parfois plusieurs semaines (3 jours à 3 semaines) pour obtenir des colonies à partir d'un produit pathologique.

La croissance de ces bactéries nécessite l'utilisation de milieux gélosés à base de peptone enrichis au sang (5% de sang de mouton). Certaines souches *B.abortus*, *B. ovis*, *B.neotomae* se développent mieux en atmosphère contenant 5 à 10% de CO₂. La température de croissance optimale est 34°C avec un pH à 6.8. La thiamine, la niacine et la biotine sont des vitamines indispensables.

Les colonies sont petites (0,5mm de diamètre) rondes, lisses, translucides, bombées à bords réguliers non hémolytiques.

Elles ont parfois une couleur de miel et sont constituées de petits coccobacilles à gram négatif.

L'aspect des colonies lisses ou rugueux peut être évalué par différentes techniques.



Les caractères suivants sont positifs :

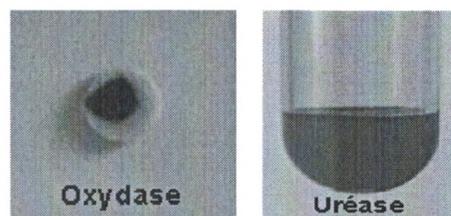
Aérobiose stricte

Catalase

Oxydase (sauf *B.ovis* et *B. meotomae*)

Nitrate- réductase (sauf *B. ovis*).

Uréase (immédiate pour *Brucella suis*, négative pour *Brucella ovis*).



Les autres caractères métaboliques sont négatifs. Les Brucelles ne fermentent pas les sucres.

b) Caractérisation de l'espèce :

- **Exigence en CO2 :** 96% des souches de *Brucella abortus* exigent une atmosphère de 10% de CO2 pour leur croissance ; *Brucella melitensis* et *Brucella suis* ne sont jamais exigeantes en CO2. C'est un bon critère d'orientation.
- **Production de H2S :** *Brucella melitensis* n'en produit pas que les souches de *Brucella abortus* et *Brucella suis* en produisent en 24heures (méthodes du papier au sous acétate de plomb coincé dans un tube de culture ensemencé)
- **Action bactériostatique des colorants :** la fushine basique et la thionine à certaines concentrations ont une action bactériostatique. La thionine inhibe *Brucella abortus* et la fushine inhibe *Brucella suis*. Les caractères ci-dessus permettent de différencier les principales espèces de *Brucella*. Néanmoins, il existe des souches atypiques qui ne correspondent pas à ce schéma d'identification. Le recours à un laboratoire spécialisé est alors nécessaire.

| espèces | Exigence en CO2 | Production de H2S | Croissance en présence de | | Agglutination avec sérums monospécifique | |
|----------------------------|-----------------|-------------------|---------------------------|-----------------|--|---|
| | | | Thionine | Fushine basique | A | M |
| <i>Brucella melitensis</i> | - | - | + | + | - | + |
| <i>Brucella abortus</i> | + | + | - | + | + | - |
| <i>Brucella suis</i> | - | ++ | + | - | + | - |

c) A=anti-*abortus* ; B= anti-*melitensis*

1. Détermination du biotype :

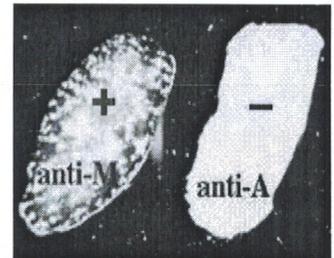
Faite en laboratoire spécialisé, elle fait appel à trois types de techniques :

- ❖ **Agglutination :** par des sérums mono spécifiques : anti-*abortus*(A), anti-*melitensis*(M).

Antigène de surface des *Brucella* :

Le lipopolysaccharide LPS est l'antigène le plus immunogène. Ce LPS est caractérisé par une variation de phase, à l'origine des phénotypes lisse (S-LPS) et rugueux (R-LPS). Le S-LPS est retrouvé à l'état sauvage chez la plupart des espèces et biovars. *B. canis* et *B. ovis* possèdent naturellement un R-LPS. Les chaînes latérales polysaccharidiques (antigène O) du S-LPS sont constituées d'un homopolymère comprenant environ 100 résidus de 4-formamido-4,6-didéoxy-D-mannopyranosyl, support essentiel des réactions croisées entre *Brucella* spp et *Yersinia enterocolitica* O:9, ou plus accessoirement *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* O:1. L'immunogénécité des protéines membranaires, périplasmiques ou cytoplasmiques est bien inférieure à celle du LPS. Certaines protéines sont responsables de réactions sérologiques croisées entre *Brucella* spp et d'autres membres de la famille des Rhizobiales.

- ❖ **Bactérie en phase S (smooth) :** toutes les espèces suivantes possèdent deux antigènes de surface A et M qui sont agglutinogènes : *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* et *Brucella neotomae*.
- ❖ **La quantité de ces antigènes diffère selon les espèces :** M est prédominant chez les *Brucella melitensis*, A est prédominant chez les autres espèces. Un sérum anti-*Brucella* global agglutine les 4 espèces. Par saturation, il est possible d'obtenir des sérums monospécifiques antiA ou antiM



- ❖ **Bactérie en phase R(Rough) :** les spécificités sont remplacées par un antigène R commun à toutes les *Brucella*, y compris *Brucella ovis* et *Brucella canis* qui sont ni A, ni M.
 - ❖ **Lysotopie :** en évaluant la sensibilité à différents bactériophages par les phages TBILISSE (Tb) et WEYBRIDGE (We), Bk
 - ❖ **Etude du métabolisme oxydatif des sucres et des acides aminés :** elle se fait par une méthode manométrique.
- On reconnaît trois biotypes pour *Brucella melitensis*, 9 biotypes pour *Brucella abortus* et 4 pour *Brucella suis*.

Différentiation des espèces de Brucella

| Espèce ; caractères | B. melitensis | B. suis | B. abortus | B. canis | B. neotomae | B. ovis |
|---|---------------|----------------|--------------------------|----------|-------------|---------|
| Oxydase | + | + | + | + | - | - |
| Exigence en CO ₂ | - | - | + ^b | - | - | + |
| Production de H ₂ S | - | +++ (1 à 6 j) | + ^c (2 à 5 j) | - | + | - |
| Hydrolyse de l'urée | >90min | <90min | >90min | <90min | >90min | - |
| Sérum monospécifique : | | | | | | |
| A | +(sauf M1) | + | +/- | - | + | - |
| M |) + | - | +/- | - | - | - |
| Sérum monospécifique R(souche rough) | - | - | - | + | - | + |
| Sensibilité à des colorants bactériostatiques : | | | | | | |
| Fuschine basique | R | S ^a | R ^d | S/R | S | S |
| Thionine | R | R | S | R | S | R |
| Safranine | S | R | S | S | S | S |
| Amplification génique PCR Omp31 et Omp25 | + | + | + | + | + | + |
| PCR IS711 | + | + | + | + | + | + |
| Lysotypie : bactériophages : | | | | | | |
| Tb | - | - | + | - | +/- | - |
| Wb | - | + | + | - | + | - |

a, sauf bv3 ; b, sauf bv5,6,9 ; c, sauf bv5 ; d, sauf bv2 . R : résistant ; S : sensible.

DIFFERENTIATION ENTRE BRUCELLA SPP ET LES AUTRES COCCOBACILLES A GRAM NEGATIF EXIGEANTS.

| Tests | Brucelle spp | Bordetella bronchiseptica | Acinéto a c a cter spp | Haemophilus influenzae | Pasteurella spp | Yersinia pestis | Moraxella phenylpyruvica |
|---|--|--|---|---|---|---|--|
| Agglutination avec un antisérum de Brucella | + ^a | - | - | - | - | - | - |
| Oxydase | + | + | - | + | + | - | + |
| Catalase | + | + | + | + | + | + | d |
| Mobilité | - | + | - | - | - | - | - |
| Uréase | + | + | +/- | +/- | - | - | + |
| Réduction du nitrate | + | + | - | NA ^b | + | + | + |
| Croissance sur gélose au sang | + | + | + | - | + | +lente | + |
| Croissance en anaérobiose | non | oui | non | oui | oui | oui | non |
| Morphologie au Gram | Coccobacille à gram – très court, rose pâle. | Petit bacille ou coccobacille à gram-, brillant. | Bacille ou coccobacille à gram- large et brillant, groupés par 2 ou en chaînette. | Coccobacille à gram – de petite taille. | Bacille ou coccobacille à gram-, groupés par 2, coloration bipolaire. | Coccobacille à gram-polymorphe, parfois à coloration bipolaire, aspect d'épingle de sûreté. | Coccobacille à gram -, très court, brillant. |

^a : B.canis a une oxydase variable et n'agglutine pas avec les antisérums de Brucella.

NA^b : non applicable

d variable.

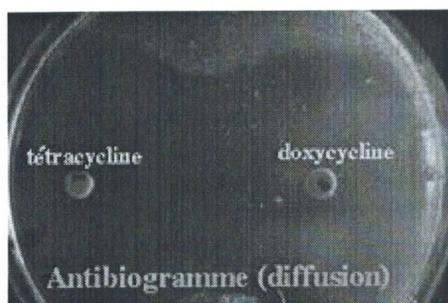
2. L'antibiogramme :

La détermination de la sensibilité des *Brucella* aux antibiotiques doit être réalisée en laboratoire équipé de niveau 3 de sécurité biologique. Plusieurs techniques adaptées aux exigences de croissance de ces bactéries ont été proposées. En fait, l'utilisation de milieu Mueller Hinton, incubé 48 heures en atmosphère enrichie avec 5% de CO₂, semble convenir pour la plupart des souches. In vitro, les *Brucella* sont sensibles à certaines bêta-lactamines : les pénicillines A, les céphalosporines de troisième génération (céfotaxime et ceftriaxone), l'imipénème. Les macrolides sont modérément actifs, l'azithromycine étant le plus actif d'entre eux (CMI=0,5-1mg/l). le chloramphénicol est peu actif. Le cotrimoxazole possède une activité variable selon les souches testées. Les antibiotiques les plus actifs sont les aminosides (streptomycine et gentamycine), les tétracyclines, la rifampicine, et les fluoroquinolones. Seuls les aminosides, les tétracyclines et la rifampicine possèdent une activité bactéricide in vitro. La résistance acquise à ces antibiotiques est rare en clinique. Il est aisé de sélectionner in vitro des mutants résistants à la rifampicine.

Antibiotiques actifs in vitro et efficacités in vivo sur *Brucella* spp.

| Famille d'antibiotiques actifs in vitro | Efficacité in vivo | Molécules à utiliser |
|---|--------------------|---|
| B- lactamines | + | PénicillineA, céphalosporines de 3 ^e génération (céfotaxime et ceftriaxone), imipénème |
| Macrolides | + | Azithromycine, érythromycine |
| Chloramphénicol | + | chloramphénicol |
| sulfamides | V ^a | cotrimoxazole |
| Aminosides | +++ | Gentamycine, streptomycine, nétromycine, tobramycine |
| Tétracyclines | ++++ | Doxycycline |
| Rifampicine | +++ | Rifampicine |
| Fluoroquinolones | ++ | Ciprofloxacine, ofloxacine |

V^a : variable en fonction de l'espèce ; en gras les antibiotiques recommandés par l'OMS.



Diagnostic génomique :

Récemment des techniques d'amplification génique ont été développées par des laboratoires spécialisés. La PCR est apparue une technique sensible et spécifique, particulièrement utile dans le cas où l'administration d'une antibiothérapie empirique empêche l'isolement de *Brucella*. L'amplification peut s'effectuer à partir du sang ou du sérum, mais aussi sur divers suppurations ou biopsies tissulaires. Une amplification du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S suivie d'un séquençage, permet l'identification d'une bactérie du genre *Brucella*. Il en est de même après amplification des gènes *omp31* ou *omp25* codant pour des protéines de membrane externe de 31 et 25kDa, ou de la séquence d'insertion IS711 dont plusieurs copies sont présentes dans le génome de *Brucella*. La présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase dans les échantillons cliniques peut conduire à de faux négatifs, alors que les contaminations de laboratoire ou plus rarement des réactions d'amplification croisée peuvent induire des faux positifs. Le genre *Brucella* étant mono spécifique (comprenant une seule espèce *B.melitensis*), la PCR ne permet pas de déterminer l'espèce en cause. La différenciation des espèces impliquées, voire de certains biovars, peut être obtenue par analyse de profil de restriction en champ pulsé du génome bactérien, par amplification de certains gènes suivie d'une restriction enzymatique, par PCR multiplexe ou par la technique d'amplification – hybridation (AMOS PCR). Ces techniques restent cependant très spécialisées. Enfin, très récemment, des techniques de PCR en temps réel ont été développées.

V- Analyse biologiques

La recherche des anticorps repose sur différentes techniques sérologiques :

Les méthodes les plus anciennes reposent sur le phénomène de la séroagglutination, d'autres étudient la consommation du complément, d'autres enfin, plus récentes, permettent de reconnaître le type des anticorps élaborés et leur taux respectif.

La séroagglutination de Wright reste la méthode de référence de l'OMS . (**Annexe 1**)

Epreuve à L'Ag tomponnée (E.A.T) (Rose bengale ou Card-test):

Est une technique de dépistage d'abord utilisée par les vétérinaires. Elle s'effectue de manière simple en mélangeant sur un morceau de bristol une goutte de sérum à une suspension de Brucella tué et coloré. La réaction est exprimée par des croix (de une à quatre).

Un test positif détecte au minimum 25 UI/mL.

Sa spécificité, sa sensibilité, et surtout sa simplicité, font de ce test un bon moyen de dépistage très utilisé dans les enquêtes épidémiologiques.(elle reste positive très longtemps).

Interprétation similaire mais cinétique des anticorps plus longue que celle du sérodiagnostic de Wright. (**Annexe 2**)

Matériel :

- Plaque d'agglutination en matière plastique .
- Flacon d'antigène
- Micropipette pour sérum (30 µl) ou comptes gouttes
- Micropipette pour antigène (30 µl) ou compte gottes fourni avec l'antigène
- Agitateur mécanique pour plaque
- Minuteur

Réactif :

L'antigène utilisée est une suspension de *Brucella abortus* inactivée colorée par le rose Bengale, tamponnée à pH = 3.6

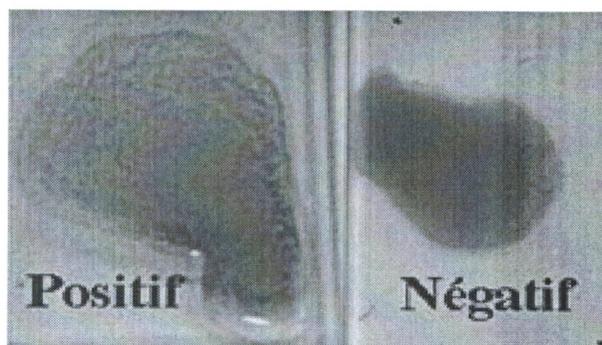
Technique : c'est la technique la plus simple à réaliser jusqu'à présent. Elle consiste en un dépôt d'une goutte (0.03 ml) de sérum à côté d'une goutte (0.03 ml) d'antigène sur une plaque.

Cette dernière sera ensuite soumise durant 4 minutes à un mouvement de bascule après avoir homogénéisé l'ensemble (sérum, antigène) à l'aide d'une fine baguette.

Lecture :

L'agglutination est signe d'un sérum positif.

L'utilisation d'un sérum témoin négatif facilite la lecture des résultats



la séro-agglutination de Wright : méthode la plus employée

Elle met en évidence les immunoglobulines M dont le taux $>1/80^{\circ}$ correspond à une brucellose évolutive récente.

La réaction est positive dès le 12 ou 15^oj, son taux croît rapidement pour revenir à un taux non-significatif au 4-5^o mois: il est donc négatif dans la brucellose chronique.

Les faux négatifs sont dus à des immunoglobulines A et immunoglobulines G bloquants.

Un Coombs indirect permet de les rechercher, et la dilution du sérum met alors en évidence les immunoglobulines. Les faux positifs sont possibles lors d'une autre maladie fébrile (*Yersinia*, choléra...). (**Annexe 3**)

Matériel :

- Portoir pour tubes à hémolyse

- Micropipette à embouts amovibles pour antigène et sérum, ou pipettes de 1 ml graduées
- Tube à hémolyse
- Une étuve à 37° C

Réactif :

- Antigène brucellique pour agglutination est obtenu à partir de culture « Smooth » de *Brucella abortus* inactivées par la chaleur et le phénol, il est standardisé par rapport au sérum anti-abortus international.
- Sérum du malade conservé à 4 °C.
- Solution d'eau phénolé (chlorure de sodium 8.5 à 9 ; phénol 5 à 5.49 ; l'eau distillée 1000 ml)

Technique :

Epreuve de séro-agglutination lente de Wright (SAW).

Les dilutions sont effectuées en solution de chlorure de sodium et de phénol. On prend 10 tubes à hémolyse (pour éviter le phénomène de zone) , ou on l'introduit dans le premier tube , puis on prélève 0.5 ml dans les autres tubes.

0.2 ml de sérum serait alors ajouté au premier tube, puis on prélève 0.5 ml de celui-ci après avoir bien agité et les transvaser dans le second , puis on opère de la même façon du deuxième au troisième tube ainsi de suite.

On obtient dans les dilutions de sérums dans l'eau salée phénolée de 01/10 à 1/5120 . lorsque les dilutions sériques sont effectuées , on ajoute à chacune des tubes 0.5 ml d'antigène.

• Schéma explicatif simplifié :

| Tube n° | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| Eau physiologique (ml) | 0,8 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Sérum (ml) | 0,2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Antigène (ml) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Dilution finale | 1/10 | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/1280 | 1/2560 | 1/5120 |

0,5
jeté

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on retire les tubes et on les laisse pendant ½ heures à température ambiante pour permettre au sédiments qui sont en suspension de se déposer.

Lecture :

La lecture des résultats peut être effectuée à l'œil nu, on prend les tubes sans les agiter et on les examine sur fond noir et un bon éclairage. La précision est fortement améliorée par l'emploi de tubes témoins. Ceux-ci sont de façon suivante :

| | | | | | |
|---------------------------|------|------|------|------|---|
| Tubes témoins | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Eau salée phénolée (ml) | 1 | 0.75 | 0.55 | 0.25 | 0 |
| Antigène dilué ½ (ml) | 0 | 0.25 | 0.5 | 0.75 | 1 |
| % d'éclaircissement | 100 | 75 | 50 | 25 | 0 |
| Intensité d'agglutination | ++++ | +++ | ++ | + | - |

N.B : ces tubes témoins sont portés à l'étuve en même temps que ceux de l'épreuve.

Pour faciliter les lectures et par accord international il faut prendre en considération la

Chapitre 2 : MATERIELS ET METHODES

plus haute dilution pour laquelle on observe un éclaircissement au moins 25% (+) (voir tableau suivant)

Exemple :

La fraction 1/20 correspond de 100% (++++) à la dilution 1/20

Les résultats sont exprimés en unités internationales par millilitre (U.I/ml) par référence au sérum étalon international

La teneur en U.I de sérum est obtenue par analogie en multipliant le dénominateur de la dilution correspondante par un coefficient de 1.25 lorsqu'elle est de 25 (+)

| | | | | | |
|---------------------------|------|------|------|------|-------|
| Tubes témoins | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Dilution de sérum | 1/10 | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 |
| % d'éclaircissement | 100 | 75 | 50 | 25 | 0 |
| Intensité d'agglutination | ++++ | +++ | ++ | + | - |
| Teneur en U.I/ml | 2 | 1.75 | 1.5 | 1.25 | 0 |

| N° Tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------------|--------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| Dilution finale% | 1/10 | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/1280 | 1/2560 | 1/5120 |
| TAUX | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D' A G | + 12,5 | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 | 3200 | 6400 |
| G L U T I | + 15 | 30 | 60 | 120 | 240 | 480 | 960 | 1920 | 3840 | 7680 |
| N A T I | + 17,5 | 35 | 70 | 140 | 280 | 560 | 1120 | 2240 | 4480 | 8960 |
| O N | + 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 | 2560 | 5120 | 10240 |

Exemple : Si la courbe est apparent au 4ème tube, on compare celui-ci aux tubes témoins, on remarque que l'intensité de l'éclaircissement du surnageant du tube témoin ++ le résultat est donc 1/80 ++ et en unité internationale 120 UI

Fixation du complément :

Elle est positive à partir d'un taux de 1/8, plus tardivement que les 2 autres réactions, mais plus longtemps que la réaction de Wright. (**Annexe 4 , 5**)

Matériel :

- Portoir de 12 tubes à hémolyse

- Pipette de 1 ml

- Bain marie à 37° C

- Une centrifugeuse

Réactif :

- Antigène dilué au 1/100 en solution tampon véroné.

- Tampon véronal (0.85 % d'eau salée , 1 ml de sulfate de magnésium à 10 %)

- Complément (constitué par un mélange de sérum de plusieurs cobayes mâle saigné à jeun depuis 24 h)

- Complément dilué à 1/80 avec tampon véronal

- Couple hémolytique formé par du sérum de lapin hyperimmunisé contre les hématies de mouton dilué à 1%0

• Hématie de mouton : sang prélevé à partir d'un mouton (race merinos) qu'on recueille dans un tube citraté ou dans une solution d'alsever . on remplace le plasma par une solution tampon après centrifugation (10 mn , 2000 tr /mn) . l'opération est renouvelée 3 fois de suite et on obtient ainsi un culot qu'on garde a une température de 4 °C.

N.B : le sang peut être utilisé que 24 heure après la récolte.

• Mélanger a parties égales le sérum hémolytique et les globules rouge dilué à 2.5 % , 20 mn avant la fin de l'incubation selon le besoin.

Technique :

Réactifs (préparatifs) :

1 / antigène à 1% ==> 0.1 ml d'Ag dans 9.9 ml de

T.V

2 / complément : le reconstituer selon solvant spécial

Dilution à 1/80 ==> 0.05 ml de C' dans 3.95 de T.v

3 / couple hémolytique :

- Ajouter une goutte de S.H dans 10 ml de T.V
- Ajouter 0.25 ml de G.R (préalablement lavées) dans 9.75 de T.V ==> dilution à 2.5 %
- Mélanger à parties égales SH et GR à 2.5 % 200mn avant la fin de l'incubation selon le besoin

II . titrage tu complément :

| N° | | | | | | | | | 9 | 10 | H ₀ | H ₁₀₀ |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------------|------------------|
| C'(ml) | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.07 | 0.08 | 0.09 | 0.10 | 0.11 | 0.12 | 0.13 | - | 0.40 |
| T.V(ml) | 0.36 | 0.35 | 0.34 | 0.33 | 0.31 | 0.30 | 0.29 | 0.28 | 0.27 | | 0.40 | - |
| Ag(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 |
| Incuber au bain -marie à 37 ° c pendant 30 mn | | | | | | | | | | | | |
| C.H (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 |

Incuber au bain marie à 37°C pendant 30 mn

Centrifuger

Obtenir H₅₀ à partir de H₀ et H₁₀₀ (parties égales)

Lecture :

Lire le tube qui équivaut le témoin H₅₀

III . titrage des anticorps (ou réaction) : exemple de dilution au 1/4 :

Chapitre 2 : MATERIELS ET METHODES

1. Tube à réaction : 0.05 ml de sérum chauffé à 60°C dans 0.15 ml de T.V
2. Tube témoin : 0.05 ml de sérum chauffé à 60 °C dans 0.35 ml de T.v

| Dilution du sérum | 1 /2 | 1/ 4 | | 1/8 | 1/16 | 1/32 | T _{Ag} | T _{Gr} | T _{C'} |
|--|------|------|------|------|------|------|-----------------|-----------------|-----------------|
| U.CEE (H50) | 10 | 20 | | 40 | 80 | 120 | | | |
| Sérum chauffé (ml) | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | | | |
| Ag titré (ml) | 0.20 | 0.20 | | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | | |
| T.V(ml) | | | 0.20 | | | | 0.20 | 0.60 | 0.40 |
| C' 6UH ₅₀ (ml) | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | | 0.20 |
| Laisser une nuit au réfrigérateur , puis 10 mn à 37 °C | | | | | | | | | |
| Couple hémo | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 |

(titre x nombre de tube x 1) /dilution du C'

Cette équation permet de connaître le volume pure utilisé pour une série de 20 tubes

Dans notre expérience , le tube N°3 est équivalent à H50 . le titre est de 0.06 on a fait :

$(0.06 \times 6) \times 20 \times 1 / 100 = 0.072$ ml de complément pur

$(0.2 \times 20) = 4$ ml : c'est la quantité du complément dilué préparé pour 20 tubes

$(4\text{ml} - 0.072 \text{ ml}) = 3.289$ ml : quantité du tampon véronal ajouté au complément pur

- Incuber au bain marie à 37 °C (le temps d'incubation se situe 5 mn après la lyse totale du témoin antigène)
- Centrifuger tous les tubes à 1500 /2000 t/mn pdt 10 min

Lecture :

Après une centrifugation de tous les tubes à 1500 tr/mn pdt 5 à 10 mn .on commence par lire les témoins .

Ils doivent impérativement présenter des résultats d'hémolyses conformes

Cas de figure de lecture des tubes témoins :

| | | | |
|---------------|----------------------|------------------------------|----------|
| Tubes témoins | réaction en présence | résultat d'hémolyse conforme | Anomalie |
|---------------|----------------------|------------------------------|----------|

| | | | |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------|--|
| Sérum | -sérum + C' + S.H | 100% | % sérum anticomplémentaire 0% C' altéré |
| Antigène | Ag +C' +SH | Hémolyse totale | C' Altéré |
| Complément | C'+SH | Hémolyse | 0% C' altéré |
| Système hémolytique (SH) | SH | Pas d'hémolyse | Lyse des Gr altérés |

Si les témoins sont conformes. On lit la série des tubes réactionnels (T.R)

On compare la couleur du liquide surnageant du témoin H50 avec celle de chacun des tubes de la série

Si la couleur du tube réactionnel est :

- Plus claire, on se rapproche très nettement de celle du témoin , la réaction est positive
- Plus foncée : la réaction est négative

En résumé, le point final de lecture correspond à la dilution 1/ 4 du sérum pour laquelle , on observe une inhibition de l'hémolyse supérieure ou égale à 50 %

l'intradermoréaction (IDR) :

Sa pratique doit toujours succéder aux prélèvements sérologiques car l'IDR peut s'accompagner d'une élévation transitoire des anticorps sériques.

L'injection intradermique d'1/10^o de ml de filtrat de culture de Brucella, ou mieux maintenant d'un antigène PI (Phénol Insoluble), permet de tester l'hypersensibilité retardée à l'antigène brucellien à la 48^oh.

La réaction est une induration érythémateuse parfois phlycténulaire. Dans les cas les plus réactifs, une lymphangite avec adénopathie satellite, voire une réaction thermique peut être observées.

La réaction est positive 3 à 4 semaines après le début clinique, et le reste définitivement témoignant d'une infection chronique.

Cette épreuve d'hypersensibilité retardée est peu utilisée en l'absence actuelle d'allergène facilement disponible dans le commerce. La réaction est précoce (lecture

après 24 h d'une réaction locale et quelquefois générale). Rechercher oedème, érythème, longue persistance de la positivité.

b) L'immunofluorescence indirecte

Elle met en évidence soit les anticorps totaux, soit les immunoglobulines M et les immunoglobulines G permettant de dater l'infection. Le taux limite est fixé à 1/100 et est maximal vers le 3^o mois. La décroissance est lente, une positivité pouvant être observée lors de la brucellose chronique.

*- En pratique, les arguments diagnostic sont les suivants:

A la phase aiguë, numération formule plaquette, hémocultures, sérodiagnostic de Wright et immunofluorescence indirecte (IFI) dès le 10^oj puis les autres réactions sérologiques.

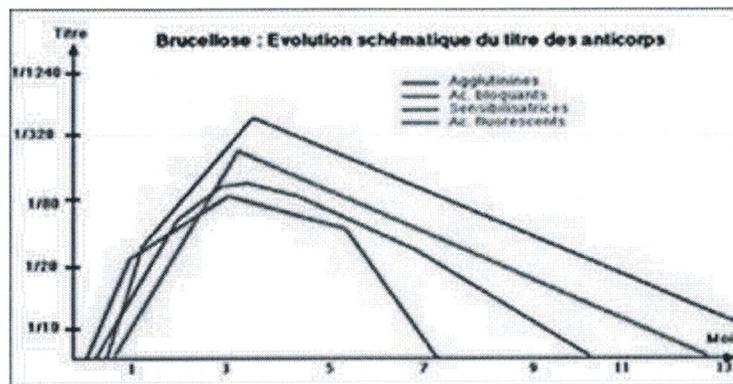
Dans les brucelloses focalisées, isolement du germe à partir d'un foyer, réactions sérologiques, IDR à la mélitine.

| Aspects cliniques | Stade évolutif | Hémocultures | Sérodiagnostic de Wright | I.D.R de Burnet |
|-------------------------|------------------|--------------|--------------------------|-----------------|
| Brucellose aiguë..... | <15 jrs | + | + | - |
| | >15 jrs < 21 jrs | + | + | - |
| | >21 jrs | - | - | + |
| Brucellose focalisée... | >30jrs ? | - | + | + |
| Brucellose chronique.. | >1 an ? | - | ± | +++ |

Dans la brucellose chronique, IFI surtout, IDR très fortement positive.

Tableau I. – Utiliser tous les moyens de la biologie.

| | Primo-invasion | Phase secondaire (facalisée ou non) | Phase tardive |
|--|----------------|--|-----------------------|
| Hémogramme | Neutropénie | Idem ou discrète polynucléose | Normale ou leucopénie |
| Vitesse de sédimentation | Modérée | Accélérée | Normale |
| Creactive protein | Subnormale | Modeste | Normale |
| Hémoculture | ++ | ± | - |
| Rose bengale | + | + | ± |
| Séroagglutination de Wright | + ++ | +++ + | ± |
| Immunofluorescence indirecte ou Elisa | | | |
| IgG | ± + | ++ | ± |
| IgA | + + | + (++ si foyer) | - (+ si foyer) |
| IgM | + ++ | + | - |



DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL :

Le polymorphisme de la brucellose explique le caractère innombrable des diagnostics différentiels envisageables en pratique :

- **Phase septicémique :**

On peut évoquer les chapitres de la pathologie fébrile :

- Fièvre de causes bactériennes ou virales : fièvre typhoïde, endocardite d'Osler, tuberculose miliaire, rhumatisme articulaire aiguë, septicémies diverses, mononucléose infectieuse, viroses saisonnières,

- Fièvre des affections malignes : maladie de Hodgkin, hémato sarcomes non hodgkiniens, cancers profonds épithéliaux ;
- Fièvre des collagénoses : lupus érythémateux aigu disséminé, périarthrite noueuse

- **Brucellose focalisée :**

- Les problèmes sont différents selon la localisation, en règle cependant, c'est la tuberculose qu'il est le plus difficile d'éliminer, en particulier dans ses localisations osseuses, il faut insister sur ce diagnostic différentiel (la brucellose a été appelé pseudo-phthisie méditerranéenne)

- **Brucellose chronique :**

- « La patraquerie brucellienne », en l'absence d'antécédents connus de brucellose, peut facilement être confondue avec des troubles psychiques.

Le diagnostic évoqué pourra être facilement confirmé à l'aide d'examens complémentaires appropriés :

- **Examens non spécifiques :** certains examens n'apportent que des arguments d'orientation, dépourvus de toute spécificité. Ce sont l'hémogramme et la vitesse de sédimentation. En principe, il existe une leucopénie (en tous les cas pas d'hyperleucocytose), et la vitesse de sédimentation est peu ou pas accélérée au cours de la phase septicémique.
- **Examens spécifiques :** d'autres examens ont une valeur spécifique : ce sont les hémocultures, le sérodiagnostic de Wright (et les autres épreuves sérologiques), l'intradermo-réaction de Burnet.

TRAITEMENT :

Le traitement repose sur plusieurs méthodes thérapeutiques :

1 / Antibiothérapie :

Les antibiotiques utilisés dans le traitement de la brucellose doivent être régulièrement actifs sur les Brucella et pénétrer à l'intérieur des cellules de l'organisme. Seuls quatre antibiotiques répondent à ces deux critères : **les tétracyclines, la rifampicine, le cotrimoxazole** (seul le thriméthoprime pénètre bien dans les cellules et le **chloramphénicol ; la streptomycine**, utilisé en association du fait de sa bonne activité, n'agit que sur les germes extracellulaires.

Par ailleurs l'antibiothérapie choisie doit être suffisamment prolongée pour diminuer le risque de rechute.

Jusqu'à ce jour, aucun protocole thérapeutique n'a été exempt d'échecs (environ 15% de rechutes dans les meilleurs cas).

Le schéma le plus employé reste celui préconisé par l'Organisation Mondiale de la santé : **tétracycline** (2g/j en 4 prises) pendant 3 semaines, associée les 2 premières semaines à la **streptomycine** (1g/jr par voie musculaire).

- Le deuxième protocole proposé est basé sur l'utilisation du **cotrimoxazole** pendant 45 jours (thriméthoprime : 480mg + sulfaméthoxazole :2400 mg/j en 2 prises)
- Le troisième schéma repose sur l'association de la **tétracycline** et de la **rifampicine** (900mg/j en 1 prise) pendant 4 semaines.
- Aucun protocole n'a été évalué chez les enfants, rarement atteints par la brucellose ; mais le **cotrimoxazole** pendant 45 jours semble être un choix logique (thriméthoprime : 6mg /kg + sulfaméthoxazole : 30mg/kg/j en 2 prises).
- Les atteintes osseuses doivent être traitées par l'association **streptomycine-tétracycline** en poursuivant la **tétracycline** au moins 45 jours.
- Les infections du système nerveux central et les endocardites semblent bénéficier de l'adjonction de la **rifampicine** à l'association **streptomycine-tétracycline**. Le **chloramphénicol** peut être utilisé comme base du traitement des atteintes neuro-méningés mais le choix des antibiotiques à associer est délicat.
- Lorsque le traitement de la brucellose échoue, la conduite à tenir dépend du protocole initialement utilisé : si celui-ci ne reposait pas sur l'association **streptomycine-tétracycline, la rifampicine** doit alors être ajoutée.

2/ Corticothérapie :

Les corticoïdes sont des indications restreintes.ils s'imposent néanmoins, en même temps que les antibiotiques, dans la thérapeutique des formes polyviscérales à la dose de 1mg/kg/j pendant une brève durée.

3/ Chirurgie :

Elle est utilisée dans des cas très rares :

- Traitement des rares foyers ostéo-articulaires, ou neuro-méningés avec retentissement fonctionnel important malgré le traitement médical.
- Chirurgie cardiaque dans certaines endocardites brucelliennes.

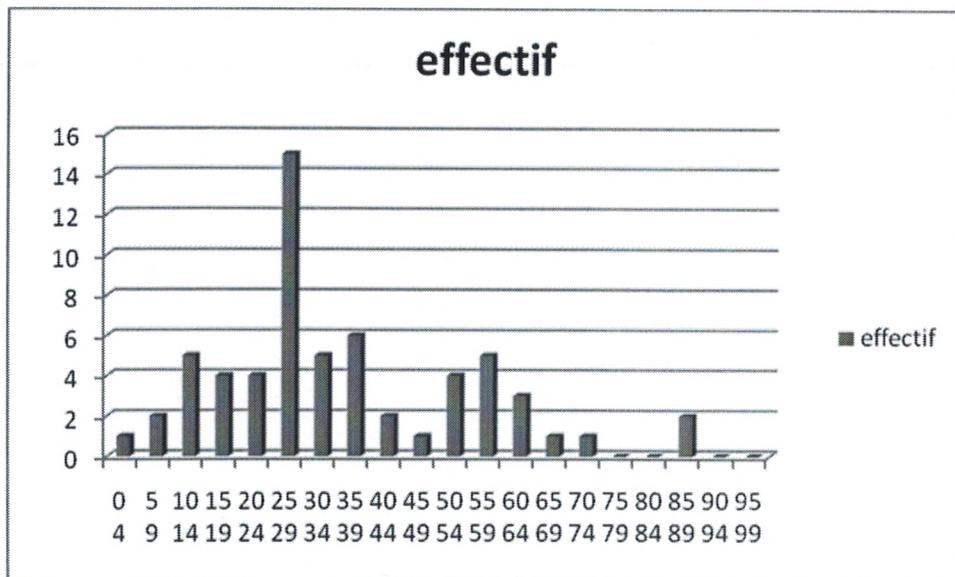
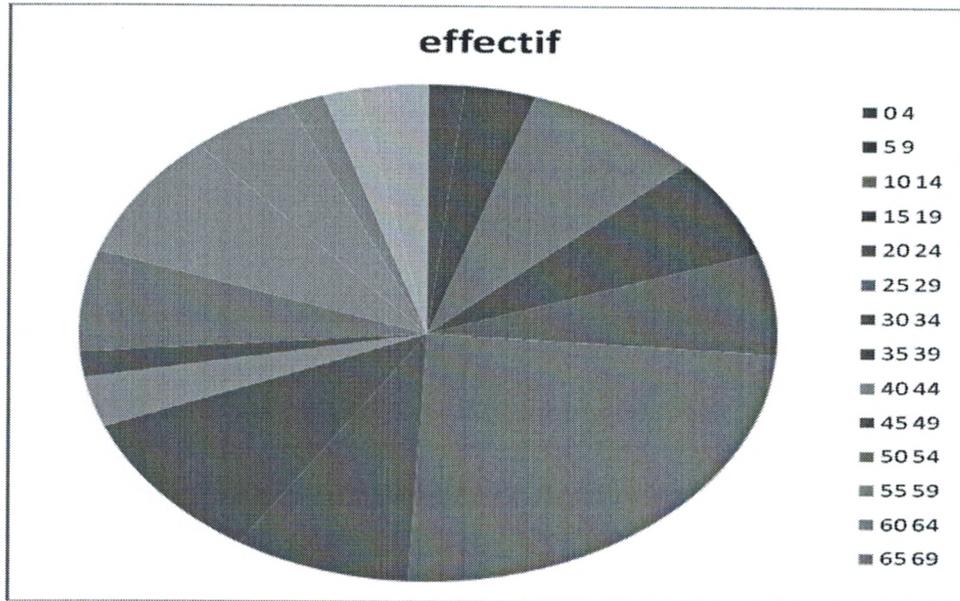
4/Antigénothérapie :

A un rôle restreint ; il existe deux modalités suivant le stade de la maladie :

- Antigénothérapie de choc : destiné à stimuler l'immunité cellulaire non spécifique du sujet. On utilise principalement le vaccin microbien anti-melitensis tués par chauffage, s'utilise par voie intraveineuse a la posologie faible et croissante. La première injection 0,1cc ; 0,25 cc et 0,5 cc pour les suivantes avec un intervalle de 4à5 jours. Il provoque une réaction fébrile élevée qui dure 12 à 24 heures.

Chapitre 3 : Etude Statistique

a) Facteur âge

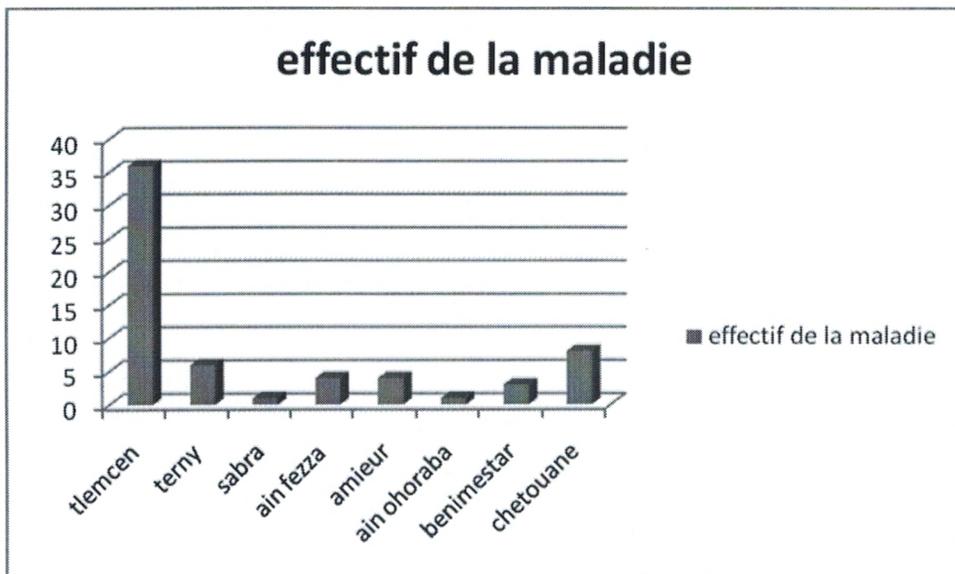
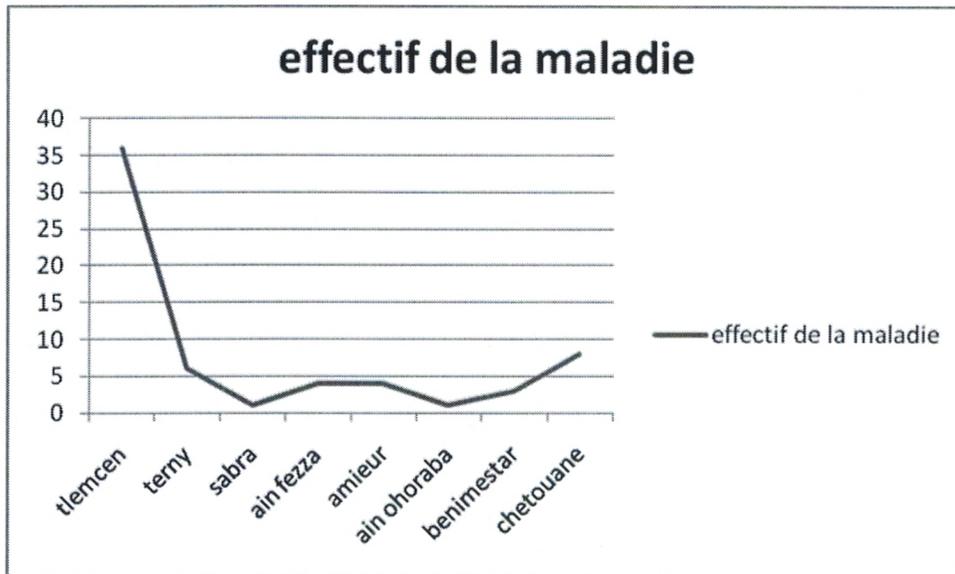


Observation :

On constate d'abord que toutes les classes d'âge sont touchées et on signale aussi la présence de la maladie chez des enfants de quelque mois allant jusqu'aux gens âgés de 80ans , cela peut être due à la consommation de lait cru ; nous supposons que cette répartition correspond plus ou moins à la pyramide des âges de la population algérienne avec une prédominance particulière chez les adultes.

On remarque aussi que la maladie frappe plus la tranche d'âge de 25 à 29ans c'est-à-dire les jeunes en pleine activité physique (la brucellose est une maladie professionnelle).

b)- facteur région ou répartition géographique :



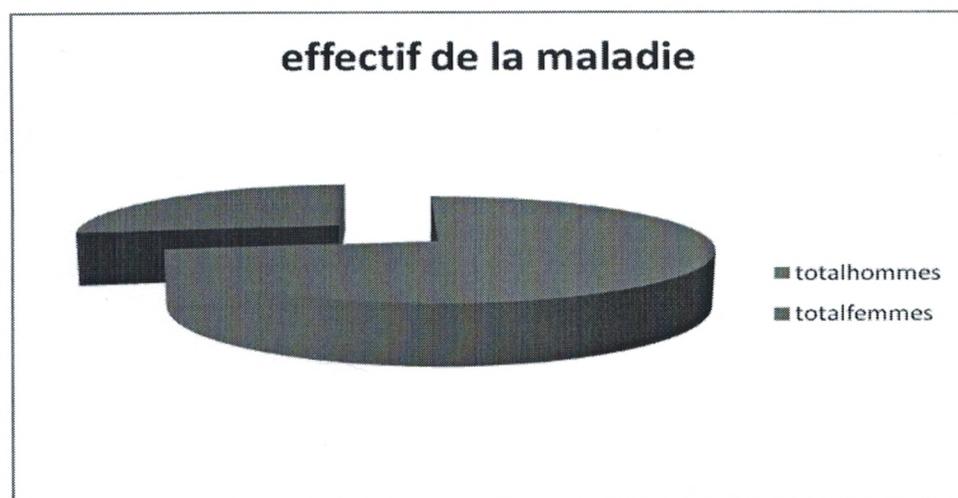
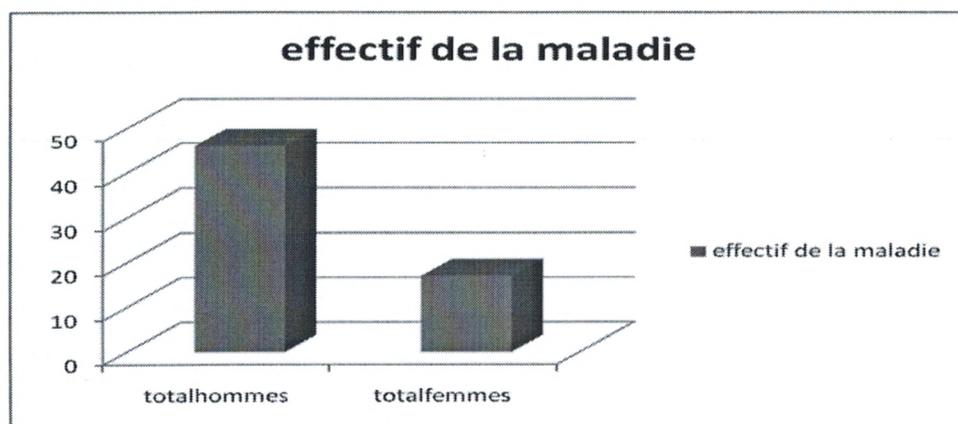
Observation :

On constate que la répartition des cas de brucellose humaine dans les différentes communes de la wilaya de Tlemcen qui en regroupe 53, 8 sont

concernées par la maladie pendant cette période avec une variation de la fréquence d'une commune à une autre ; allant d' un seul cas pour certaines communes (AIN OGHARABA), jusqu'à une valeur élevée pour la commune de Tlemcen, chef lieu de la wilaya, ceci s'explique par une population importante.

Il semblerait aussi que ce maximum est dû essentiellement au mode de contagion. En effet, d'après le service des maladies infectieuses, le mode de contagion le plus fréquent à Tlemcen serait l'ingestion du lait de vache cru, mais aussi parce qu'il s'agit d'une grande ville vers laquelle convergent beaucoup de cas. Il est à signaler que quatre autres communes sont affectées : TIRNY, AIN FEZZA, AMIEUR et CHETOUANE qui est également l'une des communes les plus touchées . Ceci est expliqué par le fait que cette zone périurbaine était essentiellement à vocation agricole d'où la présence jusqu'à aujourd'hui d'agriculteurs et d'éleveurs.

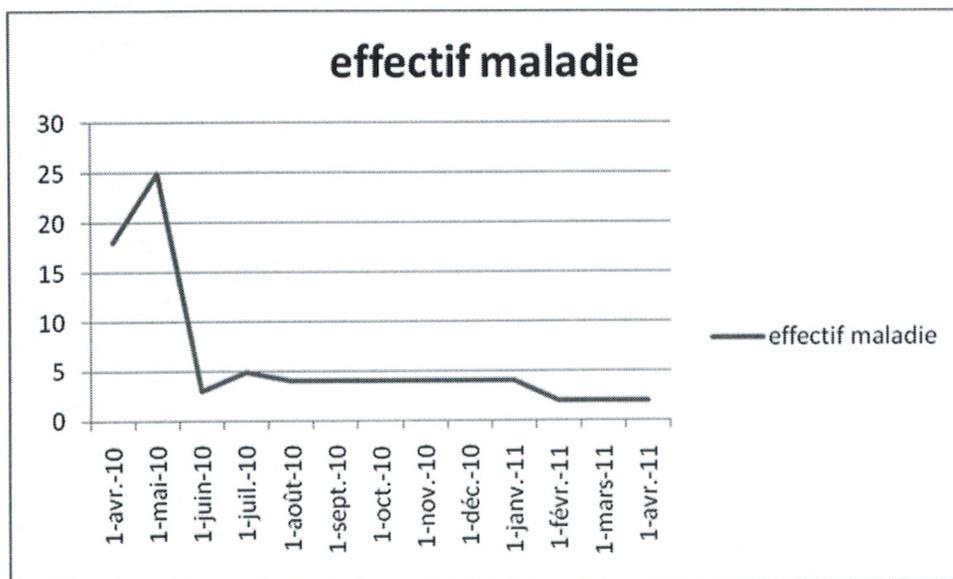
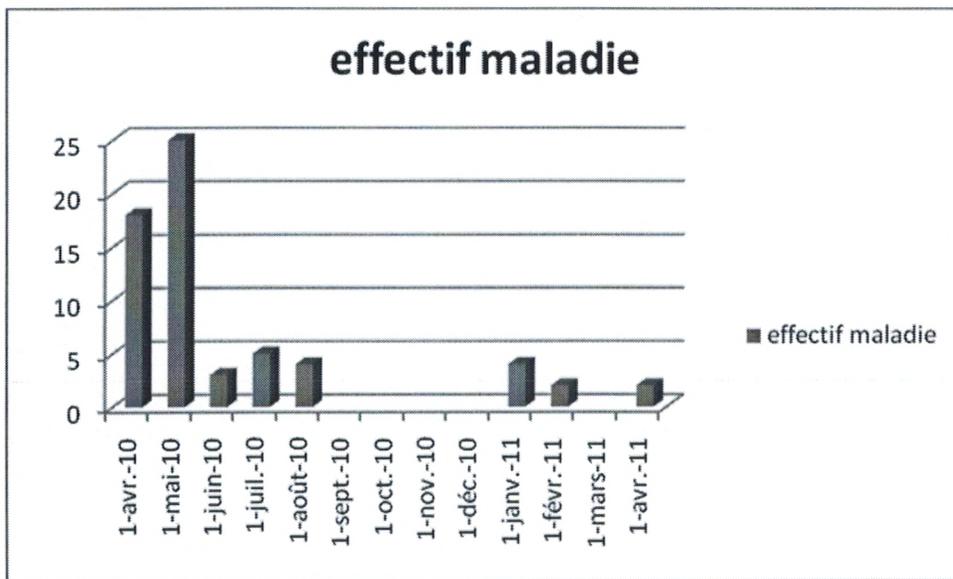
c)- Facteur sexe :



Observation :

Il existe une prédominance de la maladie chez les hommes qui de part leurs activités professionnelles sont plus exposés à la maladie, puisqu'ils sont en contact directe avec les animaux . Néanmoins, le pourcentage de femmes atteintes reste important . Nous supposons dans ce cas que le mode de contamination indirecte(digestif) par consommation de lait cru en plus des habitudes de vie et les difficultés d'accès aux structures de santé, ne permet pas d'avoir un bon dépistage de la maladie surtout chez les femmes.

d)- Facteur temps (répartition par mois des cas de brucellose) :



Observation :

On observe que les cas de brucellose humaine sont dénombrés durant presque tout les mois de l'année. Les fréquences les plus élevées sont notées pendant les mois d'Avril et de Mai. Cette période correspond à la saison de la mise-bas du cheptel, aux éventuels avortements et à une lactation intense. C'est donc pendant cette période que la contamination est importante. L'homme s'infecte par des produits de l'avortement, de la mise-bas et/ou des sécrétions génitales.

Par ailleurs, l'importance de la lactation pendant la période suivant la mise-bas, augmente les risques d'une contamination indirecte par consommation de lait cru, du lait caillé et autres dérivés.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons essayé de définir l'importance de la brucellose humaine dans la wilaya de Tlemcen à travers une analyse des données épidémiologiques s'étalant sur 2 ans. Il est clair d'après nos résultats que la brucellose humaine est :

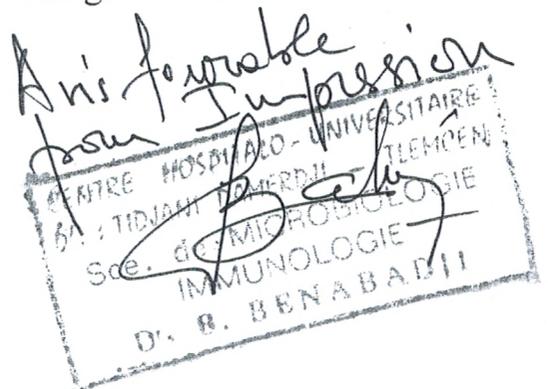
- ❖ Toujours fréquente.
- ❖ Présente dans la grande majorité des communes de la wilaya.
- ❖ Présente à la longueur d'année
- ❖ Présente chez les deux sexes
- ❖ Présente chez presque toutes les classes d'âges.

Néanmoins, les données enregistrées dans le service des maladies infectieuses ne reflètent pas la morbidité réelle de la maladie dans la wilaya de Tlemcen.

Conclusion

La brucellose humaine est une maladie à déclaration obligatoire en Algérie, elle constitue un problème majeur de santé publique d'une part, par son incidence de plus en plus importante et par son coût d'autre part ; en effet le coût de la brucellose est difficile à évaluer puisque le nombre réel des cas n'est pas connu, c'est une maladie qui coûte chère pour les raisons suivantes :

- Elle frappe le plus souvent des hommes en pleine période d'activité professionnelle.
- Le diagnostic n'est pas toujours évident et nécessite de nombreux examens médicaux et de laboratoire.
- Les formes compliqués et les formes chroniques sont fréquentes et la convalescence est toujours longue .
- Enfin, la brucellose est souvent prise en charge comme une maladie professionnelle.



Annexe 1

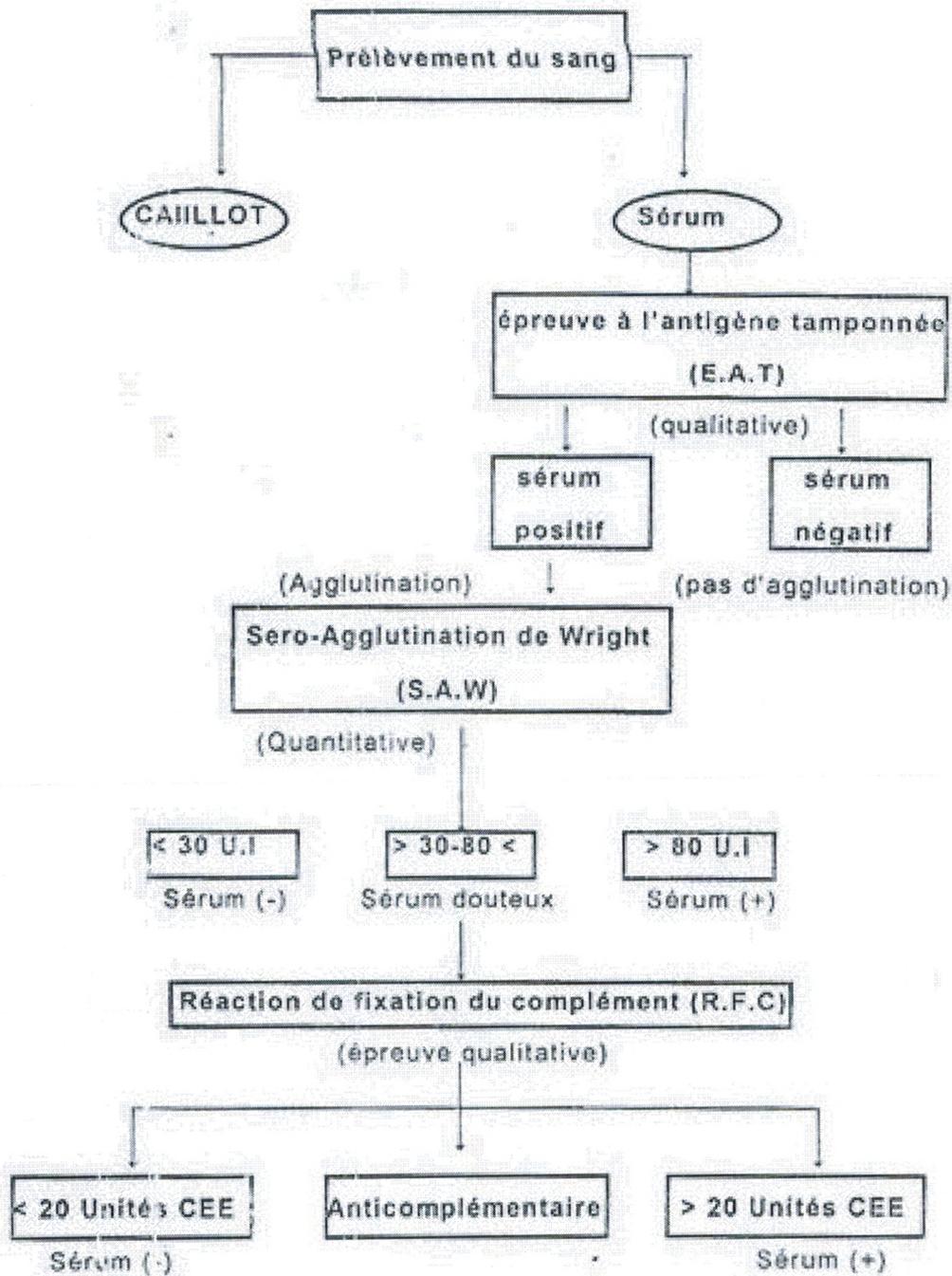
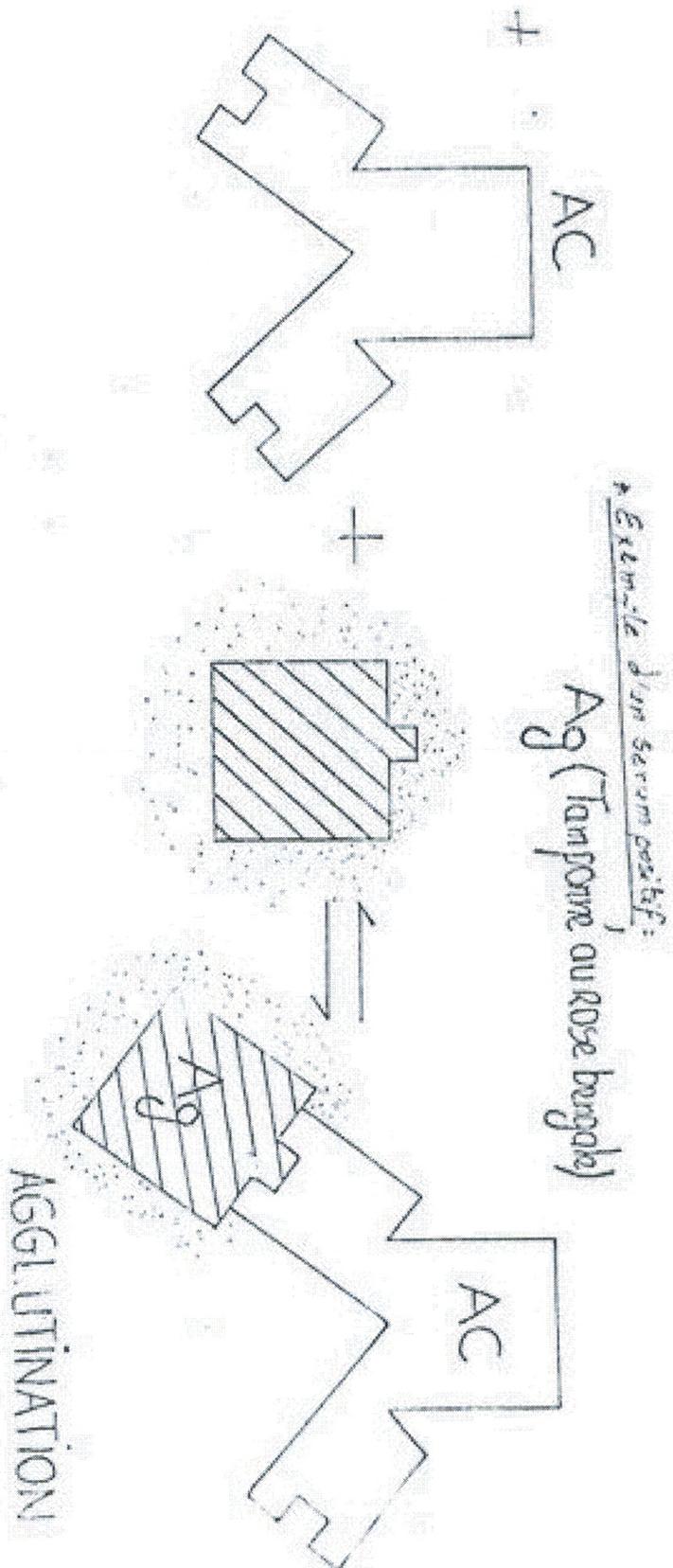


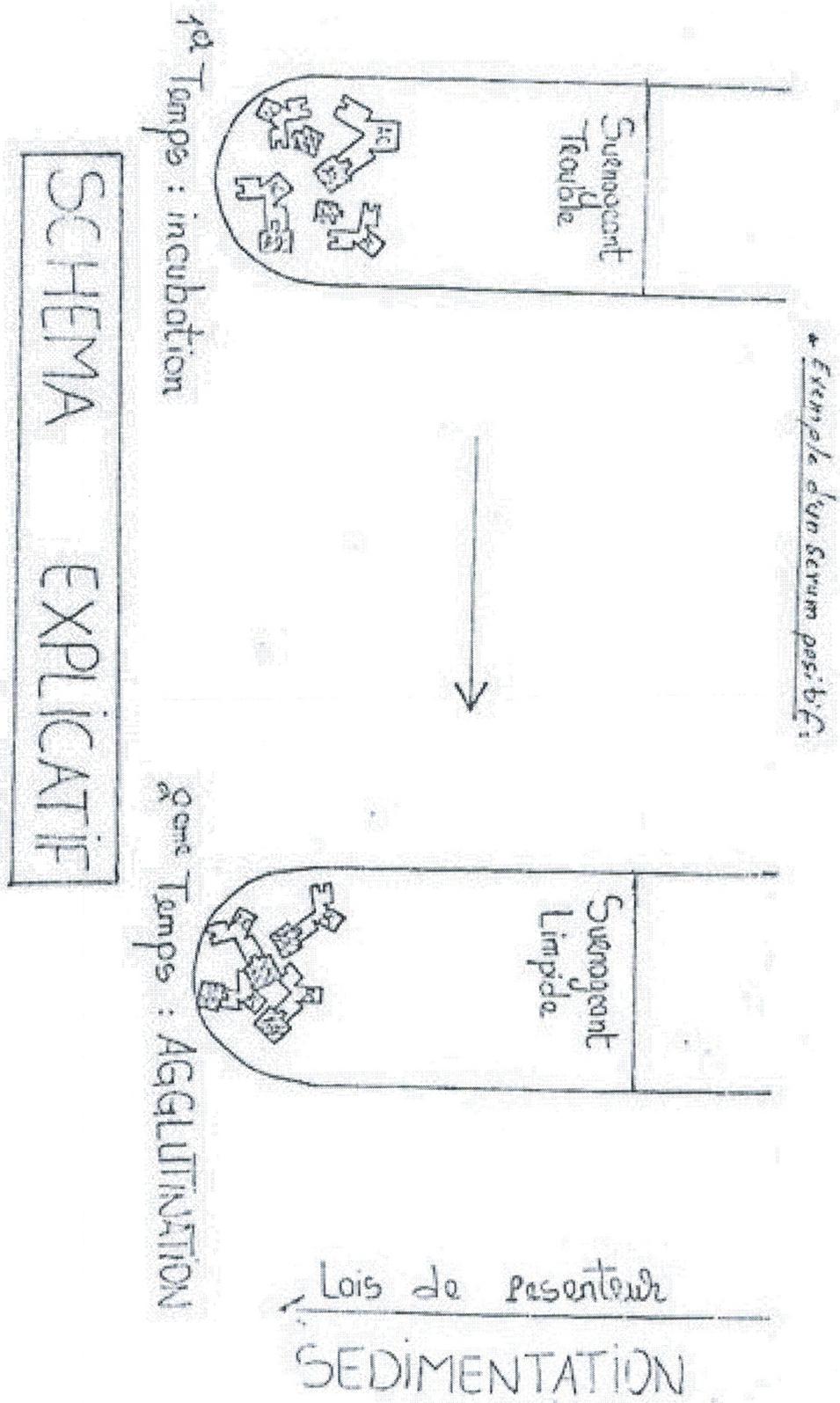
FIGURE N° 4: Protocol de travail pour l'analyse sérologique

Annexe 2

SCHEMA EXPLICATIF

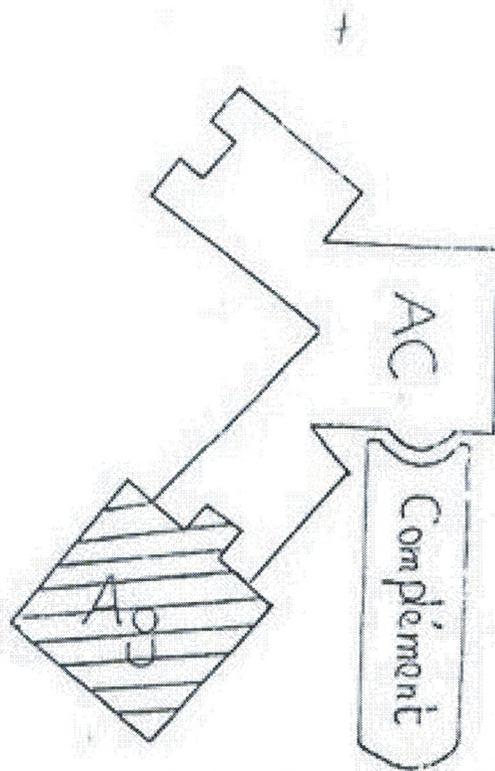


Annexe 3

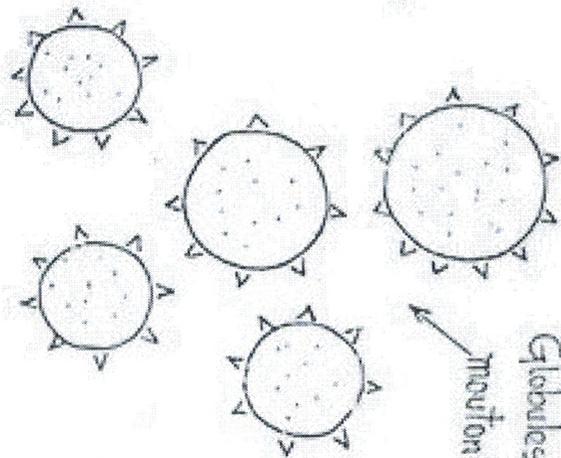


Annexe 4

$A_g + \bar{C} + C = \text{Pas de Lyse}$



** Exemple d'un serum positif*

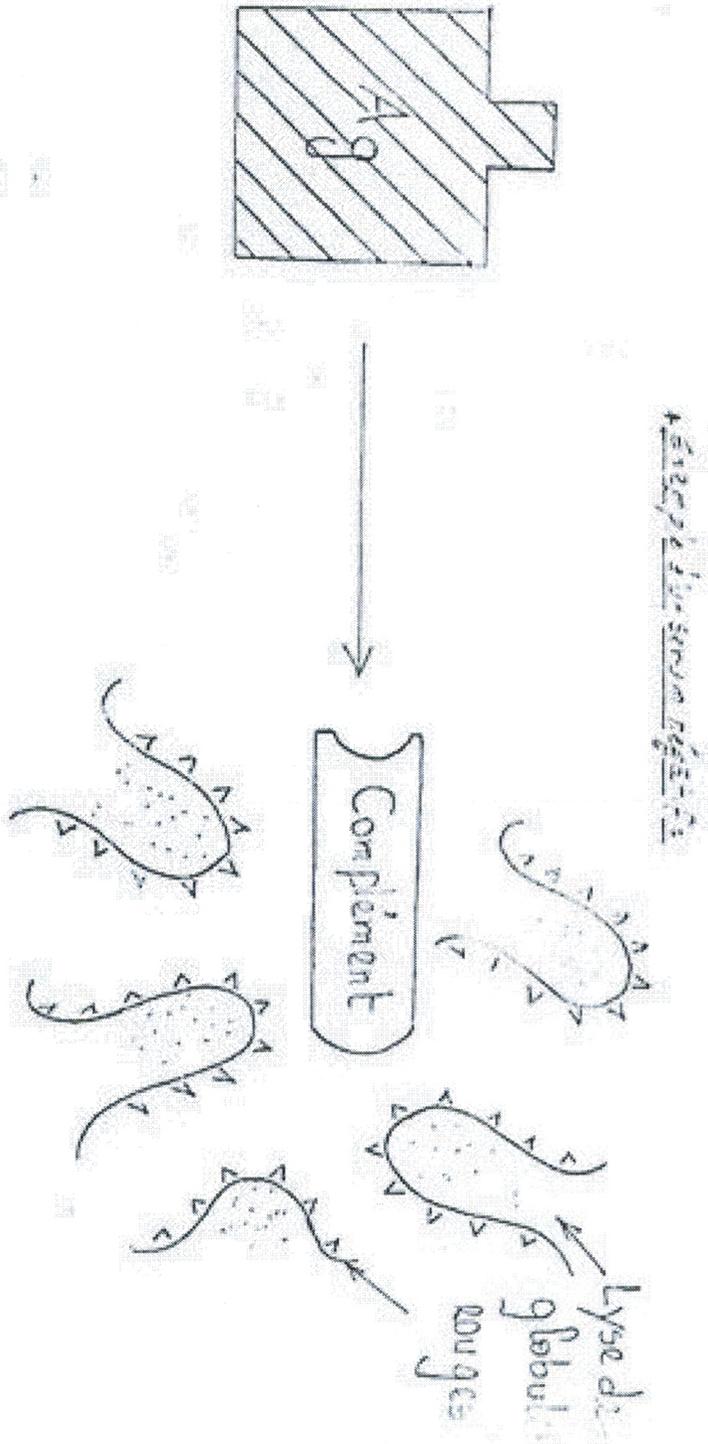


←
SEDIMENTATION

SCHEMA EXPLICATIF

Annexe 5

SCHEMA EXPLICATIF



Annexe 6

Suspicion Clinique de Brucellose
humaine humaine

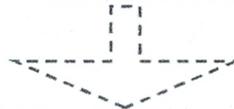


Prélevements microbiologiques

Manipulation conseillée sous PSM ou
dans un laboratoire de sécurité L3

Cultures sur des milieux gélosés sous 2-10%
de CO₂ :

Gélose au sang, gélose chocolat, TS
additionnée de sérum Mac Monkey, milieu
spécifique de Brucella (Thayer-Martin)



-Morphologie au gram : Cocobacille à
gram- , très court, rose pâle

-Culture : colonies punctiformes non
pigmentées, non hémolytiques apparaissent
après plus de 48 h d'incubation ,
croissance sur milieu aérobie (2-4 j)

Manipulation obligatoire dans un laboratoire
de sécurité L3

Test oxydase : + , Test catalases : + , test
urease : + , sensibilité RIF et TET

Envoyer au CNR des Brucelloses (Dr Gaarin-Bastuji, AFSSA, Maisons-Alfort)
, ou au laboratoire associé au CNR (Pr Maurin, CHU de Grenoble)

Déclaration obligatoire à la DDASS

La catalase est à éviter ou effectuer sous PSM pour éviter les aérosols ; En vert : les test
d'orientation rapide pour le diagnostic de Brucella ; RIF : Rifampicine ; TET :
tétracyclines

Etapes du diagnostic bactériologique de Brucella Spp

Annexe 7

Suspicion de Brucellose humaine

Fièvre
Sudoro-
algique

Aigüe

Localisation
II A

Subaigüe

Patraquerie
brucellienne

Chronique

Dg Direct

Dg Indirect

Hémoculture++
Myéloculture+++

EAT +++
SAW+++
IF/ELISA +

Dg Direct

Dg Indirect

Hémoculture++
Myéloculture+
Et suivant les
localisations(LCR
, liquide
artic.ganglions...)

IF/ELISA +++
EAT +
SAW +

Dg Direct

Dg Indirect

Hémoculture -
Myéloculture -

IF/ELISA +
EAT -
SAW -

**Intérêts des différents prélèvements microbiologiques
dans diagnostic des brucelloses**

ANNEXE 8

| Coccobacilles à Gram négatif Caractères d'identification | | | |
|--|--------------------|---|--|
| Organisme | Coloration de Gram | Culture | Réactions d'identification |
| <i>Pasteurella multocida</i> | Coccobacilles G - | Petites colonies non hémolytiques sur gélose au sang | Oxydase +, uréase - |
| <i>Brucella abortus</i> | Coccobacilles G - | Petites colonies lisses après 48 h sur gélose au sang Échantillons cliniques : jusqu'à 4 semaines de culture | Inhibition de croissance par les colorants thionine fuchsine + - |
| <i>B. melitensis</i> | " | " | - - |
| <i>B. suis</i> | " | " | - + |

+ = Inhibition.

ANNEXE9

DIFFERENTIATION ENTRE BRUCELLA SPP ET LES AUTRES COCCOBACILLES A GRAM NEGATIF EXIGEANTS.

| Tests | Brucelle spp | Bordetella bronchiseptica | Acinéto bacter spp | Haemophilus influenzae | Pasteurella spp | Yersinia pestis | Moraxella phenylpyruvica |
|---|--|--|---|---|---|---|--|
| Agglutination avec un antisérum de Brucella | + ^a | - | - | - | - | - | - |
| Oxydase | + | + | - | + | + | - | + |
| Catalase | + | + | + | + | + | + | d |
| Mobilité | - | + | - | - | - | - | - |
| Uréase | + | + | +/- | +/- | - | - | + |
| Réduction du nitrate | + | + | - | NA ^b | + | + | + |
| Croissance sur gélose au sang | + | + | + | - | + | +lente | + |
| Croissance en anaérobiose | non | oui | non | oui | oui | oui | non |
| Morphologie au Gram | Coccobacille à gram - très court, rose pâle. | Petit bacille ou coccobacille à gram-, brillant. | Bacille ou coccobacille à gram- large et brillant, groupés par 2 ou en chaînette. | Coccobacille à gram - de petite taille. | Bacille ou coccobacille à gram-, groupés par 2, coloration bipolaire. | Coccobacille à gram-polymorphe, parfois à coloration bipolaire, aspect d'épingle de sûreté. | Coccobacille à gram -, très court, brillant. |

^a : *B. canis* a une oxydase variable et n'agglutine pas avec les antisérums de Brucella.

NA^b : non applicable . d variable.

Références bibliographiques :

- 1) **Perry.J,Staley.J,Lory.S.** Microbiologie. Edition DUNOD ,2002.
- 2) **Freny.J,Renaud.F,Leclerco.R,Riegel.PH.** Precis de bactériologie clinique. Edition ESKA, 2007.
- 3) **Denis.F,Ploy.M.C, Martin.C, Bingen.E,Roland.Q.** Bacteriologie medicale: techniques usuelles. EditionMASSON, 2007.
- 4) **Berche.P,Gaillard.J-L,Simonet.M.** Bactériologie. Edition MEDECINE-SIENGE, 1988.
- 5) **Nauciel.C,Vildé.J-L.** Bactériologie médicale. Edition MASSON, 2005.
- 6) **Cenac.A,Perlemuter.L,Dournon.E,DournonA-M.** Cahier de pathologie médicale. Edition MASSON, 1976.
- 7) **Avril.J-L,Dabernat.H,Denis.F,Montiel.H.** Bacteriologie clinique 2^{ème} édition. Edition ELLIPSES, 1992.
- 8) **Brucellose ostéoarticulaire au service des maladies infectieuses .** De 1986 à Juin 2006 : thème de fin de stage en vu de l'obtention du diplôme de doctorat en médecine.
- 9) **Contribution à l'étude de la brucellose dans la willaya de Tlemcen :** mémoire soutenu de biologie
Hart.T, Shears.P. Atlas de poche de microbiologie. Edition FLAMMARION,1997.
- 10) Mémoire de biologie : **Etude de brucellose chez les ruminants**
- 11)**Bactériologie DCEMI.** Université PARIS VI.
- 11)**Pierson.A.** Biologie clinique. 2001