

CIHEAM - the International Center for Advanced Mediterranean Agronomic Studies - is an inter-governmental organization, established in 1962, which presently includes many of the Mediterranean countries, such as Albania, Algeria, Egypt, France, Greece, Italy, Lebanon, Malta, Morocco, Portugal, Spain, Tunisia, Turkey and Yugoslavia. The Center's aim is to improve the capacities of Mediterranean agriculture, through training, re-research and the study of the region's major problems.



**Scientific committee:**

R. Fevrier	(CIHEAM)
M. Plommet	(France)
J.-M. Verger	(France)
D. Yantzis	(Greece)
R. Farina	(Italy)
A. Benkirane	(Morocco)
R. Diaz	(Spain)
E. Istanbuluoglu	(Turkey)
L. Blajan	(OIE)
F. Milward	(FM-F)

**Organizing committee:**

A. Di Giulio	(CIHEAM)
S. Busittil	(FIS)
C. Vella	(MINAG)

**Under the auspices of:**

CIHEAM	International Center for Advanced Mediterranean Agronomic Studies
CEC	Commission of the European Communities
MINAG	Ministry of Agriculture And Fisheries, Malta
FIS	Foundation for International Studies, Malta
FM-F	Fondation Mérieux, France
OIE	Office International des Epizooties

UB

Dige-92-01

600-B11

1992 02

# Prevention of Brucellosis in the Mediterranean countries

Proceedings of the international seminar organized by CIHEAM, CEC,  
MINAG (Malta), FIS (Malta), Valletta, Malta, 28 - 30 October 1991  
(CIHEAM Publication No. 1, 1992)

M. Plommet (Editor)



Pudoc Scientific Publishers

Wageningen 1992

1992 02

This series is related to *Option méditerranéennes, Série A. Séminaires méditerranées* = *Series A. Mediterranean Workshops of CIHEAM*

BIBLIOTHEEK  
LANDBOUWUNIVERSITEIT  
WAGENINGEN

CIP-data Koninklijke Bibliotheek, Den Haag

ISBN 90-220-1071-6  
NUGI 835

Copyright

© Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc), Wageningen, Netherlands, 1992.

All rights reserved. Nothing from this publication may be reproduced, stored in a computerized system or published in any form or in any manner, including electronic, mechanical, reprographic or photographic, without prior written permission from the publisher, Pudoc, P.O. Box 4, 6700 AA Wageningen, Netherlands.

The individual contributions in this publication and any liabilities arising from them remain the responsibility of the authors.

Insofar as photocopies from this publication are permitted by the Copyright Act 1912, Article 16B and Royal Netherlands Decree of 20 June 1974 (Staatsblad 351) as amended in Royal Netherlands Decree of 23 August 1985 (Staatsblad 471) and by Copyright Act 1912, Article 17, the legally defined copyright fee for any copies should be transferred to the Stichting Reprorecht (P.O. Box 882, 1180 AV Amstelveen, Netherlands). For reproduction of parts of this publication in compilations such as anthologies or readers (Copyright Act 1912, Article 16), permission must be obtained from the publisher.

Printed in the Netherlands.

# Contents

<b>Preface - M. Lasram</b>	1
<b>History of human brucellosis in Malta - P. Cassar</b>	3
<b>Session 1. The current epidemiological situation of human and animal brucellosis in Mediterranean countries</b>	
Brucelloses humaine et animales: Situation épidémiologique en France en 1990 - <i>B. Garin-Bastuji</i>	9
Epidémiologie de la brucellose humaine et animale en Grèce - <i>D. Yantzis</i>	25
Epidémiologie de la brucellose humaine et animale en Italie - <i>R. Farina, E. Andreani, G. Gargani, D. Cerri, M. Ramasco</i>	30
Epidémiologie de la brucellose humaine et animale en Maghreb - <i>N. Benhabyles, A. Benkirane, B. Boudilmi, S. Benchouk, H. Bouayoun</i>	36
La brucellose en Tunisie - <i>K. El Hicheri, S. El Bahri</i>	52
Brucellosis in cattle, sheep and goats - Malta - <i>C.L. Vella</i>	59
Epidémiologie de la brucellose animale et humaine en Espagne - <i>A. Rodriguez-Torres, R. Abad et A. Orduña</i>	63
Epidemiology of human and animal brucellosis in Turkey - <i>E. Istanbuluoglu</i>	75
<b>Session 2: Human brucellosis, its diagnosis and treatment</b>	
Intersectorial collaboration in brucellosis control programmes - <i>A. Mantovani, R. Palombino, F. Palumbo, M. Scorziello, O. Vitolini</i>	83
Antibiotic therapy for human brucellosis - <i>J. Ariza</i>	87
Laboratory diagnosis of human brucellosis - <i>R. Díaz, I. Moriyón, C. Gamazo, B. Alonso-Urmeneta &amp; M. de la Viuda</i>	93
Le diagnostic immunologique de la brucellose chronique - <i>A. Serre</i>	107
<b>Session 3: Prevention of brucellosis in animals: results achieved or anticipated; the role of veterinary services</b>	
Prevention of animal brucellosis ( <i>Brucella melitensis</i> ): The role of veterinary services - <i>P. Nicoletti</i>	113
Coordination des actions entre les services vétérinaires et les organismes d'éleveurs en France - <i>B. Dufour, F. Dion</i>	117
Coordination between breeders and veterinary services in Turkey - <i>A. Çoker</i>	123
Control of brucellosis in small ruminants in Spain - <i>J.M. Blasco</i>	125
Prophylaxis and control of brucellosis due to <i>Brucella melitensis</i> in Italy: acquired and expected results - <i>V. Caporale, D. Nannini, A. Giovannini, D. Morelli, M. Ramasco</i>	127
Lutte contre la brucellose animale à <i>B. melitensis</i> : Résultats acquis et attendus - <i>D. Yantzis</i>	146
Planning and management of brucellosis control programmes - <i>G. Papadopoulos</i>	152



Lutte contre la brucellose à *Brucella melitensis*: choix d'une stratégie. Résultats attendus - *M. Plommet* 160

**Session 4: Recent progress in the knowledge of *Brucella*: microbiology and vaccines**

Vaccins issus de la biotechnologie: Normes et directives applicables à leur enregistrement - *F. Milward & J. Lechenet* 169

Contrôle officiel du vaccin Rev.1 en France

Modalités - Critères - Sanction - *B. Garin-Bastuji* 176

Le vaccin Rev.1: Dérive des caractères d'immunogénicité et de virulence indépendante des marqueurs classiques - *N. Bosseray* 182

Contribution de la biologie moléculaire à la taxonomie du genre *Brucella* - *J.M. Verger et M. Grayon* 187

Evolution of *Brucella* - *E. Moreno* 198

Production et contrôle du vaccin Rev 1 - *R. Forletta* 219

Rev.1 and B19 vaccine control in Spain. Observations on the handling and effectiveness of Rev.1 vaccine and the immune response - *F. Garrido-Abellan* 223

Manufacture of brucellosis vaccines in Turkey. Quality control and field trials - *A. Çoker* 232

**Session 5: Recent progress in understanding the immune response: immunity and diagnosis**

Identification des antigènes protecteurs et mécanismes de la protection - *G. Dubray, J.N. Limet, M.S. Zygmunt, A. Cloeckaert, I. Jacques* 237

Identification et clonage des antigènes de diagnostic de la brucellose: perspectives d'application - *J.N. Limet, T. K-O Vo, C. Saegerman, L. De Waele, A. Tibor, A. Cloeckaert, P. de Wergifosse, J-M. Trunde, M. Zygmunt, J-J. Letesson and G. Dubray* 252

Industrial production of vaccines for brucellosis - *F. Milward* 265

Diagnosis of *Brucella melitensis* infection in small ruminants - *J.M. Blasco* 272

**Session 6: General conclusions**

Seminar report 281

Rapport de synthèse 285

## Preface

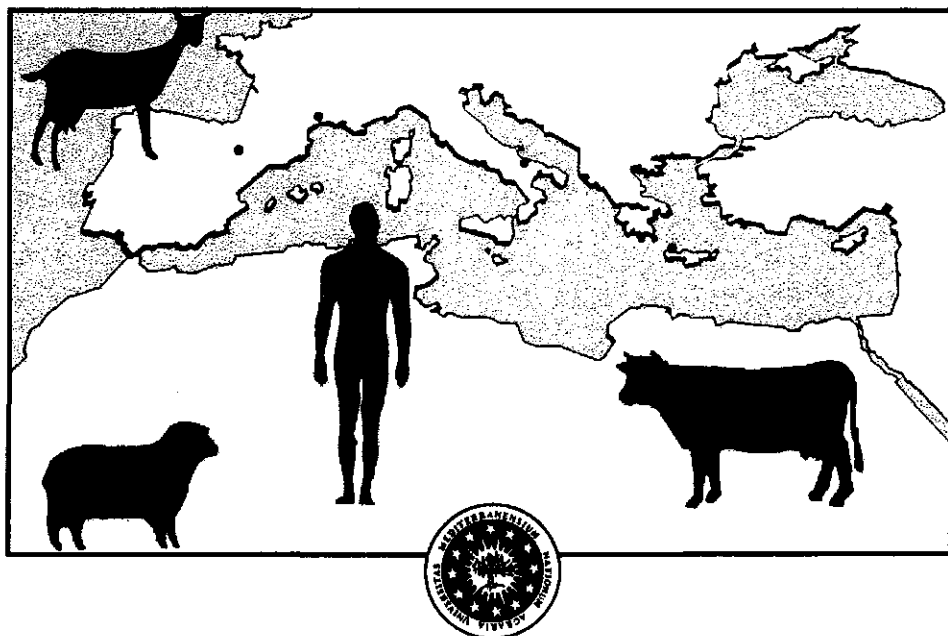
La Brucellose est, du point de vue économique, sans doute l'une des zoonoses les plus importantes dans le Bassin Méditerranéen, où elle reste endémique dans de nombreux pays. L'épidémiologie de cette maladie pouvant changer, d'une période à l'autre, il paraît utile de favoriser les rencontres périodiques entre les spécialistes de la question pour faire le point de la situation concernant l'incidence de la maladie chez l'homme et les animaux, débattre des programmes de prophylaxie et s'informer des nouvelles techniques mises au point pour le diagnostic et la vaccination.

Le CIHEAM, avec le concours de la Commission des Communautés Européennes, l'Office International des Epizooties et le Ministère de l'Agriculture de Malte, a organisé un séminaire méditerranéen, dont le compte-rendu est présenté dans cet ouvrage, portant sur le thème de la "lutte contre les brucelloses dans les pays méditerranéens".

Le choix de Malte pour tenir ce séminaire était justifié entre autres, pour des raisons historiques. A l'occasion de cette manifestation, deux éminents chercheurs, Prof. S.S. Elberg et Prof. G. Renoux, ont reçu la médaille d'or du CIHEAM en reconnaissance de leurs travaux sur les brucelloses.

L'objectif du séminaire était d'étudier l'évolution de cette maladie durant les dix dernières années, de présenter les résultats des travaux récents sur la lutte contre les brucelloses et de passer en revue les progrès réalisés par la recherche pour mettre au point des techniques nouvelles qui permettent d'améliorer l'efficacité des méthodes de lutte contre cette maladie.

Ces objectifs, de l'avis des participants au séminaire, ont été atteints.



Le tour d'horizon sur la situation concernant la Brucellose dans les pays méditerranéens a permis de constater que beaucoup de progrès ont été faits au niveau du contrôle de la Brucellose bovine. Pour la Brucellose ovine-caprine la situation est variable selon les pays, et si l'éradication dans certains pays avancés est possible à réaliser d'ici une dizaine d'années, il n'en est pas de même dans d'autres pays où la prévalence de la maladie demeure importante.

En matière de prévention de la Brucellose animale, la vaccination avec la souche Rev. 1, de l'avis des chercheurs présents, constitue une méthode efficace pouvant conduire à la quasi-éradication de la maladie, si les campagnes de vaccination sont rigoureusement conduites. Les systèmes d'élevage transhumant constituent néanmoins une contrainte sérieuse dans la maîtrise des transmissions de la maladie entre les troupeaux.

Enfin, les travaux de recherche présentés sur l'analyse des mécanismes immunitaires permettront à l'avenir d'améliorer les méthodes de diagnostic et de mettre au point de nouveaux vaccins.

Les discussions autour de ce séminaire ont montré combien le travail en équipe était nécessaire pour l'éradication de cette maladie. Nous espérons que le CIHEAM a pu contribuer à rapprocher les équipes de la région méditerranéenne.

Cet ouvrage rassemblant l'ensemble des communications présentées au séminaire permettra une diffusion plus large des informations auprès de tous ceux qui sont concernés, de près ou de loin, par la Brucellose.

A cet égard, je me dois d'exprimer de vifs remerciements à tous ceux qui ont apporté leur appui à l'organisation de ce séminaire, en particulier la Commission des Communautés Européennes (C.C.E.), l'Office International des Epizooties (O.I.E.), la Fondation Mérieux France, le Ministère de l'Agriculture de Malte et la Fondation des Etudes Internationales à Malte (F.I.S.).

*M. Lasram*

# History of human brucellosis in Malta

P. Cassar

*Consultant Psychiatrist and Medical Historian Saint Luke, Pope Alexander VII - Junction Delzan Valletta - Malta*

Brucellosis, previously called by such various names as Mediterranean, Remittent, Malta or Undulant Fever was until the third decade of this century one of the major causes of chronic illness and disability among humans in the Maltese Islands.

The first detailed clinical study of fevers in Malta, and of Mediterranean Fever in particular, was undertaken in 1860 by the British Army Surgeon J.A. Marston who was then stationed in Malta. His description of the manifestations, course, duration and complications of the illness is masterly. That he was so accurate is due in part to the fact that he himself suffered from the disease at the age of twenty-eight years during his stay in the island. Marston also clearly differentiated Mediterranean Fever from Enteric Fever.

The cause of the fever remained unknown until 1887 when the British Army Doctor (later Sir) David Bruce, with the collaboration of the Maltese doctor Giuseppe Caruana Scicluna, discovered that the disease was due to an infection by a germ which he called *Micrococcus melitensis*. He found this microbe in the spleen of a British soldier during his investigations on the nature of the disease at the Station or Military Hospital at Valletta.

Bruce's discovery, however, though of out-standing scientific value, did not lead to any practical measures for the control of the spread of the disease as the medical world had as yet no inkling as to where the microbe came from and as to the path along which it invaded the human body.

In 1904 a Commission of medical men was appointed by the British Admiralty, the War Office and the Malta Government in an endeavour to trace the source or reservoir of the microbe. The only member of this Commission was Dr. (later sir) Themistocles Zammit who then occupied the post of Government Analyst at the Public Health Department. Dr. Zammit had the intuitive flash, towards the end of 1904, that the goat might be susceptible to Mediterranean Fever. He put this idea to the test by means of experiments on a few goats; and on the 14th June 1905 he found that the blood of five out of six goats reacted to Mediterranean Fever by the agglutination test. On the 25th June he recovered the *Micrococcus* in pure culture from agar slopes. Meanwhile another member of the Commission - Major W.H. Horrocks RAMC - detected the microbe in the milk of the goat. The Commission then examined the blood of about one thousand goats and found that 50 % of these animals reacted to the serum agglutination test for Mediterranean Fever and that 10 % were actually excreting the microbe in their milk though the infected goat appeared to be quite healthy.

The importance of these facts becomes clear when one recalls that goats supplied practically all the fresh milk in the Maltese Islands. Indeed, in those days and for many years after -the herdsman or milkman brought his animals to be milked at the doorstep of the consumer in the villages and towns. It may be of interest to note that there is archaeological evidence that the goat has been in Malta as a domestic animal since neolithic times i.e. about 3000 years B.C.

In view of this association of the goat with Mediterranean Fever the Commission planned to examine the herds in certain areas with the intention of having those animals, that were discharging the germ in their milk, removed from the rest. The herdsmen, however, refused to allow samples of blood and milk to be taken from their animals for testing and finally went on strike in the second half of May 1906.

The British army and navy stationed in Malta were quick to realise the significance of Zammit's discovery and reacted to the crisis by prohibiting the use of goats' milk and products in their barracks and hospitals; and by replacing goats' milk by tinned or condensed milk. This step was attended by a striking diminution in the incidence of the fever of about 90 %. The British services never went back to the consumption of goats milk and Mediterranean Fever disappeared completely from among British soldiers and sailors.

In its efforts to eliminate the microbe from goats milk, the Commission found that if the milk was boiled, it was rendered harmless because heating it to a temperature of one hundred degrees centigrade killed the germ. On the strength of this finding, the Public Health Department endeavoured to persuade the civilian population to boil the milk before consuming it but this warning went unheeded for many years so much so that the incidence of Mediterranean Fever among the Maltese population underwent no diminution.

In the meanwhile Zammit's discovery was receiving confirmation from different parts of the world. From India, for instance, came news that the microbe had been isolated from the milk of goats supplying a Sikhs regiment where cases of the fever had occurred. In August 1906, the steamer *Joshua Micholson* shipped 65 goats from Malta for export to the USA. During the voyage, the milk was consumed by the captain and many of the crew with the result that an epidemic of the fever broke out on board.

In spite of all this evidence, doubts were expressed on the validity of the germ theory of Mediterranean Fever. Some insisted that the goat was blameless and pointed to the defective drainage system and the emanations from the drain ventilators as the source of the disease. The Public Health Department was criticized for crippling the goats industry by inducing people to drink condensed milk with the result, they said, that Maltese money was unnecessarily going abroad. They also accused the Department of scaring tourists away from Malta because of the risk of infection. The Public Health Department was undeterred by the criticism and persisted with the examination of the goat population -estimated at 20000 animals- and with the slaughter of the infected ones.

Opposition to Zammit's discovery persisted until 1916 when the critics finally accepted the goat-to-man transmission of the disease as an established and undisputed fact.

The slaughtering of goats and the constant appeals to the consumers to boil the milk before drinking it had produced no appreciable reduction in the incidence of the fever. In 1922 Prof. A. V. Bernard, later Chief Government Medical Officer, proposed the pasteurisation of milk on a national scale but this suggestion was not acted upon until the 11th May 1938. Following the pasteurisation of milk on a large scale the sale of raw milk was banned from the whole of Malta in April 1957 and from Gozo in 1964. Since then there has been a very marked decline in the incidence of human brucellosis during the past hundred years as the following figures of annual cases amply show :

1900 -	642
1922 -	1102
1942 -	456
1963 -	69
1983 -	17
1989 -	9

Thus the spectre of a very disabling disease has been laid down in the Maltese Islands and a safe and wholesome milk supply ensured for the whole population.

### References

Cassar P. . Medical History of Malta, London, 1965 - pp. 240 - 247.

Cassar P. . The Quest for *Brucella melitensis* . in Man and in the Goat. *Scientia* (Malta), 1964 - Vol. 30 pp. 102 - 109

Cassar P. . Sir Themistocles Zammit and the Controversy on the Goat's Role in the Transmission of Brucellosis 1909 - 16, Malta, 1981.

Demographic Review of the Maltese Islands 1989, Malta Central Office of Statistics 1990 p. 27.

Reports of the Commission for the Investigation of Mediterranean Fever, London 1904 - 6.

## **Session 1**

### **The current epidemiological situation of human and animal brucellosis in Mediterranean countries**

# **Brucelloses humaine et animales: Situation épidémiologique en France en 1990**

*B. Garin-Bastuji*

*Laboratoire National de Référence des Brucelloses Animales  
Laboratoire de Référence O.I.E. pour les Brucelloses Bovine, Ovine et Caprine  
C.N.E.V.A. - Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires  
B.P. 67, 94703 Maisons-Alfort Cedex, France*

## **Résumé**

La situation épidémiologique des brucelloses humaine et animales en France en 1989-1990 et son évolution depuis les dix dernières années sont présentées. Les programmes de lutte et leur évolution depuis dix ans sont également décrits. Si la situation sanitaire de la brucellose est au nord du pays extrêmement favorable, la situation au sud reste en revanche préoccupante, du fait notamment des structures d'élevage fondées largement sur la transhumance. L'endémie de brucellose à *B. melitensis* y est en effet fortement ancrée non seulement dans les cheptels de petits-ruminants mais aussi chez les bovins.

*Ce rapport est une synthèse de données publiées ou communiquées par le Ministère de la Santé, le Ministère de l'Agriculture, le CNEVA, l'INRA et la Fédération Nationale des Groupements de Défense Sanitaire du Bétail.*

## **Introduction**

Bien que des résultats considérables aient été obtenus dans l'éradication de la brucellose animale en 20 ans de prophylaxie réglementée et généralisée, cette maladie demeure en France un problème important notamment de santé publique mais surtout pour les pertes économiques qu'elle engendre directement ou indirectement pour la collectivité et l'élevage français.

## **Brucellose humaine**

La brucellose humaine est en France une maladie à déclaration obligatoire, inscrite au tableau des maladies professionnelles. La déclaration repose sur l'observation de signes cliniques de brucellose, associés à un isolement de *Brucella* ou à une conversion sérologique.

En 1989, 146 cas étaient déclarés, contre 208 en 1988. Le nombre de cas déclarés est en constante diminution depuis 1978, mais cette décroissance s'est ralentie depuis 1984 (Fig.1).

La répartition géographique est présentée sur la carte 1. La plupart des cas (42%) exercent une profession à risque, mais plus de 15 % des cas observés en 1989 sont liés à une contamination lors d'un voyage dans un pays du Bassin Méditerranéen. Les deux professions les plus fréquentes sont les agriculteurs (23 %) et les professionnels de la viande (13 %).



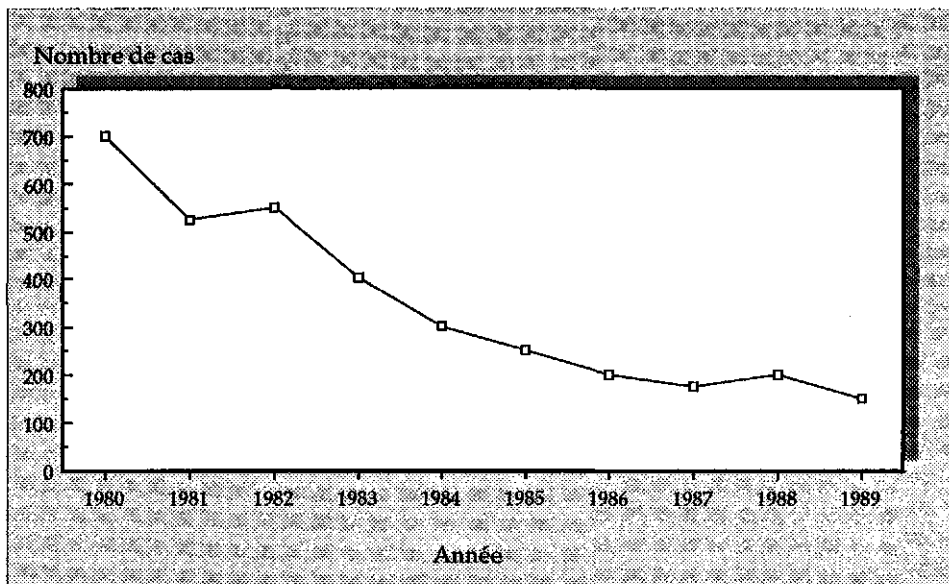


Figure 1. - Evolution du nombre de cas de brucellose humaine déclarés (1980-1989).

La majeure partie des cas sont des hommes (75 %) et la tranche d'âge la plus touchée est celle des 30-39 ans, classe composée essentiellement de professionnels à risque. Le mode de contamination des agriculteurs le plus fréquent est le contact avec des animaux infectés (56 %). Pour les personnes n'exerçant pas de profession à risque la consommation de fromage de chèvre est la première cause de contamination (54 %) puis viennent le contact avec les animaux infectés (18 %), la manipulation de fumier (18 %) ou l'absorption de lait de vache (16 %).

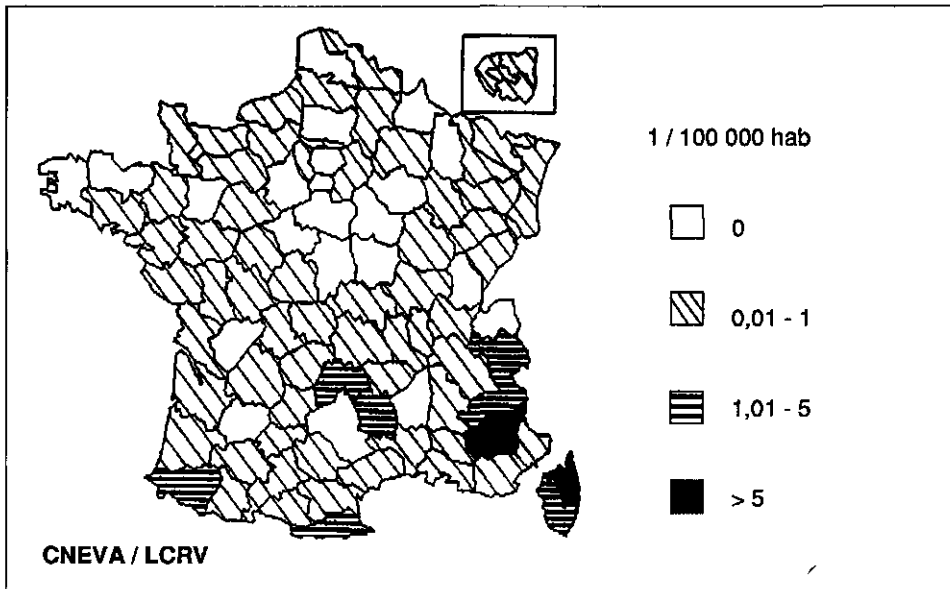
*B. melitensis* reste l'espèce la plus fréquemment isolée (65%). Aucune souche vaccinale utilisée en vétérinaire n'a été identifiée sur un prélèvement d'origine humaine. Les données épidémiologiques accompagnant les souches recouvrent globalement celles obtenues au travers des déclarations.

La brucellose humaine demeure en France largement sous-déclarée, mais il est possible de suivre la situation épidémiologique et d'évaluer l'impact sur la santé humaine des mesures prophylactiques mises en place par les Services Vétérinaires. La déclaration des cas est en diminution depuis 1971 et cette évolution est comparable à celle de la brucellose animale, notamment bovine. Les caractéristiques démographiques des cas de brucellose varient peu depuis 10 ans. La répartition par sexe, classe d'âge, activité professionnelle restent stables. Enfin, la proportion de contaminations par le fromage frais chez les cas non professionnels est en constante augmentation (53% en 1988-89 vs. 30% avant 1986).

Le coût économique et social de la maladie n'a pas fait l'objet d'études récentes, en raison vraisemblablement de la faible prévalence apparente de la maladie humaine.

## Brucelloses animales

Du fait de l'importance sanitaire, hygiénique et économique de cette maladie, un plan de lutte



Carte 1. - Taux annuel moyen d'incidence des cas de brucellose humaine déclarés (1988-1989).

contre la brucellose bovine a été mis en oeuvre dès 1968. La prophylaxie est devenue obligatoire et généralisée en 1975 chez les bovins, en 1977 pour les caprins et en 1981 pour les ovins. La lutte est dirigée par les Services Vétérinaires de l'Etat en collaboration avec les organismes techniques agricoles et vétérinaires.

Au plan financier, la prophylaxie des brucelloses animales demeure la plus coûteuse pour l'Etat (en 1989, plus de 18 millions de \$U.S. de subventions et indemnités aux éleveurs et aux laboratoires, et d'honoraires vétérinaires) et pour les autres partenaires (près de 30 millions de \$U.S.).

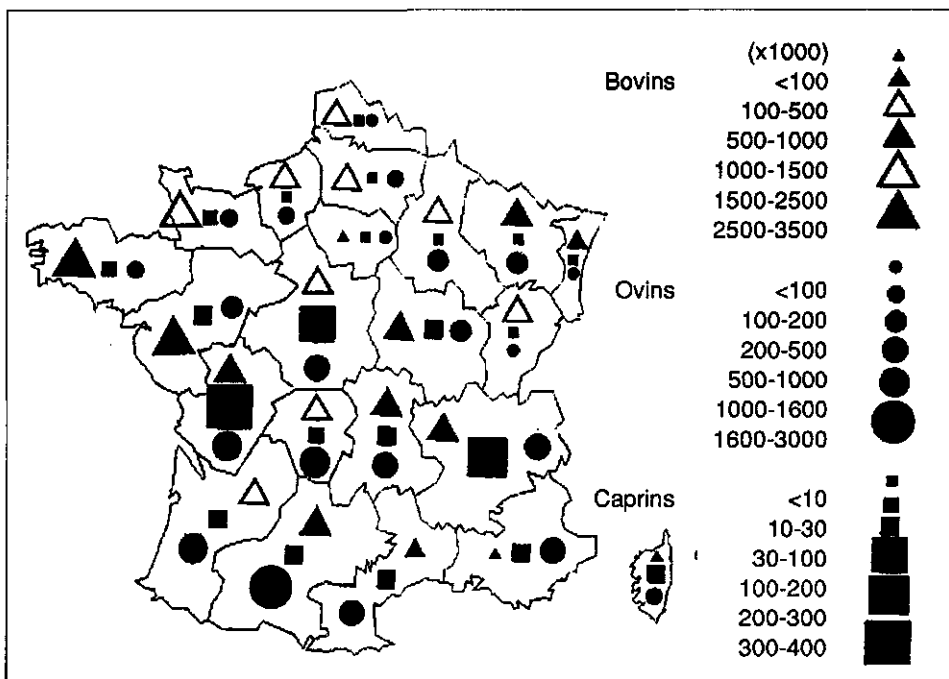
En 1989, la France comptait 16 305 214 bovins de plus de 12 mois répartis en 514 926 cheptels (Carte 2). Les cheptels ovins contrôlés étaient au nombre de 93 061 (6 129 626 animaux) et les cheptels caprins au nombre de 54 957 (955 593 animaux). Tous les bovins, et les ovins et caprins vaccinés, contrôlés ou transhumants sont obligatoirement identifiés individuellement.

## Brucellose bovine

### *Les mesures de lutte en vigueur*

Après plus de 15 ans de prophylaxie médico-sanitaire avec vaccination généralisée des jeunes femelles bovines, la prophylaxie de la brucellose bovine est depuis 1984 essentiellement fondée sur le dépistage, l'abattage et le contrôle.

L'objet de cette prophylaxie rendue plus sévère en 1990, est (1) la protection des effectifs bovins indemnes ou la qualification des cheptels assainis, et (2) l'assainissement des effectifs



Carte 2. - Répartition régionale des populations bovine, ovine & caprine en France en 1988.

bovins infectés, par l'application de mesures analogues quelle que soit la forme de brucellose constatée.

#### *Surveillance sanitaire et qualification des cheptels*

L'obtention de la qualification "officiellement indemne de brucellose" implique pour le cheptel que tous les bovins de plus de 12 mois subissent, en l'absence de toute manifestation clinique de brucellose, deux contrôles sérologiques favorables par l'épreuve à l'antigène tamponné (EAT ou Rose-Bengale) à 3-12 mois d'intervalle. Le maintien de la qualification est suspendu à un contrôle annuel favorable en EAT ou à 12 contrôles mensuels en ring-test sur lait de mélange. La qualification "indemne de brucellose" est délivrée lorsqu'il existe dans l'élevage des animaux vaccinés depuis moins de 3 ans (alors contrôlés à partir de 18 mois d'âge).

Par ailleurs, toute introduction de bovins dans ces cheptels, implique que ces bovins soient issus de cheptels qualifiés et négatifs individuellement en EAT et en fixation du complément (FC).

Enfin, la transhumance ou la mise en commun de troupeaux ne peut concerner que des cheptels qualifiés. Les cheptels ovins ou caprins conduits avec des cheptels bovins doivent être qualifiés indemnes ou indemnes vaccinés.

#### *Police sanitaire*

Il s'agit de dispositions très rigoureuses mises en application dans les cheptels où, soit un avortement brucellique a sévi, soit des résultats positifs aux épreuves allergiques, sérologiques

ou bactériologiques de dépistage de la brucellose sont apparus. Tout avortement est suspect et doit obligatoirement être déclaré, la femelle suspecte isolée et des prélèvements réalisés pour une recherche de brucellose. En cas de brucellose avérée (abortive ou non) les mesures suivantes sont prises :

- Visite, recensement et prélèvements sanguins sur les animaux de l'espèce bovine et des autres espèces sensibles présents dans l'exploitation;
- Isolement et séquestration de tous les animaux reconnus non indemnes (à test de dépistage positif), jusqu'à leur abattage;
- Marquage et abattage dans les 30 jours de tout (si plus de 5 % de séropositifs) ou partie des animaux non indemnes (y compris les veaux nés de mère infectée) dans un abattoir agréé (dans la section sanitaire avec saisie du sang, de la mamelle, des viscères et de leurs ganglions lymphatiques pour les femelles ayant avorté);
- Interdiction de sortie des animaux sensibles de l'exploitation, interdiction d'entrée dans les locaux ou sur les herbages d'animaux provenant d'autres exploitations;
- Désinfection des locaux, interdiction d'épandage et mise en interdit des pacages infectés (60 jours au moins) obligatoire après élimination;
- Traitement thermique du lait produit obligatoire;

#### *Assainissement et requalification*

Après élimination du dernier animal infecté, le contrôle sérologique en EAT et en FC reprend après 6 à 8 semaines. Si le premier contrôle est favorable (EAT et FC négatives) le cheptel est considéré comme assaini. Pour récupérer sa qualification, le cheptel doit subir encore deux contrôles favorables, le premier 6-8 semaines et le second 4-6 mois après la déclaration d'assainissement. Tout résultat positif entraîne l'abattage du bovin concerné et le maintien des mesures prévues au paragraphe de police sanitaire.

*Tableau I. - Brucella isolées chez les ruminants domestiques en France (1982-1990)  
(Données CNEVA-INRA)*

Espèce animale	<i>Brucella</i>	Biovar/souche	N	%	
Bovins	<i>B. abortus</i>	1	130	31,94	
		1/B19	3	0,74	
		2	6	1,47	
		3	168	41,28	
		4	6	1,47	
		6	2	0,49	
		9	4	0,98	
		<i>B. melitensis</i>	1	13	3,19
			3	75	18,43
			Total	407	
Ovins- Caprins	<i>B. melitensis</i>	1	6	8,96	
		1/ Rev.1	1	1,49	
		3	59	88,06	
		3	1	1,49	
	<i>B. abortus</i>	3	1	1,49	
		Total	67		

Enfin, les épreuves bactériologiques (sur le lait notamment), le ring-test individuel et l'épreuve cutanée allergique (Brucelline) peuvent être utilisées comme méthodes complémentaires pour accroître l'efficacité et la rapidité des assainissements.

### Bilan épidémiologique en 1989-1990

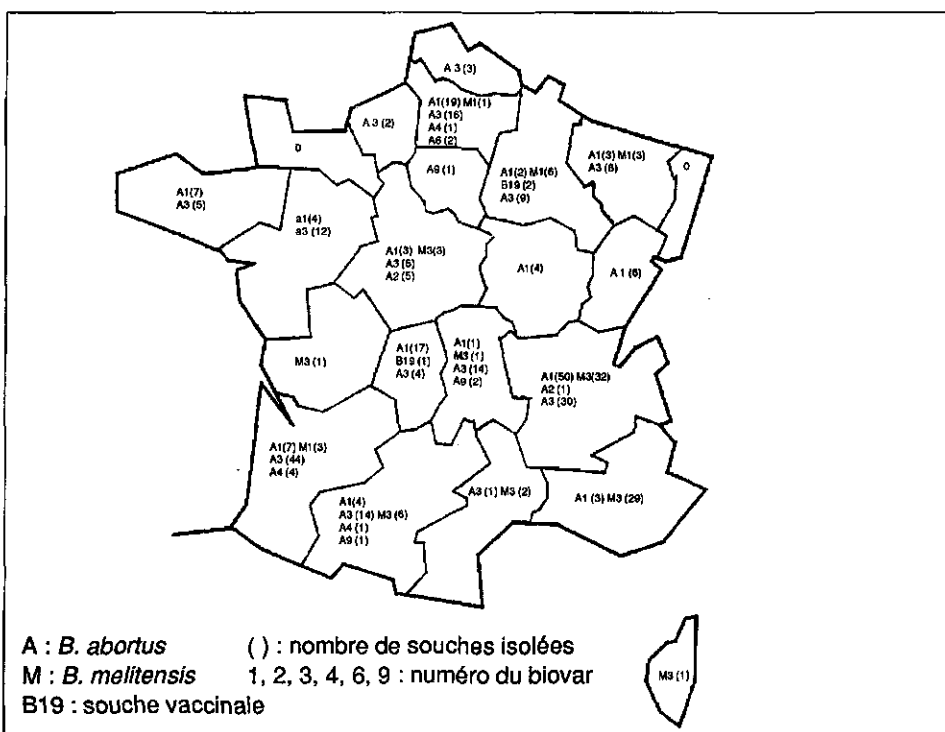
#### Avortements brucelliques

Au moment où la France a engagé la lutte (1968), près d'un avortement sur deux déclarés était d'origine brucellique. En 1990, le taux d'avortements brucelliques n'était plus que de 1,12 %, bien que le nombre d'avortements déclarés soit resté sensiblement le même.

#### Souches identifiées

Comme l'indique le tableau I, la très grande majorité des souches isolées chez les bovins appartiennent à l'espèce *B. abortus* (319 souches isolées de 1982 à 1990 vs. 88 pour *B. melitensis*). Cette proportion est en revanche largement inversée dans les zones sud du pays où l'infection des petits-ruminants par *B. melitensis* est endémique (Carte 3).

Les biovars les plus souvent rencontrés sont pour *B. abortus*, le biovar 1 et le biovar 3 et plus rarement les biovars 2, 4 et 9. Un isolat du biovar 6 a été identifié en 1988-89 dans le nord du pays. La distribution des biovars de *B. melitensis* correspond à celle observée pour les petits-ruminants, le biovar 3 essentiellement au sud, le biovar 1 au nord.



Carte 3. - Répartition régionale des souches de *Brucella* identifiées chez les bovins (1982-1990). (Données CNEVA-INRA)

### Prévalence de l'infection

Au début du programme de lutte, près de 50 % des cheptels étaient infectés pour seulement 0,55 % en 1990.

Le taux de prévalence des animaux infectés estimé au départ à 25%, n'est plus en 1990 que de 0,12%. Cette diminution, rapide dans les 10 premières années s'est ralentie dans les années 1980, notamment depuis l'arrêt de la vaccination généralisée en 1984 (Fig. 2) (510 000 vaccinations en 1983 vs. 9300 en 1990).

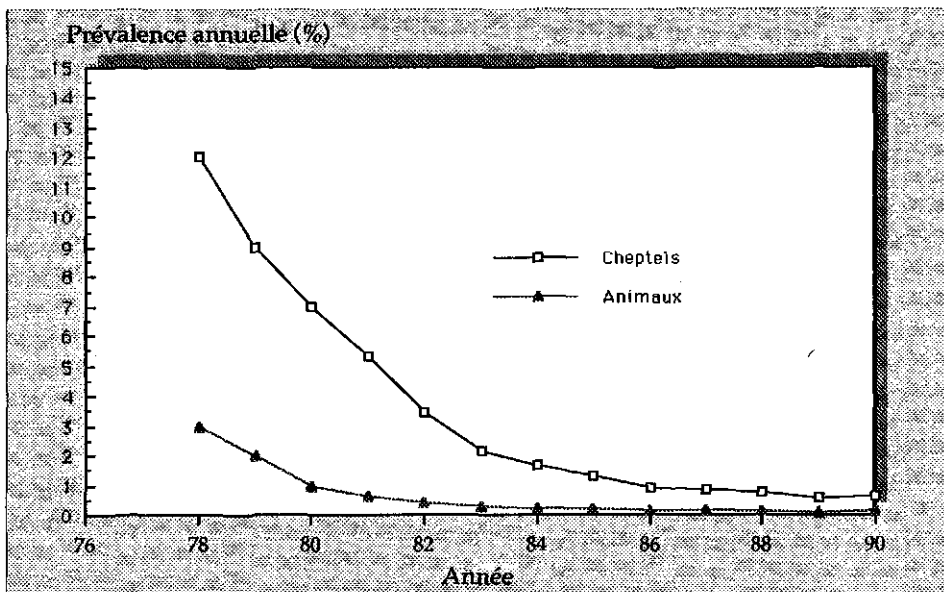


Figure 2. - Evolution de la prévalence annuelle de l'infection brucellique bovine (1978-1990).

### Distribution géographique

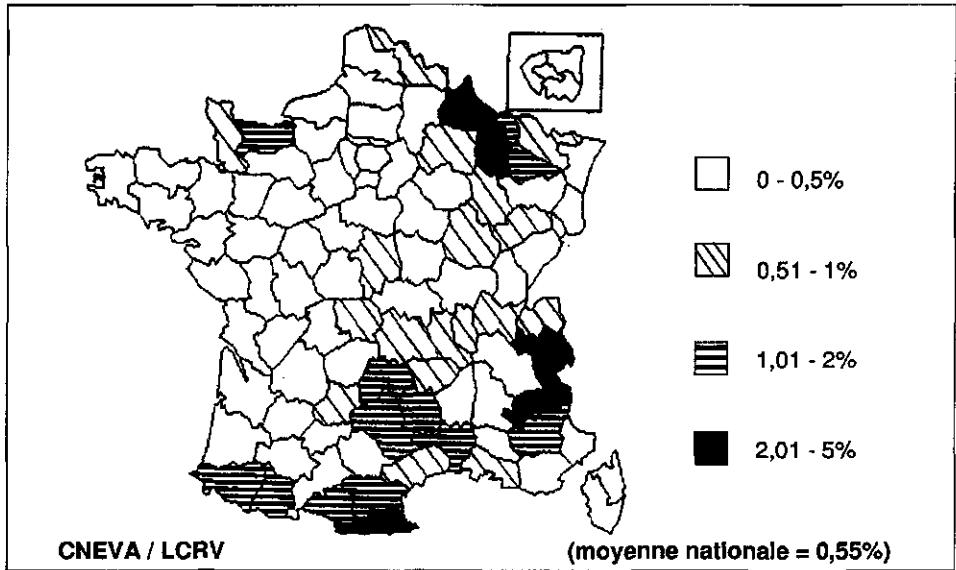
La distribution géographique de l'infection brucellique bovine est représentée sur les cartes 4 et 5, l'évolution des taux départementaux étant précisée au tableau 2.

Tableau 2. - Répartition départementale du taux annuel de cheptels bovins infectés (1978-1990).

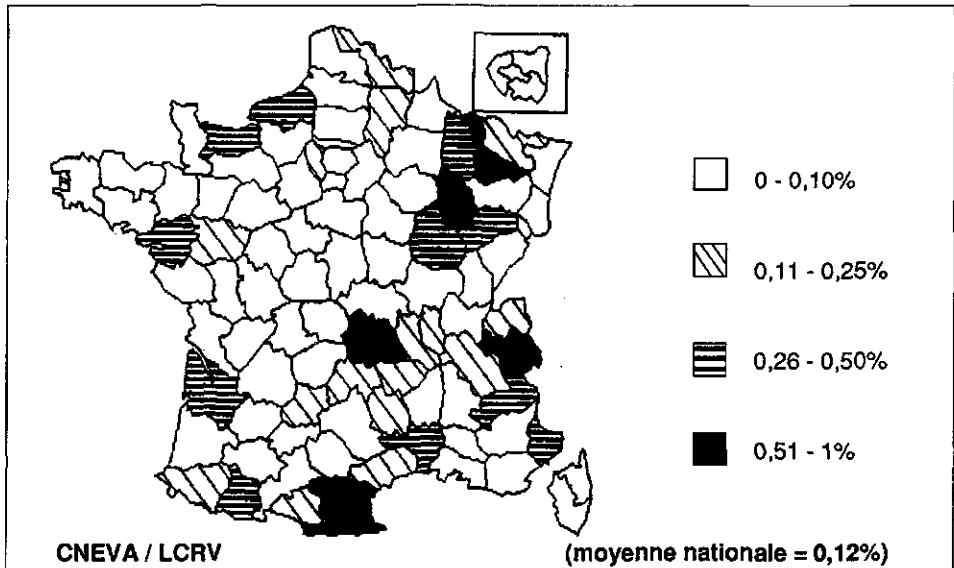
Taux annuel de cheptels infectés (T)	Nombre de départements par année								
	78	83	84	85	86	87	88	89	90
$T \leq 1\%$	6	24	40	53	58	64	68	74	80
$1\% < T \leq 3\%$	8	46	39	29	33	27	23	21	13
$3\% < T \leq 5\%$	12	16	9	7	2	2	3	1	3
$5\% < T \leq 10\%$	28	6	5	5	2	2	2	0	0
$T > 10\%$	37	1	1	0	1	1	0	0	0
France	12	2,1	1,7	1,3	0,9	0,8	0,8	0,6	0,55

Les zones encore particulièrement touchées sont le sud-est et l'extrême sud-ouest où sévit largement la brucellose des petits-ruminants. Dans le nord du pays, la Normandie et le nord-est connaissent encore des taux d'infection élevés.

Le tableau 2 traduit l'amélioration progressive du taux d'infection départemental des cheptels bovins.



Carte 4. - Prévalence annuelle des cheptels bovins infectés en 1990



Carte 5. - Prévalence annuelle des bovins infectés de brucellose en 1990

### *Abattages*

En diminution constante jusqu'en 1988, le nombre de bovins abattus a légèrement augmenté en 1989 et 1990. En fait, parallèlement la proportion d'animaux à sérologie négative et abattus et la proportion de cheptels soumis à abattage total ont également augmenté (taux respectifs pour 1990 : 63% vs. 35% en 1984 et 16,8 % vs. 5% en 1982).

Cette augmentation globale des abattages traduit vraisemblablement une sévérité accrue dans la conduite des assainissements comme l'indique par ailleurs l'augmentation du taux annuel d'assainissement des cheptels (64 % en 1990 vs. 53 % en 1987). Ce taux est calculé par le rapport du nombre de cheptels assainis sur le nombre total de cheptels infectés dans l'année.

### **Brucelloses ovine et caprine**

#### *Les mesures de lutte en vigueur*

Le programme de lutte mis en oeuvre en 1987, tenant compte de près de 10 ans de prophylaxie obligatoire chez les petits-ruminants se fonde sur les constats suivants :

- une zone très peu infectée dans le nord du pays où les troupeaux sont généralement sédentaires (foyers sporadiques non extensifs),
- une zone beaucoup plus touchée dans le sud où la transhumance représente un mode d'élevage largement dominant,
- un taux d'infection très faible des troupeaux caprins (généralement sédentaires) pour un taux plus important pour les troupeaux ovins ou mixtes (transhumants dans le sud).

Aussi, la prophylaxie est-elle strictement sanitaire pour les troupeaux caprins et au nord pour tous les petits-ruminants, sans vaccination, et avec dépistage et abattage des animaux infectés. Elle est, en revanche, de type médico-sanitaire au sud (zones dites "à risques") pour les troupeaux ovins ou mixtes, avec vaccination des jeunes par le vaccin Rev.1, et dépistage et abattage des animaux adultes infectés.

La prophylaxie exclusivement médicale (vaccin H38) est depuis 1987 interdite sur l'ensemble du territoire.

#### *Prophylaxie médico-sanitaire et qualification des cheptels*

Le contrôle sanitaire des troupeaux est réalisé par l'EAT confirmée par la FC, annuellement ou plus fréquemment selon le niveau de qualification des cheptels (Tabl. 3).

La vaccination des jeunes (2-9 mois chez les ovins et 3-6 mois chez les caprins) est réalisée dans les zones dites "à risques" pendant une période d'au moins 3 ans au moyen du vaccin Rev.1. Ces zones "à risques" sont les départements où existent, (1) des mouvements de transhumance intra- ou interdépartementale, et/ou (2) une proportion de cheptels infectés supérieure ou égale à 1%.

Lors d'introduction d'animaux, les cheptels d'origine doivent présenter des garanties égales ou supérieures à celles des cheptels de destination.

Les cheptels mis en commun lors de transhumance doivent être soumis à des mesures de prophylaxie équivalentes et titulaires de qualifications semblables.

#### *Police sanitaire*

Il s'agit de dispositions très rigoureuses mises en application dans les cheptels où, soit un avortement ou une orchite brucellique a sévi, soit des résultats positifs aux épreuves sérologiques ou bactériologiques de dépistage de la brucellose sont apparus.



Tout avortement ou orchite est suspect et doit obligatoirement être déclaré, la femelle ou le mâle suspect isolé et des prélèvements réalisés pour une recherche de brucellose.

En cas de brucellose avérée (clinique ou non) les mesures suivantes sont prises :

- Visite, recensement et prélèvements sanguins sur l'ensemble des animaux des espèces sensibles présents dans l'exploitation;
- Isolement et séquestration de tous les animaux reconnus non indemnes (à test de dépistage positif), jusqu'à leur abattage;
- Marquage et abattage dans les 30 jours de tout ou partie (selon la zone et le taux d'infection du cheptel) des animaux non indemnes dans un abattoir agréé;
- Transhumance et commerce interdits;
- Désinfection des locaux, interdiction d'épandage et mise en interdit des pacages infectés obligatoires après élimination;
- Traitement thermique du lait produit obligatoire;

Tableau 3. - Prophylaxie réglementée de la brucellose chez les petits-ruminants en France. Qualifications

Qualification	Caprins		Ovins		Mixtes		
	Indemne	Indemne	Indemne vacciné	Présumé indemne	Indemne	Indemne vacciné	Présumé indemne
Obtention	2 CST	2 CST ou 3 CSP	Rev.1 + 2 CST ou 3 CSP	Rev.1 (ou non) + 1 CST ou 2 CSP	2CST (Cp) + 2 CST (Ov) ou 3 CSP (Ov)	Rev.1 + 2CST (Cp) + 2 CST (Ov) ou 3 CSP (Ov)	Rev.1 (ou non) + 1CST (Cp) 1 CST (Ov)  ou 2 CST (Cp) + 2 CSP (Ov)
Maintien	CSP annuel	CSP annuel	Rev.1 évolue vers + CSP annuel	Transitoire + indemne ou indemne vacciné	CST (Cp) + CSP (Ov) annuels	Rev.1 évolue vers CST (Cp) + CSP (Ov) annuels	Transitoire  indemne ou indemne vacciné

- CST: contrôle sérologique de la totalité des animaux non vaccinés âgés de plus de 6 mois, ou des caprins (Cp) vaccinés de plus 12 mois, ou des ovins (Ov) vaccinés de plus de 18 mois (2 = 2 contrôles à 6 mois - 1 an d'intervalle)

- CSP: contrôle sérologique partiel et annuel des ovins: tous les mâles non castrés, les animaux nouvellement introduits et 25% des femelles ayant reproduit âgées de plus de 6 mois (ou plus de 18 mois en cas de vaccination). (3 = 3 contrôles annuels successifs).

- Rev.1: vaccination par la souche Rev.1 des ovins entre 2 et 9 mois ou/et des caprins entre 3 et 6 mois.

- La commercialisation de lait cru ou de produits au lait cru interdit les contrôles sérologique partiels.

- Les animaux vaccinés, contrôles par prise de sang, commercialisés, ou transhumants doivent être identifiés individuellement (N° individuel + N° de cheptel).

### Assainissement et requalification

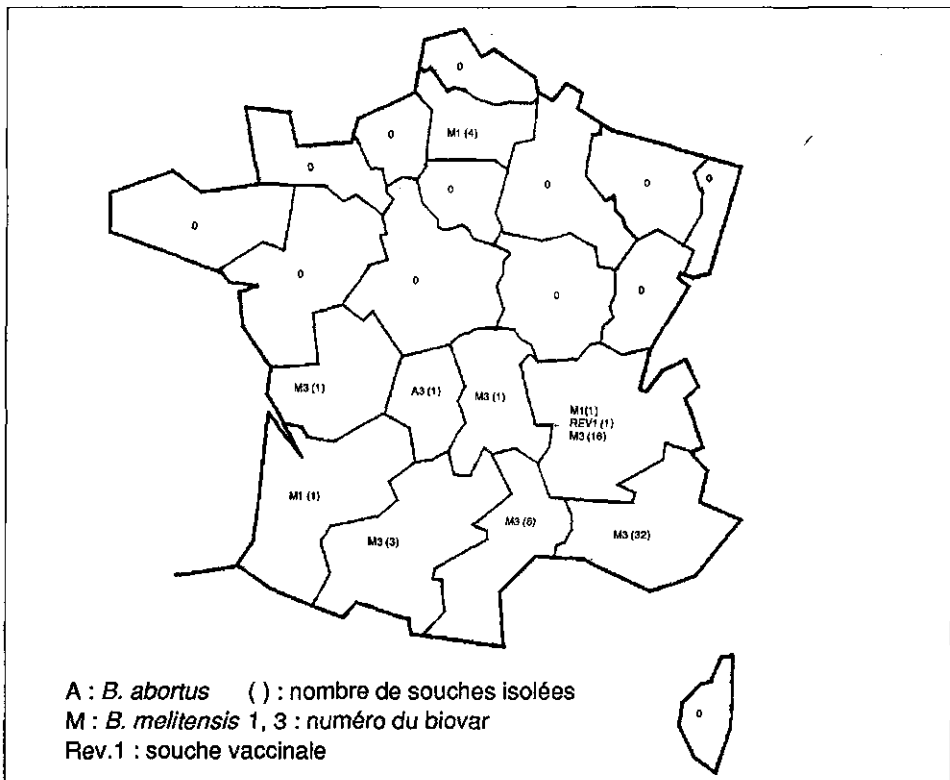
Après élimination des animaux infectés, le cheptel est recontrôlé tous les 2 mois, jusqu'à obtention de résultats favorables, puis deux fois à 6-12 mois d'intervalle pour requalification.

Tout résultat positif observé lors de ces contrôles entraîne l'abattage de l'animal concerné et le maintien des mesures prévues au paragraphe précédent.

### Bilan épidémiologique en 1990

#### Souches identifiées

Comme l'indique la carte 6, la quasi-totalité des souches isolées chez les ovins-caprins appartiennent à l'espèce *B. melitensis*. Un foyer caprin à *B. abortus* a pu être mis en évidence (brucellose latente) en 1990. Le biovar 3 de *B. melitensis* largement prédominant (89 %) dans le pays est quasi-exclusif dans le sud (97 %). Le biovar 1 est retrouvé surtout au nord. Le biovar 2 n'est plus isolé en France depuis plus de 10 ans.



Carte 6. - Répartition régionale des souches de *Brucella* identifiées chez les ovins et les caprins (1982-1990). (Données CNEVA-INRA)

#### Prévalence de l'infection

La brucellose est plus répandue chez les ovins que chez les caprins (Tabl. 4). L'évolution du taux de prévalence de l'infection des cheptels (Fig. 3) est difficile à apprécier. La sévérité accrue des contrôles depuis 1988 explique vraisemblablement l'augmentation constatée en

1989. Les taux de prévalence annuelle des cheptels et des animaux infectés diminuent régulièrement (0,41 % et 0,11 % respectivement en 1990 pour les caprins, 1,54 % et 0,19 % pour les ovins).

Tableau 4.- Données épidémiologiques relatives à la situation de la brucellose ovine et caprine en 1990.

	Ovins	Caprins
Effectifs totaux (1988)	12 091 000	1 115 000
Effectifs contrôlés	6 129 000	955 000
%	50,6	85,7
Cheptels indemnes / contrôlés (%)	58,81	77,42
Prévalence des cheptels (%)	1,54	0,41
Prévalence animaux (%)	0,19	0,11
Animaux vaccinés	247 000	4900 (mixtes)
Cheptels abattus en totalité/total (%)	2	18
Animaux séronégatifs abattus/total (%)	25	20
Taux annuel d'assainissement (%)	20	26

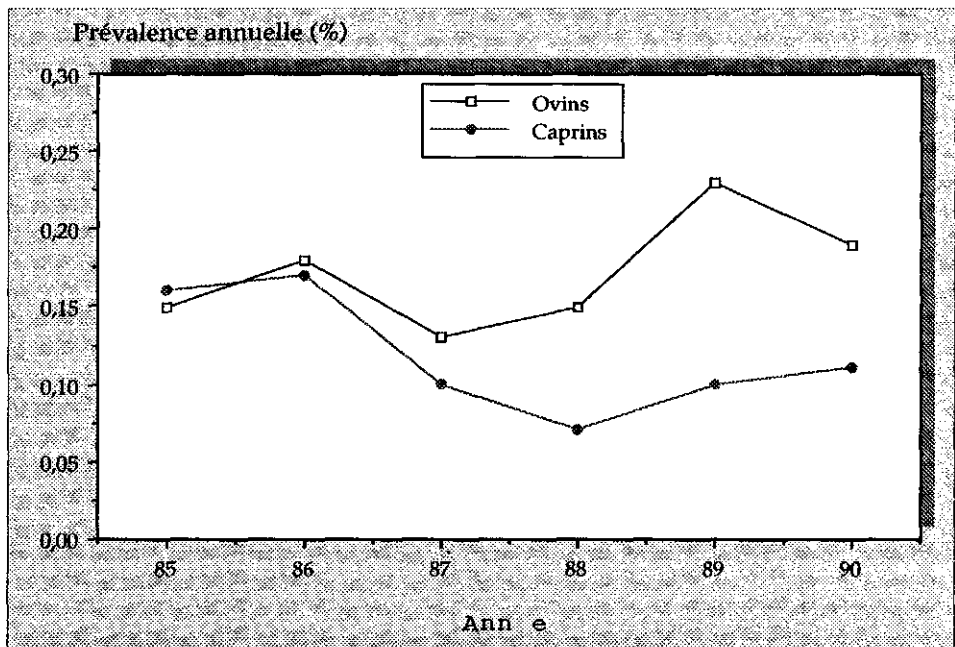


Figure 3. - Evolution de la prévalence annuelle de l'infection brucellique des ovins et caprins (1985-1990).

### *Distribution géographique*

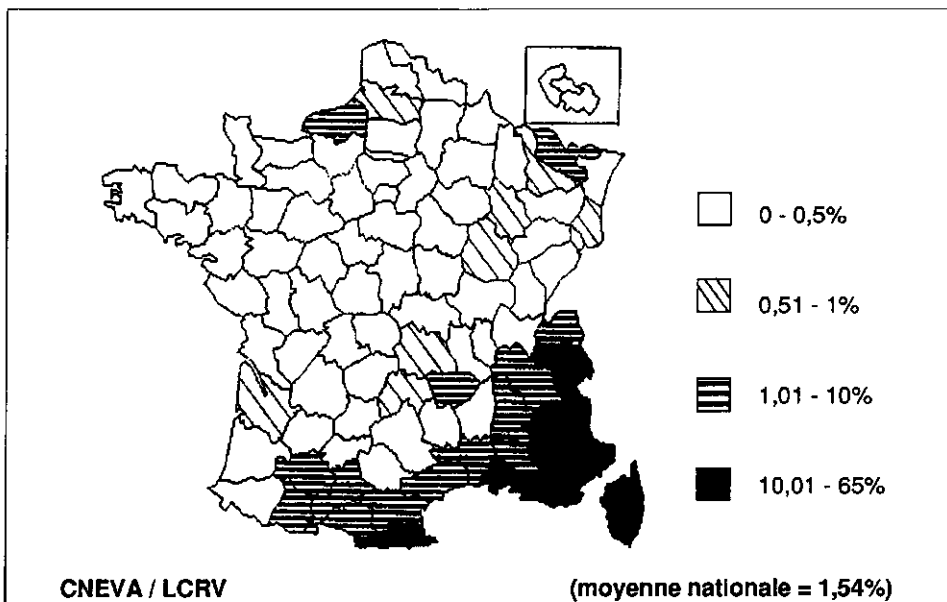
En fait, comme l'indiquent les cartes 7 à 10 suivantes, la plus grande partie du territoire est pratiquement indemne, l'infection étant surtout localisée dans l'extrême sud du pays, sur les bordures pyrénéennes, alpines et méditerranéennes, et de façon sporadique à l'est et au nord-ouest.

### *Abattages et vaccination*

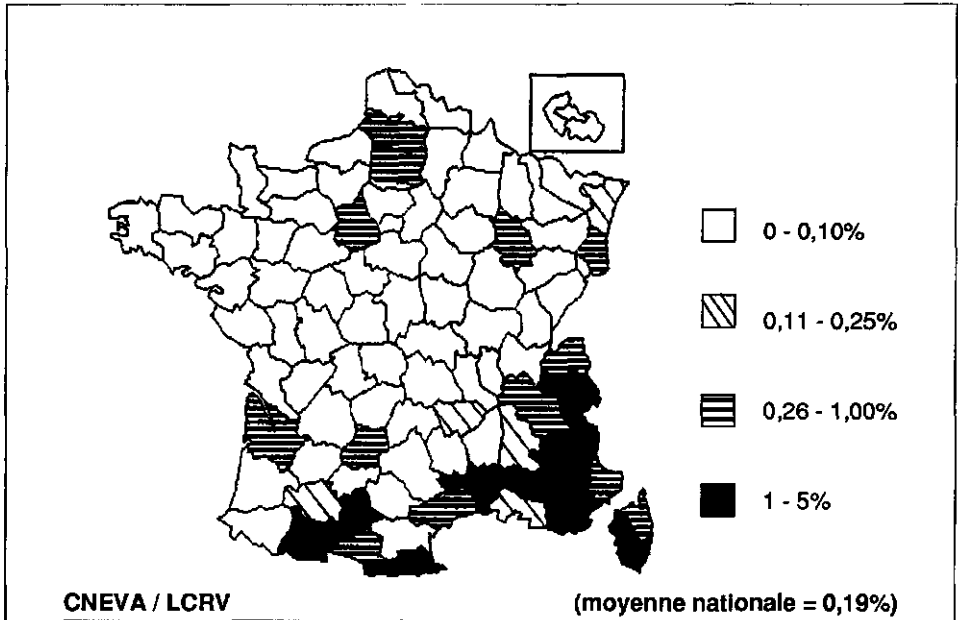
L'assainissement des cheptels a conduit à intensifier l'élimination chez les ovins en 1990 (19843 animaux abattus vs. 13284 en 1988 et 17038 en 1989) en rapport avec un renforcement de la lutte et la généralisation du dépistage depuis 1988 -plus de 81% des cheptels furent contrôlés par exemple en région sud-est en 1990 soit une augmentation de 172% en un an-. Ce chiffre est en revanche en légère diminution en 1989 chez les caprins (1434 vs. 2030 en 1988 et 1807 en 1989).

Le pourcentage d'abattages totaux est toujours plus élevé en 1990 chez les caprins (18 %) que chez les ovins (2 %), ce qui traduit une conduite généralement plus sévère des assainissements chez les caprins.

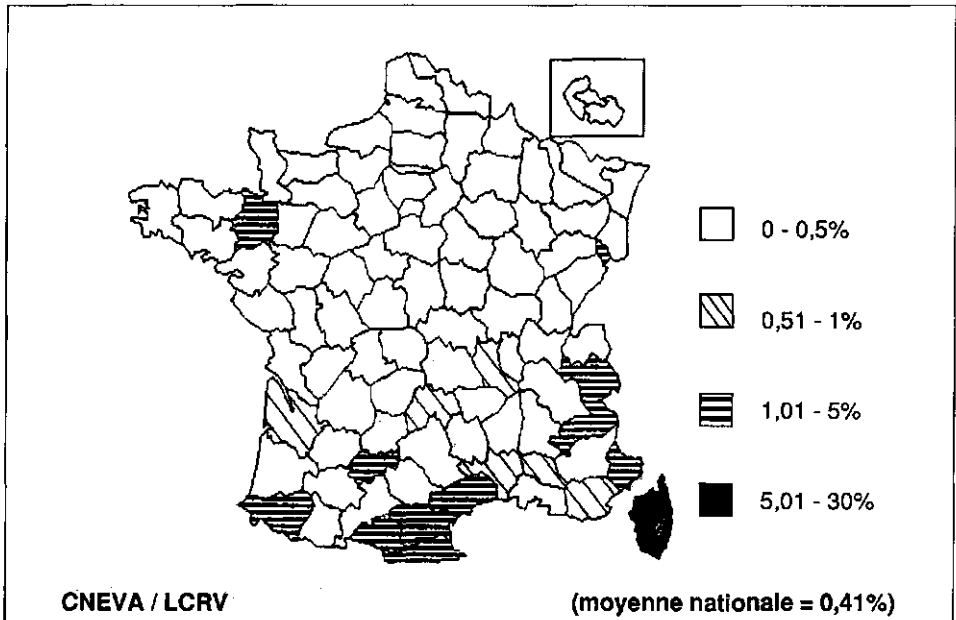
La vaccination continue d'être largement utilisée chez les ovins (247 000) animaux vaccinés en 1990 vs. 233 500 en 1988) beaucoup moins chez les caprins de troupeaux mixtes (4900). La couverture vaccinale atteint par exemple en région sud-est près de 80% des cheptels ovins.



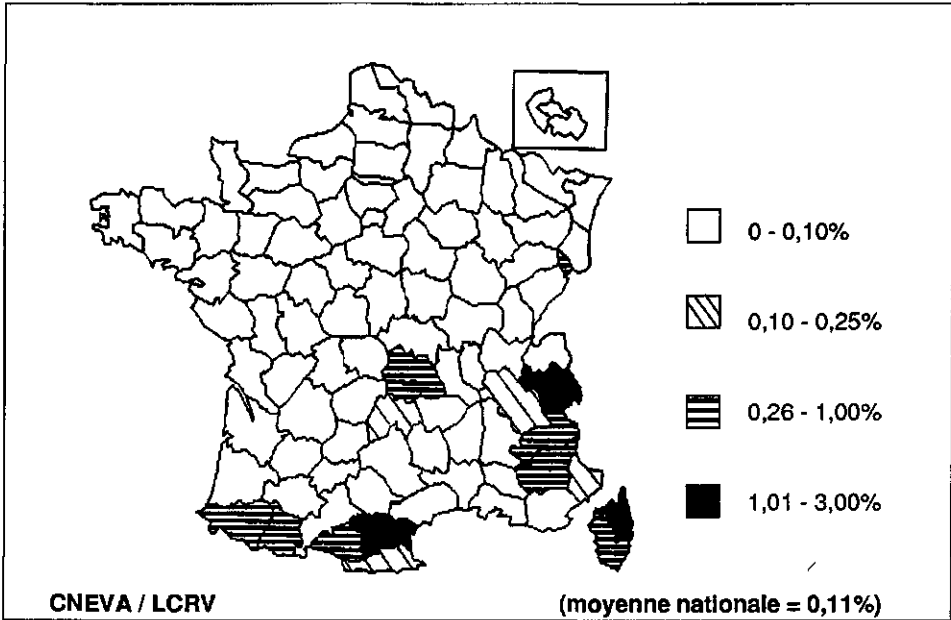
Carte 7. - Prévalence annuelle des cheptels ovins infectés en 1990



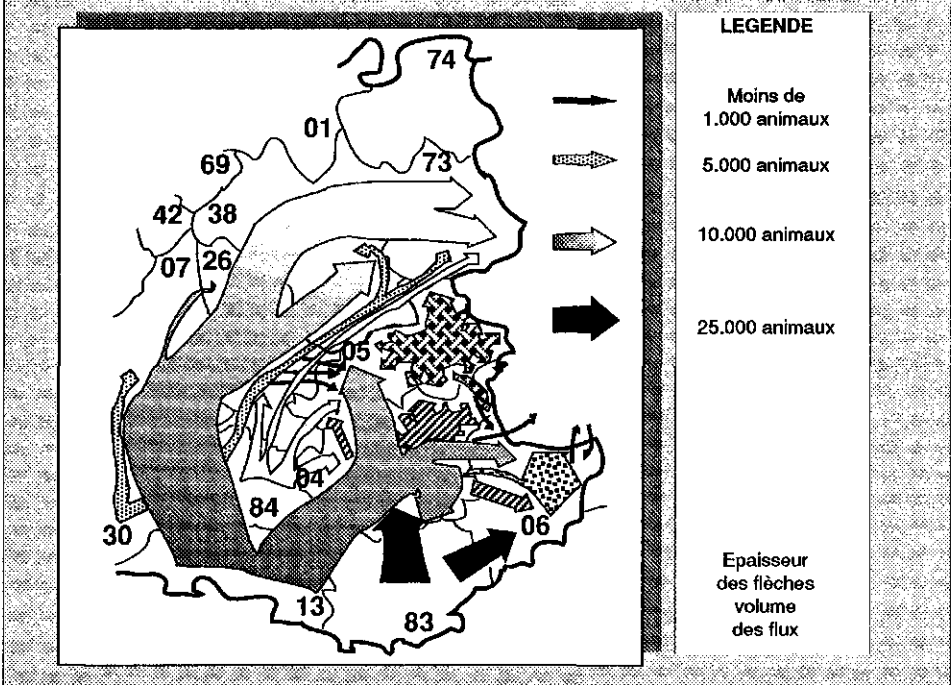
Carte 8. - Prévalence annuelle des ovins infectés en 1990



Carte 9. - Prévalence annuelle des cheptels caprins infectés en 1990



Carte 10 - Prévalence annuelle des caprins infectés en 1990



Carte 11. - Flux des ovins transhumant durant l'été 1989 au travers du massif alpin (Total = 520 000 animaux).

### *Transhumance*

La transhumance constitue une des difficultés majeures de la lutte contre la brucellose à *B. melitensis*. Elle favorise d'une part l'entretien de la maladie dans les troupeaux de petits-ruminants mais aussi la recontamination régulière des troupeaux bovins.

A titre d'exemple, la transhumance concerne en région sud-est près de 520 000 animaux (Carte 11). Ces troupeaux transhument fréquemment entre départements dont la situation sanitaire et vaccinale est très inégale. Aussi, les organismes d'élevage et les services vétérinaires ont-ils décidé depuis 1989 la mise en place progressive d'une gestion sanitaire des alpages (zones de rassemblements de troupeaux en montagne) avec suivi des troupeaux migrants et des troupeaux d'accueil.

### **Conclusion**

La situation épidémiologique de la brucellose humaine s'améliore d'année en année et les caractéristiques démographiques de la population atteinte restent stables (40% en moyenne de cas dûs à une exposition professionnelle). Chez les bovins, la situation continue de s'améliorer, notamment au nord où la maladie est pratiquement éradiquée. Aussi, la prophylaxie bovine est-elle depuis plus de 5 ans presque exclusivement de type sanitaire. Les problèmes liés aux formes latentes de la maladie et aux mouvements non contrôlés d'animaux ralentissent cependant en certains endroits l'avancement de l'éradication. Au sud, la brucellose bovine est majoritairement due à *B. melitensis*, dans une zone où la brucellose ovine et caprine est fortement ancrée. Chez les petits-ruminants, la situation au nord est là encore extrêmement favorable. Au sud, de larges efforts sont entrepris depuis plus de 3 ans pour généraliser l'identification, la couverture vaccinale et le contrôle sanitaire des cheptels. Des efforts tout aussi considérables devront être conduits dans les années à venir pour parfaire cette généralisation mais aussi pour arriver à un meilleur contrôle de la transhumance, économiquement indispensable à l'élevage, mais aussi facteur primordial de diffusion et d'entretien de l'infection dans les cheptels.

### **Références**

- FRGDS PACA, 1990-1991. Politique régionale Provence-Alpes-Côte d'Azur de lutte concertée contre la brucellose ovine, comm. pers.
- Note de Service DGAI / SVSPA n°91 / N°8132 du 16 juillet 1991. Exploitation du rapport annuel 1990.
- Rufat P., Merlin P., Cluzan S. et Hubert B., 1990. La brucellose en France en 1988 et 1989, Bull. Epidemiol. Hebd., N°36, 155-157.
- Toma B., 1990. La brucellose animale en France en 1989. Epidemiol. Santé anim., N°18, 87-96.

# Epidémiologie de la brucellose humaine et animale en Grèce

D. Yantzis

Institut Vétérinaire des Maladies Infectieuses et Parasitaires, 66, rue du 26 octobre  
546 27 Thessalonique-Grèce

## Brucellose humaine

La relation historique la plus ancienne, est probablement celle d'Hippocrate, qui, vers 450 avant J.C., décrit, en Grèce, dans l'île de Thassos, une maladie ressemblant à la brucellose humaine contemporaine.

Il semble donc probable que, l'infection due à *B. melitensis* est présente dans le Bassin Méditerranéen et au Moyen Orient, depuis les débuts de la domestication du mouton et de la chèvre par l'Homme (1).

La brucellose chez l'homme a été observée, pour la première fois, en 1903. Depuis cette année, quelques cas de la maladie ont été présentes dans toute la Grèce (6).

Dans mon pays, la brucellose sévit historiquement à l'état endémique et provoque des grands dommages à l'élevage et met en danger la santé publique. Elle est une maladie soumise à la déclaration obligatoire.

En Grèce, la source de contamination de l'homme est essentiellement caprine et ovine.

Il faut dire que, la majorité des souches qui ont été isolées chez l'homme et identifiées appartiennent à la *B. melitensis* (80 à 90 %) (6).

Pendant les années 1980 à 1990, le nombre de cas de brucellose humaine, déclarés chaque année et l'indice de morbidité (nombre de cas pour 100 000 habitants), sont reportés sur le Tableau 1; la Figure 1 nous montre l'évolution de cas de la brucellose déclarés.

Tableau 1. Nombre des cas brucelliques humaines déclarés au cours des années 1980 à 1990 et l'indice de morbidité.

Année	Nbre de cas brucelliques	Indice de morbidité
1980	1081	12,0
1981	848	9,8
1982	674	6,9
1983	558	5,6
1984	514	5,1
1985	485	4,8
1986	444	4,4
1987	345	3,4
1988	269	2,6
1989	230	2,3
1990	187	1,8



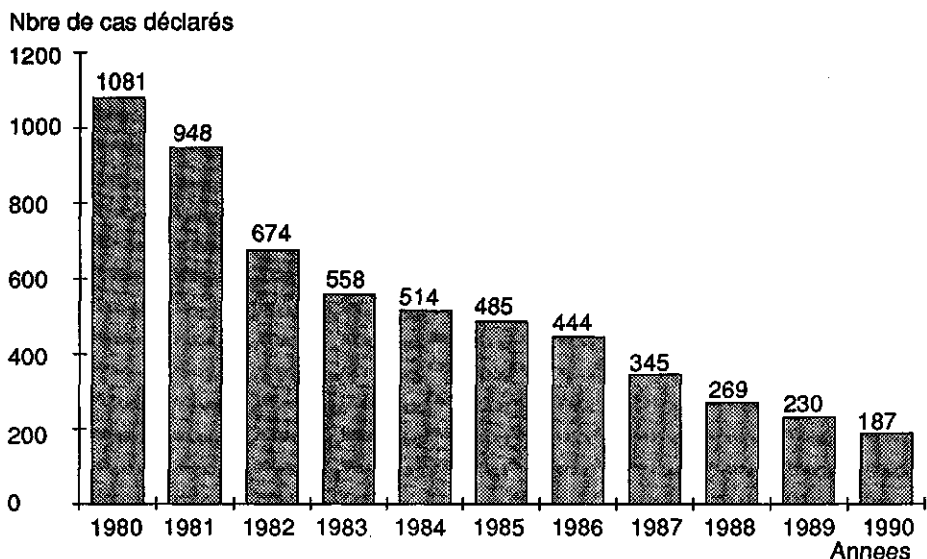


Figure 1. Evolution de cas de brucellose humaine déclarés au cours des années 1980 à 1990.

Le Tableau 2 et la Figure 2 nous donnent la répartition et l'évolution mensuelle moyenne de cas de brucellose humaine, déclarés au cours des années 1980 à 1990.

Dans la Figure 2, on note deux périodes d'incidence élevées :

- un pic important pendant des mois de Mars-Avril-Mai.
- un second pic, moins important, pendant Juin-Juillet-Août.

En effet, au cours du printemps, on est en pleine période de lactation; et les contacts avec les animaux infectés se multiplient pendant les vacances d'été et la consommation de produits laitiers locaux augmente.

La maladie a une prédominance masculine (66,6 %) au sein de la population rurale (éleveurs-agriculteurs); en revanche, chez les habitants urbains (d'autres qu'éleveurs-agriculteurs), une prédominance féminine (75,7 %) (5).

Parmi les malades, on note une nette prédominance de l'atteinte adulte 87,8 % en moyenne - de 15 ans jusqu'à 65 ans (4).

Tableau 2. Répartition mensuelle moyenne de cas déclarés, au cours des années 1980 à 1990.

Mois/ Années	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
1980 à 1990	46	61	108	118	136	122	93	82	64	43	31	26

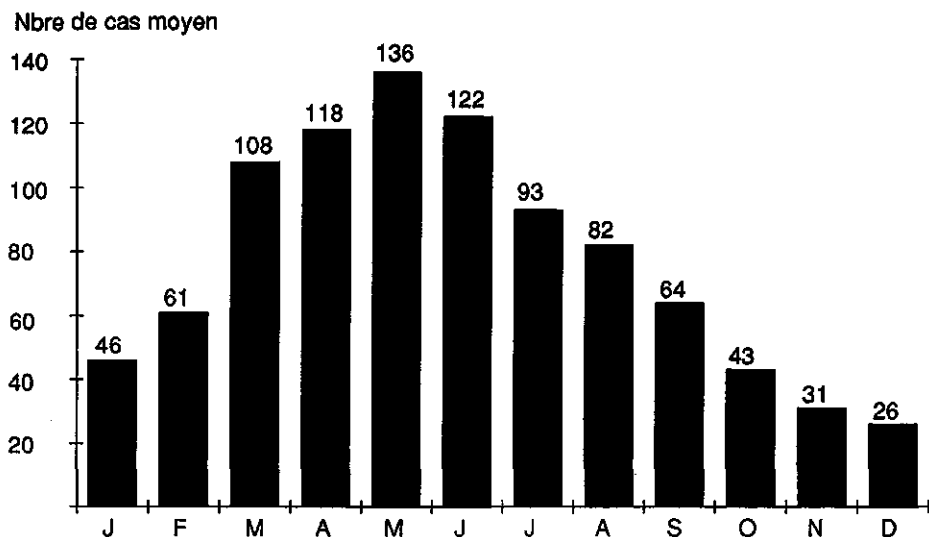


Figure 2. Evolution de la répartition mensuelle moyenne de cas déclarés au cours des années 1980 à 1990.

La répartition régionale de la brucellose n'est pas uniforme. Les régions les plus affectées sont Macédoine, Thrace Thessalie, et Epire.

Au point de vue économique, pendant les années 1980-1984, Stefanou et Violaki-Paraskeya (4), avaient estimé les pertes économiques de la brucellose humaine, qui atteint, environ, la somme de 210.343.440 drachmes.

### Brucellose ovine et caprine

La brucellose ovine et caprine, est depuis longtemps considérée comme l'une des maladies le plus graves, qui sévissent dans les pays de la région Méditerranéenne, où s'élève une population extrêmement importante de moutons et de chèvres.

En ce qui concerne l'élevage des petits ruminants, dans notre pays, il y a environ 8.000.000 des moutons et 4.000.000 des chèvres, répartis sur 110.000 troupeaux.

Généralement, les chèvres et les moutons ne sont pas élevés dans les établissements agricoles, c'est à dire dans des "fermes" comme par exemple les bovins. On vit pendant l'été, le printemps et l'automne dans les montagnes et pendant l'hiver dans les vallées où les conditions du climat sont agréables.

Les études réalisées au plan régional, ont montré une grande variation dans la prévalence et l'étendue de la maladie.

Pendant les années 1960-1970, le taux d'infection a été 11,12 % pour les caprins et 22,36 % pour les ovins (3).

En 1984-86, on a procédé à une enquête sérologique pour déterminer le taux d'infection et la répartition géographique de la brucellose de la chèvre et du mouton. Des prélèvements de sang ont été effectués, selon un échantillonnage basé sur les règles statistiques et en provenance de troupeaux de toutes les régions du pays.

Ainsi, la recherche a montré que le pourcentage d'infection est 3,4 % pour les moutons et 2,7 % pour les chèvres. Mais, la brucellose de petits ruminants continue à poser un grand problème dans notre pays.

Il faut préciser que les souches de *Brucella* d'origine ovine et caprine appartiennent à l'espèce *B.melitensis*. Le biovar 3 prédomine, suivi par 1 et 2.

Le premier cas de la brucellose ovine en Grèce, dû à *B.melitensis*, a été signalé en 1931 (2).

### Brucellose bovine

En ce qui concerne la brucellose des bovins, les souches de brucella d'origine bovine qui ont été isolées et identifiées à partir de prélèvements foetaux, placentaires ou du lait, appartiennent à *B.melitensis* et *B.abortus*. Le biovar 3 de *B.abortus* prédomine. Les souches de brucella isolées des bovins en étable appartiennent, essentiellement, à l'espèce *B.abortus*. De l'autre côté, des animaux qui séjournent en prairie, en contact avec les troupeaux de petits ruminants les souches isolées, sont *B.melitensis* ou *B.abortus* (7).

Le Tableau 3, nous montre le pourcentage de positivité des animaux et des exploitations bovins, pendant les dernières dix années, dans l'ensemble du pays.

Tableau 3. Pourcentage de positivité chez les bovins.

Année	% de positivité/animaux	% de positivité/exploitations
1980	1,22	2,35
1981	1,19	1,80
1982	0,82	1,36
1983	0,61	1,03
1984	0,51	0,77
1985	0,55	0,89
1986	0,46	0,74
1987	0,55	0,67
1988	0,75	0,76
1989	0,89	0,74
1990	0,70	0,70

### Brucellose porcine

Des souches de *B.melitensis* ont été isolées à partir de prélèvements foetaux et placentaires de porcins (8).

### Références

1. Alton G.G., Fensterbank R., Plommet M., Verger J.M., (1984) La brucellose de la chèvre. Ed. INRA Publ., n° 28, 69-91

2. Ananiadés B., and Miaoulis N. (1931) Avortement épizootique des brebis en Grèce. Extrait de la Revue Générale de Médecine Vétérinaire.
3. Karvounaris P., and Papakyriakou E., (1971) Recherche sur l'épizootologie de la brucellose de la vache, de la chèvre et du mouton en Grèce par la méthode de séroagglutination lente. Proc.4th Nat.Sympos.Bacter., Athens, 114-116.
4. Stefanou Th., Violaki-Paraskeya M., (1987) Epidemiological observations on brucellosis in Greece. Acta Microbiologica Hellenica, 32, 300-324
5. Vouyoukas A., Yantzis D., Kalligatsis C., Kolokotroni Desp., Kastanidou Chr., Kiosses V., and Dourvas G. (1987) The treatment of human brucellosis with a more succesfull therapeutic schedule. Galenus, 29, 643-654.
6. Yantzis D., (1985) Brucella Melitensis in Greece : Current situation report. Brucella melitensis ; Verger J.M., Plommet M., editors,43-46
7. Yantzis D., et Kastanidou Chr., (1990) Isolation and identification of brucella strains coming from cattle. Bull.Hellenic Vet.Med.Soc., 41 : 35-39.
8. Yantzis D., et Kastanidou Chr., (1990) Isolation of Br.suis in embryos. First case in Greece. Bull.Hellenic Vet.Med.Soc., 42 : 100-106.

# Epidémiologie de la brucellose humaine et animale en Italie

R. Farina - E. Andreani - G. Gargani - D. Cerri - M. Ramasco

Università di Pisa, Dipartimento di Pathologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Viale delle Piage 2, 56100 Pisa, Italia

La brucellose représente encore aujourd'hui un problème d'une importance primordiale du point de vue zooéconomique et social en Italie. Par rapport au passé, la situation s'est nettement améliorée aussi bien chez les animaux que chez l'homme, grâce surtout à la vaccination obligatoire avec Rev.1, effectuée durant de nombreuses années dans les élevages ovins et caprins et à la réalisation du plan national d'éradication de la brucellose ovine.

L'Italie est depuis toujours à l'abri de la brucellose porcine due à *Brucella suis*, de même la présence de *B. ovis* et *B. canis* n'a pas été signalée.

La très grande majorité des foyers d'infection apparaît encore dans les élevages d'ovins et de caprins (où ils sont causés presque exclusivement par *B. melitensis* biovar 2) et, dans une moindre mesure, dans les élevages de bovins et de buffles et sont provoqués par différents biovars de *B. abortus* et assez souvent par *B. melitensis* 2.

Ces dix dernières années nous avons effectué, dans nos laboratoires, le typage de 433 souches de *Brucella* identifiées chez les animaux et chez l'homme dans 14 régions du pays. Les résultats de ce typage, reportés dans le Tableau 1, reflètent très bien la situation épidémiologique de la brucellose en Italie. Nous pouvons observer que :

- *B. melitensis* 2 est répandue sur tout le territoire national, mais particulièrement dans le

Tableau 1. Identification de 433 souches de *Brucella* isolées en Italie durant la période 1981-1990.

Biovars	Homme	Bovins	Buffles	Brebis	Chèvres	Chiens	Origine inconnue	Totaux
melitensis 1	-	-	-	-	2	-	-	2
melitensis 2	219	23	1	104	13	2	10	372
abortus 1	2	26	4	-	-	-	-	32
abortus 2	-	4	-	-	-	-	-	4
abortus 3/6	-	7	1	5	1	-	9	23
Totaux	221	60	6	109	16	2	19	433

131 souches (84 humaines et 47 animales) ont été classées comme "atypiques"

Sud continental et en Sicile. De nombreuses souches (131 sur 433) ont été classées comme "atypiques" du fait de leur sensibilité à la thionine, au bactériophage Wb et de la production de grandes quantités de H<sub>2</sub>S. On peut considérer ces propriétés, qui sont parfois associées entre elles, comme des marqueurs épidémiologiques des souches italiennes ;

- comme il fallait s'y attendre, *B. melitensis* s'avère responsable d'infection chez beaucoup d'animaux (ovins, caprins, bovins, buffles, chiens) ainsi que chez l'homme ;
- particulièrement importante est la fréquence avec laquelle *B. melitensis* 2 est responsable d'infection chez les bovins. Sur les 23 souches identifiées chez ces animaux, 22 proviennent des régions méridionales et des îles où les foyers de brucellose bovine due à *B. melitensis* sont assez nombreux ;
- des deux souches identifiées comme *B. melitensis* 1, la première a été obtenue à partir d'une chèvre importée de France et la deuxième, isolée à partir des testicules d'un chevreau ayant une orchite, s'est révélé Rev.1 (Tolari e Salvi, 1980). Cela confirme que *B. melitensis* 1 est pratiquement absente en Italie et que toutes les souches identifiées comme telles doivent être soumises à des recherches supplémentaires pour une différenciation d'avec la souche Rev.1. ;
- *B. abortus* 1 a été identifiée chez des bovins et des buffles dans plusieurs régions de notre pays, *B. abortus* 2 chez des bovins de Sicile seulement ;
- *B. abortus* 3 et 6 se différencient, comme chacun sait, uniquement par la propriété de se développer ou non en présence de thionine 1/25.000; c'est pourquoi, d'un point de vue épidémiologique, il semble préférable de considérer les deux biovars 3 et 6 comme un seul biovar (Tolari et Al., 1981). Celui-ci est plus fréquent dans les régions méridionales où il infecte surtout les bovins; le contact étroit entre bovins et petits ruminants peut toutefois faciliter la transmission de l'infection à la brebis et à la chèvre dans des conditions naturelles. Il s'agit d'une situation épidémiologique signalée à diverses reprises même en France (Garin, 1985), dans plusieurs pays africains (Thim et Wundt, 1976) et en Iran (Zowghi et Ebadi, 1988).

En Italie, le cheptel ovin et caprin est évalué actuellement à 11 millions de têtes environ (10 millions de mouton et 1 million de chèvres), mais à la fin de 1990, le nombre d'animaux adultes s'élevait à 7.706.426. Selon les statistiques officielles, ce cheptel concerne aujourd'hui 128.653 exploitations dont la répartition est la suivante: 60,5 % regroupent 1 à 10 têtes, 20,1 % regroupent 10 à 50 têtes, 11,1 % regroupent 51 à 100 têtes, 7,6 % regroupent 101 à 300 têtes et 1,7 % de ces exploitations dépasse 300 têtes.

Les animaux ne sont pas répartis de façon homogène dans le pays; en effet, on en trouve 6,10 % dans les régions du Nord, 22,55 % dans les régions centrales, 28,50 % dans les régions méridionales et 42,85 % dans les îles (Sicile et Sardaigne). Rien qu'en Sardaigne on trouve 29,15 % de tout le cheptel ovin et caprin national (2.245.297 têtes).

La répartition des troupeaux et des têtes à l'intérieur du pays est reportée dans le Tableau 2. Au cours de ces dix années, le nombre d'exploitations a subi une baisse sensible (il est passé de 253.270 en 1981 à 128.653 en 1990) alors que le nombre des animaux en vie productive est resté à peu près constant; nous avons assisté, par conséquent, à une augmentation évidente du nombre des têtes par exploitation.

La situation dans les régions du Nord est tout à fait particulière: à un nombre limité d'animaux correspond un nombre très élevé de troupeaux.

Il existe en Italie, comme dans d'autres pays du bassin méditerranéen, des conditions

Tableau 2. Nombre de troupeaux et de têtes d'ovins et de caprins adultes en Italie au 31/12/1990

Région	Nombre de troupeaux	% en comparaison du nombre total de troupeaux	Nombre de têtes	% en comparaison du nombre total de têtes	Moyenne de têtes dans chaque troupeau
Nord	25.689	19,94	471.212	6,10	18,3
Centre	21.157	16,43	1.736.029	22,55	82,0
Sud	47.164	36,73	2.196.558	28,50	46,6
Iles	34.643	26,90	3.302.627	42,85	95,3
Totaux	128.653	100,00	7.706.417	100,00	60,55

particulières d'élevage qui favorisent la diffusion de la brucellose des petits ruminants et qui font que la lutte contre cette maladie est très difficile. A cet égard il ne faut pas oublier que:

- les chèvres vivent très souvent en contact avec les brebis, avec toutes les conséquences épidémiologiques qu'une situation de ce genre peut entraîner du fait que l'infection persiste longuement chez les chèvres;
- malgré le développement -récent et indéniable- de l'élevage intensif, l'élevage extensif domine encore, en particulier dans les régions méridionales; il comporte d'ailleurs le déplacement continu des troupeaux d'ovins et de caprins d'un territoire à l'autre à la recherche constante de pâturages;
- ces troupeaux doivent se déplacer dans les zones de montagne pendant l'été pour se nourrir;
- ces troupeaux utilisent des parcours communs durant leurs déplacements et les animaux des différents troupeaux peuvent se mélanger pendant le séjour dans les pâturages.

Il faut tenir compte également :

- du nombre élevé d'exploitations de dimensions modestes (actuellement 80 % des troupeaux ne dépassent pas 50 têtes); de là le danger que l'infection puisse exister et persister dans un grand nombre de petits foyers disséminés sur de vastes territoires;
- de la faible collaboration des bergers en grande partie très peu sensibles (et que l'on sensibilise difficilement) à la nécessité d'établir -dans leur intérêt également- des plans radicaux de prophylaxie de la maladie.

La lutte contre la brucellose ovicaprine est devenue obligatoire sur tout le territoire national à partir du 19/2/1991. Elle se fonde essentiellement sur le contrôle sérologique de tous les animaux de plus de six mois qui se trouvent dans les exploitations, sur l'élimination de ceux qui sont infectés, sur la répétition périodique des tests sérologiques chez les sujets non contaminés jusqu'à la constitution de troupeaux "officiellement indemnes" ou "indemnes" de brucellose, en tenant compte également des indications fournies par la CEE.

Avant 1991, la prophylaxie avait un caractère volontaire et était effectuée selon les dispositions prévues par le Décret du Ministère de la Santé du 4/6/1968 qui, entre autres, rendait obligatoire la vaccination de toutes les brebis et de toutes les chèvres âgées de 3 à 7 mois avec la souche Rev.1. La vaccination comme seule intervention initiale de lutte avait

pour but d'obtenir, sur une période de dix ans, une réduction de l'incidence de l'infection jusqu'à des niveaux autorisant, dans un second temps, l'application économiquement avantageuse de mesures de prophylaxie sanitaire.

Environ 18 millions de têtes ont été vaccinées de 1969 à nos jours (8.909.500 pour la période 1981-1990). Il est évident que, dans la seconde de phase de cette campagne d'assainissement, l'obligation de la vaccination a été révoquée et l'inoculation du Rev.1 n'est admise que dans des circonstances particulières (exploitations et territoires encore fortement contaminés par *B. melitensis*) et uniquement chez de jeunes animaux âgés de 3 à 5 mois.

D'après ce qui précède, il n'est pas possible actuellement de tracer un tableau, même approximatif, de la situation épidémiologique concernant la brucellose ovine et caprine car nous manquons de données sûres et nombreuses. Nous pourrions avoir les indications précises à la fin de 1992, lorsque le contrôle sérologique de toutes les exploitations sera probablement complet.

Cependant, de bons résultats ont été obtenus au cours de ces dix dernières années du fait de l'adhésion des éleveurs à l'égard du plan national volontaire d'éradication et à la suite de l'application des mesures prévues par le Règlement de Police Vétérinaire dans les foyers d'infection ou par les programmes de prophylaxie obligatoire réalisés dans certaines régions.

Durant cette période, on a enregistré 8.351 foyers de brucellose ovicaprine soit: 51,9 % dans le Nord, 6,6 % dans le Centre, 36,4 % dans le Sud et 5,1 % dans les îles.

D'autres données sur les progrès obtenus de 1981 à 1990 ont été résumées dans le Tableau 3.

Nous pouvons remarquer :

1. le nombre croissant des exploitations où ont lieu des opérations de prophylaxie officielle; dans les régions septentrionales 90 % de ces exploitations sont actuellement sous contrôle sanitaire. La situation est tout à fait différente dans le sud du pays où, bien qu'on ait constaté quelques progrès surtout dans certaines zones, 2,62 % seulement des exploitations sont soumises aujourd'hui à un contrôle;

*Tableau 3. Brucellose ovicaprine en Italie. Comparaison entre quelques données concernant les années 1981 et 1990.*

	1981	%	1990	%
Troupeaux sous contrôle	20.220	7,98	39.303	30,55
Troupeaux infectés	605	2,99	1458	3,70
Animaux sous contrôle	388.898	4,30	826.797	10,73
Animaux infectés	17.555	2,11	18.565	2,25
Troupeaux "officiellement indemnes" ou "indemnes"	12.999	5,17	25.869	20,10
Animaux vivant dans de troupeaux "officiellement indemnes" ou "indemnes"	178.571	1,97	400.186	5,19



2. le nombre en progression constante, des troupeaux infectés (605 en 1981, 853 en 1985 et 1.458 en 1990) n'est pas lié à une augmentation réelle des foyers mais plutôt à un élargissement sensible, surtout dans quelques zones, des opérations de prophylaxies;
3. la bonne disponibilité actuelle d'exploitations assainies (plus de 20 % du total) et d'animaux vivant dans des troupeaux "officiellement indemnes" ou "indemnes" (environ 6 % du total). Il s'agit d'un effectif d'animaux dans lequel on pourra puiser pour effectuer le repeuplement des exploitations encore infectées après leur assainissement.

De 1981 à 1990 la brucellose humaine en Italie a décliné (Tableau 4) même s'il ne manque pas de recrudescences annuelles de temps en temps.

*Tableau 4. Cas de brucellose humaine déclarés en Italie durant la période 1981-1990.*

Année	Nombre des cas
1981	2846
1982	2987
1983	2623
1984	2759
1985	2373
1986	2028
1987	1606
1988	1216
1989	1521
1990	1491

L'incidence nationale de la brucellose est évidemment la résultante d'un grand nombre de situations locales; l'épidémiologie de cette maladie, zoonose typique transmise par des animaux domestiques, est influencée par la présence de différentes espèces, par le type d'exploitation, enfin et surtout par l'état sanitaire de cette dernière. Les augmentations brusques sont souvent dues à des régions isolées. Ainsi, l'accroissement en 1982 (Tableau 5) fut la conséquence d'épisodes épidémiques dans les Pouilles, en Calabre et en Sicile, régions où le nombre de cas de brucellose fut le double de celui de l'année précédente. La même année, dans d'autres régions, ce fut le contraire (dans le Piémont il y eut une réduction de plus de 50 %).

Cette répartition particulière de l'endémie brucellienne, conséquence à la fois du type et des conditions sanitaires des exploitations et du contrôle du lait et surtout de ses dérivés, avec une majorité de cas dans les régions méridionales et alpines, montre que ce sont les élevages de mouton et, dans une moindre mesure, les élevages de chèvres, les principales sources de contagion. Cela est confirmé par la courbe de la maladie chez l'homme, courbe qui atteint son maximum en avril-mai au moment de la saison des mises bas, de la lactation et de la production de fromages.

Comme nous l'avons dit, des 221 souches de *Brucella* identifiées en Italie chez l'homme, 219 sont *B. melitensis*, et les observations mettent en évidence une contagion à partir des brebis et des chèvres ou à partir des bovins. Il existe en tout cas des foyers de brucellose

Tableau 5. Taux de morbidité de brucellose dans quelques régions italiennes durant les périodes 1981-82 et 1988-1990.

Région	Années				
	1981	1982	1988	1989	1990
Piémont	249	106	148	133	74
Lombardie	178	140	81	79	31
Vénétie	90	101	12	24	21
Latium	410	434	80	85	74
Abruzzes	110	120	61	50	78
Campanie	370	376	212	285	473
Pouilles	245	439	289	266	202
Calabre	134	227	105	152	124
Sicile	391	538	159	187	240

animale qui ne sont pas apparemment liés à des cas humains, comme ceux qui ont été identifiés récemment chez des buffles.

Deux cas seulement d'infection à *B. abortus* ont été identifiés chez l'homme. Le premier cas est intéressant dans la mesure où l'identification a été obtenue au cours d'une petite épidémie, que le typage de la souche a permis d'attribuer à une chaîne épidémiologique (élevages de bovins) différente de la chaîne habituelle (contagion par des ovins ou des caprins). L'épisode montre à quel point l'identification exacte des souches est utile pour remonter à l'origine de la contagion.

Il faut considérer que l'abaissement progressif et consistant des cas de brucellose humaine est dû en grande partie à la vaccination avec le Rev.1 qui a été pratiquée, comme nous l'avons dit précédemment, de façon intensive, en Italie dès 1969. Nous en avons pour preuve le fait que dans les quatre années antérieures à 1969 (1965-1968) la moyenne annuelle des cas signalés s'élevait à 4.828, alors que celle de cas signalés durant la période 1987-1990 est nettement inférieure (1.458, c'est à dire plus de 75 %).

## Références

- Gargani, G., Tolari, F., Brucella phagotypes: their relation to the spread of infection in Italy. Eur. J. Epid. 1986,2, 67-69
- Garin B.: *Brucella melitensis* in animals in France. Brucella melitensis, a seminar in the CEC. Programme of coordination of Res. on Anim. Path. Martinus Nijhoff 1985, 29-41.
- Thimm B., Wundt W.: The epidemiological situation of Brucellosis in Africa. Develop. Biol. Stand. 1976, 31, 201-217.
- Tolari F., Salvi G.: Segnalazione di un caso di orchite bilaterale in un capretto in seguito a vaccinazione con Rev.1. Ann. Fac. Med. Vet. Un. Pisa 1980, 33, 87-91.
- Tolari F., Thomas E.L., Corbel M.J.: On the differentiation of *Brucella abortus* biotypes 3 and 6. Annali Sclavo 1981, 23, 320-326.
- Zowghi E., Ebadi A.: Abortion due to *Brucella abortus* in sheep in Iran. Rev. Sc. Techn. O.I.E. 1988, 7, 379-382.

# Epidémiologie de la brucellose humaine et animale au Maghreb

N. Benhabyles<sup>1</sup>, A. Benkirane<sup>2</sup>, B. Boudilmi<sup>3</sup>, S. Benchouk<sup>4</sup>, H. Bouayoun<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Institut National de Santé Publique - Alger, Algérie, <sup>2</sup>Département de microbiologie, Institut Agronomique et Vétérinaire, Hassan 2 - Rabat, Maroc, <sup>3</sup>Laboratoire Vétérinaire Régional de Tlemcen - Algérie, <sup>4</sup>Centre hospitalo-universitaire de Tlemcen - Algérie, <sup>5</sup>Vétérinaire - Oujda, Maroc

## Introduction

La brucellose humaine ou fièvre de Malte représente au Maghreb, comme pour tous les pays du bassin méditerranéen, un problème de santé publique important mais encore mal évalué. Peu d'études ont été réalisées sur les répercussions économiques de cette maladie, occasionnant pourtant de lourdes pertes.

L'enzootie brucellienne, notamment à *Brucella melitensis*, est très répandue au Maghreb (6, 7, 13, 17, 24) puisque les dépistages effectués par les services vétérinaires depuis les années 60 montrent l'existence d'un réservoir animal.

Au Maghreb, la caractéristique essentielle de l'épidémiologie de la brucellose est la *rareté apparente* des cas humains produisant un contraste remarquable avec les taux élevés de séropositivité dans le cheptel. Un tel réservoir de germes peut-il épargner les hommes qui vivent à son contact ? Ceci est peu vraisemblable (22).

## Historique

C'est une maladie connue depuis longtemps au Maghreb :

- *En Algérie*, les premières descriptions ont été faites en 1895 par Cochez et en 1899 par Legrain (14,21). Par la suite, d'autres cas ont été rapportés par les auteurs de l'Institut Pasteur d'Algérie.

- *Au Maroc*, les premiers cas sont diagnostiqués en 1916 à El-Jadida (13).

- *En Tunisie*, c'est à Charles Nicolle que l'on doit les premières observations sur la fièvre de Malte en 1909 (10).

Par comparaison, les premiers cas sont rapportés en France en 1909 par Cantaloube (5, 19).

D'autres cas de fièvre de Malte et un certain nombre de foyers de mélitococcie ovine et caprine furent régulièrement décelés au cours des cinq décennies suivantes, un peu partout en Afrique du Nord (6).

Depuis les années 1960, la brucellose des petits ruminants est demeurée plus ou moins ignorée. Certes, des foyers sporadiques ont été signalés çà et là, mais leur fréquence est loin de refléter la situation épidémiologique à laquelle on pourrait s'attendre dans des pays possédant un important cheptel ovin et caprin.

D'ailleurs, en 1982, un rapport de la FAO sur la brucellose au Proche-Orient faisait état

de l'absence "probable" de brucellose à *Brucella melitensis* en Algérie, Maroc et Libye, et sa présence, sous forme sporadique chez les caprins et l'homme en Tunisie (18).

Ce silence épidémiologique demeura jusqu'en 1984, date à laquelle on assista à l'apparition de plusieurs cas de brucellose humaine à Ghardaïa, dans le sud algérien. Ainsi donc, dans ce pays la brucellose animale n'a été recherchée que lorsque l'homme en a été le révélateur et grâce à une collaboration étroite entre les services médicaux et vétérinaires. En effet, le foyer de Ghardaïa incita à une enquête épidémiologique à l'échelle nationale. Nous aborderons successivement la brucellose animale puis la brucellose humaine.

## Première partie: Brucellose des petits ruminants

Ne disposant d'aucune donnée récente sur la situation épidémiologique de la maladie en Tunisie et en Libye, les auteurs se borneront à présenter les résultats obtenus en Algérie (ceux-ci porteront sur six wilayas de l'ouest algérien) et au Maroc (exploitation d'une banque de sérums provenant de troupeaux où des avortements ont été observés de 1980 à 1991).

### Matériel et méthodes

#### Protocole d'étude

##### Dans l'ouest algérien

Une enquête a été menée de novembre 1986 à mars 1989 dans les wilayas de : Sidi Bel Abbès, Tlemcen, Oran, Mostaganem, Aïn Temouchent et Naâma.

Après avoir recensé les cheptels ovins et caprins de chaque commune des 6 wilayas concernées, un tirage au sort a été effectué en respectant la taille des troupeaux et leur distribution géographique. La fraction d'échantillonnage a été fixée à environ 1 % de l'effectif (fig.1).

1#	6#	11*	16+	21+	<i>Légende :</i> Schéma de 25 communes (numérotées de 1 à 25) d'une wilaya imaginaire dans laquelle on a recensé 10.000 têtes de caprins réparties de façon hétérogène : - 50 % (5.000) dans 4 communes (#) - 30 % (3.000) dans 8 communes (*) - 20 % (2.000) dans 13 communes (+)
2#	7#	12*	17+	22+	
3*	8*	13*	18+	23+	
4*	9*	14*	19+	24+	
5+	10+	15+	20+	25+	

Figure 1. Protocole d'enquête sur la brucellose des petits ruminants dans l'Ouest algérien (1986-1989).

Dans ces trois différentes zones de la wilaya, il faut échantillonner au moins 3 communes (une dans chaque zone), en prélevant, à chaque

fois 1 % de l'effectif de la zone. La désignation de ces communes se fait par tirage au sort.

#### Exemple :

- le sort désigne la commune 2 (1ère zone) ... 50 sérums à prélever ;
- le sort désigne la commune 12 (2ème zone)... 30 sérums à prélever ;
- le sort désigne la commune 19 (3ème zone)... 20 sérums à prélever.

Les prélèvements de sang sont effectués à l'aide de tubes "Venojet" sous vide. Ces tubes sont placés dans des caissons isothermes pour leur acheminement au laboratoire. Ils sont

identifiés au moyen d'étiquettes de 2 couleurs différentes (une pour les ovins et l'autre pour les caprins), portant le numéro de l'animal et celui du troupeau d'où il est issu. Les prélèvements sont accompagnés de fiches de renseignements comportant des données sur les animaux prélevés (âge, sexe ...) et sur les troupeaux, notamment les mouvements d'animaux qui s'y sont produits au cours des 6 mois précédant la visite de l'enquêteur et les fréquences approximatives des avortements observés. (A signaler que l'exploitation informatique du rôle de ces différents paramètres est en cours et que, par conséquent, ses résultats ne seront pas présentés ici).

Au total, sur un effectif de 1,6 millions d'ovins élevés dans la région, environ 20.000 sérums (1,25 %) ont été analysés. Parallèlement, sur les 88.500 caprins, environ 2.100 (2,37 %) ont été soumis à l'analyse.

#### *Au Maroc*

Depuis 1980, les étudiants de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, préparant leur thèse vétérinaire au département de microbiologie, épidémiologie et maladies contagieuses, sur un thème en relation avec la pathologie ovine ou caprine, sont chargés de ramener des prélèvements sanguins des élevages qu'ils visitent. Lors de ces visites, environ 10 % de l'effectif est prélevé, y compris toute femelle ayant avorté au cours de la saison d'agnelage précédant la visite ou coïncidant avec celle-ci.

En outre, depuis la recrudescence de la maladie dans l'ouest algérien, le laboratoire d'analyses et de recherches vétérinaires d'Oujda effectue des visites d'élevages dans les provinces d'Oujda et de Figuig, en vue d'apprécier la situation épidémiologique de la brucellose dans ces zones frontalières. C'est sur la base de l'exploitation de cette banque de sérums que les résultats sont présentés ; au total, ils portent sur plus de 3.200 sérums issus de 203 troupeaux dont 147 (72 %) d'ovins et 56 (28 %) de caprins.

Parallèlement aux investigations sérologiques, des tentatives d'isolement des brucelles ont été faites, soit à partir d'un matériel d'origine animale (avortons, écouvillons vaginaux, lait, etc.), soit à partir du sang prélevé sur des malades présentant une brucellose aiguë.

#### *Techniques de laboratoire*

##### *Techniques sérologiques*

Les différentes étapes du diagnostic sérologique sont résumées dans la figure 2.

L'épreuve à l'antigène tamponné a servi de "screen test" et la fixation du complément de test de confirmation.

Les réactifs utilisés dans ces deux techniques sont les réactifs du commerce (Bio-Mérieux).

Les sérums anticomplémentaires ont été passés au test de Coombs.

##### *Techniques bactériologiques*

L'isolement est réalisé sur milieu "Brucella modifié" ou "Trypticase soja" (Difco) additionné d'un mélange d'antibiotiques P.C.B. (polymyxine, bacitracine, cycloheximide) pour les prélèvements d'origine animale et sur flacons de Castadena contenant le même milieu (sans antibiotiques) pour le sang humain.

Les méthodes d'identification sont celles décrites dans le manuel de Alton et al. (1988)(1).

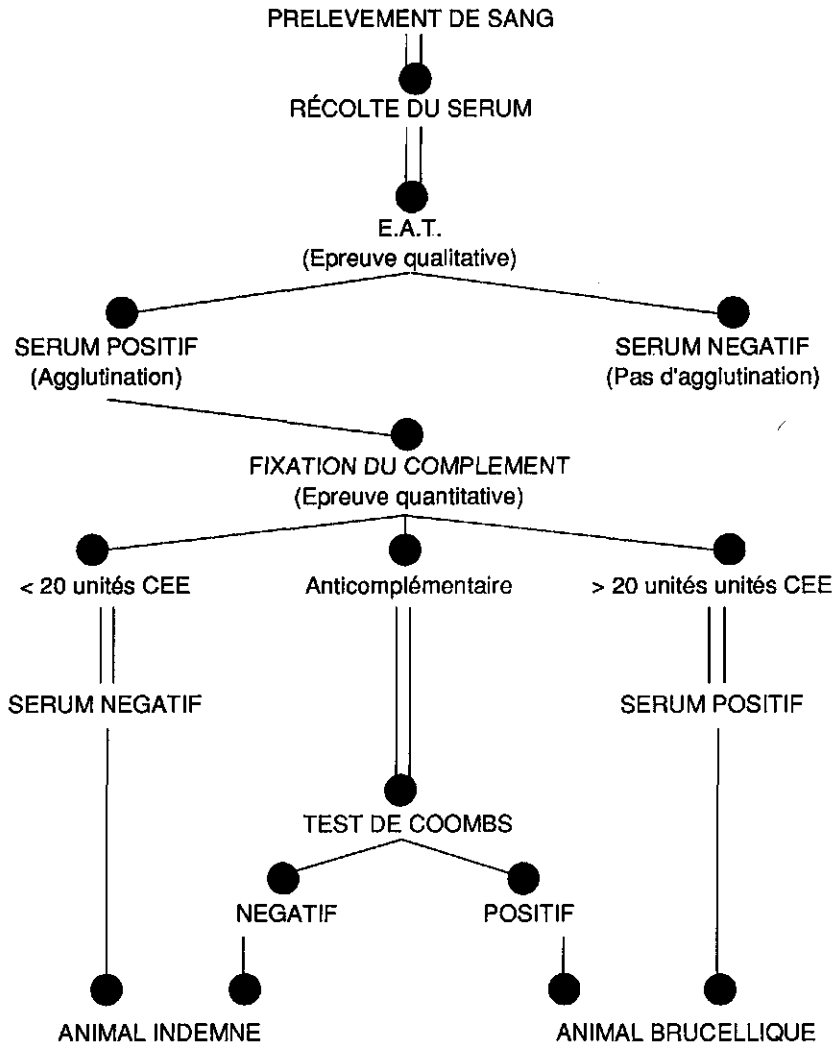


Figure 2. Etapes du diagnostic sérologique de la brucellose des petits ruminants.

## Résultats et interprétation

### Enquête séro-épidémiologique dans l'ouest algérien

Le bilan de l'enquête épidémiologique dans les 6 wilayas de la région ouest de l'Algérie est présenté dans les Tableaux 1.

La répartition géographique des foyers de brucellose ovine et caprine figure sur la carte 1.

On note que le taux global de séropositivité est de 2,18 % chez les ovins et 12,01 % chez les caprins.

Le test de  $\chi^2$  indique une différence hautement significative dans le taux d'infection entre ces deux espèces animales ( $p < 0,01$ ).

En revanche, en ce qui concerne la prévalence par troupeau, on obtient 43,5 % et 42 % de troupeaux infectés, respectivement chez les ovins et les caprins.

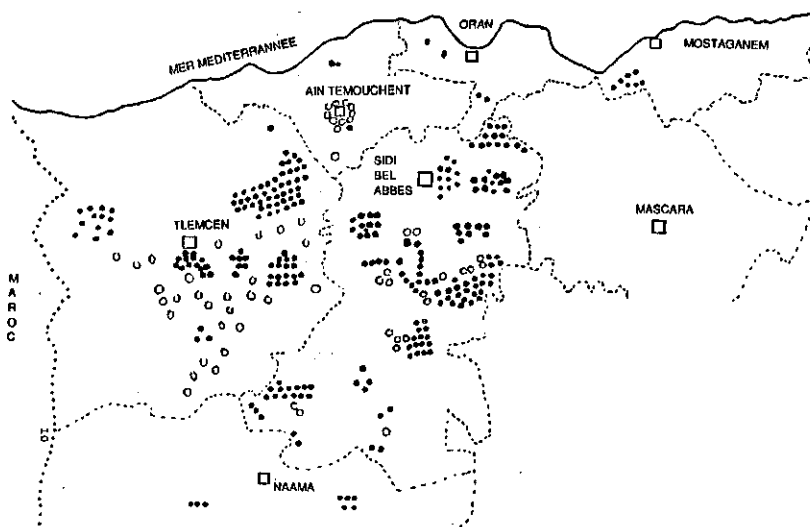
Chez les ovins, le nombre d'échantillons analysés par wilaya étant comparable, il ressort que la wilaya de Sidi Bel Abbès est la plus infectée, suivie de Tlemcen, de Mostaganem et de Aïn Temouchent ; Oran et Naâma étant les moins infectées.

Chez les caprins, l'infection n'a été décelée que dans 3 wilayas sur les 5 échantillonnées, parmi ces wilayas, Aïn Temouchent est de loin la plus touchée, devant Tlemcen et Sidi Bel Abbès.

Il convient de noter cependant que la disparité dans le nombre de prélèvements provenant des différentes wilayas, interdit toute extrapolation à l'ensemble de la population caprine de ces wilayas.

Tableau 1. Bilan de l'enquête épidémiologique dans l'ouest Algérien (1986-89).

Wilaya	Effectif total	Taux d'infection		Prévalence par troupeaux		
		Sérums analysés et fractions d'échantillonnage (%)	Sérums positifs et pourcentage de séropositivité	Troupeaux échantillonnées	Troupeaux positifs	Prévalence (%)
<i>Cheptel ovin</i>						
Sidi bel abbes	561000	4354 (0,77%)	170 (3,90%)	196	141	72
Tlemcen	336000	8220 (2,44%)	224 (2,72%)	316	116	37
Oran	112000	1300 (1,16%)	6 (0,46%)	15	4	27
Mostaganem	130000	845 (0,65%)	12 (1,42%)	9	6	66
Aïn temouchent	48000	2879 (6,00%)	36 (1,25%)	32	3	9
Naama	404000	2623 (0,65%)	8 (0,30%)	71	8	11
<b>Total</b>	<b>1591000</b>	<b>20321 (1,28%)</b>	<b>444 (2,18%)</b>	<b>639</b>	<b>278</b>	<b>43,50</b>
<i>Cheptel caprin</i>						
Sidi bel Abbès	34500	451 (1,30%)	10 (2,22%)	34	19	56
Tlemcen	29000	1023 (3,52%)	215 (2,10%)	60	29	48
Mostaganem	3000	311 (10,36%)	0	26	0	0
Aïn temouchent	7000	248 (3,54%)	27 (10,88%)	17	11	64
Naama	15000	64 (0,43%)	0	4	0	0
<b>Total</b>	<b>88500</b>	<b>2097</b>	<b>252</b>	<b>141</b>	<b>59</b>	<b>42</b>



#### Légende

- ■ ■ limite d'Etat
- - - limite de Wilaya
- chef-lieu de Wilaya
- foyer de Brucellose ovine
- foyer de Brucellose caprine

Carte 1. Brucellose ovine et caprine dans l'ouest Algerien.

#### Exploitation des données de la banque de sérums au Maroc

Les résultats sont regroupés par régions.

Les prélèvements sont issus de 5 régions :

- région 1 : nord-est : provinces de Taza, Fèz, Oujda et Figuig ;
- région 2 : centre-nord : provinces de Kénitra et Khemisset et préfectures de Rabat, Salé et Skhirat-Témara ;
- région 3 : centre : provinces de Settat, Ben Slimane, El Jadida et préfectures de la wilaya du Grand Casablanca ;
- région 4 : centre-sud : provinces de Beni-Mellal et Khénifra
- région 5 : sud : provinces d'Agadir et de Ouarzazate.

Au niveau de ces régions, le taux d'infection global obtenu au cours de 3 intervalles de temps est le suivant :

- (1): de 1980 à 1983 : 8 sérums positifs sur 66 (12 %)
- (2): de 1984 à 1987 : 55 sérums positifs sur 1.780 (3,2 %)
- (3): de 1988 à 1991 : 119 sérums positifs sur 1.365 (8,7 %)



*Tableau 2. Distribution géographique des foyers de brucellose ovine et caprine au Maroc (1980-1991).*

Region	Ovins		Caprins		Total		
	troupeaux testés	trou. positifs	trou. testés	trou. positifs	trou. testés	trou. positifs	prévalence (%)
Nord-est	83	15	13	3	96	18	18,76
Centre-nord	43	2	17	2	60	4	6,66
Centre	9	4	5	0	14	4	28,67
Centre-sud	8	1	3	0	11	1	9,09
Sud	4	1	18	1	22	2	9,09
Total	147	23	56	6	203	29	14,28

Le Tableau 2 présente la répartition géographique des foyers recensés chez les ovins et les caprins durant toute la période d'étude.

Le Tableau 3 donne la distribution globale de ces foyers sur les 3 intervalles de temps retenus.

La carte 2 indique les zones où la brucellose ovine et/ou caprine a été décelée.

Il ressort de ces résultats que l'infection ovine (15,64 %) est plus fréquente que l'infection caprine (10,71 %).

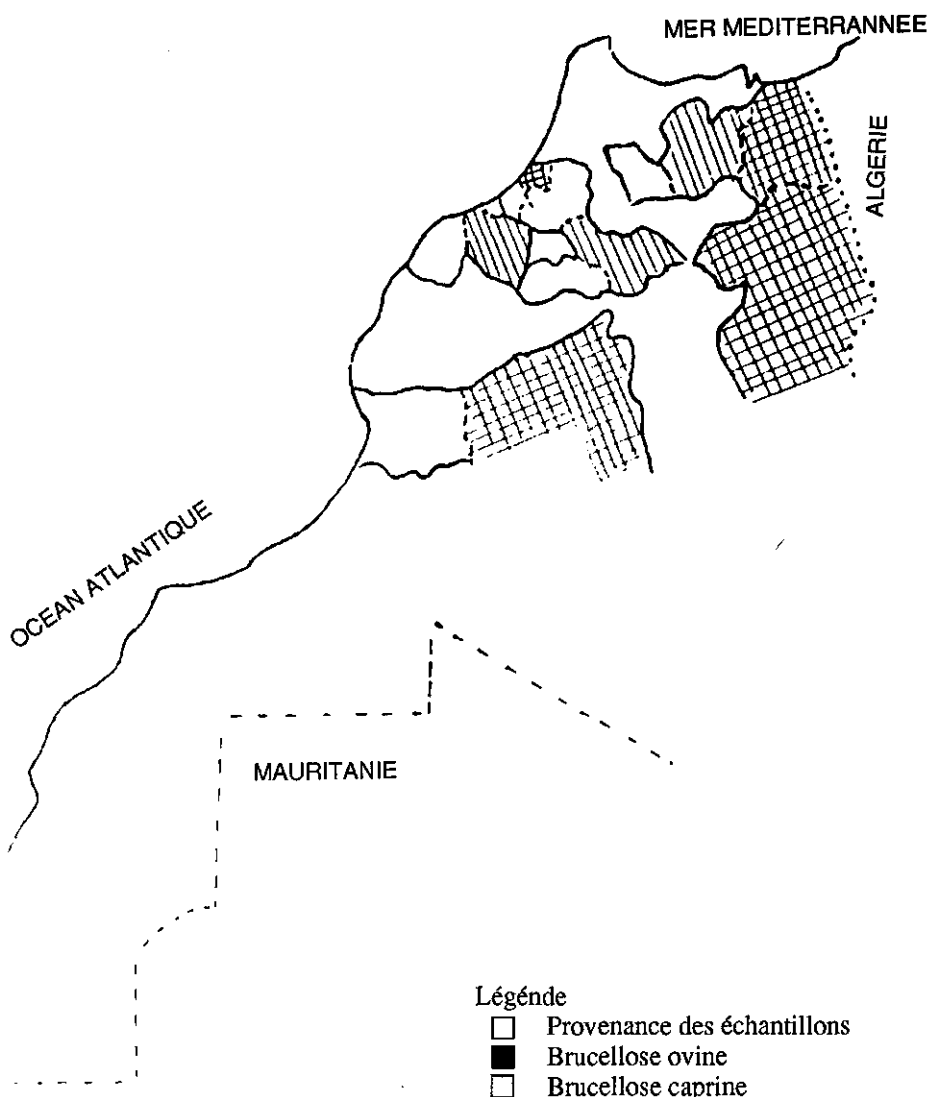
Cependant, les données n'étant pas basées sur un échantillonnage rigoureux, on ne peut leur accorder aucune valeur statistique.

Il est également difficile d'estimer la prévalence relative de l'infection dans les 5 régions.

Ces résultats n'ont tout au plus qu'une valeur qualitative, indiquant la présence de cette infection dans les 5 régions concernées par l'étude.

*Tableau 3. Distribution temporelle des foyers de brucellose ovine et caprine au Maroc.*

Période	Ovins		Caprins		Total		
	troupeaux testés	trou. positifs	trou. testés	trou. positifs	trou. testés	trou. positifs	prévalence (%)
1 (1980-83)	14	2	6	1	20	3	15
1 (1984-87)	60	5	34	2	94	7	7,44
3 (1987-91)	73	16	16	3	89	19	21,34
Total	147	23	56	6	203	29	14,28



Carte 2. Brucellose ovine et caprine dans 5 régions du Maroc.

### Etude bactériologique

La recherche effectuée sur environ 46 prélèvements (28 d'origine humaine en Algérie et 18 d'origine ovine au Maroc) a abouti à l'isolement de 30 souches de *Brucella* ; tous les prélèvements d'origine humaine s'étant avérés positifs. Toutes ces souches sont des *Brucella melitensis* biovar 3.

## Discussion

En Algérie, ce travail mené dans le cadre d'une enquête montre que la brucellose à *Brucella melitensis* est loin d'être une affection localisée ou sporadique comme le laissaient supposer les rares données bibliographiques disponibles. En effet, avec plus de 40 % de troupeaux de petits ruminants trouvés infectés, l'ouest algérien est sans doute un réservoir brucellique important.

Pour évaluer cette situation épidémiologique, pour le moins préoccupante, un groupe de travail constitué de médecins et de vétérinaires, a entrepris un travail méthodique et de longue haleine, avec le soutien technique du laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen, convenablement équipé pour le diagnostic tant sérologique que bactériologique de l'infection.

Les mouvements incontrôlés du bétail représentent sans doute le facteur de risque le plus important dans la diffusion de l'infection, comme en atteste le taux de prévalence par troupeau, très élevé dans la wilaya de Sidi Bel Abbès (près de 70 %) où se trouve l'un des plus grands marchés à bestiaux de l'ouest algérien.

Les taux d'infection relevés imposent la mise en place immédiate d'un plan de prophylaxie adéquat, prenant en considération le mode de conduite des troupeaux et les habitudes alimentaires du consommateur local, essentiellement de lait et de produits laitiers d'origine caprine et éventuellement ovine.

Au Maroc, les résultats n'étant pas basés sur une enquête, seule une valeur qualitative peut leur être attribuée : la brucellose à *Brucella melitensis* est présente dans le pays.

L'absence de sensibilisation du corps médical à l'importance et à la gravité de la maladie humaine a, jusqu'ici, constitué un frein à l'exploration de l'impact réel de l'infection. Lors d'une enquête sur les principales causes infectieuses d'avortement chez les ovins, le faible taux de séropositivité relevé n'a pas permis d'attribuer l'infection à *Brucella melitensis* (4).

Le fait que toutes les souches isolées appartiennent au sérovar 3 de *Brucella melitensis* n'appelle pas de commentaire particulier, du fait que toutes ces souches aient été isolées dans un périmètre géographique relativement limité, d'une part, et de la prédominance de ce sérovar dans d'autres pays du bassin méditerranéen d'autre part (23).

## Deuxième partie: la brucellose humaine

Au Maghreb, la brucellose est une maladie humaine qui pose problème : l'infection animale n'est toujours pas maîtrisée et, en conséquence, la transmission à l'homme survient encore trop fréquemment. La maladie y sévit à l'état endémique, mais a connu au cours de la dernière décennie des flambées épidémiques.

La brucellose est peu diagnostiquée, les aspects trompeurs de sa symptomatologie polymorphe, l'insuffisance voire la non disponibilité de moyens diagnostiques en sont les raisons essentielles.

Malgré cela, de plus en plus de cas de brucellose sont identifiés depuis qu'on la recherche systématiquement devant des tableaux cliniques divers et lors des enquêtes de dépistage entreprises dans les populations à risque et/ou vivant autour d'un foyer de brucellose animale décelé.

La brucellose est soumise à une déclaration obligatoire par la législation sanitaire des pays du Maghreb, de plus c'est une *maladie professionnelle indemnisable*.

Cette obligation laisse penser que les statistiques des cas déclarés pourraient représenter un indicateur fiable de l'importance de la brucellose. En fait, cette déclaration n'est pas toujours respectée pour diverses raisons : par exemple, en tant que maladie

professionnelle, *seuls* les travailleurs affiliés à la sécurité sociale bénéficient des indemnités donc de déclaration de la maladie.

## Situation Epidémiologique de 1981 à juin 1991

### *Les sources de données*

Bilans des cas déclarés annuellement avec une sous-déclaration importante.  
Résultats des travaux publiés et d'enquêtes sérologiques souvent partielles, et régionales.

### *Tableau épidémiologique de 1981 à Juin 1991*

#### *En Algérie*

La décennie 1981 - 1990 a été marquée par :

- l'éclosion d'une importante épidémie de brucellose en 1984 à Ghardaïa, dans la vallée du M'Zab, avec plus de 600 cas cliniques déclarés dont 248 confirmés par le laboratoire de l'Institut Pasteur d'Alger (11). *Brucella melitensis* est l'agent responsable. Cette épidémie est due à la consommation d'un fromage frais de chèvre (Kemaria) de fabrication artisanale, très prisé dans la région. Ceci a révélé l'existence et l'importance du réservoir caprin.

- L'organisation de la lutte contre la brucellose basée sur une collaboration étroite entre les services vétérinaires et les services de santé humaine (12). En 1985, le programme de lutte initié par le Ministère de l'Agriculture a permis un meilleur dépistage puisque le recours aux examens de laboratoire était facilité.

En effet, des laboratoires vétérinaires régionaux ont été équipés et assurent le diagnostic biologique aussi bien aux services vétérinaires qu'aux services de santé humaine. Depuis l'installation de ces laboratoires régionaux on note l'apparition d'un "phénomène de foyer révélé" avec éclosion d'une véritable épidémie (augmentation des cas de brucellose humaine déclarés). Ceci nous permet de conclure que la brucellose existe dans tout le pays mais que le diagnostic n'est pas toujours établi.

- *Cas déclarés à l'autorité sanitaire* (2, 3, 20) : Jusqu'en 1984, aucun cas de brucellose n'a été déclaré.

- En 1984, importante épidémie à Ghardaïa (600 cas).
- En 1985, 2 cas déclarés à Ghardaïa.
- En 1986, la région de Tlemcen enregistre les premiers cas dans l'Ouest du pays. Depuis, le nombre de cas ne cesse d'augmenter.
- En 1987, 49 cas déclarés pour tout le pays. Plusieurs régions déclarent des cas.
- En 1988, 84 cas sont notifiés en Algérie.
- En 1989, apparition d'une importante épidémie dans la région de Sétif, à l'Est du pays. Tous ces cas proviennent d'une même localité et la contamination est d'origine alimentaire.
- En 1990, 162 cas sont déclarés à l'échelle nationale.
- En 1991, 151 cas déclarés au cours du premier semestre.

Il faut souligner qu'il n'est pas rare que des cas de brucellose humaine soient le révélateur de foyers latents méconnus de brucellose animale; ceci a été prouvé dans plusieurs zones d'élevage.

Les chiffres cités traduisent les cas déclarés ; des études ont montré qu'il faut multiplier par un facteur variant de 3 à 5 ce nombre pour connaître le nombre de cas réellement traités par les médecins. Le nombre trouvé n'inclut pas les brucelloses frustes non diagnostiquées

certainement plus nombreuses, car on connaît la fréquence de la forme inapparente dans la brucellose.

*-Les enquêtes sérologiques effectuées par différentes équipes : quelques résultats*

- A l'Ouest du pays, M. Boudilmi et collaborateurs retrouvent 422 sérums positifs sur 928 sérums testés de novembre 1986 à 1990 (7).
- A Sétif (zone d'élevage des hauts plateaux à l'Est du pays), Hamdi Chérif et collaborateurs retrouvent dans deux études successives :
  - une prévalence de 6,86 % dans une population à haut risque en 1986 ;
  - une prévalence de 4,25 % lors d'enquêtes réalisées de 1987 à 1989 (15).
- A Annaba, ville côtière de l'Est du pays, Tourab dans une population issue de secteurs à haut risque infectieux (travailleurs de domaines agricoles spécialisés dans l'élevage, travailleurs des abattoirs, personnels de santé vétérinaire) retrouve en 1987 une prévalence de la brucellose de 6,5 % (22).

#### *Au Maroc*

Au cours de la décennie 1981 - 1990 et durant le premier semestre 1991, aucun cas de brucellose n'a été déclaré ; cependant quelques rares observations sont rapportées par les services cliniques.

#### *En Tunisie*

La brucellose humaine semble être une maladie rare si l'on examine les données concernant les cas déclarés et publiés dans le bulletin épidémiologique trimestriel du Ministère de la Santé (Tableau 4).

*Tableau 4. Brucellose humaine en Tunisie.*

Années	Nombre de cas déclarés
1985	9
1986	3
1987	4
1988	3

(Source : bulletin épidémiologique trimestriel)

Les enquêtes sérologiques effectuées par Bachouche et Benchaabane en 1980 chez des travailleurs agricoles exposés, retrouvent un taux d'infection de 7,9 % (8.10).

Au premier semestre 1991, 239 cas dont 158 à Gafsa ont été déclarés (9).

#### *Analyse épidémiologique des cas déclarés*

Nous limiterons l'analyse aux cas déclarés en Algérie de 1988 à 1990. Avant 1988, les données disponibles en Algérie sont parcellaires. Les statistiques des autres pays du Maghreb disponibles sont insuffisantes et ne nous permettent pas une analyse précise et représentative.

### Caractéristiques de temps

L'incidence annuelle augmente d'année en année :

0,36 pour 100.000 habitants en 1988.

0,59 pour 100.000 habitants en 1989.

0,67 pour 100.000 habitants en 1990.

Les variations saisonnières (tableau 5):

Durant six mois de l'année, l'incidence mensuelle (nombre de cas) est supérieure à l'incidence mensuelle moyenne (10,83), avec 2 pics importants en mai et en août.

Le printemps, saison de plus haute incidence, correspond à la période de pleine lactation et de mise-bas.

Tableau 5. Répartition mensuelle moyenne des cas déclarés au cours des années 1988 à 1990 en Algérie.

Mois	Nombre de cas déclarés en			Moyenne sur 3 ans
	1988	1989	1990	
Janvier	0	2	4	2
Février	6	1	11	6
Mars	9	21	11	13,66*
Avril	7	21	15	14,33*
Mai	6	28	25	19,66*
Juin	4	5	9	6
Juillet	19	17	7	14,33*
Août	15	12	26	17,66*
Septembre	6	9	12	9
Octobre	2	23	9	11,33*
Novembre	5	4	23	10,66
Décembre	5	1	10	5,33
	84	144	162	

\* incidence supérieure à l'incidence mensuelle moyenne.

### Caractéristiques de personnes

*Répartition selon l'âge et le sexe.* On note une nette prédominance masculine (65,3 % des cas déclarés), l'homme étant plus exposé de par ses activités (éleveur...).

Cependant, les deux sexes sont également atteints lors des contaminations d'origine alimentaire. Tous les âges sont touchés, mais c'est l'adulte à partir de la trentaine qui est le plus atteint. L'incidence spécifique pour l'âge augmente régulièrement jusqu'à 45-54 ans (Tableau 6).

*Répartition selon l'exposition professionnelle.* La contamination est d'origine professionnelle exclusive dans 10 % des cas. Cette proportion serait certainement plus importante si une surveillance sérologique systématique était pratiquée chez les travailleurs exposés et le diagnostic posé devant les tableaux cliniques trompeurs (formes frustes...).

*Tableau 6. Répartition selon l'âge des cas déclarés de 1988 à 1990 en Algérie.*

Tranche d'âge	Taux spécifique
0 - 4	0,07
5 - 9	0,11
10 - 14	0,18
15 - 19	0,43
20 - 24	0,34
25 - 34	0,92
35 - 44	1,05
45 - 54	1,45
55 - 64	1,17
65 et plus	0,35

#### *Caractéristiques de lieu*

De plus en plus de régions déclarent des cas, la brucellose existe dans tout le pays et prédomine dans les zones d'élevage.

Si l'on considère la répartition selon le mode d'habitat rural ou urbain, on note une prédominance des cas ruraux.

Beaucoup de cas sont considérés à tort comme urbains : en effet, beaucoup de résidents des villes continuent à adopter un mode de vie rural (consommation de produits laitiers frais, en particulier fromage de chèvre de fabrication artisanale, élevage familial de quelques bêtes comme à Ghardaïa).

#### *Mode de contamination*

En dehors de l'épidémie de 1984 où la contamination par ingestion de fromage frais a été retrouvée dans 100 % des cas, le mode de contamination est dans 60 % des cas alimentaire, dans 10 % des cas professionnel et dans 30 % des cas mixte;

#### **Discussion**

Les principaux résultats montrent que :

- l'incidence annuelle augmente d'année en année, résultant d'un meilleur dépistage dans la population générale ;
  - toutes les régions du pays sont touchées ;
  - la maladie touche largement la population générale. Les cas retrouvés dans les professions exposées sont en deçà de la réalité, le dépistage n'étant pas systématique.
- Cette analyse confirme plusieurs données épidémiologiques classiquement connues comme la répartition par âge et par sexe et la répartition saisonnière.

Les résultats spécifiques à notre région trouvent en partie leur explication dans les coutumes alimentaires, les habitudes de vie (élevage familial...) et difficultés d'accès aux structures de santé (éloignement, examens de laboratoire pas toujours possibles, expliquant la fréquence des cas diagnostiqués tardivement).

## Estimation du coût de la maladie chez l'homme

Le coût de la brucellose humaine est difficile à évaluer puisque le nombre réel de cas n'est pas connu. C'est une maladie qui coûte cher pour les raisons suivantes :

- cette maladie frappe le plus souvent des hommes en pleine période d'activité professionnelle ;
- le diagnostic n'est pas toujours évident, nécessitant de nombreux examens médicaux et de laboratoire ;
- les formes compliquées et les formes chroniques ne sont pas rares, la convalescence est toujours longue ;
- enfin, la brucellose est souvent prise en charge comme une maladie professionnelle.

L'estimation du coût global doit donc tenir compte :

- 1) du coût direct comprenant les consultations médicales, l'hospitalisation, les examens biologiques et les traitements.
- 2) du coût indirect comprenant les indemnités journalières d'arrêt de travail, les indemnités en cas de maladie professionnelle et enfin le manque à gagner.

En 1990, sur la base des prix pratiqués dans le secteur public et sans tenir compte des fluctuations monétaires, le coût direct d'une brucellose aigüe septicémique hospitalisée pendant 7 jours et en traitement ambulatoire pendant 45 jours peut être estimé à 12.000 dinars algériens (DA), le salaire minimum garanti pour un ouvrier étant de 1.500 DA. Ce coût comprend les frais de séjour hospitalier (hôtellerie), les examens biologiques et le traitement. Dans les pays du Maghreb, en particulier en Algérie, le coût est plus élevé si l'on sait que les médicaments, les réactifs et les films radiologiques sont importés.

A ce coût, doivent être rajoutés les frais de transport liés à l'éloignement des centres de diagnostic.

Si l'on considère que le nombre estimé de cas diagnostiqués en 1990 varie de 600 à 1.000, calculé sur la base de 200 cas déclarés annuellement, le coût direct de la brucellose humaine en Algérie se situerait entre 7.200.000 DA et 12.000.000 DA.

Nous n'avons pas tenu compte dans cette estimation du coût des cas compliqués et/ou chroniques qui alourdissent le coût global de la maladie. Ce coût qui est une estimation grossière suffit à montrer le poids financier de la brucellose humaine pour l'économie des pays maghrébins.

## Conclusion

Les brucelloses représentent un problème de santé publique majeur au Maghreb. L'endémie brucellienne persistera tant que le réservoir animal ne sera pas contrôlé. La stratégie de lutte contre la brucellose implique la surveillance sanitaire des cheptels ovin et caprin ainsi que le relevé systématique des suspicions de brucellose humaine et leur confirmation par les services hospitaliers et le laboratoire.

Cet objectif ne peut être atteint que par une collaboration étroite et continue entre les équipes vétérinaires et médicales.

Devant l'existence d'un réservoir animal extrêmement dense et largement dispersé dans nos pays, il est nécessaire que le médecin soit averti de l'existence de ce réservoir et qu'il puisse faire appel à des moyens diagnostiques fiables devant toute symptomatologie évocatrice.

Les déclarations de cas d'un service à l'autre amélioreront le dépistage. En Algérie, les services vétérinaires sont informés de tout nouveau cas humain et entreprennent une



enquête dans le troupeau incriminé; de même tout foyer animal nouvellement dépisté entraîne systématiquement une enquête sérologique dans la population à risque. Les moyens de diagnostic sont mis en commun ce qui renforce la collaboration et l'efficacité des mesures de contrôle.

Depuis la mise en place du programme de lutte, nous assistons à une augmentation du nombre de cas témoignant d'un meilleur dépistage (12).

## Références

1. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M., 1988. Techniques for the brucellosis laboratory, INRA, Paris.
2. Bouchouk S., 1989. Epidémiologie et étude de la brucellose humaine dans la wilaya de Tlemcen. Colloque : La brucellose - Tlemcen - Mai 1989.
3. Bouchouk S., 1990. Epidémiologie et étude de la brucellose humaine dans la wilaya de Tlemcen. Séminaire sur les brucelloses - Ghardaïa, novembre 1990.
4. Benkirane A., Jabli N., Rodolakis A., 1990. Fréquence d'avortement et séroprévalence des principales maladies infectieuses abortives ovines dans la région de Rabat (Maroc) Ann. Rech. Vét., **21**, 267-273.
5. Bertrand A., 1981. Brucellose Encycl. méd. chir., Paris - Maladies infectieuses, 8083 A10 - 5 - 1981.
6. Bouatra M., 1970. Contribution à l'étude de la brucellose. Epidémiologie et prophylaxie au Maroc. Thèse méd. vét., Toulouse.
7. Boudilmi B., CHALABI N., MOUAZIZ A., 1990. Brucellose animale et humaine dans l'Ouest algérien. Quelques résultats sérologiques et bactériologiques. Communication présentée au séminaire sur les brucelloses en novembre 1990 à Ghardaïa.
8. Bulletin épidémiologique trimestriel (Ministère de la Santé Tunisien) n° 1 - 1989 - n° 2.3.4. - 1987.
9. Bulletin épidémiologique hebdomadaire (Ministère de la Santé Tunisien - DSSB), n° 28, 1991.
10. Chadli A., 1984. La brucellose en Tunisie ; Historique et données actuelles. Bull. acad. Nat. Med. 1984 octobre, novembre ; 168 (7-8) :941-57.
11. Cherif A., Benelmouffok A., Doudou A., 1986. Consommation de fromage de chèvre et brucellose humaine à Ghardaïa - (Algérie). Archives Institut Pasteur d'Algérie 1986, 55, 9-14.
12. C.N.L.C.Z. (Comité National de Lutte Contre les Zoonoses) Programme de lutte contre les zoonoses : documents de travail - rapports annuels de 1986 à 1990.
13. Fassi Fehri M., 1986. Evaluation et facteurs de diffusion de la brucellose au Maroc. Maroc. Med. 1975; 55, (1986) : 28-32.
14. Ferah T., Thomas J. et Coll., 1975. La brucellose humaine en Algérie. Revue du service de santé de l'armée nationale populaire - vol 8, 1975.
15. Hamdi-Cherif M. et Coll., 1990. La brucellose dans la wilaya de Sétif - Données épidémiologiques et stratégie. Communication présentée au séminaire sur les brucelloses à Ghardaïa - Novembre 1990.
16. Klouche C., 1990. La brucellose humaine à Ghardaïa. Communication présentée au séminaire sur les brucelloses en novembre 1990 à Ghardaïa.
17. Mehemli N., 1990. Cas d'un foyer animal et humain de brucellose - Laboratoire

- Vétérinaire Régional de Constantine. Communication présentée au séminaire sur les brucelloses en novembre 1990 à Ghardaïa.
18. Nicoletti P., 1982. Diagnostic and vaccination for the control of brucellosis in the Near East. FAO animal production and health paper n° 38, Rome.
  19. Oberti J., 1989. La brucellose en Algérie - Colloque : La brucellose - Tlemcen - mai 1989.
  20. Relevés épidémiologiques mensuels de l'Institut National de Santé Publique Algérie. Années 1989 - 1990.
  21. Sergent Ed., 1908. La fièvre méditerranéenne en Algérie. Ext. bull. Pathol. Exoth. T1 n° 1 - 1908.
  22. Tourab DJ., 1988. Epidémiologie de la brucellose professionnelle dans la région de Annaba - Thèse DESM 1988 - Université de Annaba - Algérie.
  23. Verger J.M., Duee J.P., Grayon M., 1982. Brucella isolées en France : bilan de 10 ans de typage. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), **133B**, 433-447.
  24. Zribi A., Bouzouaia N., Benchaabane T., Bensalem N., 1986. La brucellose en Tunisie in la rage et la brucellose dans le bassin méditerranéen et la péninsule arabe. Collection fondation Marcel Mérieux - Lyon 1986.

# La brucellose en Tunisie

K. El Hicheri, S. El Bahri

Directeur Général de l'Institut de la Recherche Vétérinaire, Rue Jebel Lakhdar, La Rabta, 1006 Tunis, Tunisie

## Aperçu sur l'élevage Tunisien

Le cheptel tunisien est dominé par les espèces ovine et caprine qui comptent respectivement 3.315.000 et 690.000 unités femelles. L'effectif bovin quant à lui, est constitué de 352.000 unités femelles dont 104.000 (30 %) de race pure laitière (frisonnes et croisées holstein).

Sur le plan géographique, l'élevage bovin prédomine dans le nord du pays (80 % de l'effectif), celui des petits ruminants prédominant dans le centre sud (65 % environ de l'effectif). En ce qui concerne les dromadaires, dont l'effectif est de 50.000 unités femelles, ils se situent principalement dans le sud et le centre de la Tunisie.

Le mode d'élevage prédominant, aussi bien par les bovins que pour les petits ruminants, est de type extensif. Seuls 30 % des bovins (bovins laitiers de race pure) sont élevés en système intensif. Pour les petits ruminants, la transhumance constitue le mode d'exploitation le plus pratiqué (déplacement du sud vers le nord en saison sèche, à la recherche de parcours). Dans la grande majorité des cas, il s'agit de troupeaux mixtes (ovins et caprins) appartenant à plusieurs propriétaires et dépassant souvent une vingtaine de femelles par propriétaire. En dehors des périodes de grande transhumance, ces troupeaux pègrinent dans leurs régions, à la recherche de parcours et de points d'eau.

Le cheptel de façon générale, n'est pas identifié individuellement, à l'exception des bovins laitiers soumis au contrôle des performances et à l'insémination artificielle.

Dans le sud tunisien, les grands parcours sahariens sont souvent pâturés en commun par des troupeaux tunisiens et de pays voisins. Au niveau des frontières terrestres, l'étanchéité n'est pas assurée et des échanges perpétuels d'animaux dans un sens et dans l'autre, se font au gré des saisons et des marchés.

## Epidémiologie de la brucellose en Tunisie

### Brucellose humaine

Le premier cas de brucellose humaine diagnostiqué en Tunisie l'a été en 1909 par Charles Nicolle. Les cas cliniques de brucellose humaine officiellement déclarés par les services du Ministère de la Santé Publique durant la période 1980 à 1988 sont de 45, soit une incidence moyenne annuelle de 5 cas.

A partir de 1989 et jusqu'en 1991 (à la date du 10 Octobre), une recrudescence des cas de brucellose humaine est enregistrée; de 59 cas en 1989, on passe rapidement en 1991 à 407 cas dont 225 pour la seule région de Gafsa, avec un pic pour les mois de Mai et Juin.

- Le germe en cause est *Brucella melitensis biovar 3*.
- Les malades de sexe mâle prédominent légèrement (sexe ratio de 1,35)

Tableau 1. Brucellose humaine en Tunisie (1980 - 1991).

Gouvernorats	1980/1988	1989	1990	1991 au 21/9/91	Total 1989- 21/9/91	Taux d'inci- dence moyen par an: 1989 - 1991
Kasserine	3	24	5	25	54	5,53
Kebili	1	14	16	8	38	12,12
Tataouine	3	9	17	55	81	24,96
Gafsa	0	3	10	211	224	29,40
Tozeur	-	2	1	24	27	13,58
Sidi Bouzid	0	2	2	4	8	0,86
Gabes	0	0	2	5	7	0,91
Le Kef	1	0	0	3	3	0,40
Total Tunisie	45 (5/an)	59	55	344 **	458	2,05 *

\* Taux d'incidence attendu (Tunisie/an/100.000 habitants) = 0,17

\*\* A la date du 19/10/91: 407 cas ont été enregistrés.

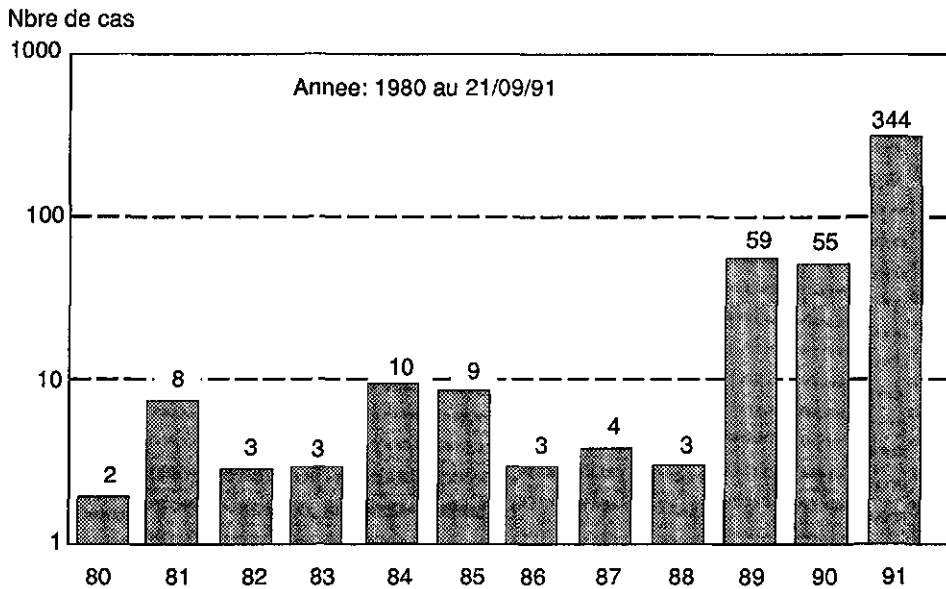


Figure 1. Incidence déclarée de la brucellose en Tunisie.

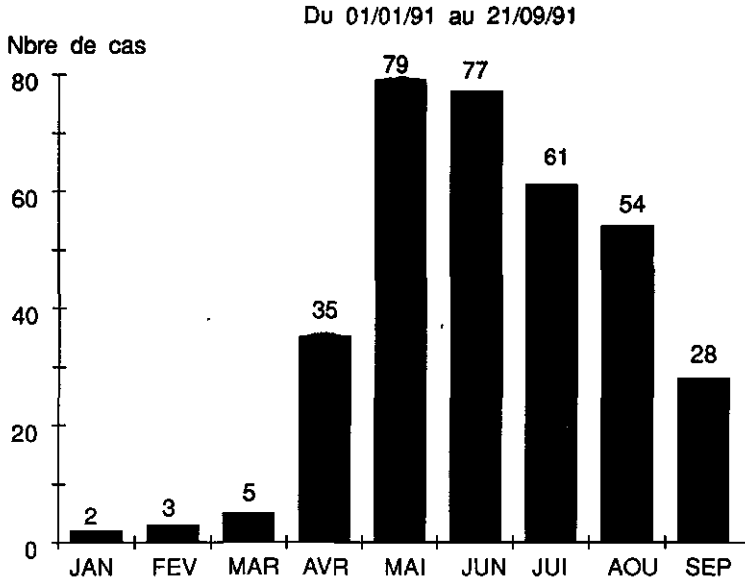


Figure 2. Incidence déclarée de la brucellose en Tunisie.

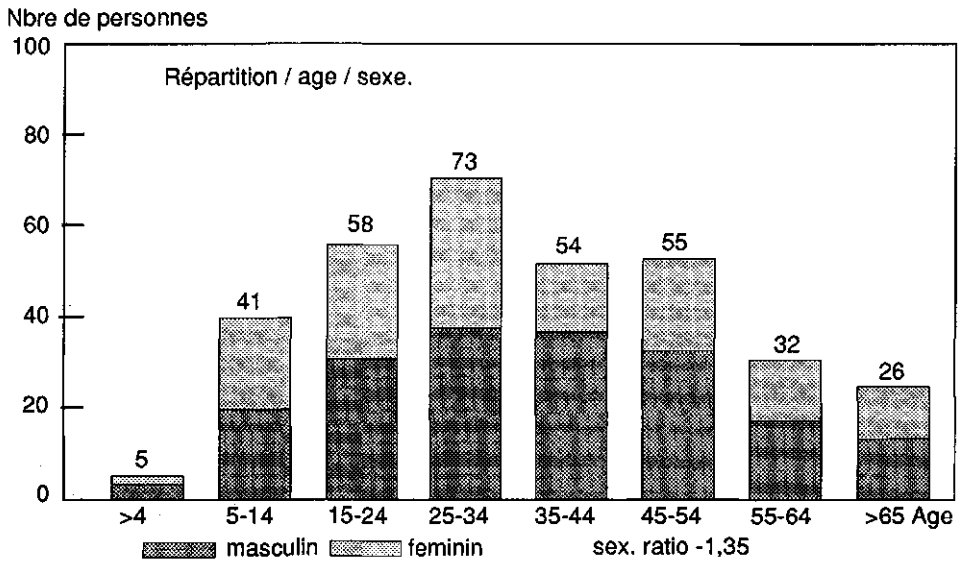


Figure 3. Brucellose humaine en Tunisie 01/01/91 au 21/09/91.

- L'ingestion de lait frais des petits ruminants et de lait cru caillé est dans 85 % des cas à l'origine de l'infection.

Les enquêtes sérologiques effectuées par l'Institut Pasteur de Tunis ou dans le cadre de travaux de thèse de doctorats vétérinaires révèlent les taux de séropositivité suivants :

- 15.876 sérums testés dont 1,5 % positifs (1954 à 1965)
- 15.093 sérums testés dont 0,15 % positifs (1968 à 1970)
- 412 sérums testés de 1980 à 1985 dans 3 régions du pays (Gabès, Mateur et Béjà) sur les catégories professionnelles à risque (éleveurs, bergers...) révèlent un taux de 6,6 % positifs.

### Brucellose des petits ruminants

Il n'y a pas eu jusqu'ici d'enquête épidémiologique à l'échelle nationale et le taux de prévalence à l'échelle des troupeaux de petits ruminants est encore inconnu.

Un projet d'enquête épidémiologique a été élaboré qui couvrira chacune des six grandes régions géo-économiques du pays. Les tests seront effectués sur les troupeaux identifiés par sondage aléatoire.

Un certain nombre d'informations sur le taux d'infection des animaux dans plusieurs régions du pays a pu néanmoins être dégagé à partir des travaux de thèse de doctorat vétérinaire. C'est ainsi que :

*chez les ovins*: cinq thèses ont été préparées de 1981 à 1984 dans cinq régions (Mateur, Monastir, Grombalia, M'saken et Sfax).

Les enquêtes sérologiques réalisées dans le cadre de ces travaux de thèse ont concerné 3.198 brebis et béliers, reproducteurs; 64 sérums se sont révélés positifs à l'épreuve du Rose

Tableau 2. Etat des foyers de Brucellose des petits ruminants déclarés en 1991.

Gouvernorats	Date de déclaration des foyers	Nombre de foyers	Observations
** Gafsa	22.4	1	
** Kebili	22.4	1	** confirmation par épreuves bactériologiques et sérologiques.
* Kasserine	23.5	2	
* Tozeur	29.5	2	
** Beja	6.7	4	
* Sidi Bouzid	9.7	1	* confirmation par épreuve sérologique.
** Kairouan	30.7	2	
* Sousse	3.8	1	
** Siliana	9.8	2	
** Bizerte	27.8	2	
* Zaghouan	28.8	3	
** Nabeul	28.8	1	
Total		22	

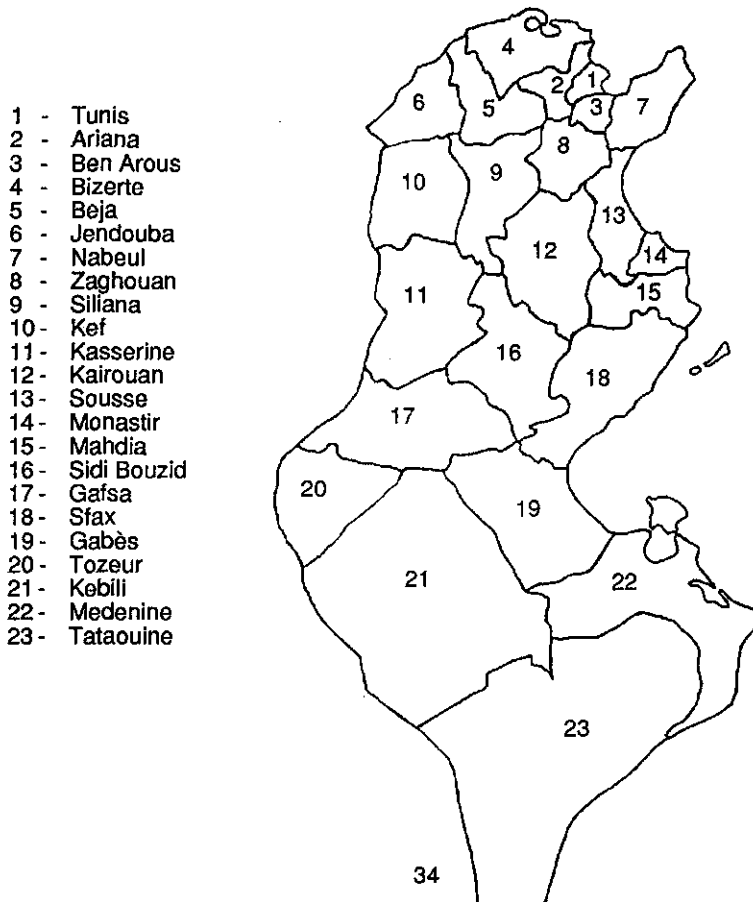
Bengale, soit un taux d'infection de 2 % des animaux testés.

*chez les caprins*: trois thèses ont été préparées en 1983 et ont concerné trois régions (Sejenane, Gabès et Mateur).

Les enquêtes sérologiques ont touché 34 troupeaux totalisant 3.378 brebis et béliers reproducteurs sur lesquels 1.551 sujets (46 % de l'effectif) ont fait l'objet de prises de sang; 48 sérums se sont révélés positifs à l'épreuve du Rose Bengale, soit un taux d'infection de 3,1 % des animaux testés.

L'année 1991 a été caractérisée par l'apparition de plusieurs foyers d'avortement épizootiques dont l'étiologie brucellique a été confirmée par les épreuves sérologiques et bactériologiques qui ont permis d'identifier l'agent pathogène en cause: *Brucella melitensis* Biovar 3.

Le premier foyer de brucellose des petits ruminants a été déclaré en Avril 1991 dans le



Carte 1. Gouvernorats ayant déclaré des foyers de Brucellose des petits ruminants durant l'année 1991.

gouvernorat de Gafsa; une enquête épidémiologique concernant plusieurs troupeaux a été effectuée; 1.279 petits ruminants ont fait l'objet de prises de sang; les résultats ont révélé ce qui suit :

- 61 % des caprins ont réagi positivement à l'épreuve du Rose Bengale.
- 30 % des ovins ont réagi positivement à l'épreuve du Rose Bengale.

Sur ces troupeaux du foyer déclaré, 15 à 20 % des femelles en gestation avaient avorté.

La séropositivité parmi les femelles ayant avorté est de 72,6 %.

Depuis la déclaration de ce foyer, qui a été à l'origine de la contamination de 225 personnes, 22 autres troupeaux ont été déclarés infectés dans 13 gouvernorats différents, en l'espace de 7 mois (d'Avril à Octobre 1991).

### **Brucellose des bovins**

Une enquête sérologique réalisée en 1983 par l'Institut de la Recherche Vétérinaire de Tunisie dans les élevages bovins laitiers de race pure du secteur privé ainsi que du secteur étatique et para-étatique a relevé ce qui suit:

- 400 exploitations privées ont été couvertes par l'enquête; sur 2.656 femelles bovines adultes ayant fait l'objet de prises de sang, 3,9 % des effectifs ont réagi positivement à l'épreuve du Rose Bengale et 13,7 % des troupeaux se sont révélés infectés.
- 26 exploitations du secteur étatique et para-étatique ont été couvertes par l'enquête; sur 6.039 femelles bovines adultes ayant fait l'objet de prises de sang, 0,74 % des sujets ont réagi positivement à l'épreuve du Rose Bengale.

Les enquêtes sérologiques effectuées dans le cadre des travaux de 4 thèses de doctorat vétérinaire intéressant 4 régions (Gafsa, Mateur, Nabeul, Sejenane) et ayant porté sur 1.971 sérums de femelles bovines adultes, ont révélés 38 sérums ayant réagi positivement à l'épreuve du Rose Bengale, soit 1,92 % des animaux testés.

Il n'y a actuellement pas de renseignements précis sur le taux d'infection des troupeaux et des bovins de races locales et croisées élevées en extensif.

L'enquête épidémiologique prévue en 1992 nous permettra de recueillir les informations nécessaires.

### **Programme de lutte**

Le programme de lutte contre la brucellose bovine n'est appliqué que sur les bovins laitiers de race pure. La vaccination des jeunes femelles bovines au B.19 (par voie sous-cutanée, à l'âge de 4 à 7 mois) ou au 45/20 (pour les génissons de 4 à 12 mois) touche 20.000 jeunes femelles bovines chaque année.

Les animaux vaccinés sont marqués à l'oreille par un trèfle en emporte-pièce.

Le programme de lutte contre la brucellose bovine comporte également une composante dépistage sérologique sur les femelles bovines âgées de plus de 18 mois. L'abattage des sujets présentant une sérologie positive est préconisé (>80 UI en SAW), mais aucune indemnisation n'est accordée.

Dans les élevages fortement infectés, les bovins du foyer sont vaccinés au H.38. L'agent pathogène en cause dans les brucelloses bovines est *Brucella abortus*.

Le programme de lutte contre la brucellose ne concernait jusqu'en 1991 que les bovins; néanmoins, vu l'important accroissement du nombre de cas de brucellose des petits ruminants, un séminaire a été organisé à Douz dans le sud du pays du 27 au 29.9.1991. Ce



séminaire a réuni vétérinaires du Ministère de l'Agriculture et médecins du Ministère de la Santé Publique, et a abouti à l'élaboration d'un programme national de prévention et de lutte contre la brucellose axé sur deux programmes d'intervention :

- la vaccination des petits ruminants ;
- l'éducation sanitaire du public.

Le choix de la vaccination de masse généralisée, obligatoire et gratuite, des petits ruminants, a été dicté par les conditions particulières d'élevage de ce cheptel, qui s'opposent à l'adoption d'une prophylaxie sanitaire ou médico-sanitaire (élevage extensif, échanges incontrôlés, troupeaux mixtes...).

Le vaccin retenu dans le cadre de cette vaccination est le Rev.1 administré par instillation oculaire (voie conjonctivale) à dose réduite ( $5-10 \times 10^9$ ) sans rappel.

La vaccination aura lieu dans la période qui s'étend de la fin de l'agnelage au début de la saison de lutte; elle devra être exhaustive et sera appelée à durer au moins dix ans.

La première campagne nationale de vaccination s'étendra ainsi de fin Novembre 1991 à Mars 1992 et concernera toutes les femelles ovines et caprines ainsi que les mâles reproducteurs, à partir de l'âge de trois mois; par la suite, ne seront vaccinés annuellement que les jeunes femelles ainsi que les jeunes mâles futurs reproducteurs nés au cours de l'année.

Les animaux vaccinés seront marqués à la pince emporte-pièce au niveau de l'oreille.

Le programme d'éducation sanitaire du public, qui sera mis en oeuvre par les services du Ministère de la Santé Publique avec la participation des services du Ministère de l'Agriculture, a pour but de maîtriser ou de réduire l'extension de la maladie.

Les objectifs fixés à ce programme sont de faire connaître à la population la maladie et ses conséquences sanitaires et de sensibiliser plus particulièrement la population à risques, en vue de l'amener à adopter des comportements de protection et à utiliser les moyens de lutte préconisés.

Le programme d'éducation sanitaire utilisera les moyens audio-visuels disponibles (médiats et relais de communications), organisera des séances de communication de masse et de groupe sous forme de tables rondes, journées d'information, éducation des malades, supports éducatifs dans les écoles.

Un certain nombre de mesures d'accompagnement a également été adopté; il s'agit notamment de :

- la vaccination des groupes professionnels à risques par les services de la médecine du travail ;
- l'extension du contrôle bactériologique pour la recherche des brucelles dans les produits laitiers crus ;
- l'extension des compétences du comité interdépartemental de lutte contre la rage à la brucellose ;
- le développement des échanges d'information épidémiologiques entre vétérinaires et médecins ;
- l'intégration du programme de lutte contre la brucellose dans un cadre régional Maghrébin.

# Brucellosis in cattle, sheep and goats - Malta

C.L. Vella

Director of Veterinary Services, Ministry of Agriculture and Fisheries, 3A Old Mint Street, Valletta, Malta

## Background

Cattle, goats and sheep are kept on the main Island Malta and the sister island Gozo. It is known that the dairy population has for many years been affected by *Brucella melitensis*. Back in the fifties, the eradication of brucellosis was proposed, and it became compulsory in 1961. Since then the eradication scheme has had bouts of success followed by regression mainly due to the approach in eradicating the disease; lack of funds; the change of farm management from barns to open yards; uncontrolled movement of animals due to the profitable sales of milk quotas; lack of human resources, mainly veterinarians.

In 1973, with the limited funds available, the disease was tackled on the island of Gozo. The main problem was in the goat and sheep population, where 21 % of the goats were reactors, and 5,2 % of the sheep were affected. Only 0,7 % of the cattle were reactors. A test and slaughter scheme led to the virtual eradication of brucellosis by 1980 (see Table 1).

Table 1. Evolution of prevalence of *Brucella* infection in ruminants from 1974 to 1980. Gozo

Year	Sheep(%)	Goats(%)	Cattle(%)
1974	5,2	20,9	0,7
1975	0,51	11,7	0,23
1976	4,7	23,4	0,23
1977	0,29	0,85	0,08
1978	0	0,17	0,1
1979	0	0	0,1
1980	0	0	0,1

Up to the 1980's there were insufficient funds for brucellosis eradication in Malta and the political will to carry out (or rather to finance) eradication was lacking. Under such circumstances the Veterinary Services had no option but to introduce limited strain 45/20 vaccination for cattle in herds that : (a) had no active infection and (b) were adjacent to infected farms. The producers were then assisted in carrying out voluntary slaughter of

reactors. Through this scheme, out of the 22 infected herds vaccinated, fifteen herds became accredited within 7 years of vaccination. It is worth noting that in 1980, 8 % of the cattle were reactors. During the same period no testing or vaccination of sheep and goats was carried out except for a survey in 1983, which showed that 12 % of the goats and 5 % of the sheep were affected.

### **Present situation**

In 1987, the newly elected Government approved the eradication of both brucellosis and tuberculosis from dairy animals. During the same year, a survey was carried in preparation for a sound eradication scheme. The infected status was bovines 7 %, goats 9 % and sheep 1 %, all on farms supplying milk for pasteurisation. With the tuberculosis situation being worse than that of brucellosis, and with almost half the dairy herds being infected with one or both diseases, it was decided to carry out a "blitz" eradication programme to eradicate both diseases in the shortest time possible. The principles laid down for this scheme, which are still being followed, are :

- (a) Legislation was amended to give a better enforcement of the control procedures, mainly the compulsory registration of all dairy units and the control of animal movements.
- (b) The public was made aware of the fact that undulant fever was caused by eating small cheeses made from the milk of infected animals. The public reacted by taking more care and buying less cheese. As a result of this most dairy owners came forward to register their herds and assist in the eradication of brucellosis. Over a thousand hitherto unknown units were registered.
- (c) No movement of animals (except for slaughter) was allowed during the first three months of the scheme.
- (d) During the first 12 months all registered animals were identified by ear-tagging and/or freeze branding and tested, and all new born animals had to be registered and identified by ear-tagging and also by photokit in the case of bovines. Unidentified animals were, and still are not allowed to be slaughtered before testing and identification.
- (e) Herds containing more than 10 % infected animals were depopulated within the first 8 months of the scheme. The depopulated farms were cleaned, disinfected and left empty for at least six months.
- (f) All animals on a problem farm were freeze branded with the letter 'B'.
- (g) Testing on infected farms was carried out at intervals of 1-3 months, depending on whether there was an active infection or not. Brucella reactors were ear-notched.
- (h) Reactors from non-problem farms were slaughtered as soon as possible, and not more than 14 days following the test.
- (i) Accredited herds were tested twice during the first twelve months of the scheme and then at least once yearly.
- (j) Milk quota transfers are strictly controlled and no quota is transferred if the herd is not accredited or if there is proof of unauthorised movement of animals.
- (k) Producers that had their farms depopulated were employed by the Government on a casual basis so that they carried out work (cleaning and restructuring) on their own farms. They are also assisted by other Government workers and were provided with the necessary equipment and supplies.
- (l) In the case of cattle farms, compensation was in kind -replacement of heifers- while for slaughtered goats and sheep financial compensation was given.

## Surveillance and testing

- All animals slaughtered are bled and screened.
- The ring test on bulk milk is carried out monthly on all farms that are officially licensed to sell milk to the pasteurisation plant.
- The Rose Bengal test is used as a screening test, sometimes complemented by the serum agglutination test. The micro-complement fixation test, the RDTA/SAT test and ELISA were introduced at the end of the scheme.

## Results

Table 2 shows the level of infection in sheep, goats, and cattle from 1988 to 1990.

*Table 2. Evolution of prevalence of brucella infection in ruminants from 1988 to 1990  
Malta*

Year	Type of Unit	Sheep(%)	Goats(%)	Cattle(%)
1988	Milk producers	2,78	10,4	1,8
	Others*	0,46	5,3	0,17
1989	Milk producers	2,17	6,4	0,2
	Others*	0,32	6,3	0,2
1990	Milk producers	0,78	3,1	0,28
	Others*	0,57	2,59	0

\*Others : cheese producers, fattening units, caring units

From Table 2 it appears that the eradication process is slow but this does not reflect reality as, for example in 1988, 38 herds (of milk producers) were affected (27 %), while in 1990 21 herds were affected (15 %), and in 1991 (till May) only one herd was infected (0,7 %). This "Slow" reduction of disease in ruminants was caused by the appearance of a few (but large) "phantom" herds that were traced through the bulk milk ring test or through epidemiological investigations following reported human brucellosis cases.

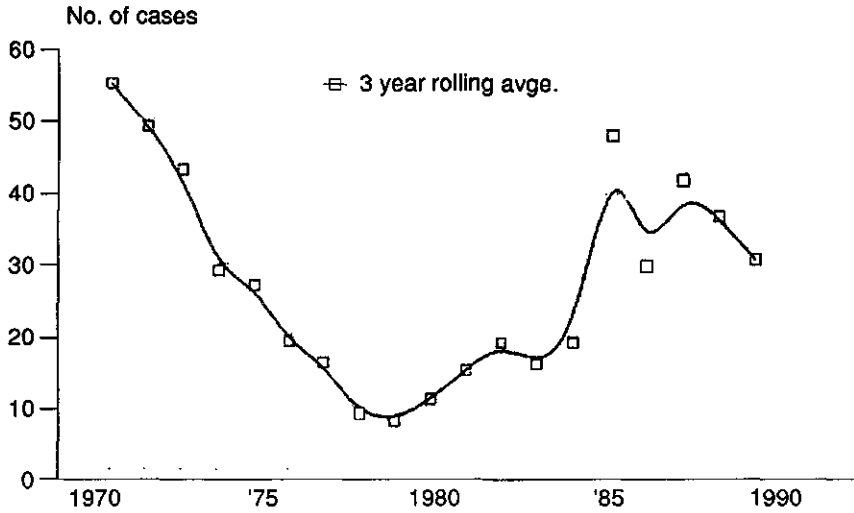
During the three years of intensive testing and controls, the spread of brucellosis was monitored. The main causes of the spread of the disease were :

- (a) unauthorised animal movement especially from "phantom" herds.
- (b) animals from different herds were moved to common grazing land.
- (c) human beings visiting infected farms or the slaughter house.

Dogs, through blood sampling for leishmaniosis, and pigs, through blood collected from the abattoir line, were screened for the possibility of their acting as vectors, but none was positive.

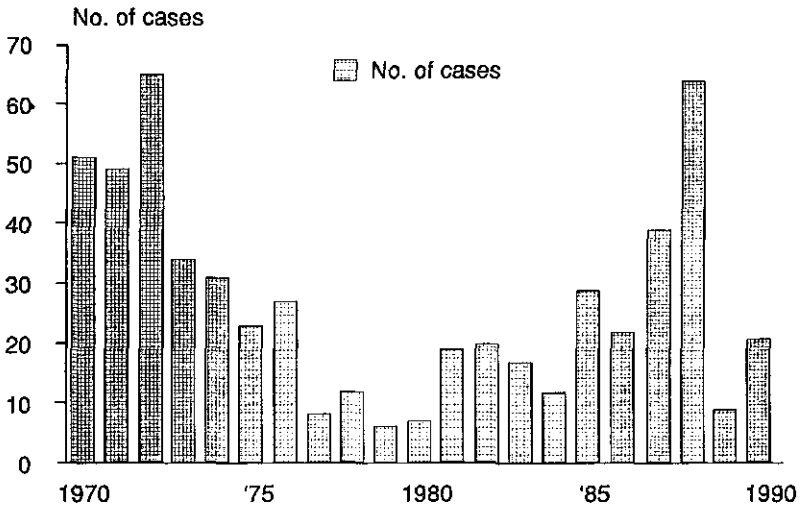
## Human brucellosis

Brucellosis in humans is notifiable and is also classified as an industrial disease. Though the local population seldom drinks raw milk, because it is pasteurized, it is a common habit to eat soft cheese made from sheep milk (though goats and cows milk is also utilized). Infection



Malta 1970-90

Figure 1. Human brucellosis, notified cases; Disease Surveillance Branche - D.O.H.



Malta 1970-90

Figure 2. Human brucellosis, Notified cases; Disease Surveillance Branch - D.O.H.

in humans was acquired more often through the consumption of cheese rather than through contact in the farming, milk and meat industries.

Figures 1 and 2 clearly demonstrate that once eradication commenced in Gozo (1973) and then Malta (1988) there was a considerable drop in human cases, not just through less infected cheese but also through public awareness.

# Epidémiologie de la brucellose animale et humaine en Espagne

A. Rodriguez-Torres, R. Abad et A. Orduña

- Laboratoire Régional de la Brucellose, Service de Bien-être Social, Valladolid - Département de Microbiologie, Hôpital Universitaire et Faculté de Médecine, Valladolid

## Introduction

La brucellose animale et humaine en Espagne est toujours un problème important de santé publique, bien que ces dernières années, on observe une amélioration considérable de la situation. Il est absolument évident que *Brucella melitensis* est l'agent responsable chez l'homme, dans l'immense majorité des cas, et toutes les études épidémiologiques confirment que la maladie dans le bétail ovin, et dans une moindre proportion les caprins, constitue la source fondamentale pour l'homme.

## Brucellose animale

Le Tableau 1 reflète le nombre de têtes de bovins, ovins, caprins en Espagne et leur distribution dans les 17 Communautés Autonomes constituant les divisions administratives et politiques du pays.

Les bovins (plus de 5 millions de têtes) sont surtout concentrés au nord du pays (Galice, Asturies, Cantabrie, Pays Basque, Navarre et Catalogne) ; on les trouve aussi en grand nombre dans quelques provinces de Castille et Léon.

Il y a plus de 23 millions d'ovins en Espagne. On les trouve dans toutes les régions, mais spécialement en Aragon, en Extrémadoure, en Castille-La Mancha, en Andalousie et plus encore en Castille et Léon.

Les caprins, plus de trois millions cinq cent mille têtes, sont particulièrement nombreux en Extrémadoure, en Castille-La Mancha et en Andalousie.

A partir de 1978, il existe un plan national d'assainissement du bétail en ce qui concerne la brucellose, recherchant, sur trois phases (1978/85, 1986/90 et 1991/95) l'éradication de la brucellose bovine et le contrôle de l'infection chez les ovins et les caprins.

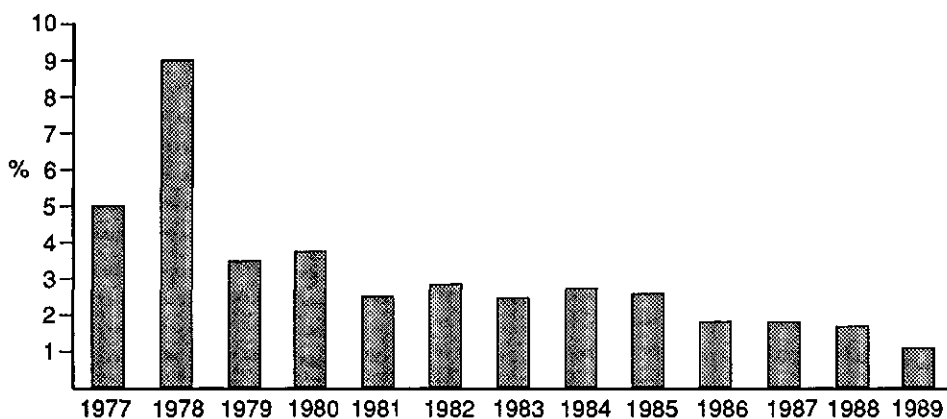
Quant à la brucellose bovine, la Figure 1 montre l'évolution du pourcentage d'animaux positifs, parmi ceux étudiés au cours des campagnes d'assainissement, pendant la période 1978-1989. On observe une diminution progressive de la prévalence jusqu'à des taux inférieurs à 1 % en 1989. Cette année (Tableau 2), 0,93 % d'animaux positifs ont été détectés chez les bovins. Les indices de positivité les plus élevés furent observés à Madrid (4,1 %), en Catalogne (2,6 %) et en Castille et Léon (2,7 %), tandis que dans les régions atlantiques, les pourcentages étaient très faibles (Navarre 0,2 % ; Pays Basque 0,9 % ; Asturies 0,3 % ; Cantabrie 0,5 % ; Galice 0,5 %).

En ce qui concerne la brucellose chez les ovins et les caprins, l'information existante est moins complète. L'évolution pendant la période 1978-89 du pourcentage d'animaux positifs parmi ceux étudiés au cours des campagnes d'assainissement (Figure 2) montre une

*Tableau 1. Recensement du bétail bovin, ovin et caprin en Espagne par communautés autonomes, décembre 1988.*

Communautés autonomes	Bovins	Ovins	Caprins
Galice	837.516	111.601	86.673
Asturies	389.420	43.205	32.998
Cantabrie	333.215	55.176	17.774
Pays Basque	180.034	338.551	34.829
Navarre	84.940	809.608	31.306
La Rioja	43.165	272.734	52.482
Aragon	181.910	3.542.428	117.544
Catalogne	528.811	1.224.138	76.413
Baléares	57.018	321.633	18.796
Castille et Léon	1.095.945	5.696.433	344.349
Madrid	94.528	249.637	54.754
Castille-La Mancha	266.406	233.691	853.127
C. de Valence	43.793	510.454	83.694
R. de Murcie	25.651	451.382	87.608
Extremadoure	406.624	3.679.435	570.323
Andalousie	477.221	2.250.711	1.075.784
Canaries	14.880	7.128	110.054
Espagne	5.061.075	19.797.945	3.648.508

Source: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación



*Figure 1. Bétail bovin. Prévalence d'animaux positifs obtenue au cours des campagnes d'assainissement. Espagne, période 1977-1989. Source: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.*

*Tableau 2. Brucellose chez les bovins en Espagne, 1989.*

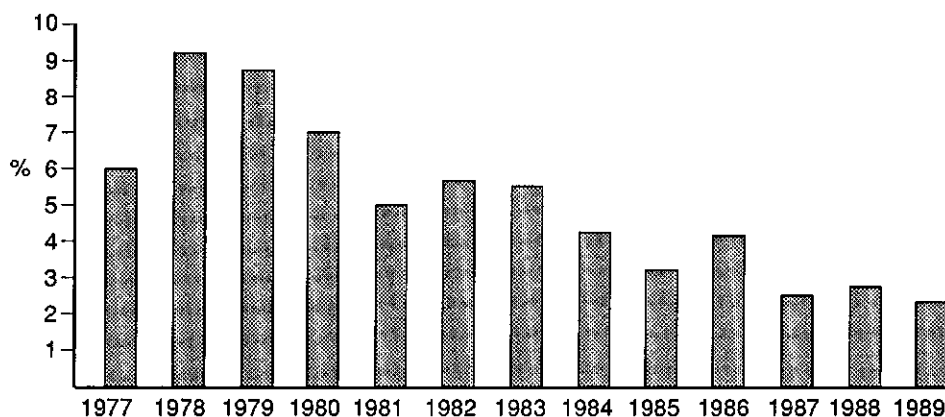
Troupeaux étudiés	209.415
Troupeaux libres	200.965 (96%)
Têtes de bétail étudiées	2.050.599 (45% du recensement)
Têtes de bétail positives	19.189 (0,93%)
Indemnités	531 millions de pèsètes

Source: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Laboratorio Nacional de Sanidad Animal.

*Tableau 3. Brucellose chez les ovins et les caprins en Espagne. 1989.*

Troupeaux étudiés	30.984
Têtes de bétail étudiées	1.392.081 (5% du recensement)
Têtes de bétail positives	27.059 (1,94%)
Indemnités	191 millions de pèsètes

Source: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Laboratorio Nacional de Sanidad Animal.



*Figure 2. Bétail ovin et caprin. Prévalence d'animaux positifs obtenue au cours des campagnes d'assainissement. Espagne, période 1977-1989. Source: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.*

baisse progressive de la prévalence jusqu'à des taux inférieurs à 2 % en 1989. Cette année (Tableau 3), 1,94 % d'animaux positifs furent détectés. Les taux de positivité les plus élevés, bien que calculés sur des échantillons peu significatifs, furent observés en Aragon (22 %), dans la Communauté de Valence (12 %), en Catalogne (11 %) et en Castille et Léon (9,1 %), alors que les taux étaient plus bas (<0,5 %) dans d'autres régions comme les Asturies ou le Pays Basque.



## Espèces et biovars responsables de la brucellose animale

Le Tableau 4, établi sur la base de données bibliographiques<sup>1-4</sup>, indique les espèces et biovars de *Brucella* isolées dans différentes espèces animales en Espagne et confirme, bien que de façon non exclusive, la spécificité d'hôte préférentiel parmi le bétail. En ce qui concerne l'infection par *B. melitensis*, le sérovar 1 prédomine (61 %), suivi de loin par les biovars 2 et 3 (à peu près 19 % pour chacun). L'infection par *B. abortus* est due presque exclusivement (98,3 %) au biovar 1 (F. Crespo, Laboratoire National de la Brucellose, Murcie : Communication personnelle).

En résumé, le problème de la brucellose animale en Espagne se pose surtout pour les ovins et les caprins. Pour les bovins, la brucellose est bien contrôlée grâce à plusieurs facteurs : la taille adéquate des exploitations, les bonnes conditions d'hygiène et l'efficacité des stratégies de lutte, basées notamment sur la vaccination avec B19.

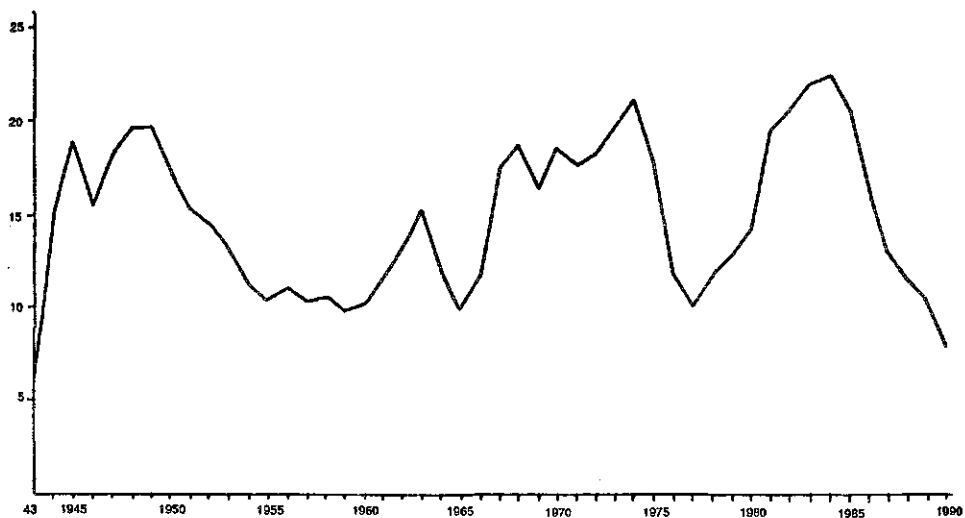
Par contre, les dimensions inadéquates des exploitations, souvent de type familial, le régime économique précaire, les conditions culturelles et sociales, la transhumance, et les limitations de la vaccination avec Rev.1, rendent difficiles le contrôle de la brucellose ovine et caprine.

Tableau 4. Espèces et biovars de *Brucella* isolées des animaux en Espagne.

Espèce	Biovar	Bétail
<i>B. melitensis</i>	1	Ovin/Caprin/Bovin/Porcin
	2	Ovin/Caprin
	3	Ovin/Caprin/Bovin
<i>B. abortus</i>	1	Bovin/Porcin
	2	Bovin
	3	Bovin/Porcin
	4	Bovin/Ovin
<i>B. suis</i>	1	Porcin
	2	Porcin
<i>B. ovis</i>		Ovin

## La brucellose humaine

La Figure 3 montre l'évolution des taux pour 100.000 habitants, de 1943 à 1990, des cas de brucellose humaine déclarés en Espagne. On distingue trois vagues (1944-1955, 1967-1977, 1978-1987) suivies de périodes pendant lesquelles le nombre des cas diminue considérablement. Une analyse attentive des cas et des taux par province et par région, réalisée par le Centre National d'Epidémiologie, permet d'expliquer que ces oscillations, au niveau national, sont dues à la diffusion épidémique de la maladie dans plusieurs Communautés Autonomes, à des périodes différentes. Pour la période 1944-1955, les régions les plus atteintes, avec des taux très élevés, ont été en grande partie la Navarre, l'Aragon et la Rioja. La vague correspondant à la période 1967-1977, est due principalement à la diffusion explosive de la maladie en Castille et Léon. La dernière de ces vagues, 1978-1987, correspondant sans doute à l'accroissement enregistré pendant cette période en



*Figure 3. Evolution de la brucellose humaine en Espagne. Taux pour 100.000 habitants pendant la période 1943-1990. Source: Boletín Epidemiológico Semanal del Ministerio de Sanidad y Consumo*

Castille-La Mancha, en Extrémadoure et en Andalousie. La Figure 4 exprime ces faits graphiquement et dans leur totalité.

Les chiffres officiels résultant de cas déclarés en Espagne reflètent assez bien la réalité des cas cliniques, du moins à partir des années 80, suite à l'effort des chercheurs qui se sont consacrés à l'étude de la brucellose en Espagne, avec la multiplication des activités de recherche et de vulgarisation, surtout à partir des années 70, et qui ont mené à une considérable prise de conscience de la part des médecins généralistes. En tout cas, même en supposant que les statistiques basées sur les déclarations sous-estiment en partie le nombre des cas, elles définissent clairement les tendances. Depuis 1986, le nombre de cas a diminué progressivement, et les indices épidémiques reflètent clairement cette chute spectaculaire (Tableau 5).

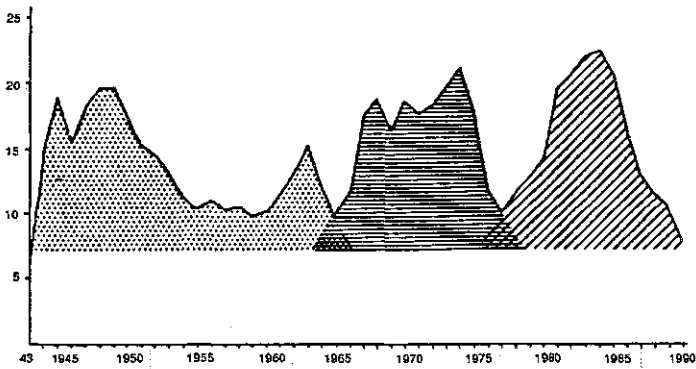
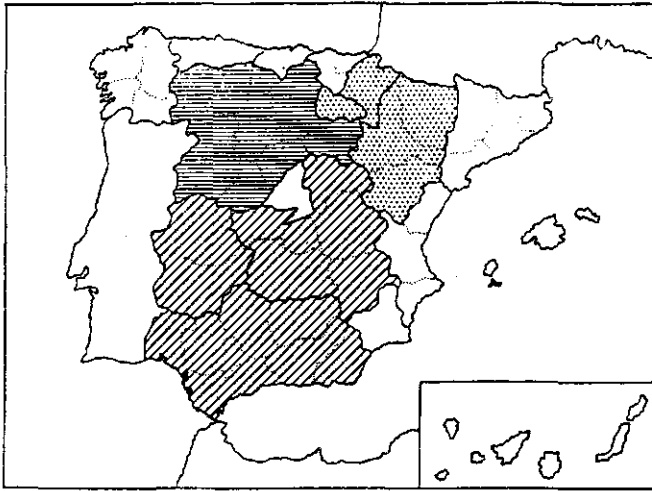
En Espagne, la brucellose humaine présente divers modèles épidémiologiques<sup>5</sup>, qui peuvent se regrouper au moins en trois régions et circonstances (Tableau 6).

#### **Espèces et biovars responsables de la brucellose humaine**

Pendant la période comprise entre 1974 et avril 1990, au Laboratoire Régional de la Brucellose de Valladolid (Tableau 7), 2 078 souches du genre *Brucella*, isolées chez l'homme et provenant de 34 provinces espagnoles appartenant à 16 Communautés Autonomes, ont été biotypées.

Les souches, isolées majoritairement par hémoculture, ont été remises par 72 centres sanitaires, et surtout des hôpitaux.

Le biotypage a été réalisé par les méthodes habituelles<sup>6-8</sup>. Le Tableau 8 montre les biovariétés identifiées par province d'origine.



*Figure 4. Représentation graphique de l'évolution de la brucellose humaine en Espagne et de la participation de plusieurs régions dans les oscillations enregistrées dans l'incidence. Période 1943-1990.*

- ..... Navarre, Aragon et La Rioja.
- ===== Castille et Léon.
- //// Castille-La Mancha, Extremadoure et Andalousie.

*Tableau 5. Cas, taux pour 100.000 habitants, et indices épidémiques de la brucellose humaine pour la période 1980-1990.*

Années	Cas		Indice épidémique* accumulé
	nombre	taux	
1980	5423	14,48	1,19
1981	7423	19,63	1,61
1982	7840	20,52	1,60
1983	8393	21,75	1,55
1984	8698	22,33	1,18
1985	8138	20,68	1,04
1986	6255	15,74	0,77
1987	4948	12,32	0,61
1988	4683	11,55	0,58
1989	4217	10,29	0,68
1990	3041	7,35	0,61

\* L'indice épidémique est le rapport entre les cas observés pour une période et les cas attendus (moyenne des 5 années précédentes). Si la valeur de l'indice se trouve entre 0,75 et 1,24, l'incidence sera considérée normale, basse si elle est inférieure ou égale à 0,75, et élevée si elle est supérieure ou égale à 1,25.

Source: Boletín Epidemiológico Semanal del Ministerio de Sanidad y Consumo.

*Tableau 6. Profils épidémiologiques de la brucellose humaine en Espagne.*

**Castille et Léon, Plateau Nord\***

Source d'infection: Brebis.

Mécanisme principal de transmission: Contact avec les animaux.

Prédominance claire chez les hommes.

Distribution dans toutes les tranches d'âge actives.

Maladie professionnelle.

**Andalousie**

Source d'infection principale: la chèvre.

Mécanisme de transmission principal: ingestion de lait et de produits dérivés.

Pas de prédominance chez les hommes.

**Zones urbaines**

Mécanisme de transmission principal: ingestion de fromage frais de fabrication artisanale et d'origine rurale.

\* Il est probable que ce modèle prédomine aussi dans la plus grande partie du centre de la péninsule

Tableau 7. Distribution par communautés autonomes, provinces et nombre d'établissements de 2078 souches envoyées pour identification entre 1974 et avril 1991.

Communautés autonomes	Provinces	N° d'établissements	N° de souches
Galice	La Coruña	1	3
	Lugo	1	27
Asturies	Asturias	5	17
Cantabrie	Cantabrie	1	24
Pays Basque	Vizcaya	1	3
	Guipuzcoa	1	2
	Alava	1	4
Navarre	Navarre	2	88
La Rioja	Logroño	2	5
Aragon	Zaragosse	3	41
	Huesca	1	1
Catalogne	Barcelone	16	498
	Tarragone	1	47
Baléares	Baléares	1	1
Valence	Valence	2	47
	Alicanta	1	23
Castille et Léon	Zamora	1	10
	Salamanque	1	28
	Avila	1	3
	Palencia	1	2
	Valladolid	4	682
	Burgos	2	61
	Soria	1	65
	Madrid	Madrid	6
Extremadoure	Badajoz	1	1
	Caceres	1	1
Castille-La Mancha	Ciudad Real	1	3
Andalousie	Albacete	1	41
	Cordoue	3	38
	Seville	1	97
	Malaga	1	59
	Grenade	3	9
Canaries	Tenerife	1	1
	Grande Canarie	2	2
16	34	72	2078

Tableau 8. *Especie et biovar de 2078 souches de Brucella d'origine humaine. Distribution par provinces.*

	<i>B. melitensis</i>			<i>B. abortus</i>		Non typables*	Total
	Serovar 1	Serovar 2	Serovar 3	Biovar 1	Biovar 3		
La Coruña	2	-	1	-	-	-	3
Lugo	26	-	-	1	-	-	27
Asturies	9	-	2	5	-	1	17
Cantabrie	9	-	13	2	-	-	24
Vizcaya	1	-	-	2	-	-	3
Guipuzcoa	2	-	-	-	-	-	2
Alava	3	-	1	-	-	-	4
Navarre	71	-	13	4	-	-	88
Logroño	5	-	-	-	-	-	5
Zaragosse	32	1	8	-	-	-	41
Huesca	1	-	-	-	-	-	1
Barcelone	356	11	125	3	-	3	498
Tarragone	18	5	24	-	-	-	47
Baleares	1	-	-	-	-	-	1
Valence	21	3	23	-	-	-	47
Alicante	21	-	2	-	-	-	23
Zamora	2	-	8	-	-	-	10
Salamanque	9	1	18	-	-	-	28
Avila	-	-	3	-	-	-	3
Palencia	1	-	1	-	-	-	2
Valladolid	16	4	658	-	1	3	682
Burgos	31	1	29	-	-	-	61
Soria	44	3	18	-	-	-	65
Madrid	109	2	31	-	-	2	144
Badajoz	1	-	-	-	-	-	1
Caceres	-	-	1	-	-	-	1
Ciudad Real	2	-	1	-	-	-	3
Albacete	29	4	8	-	-	-	41
Cordoue	31	2	5	-	-	-	38
Seville	85	-	12	-	-	-	97
Malaga	51	7	1	-	-	-	59
Grenade	8	-	1	-	-	-	9
Tenerife	1	-	-	-	-	-	1
G. Canarie	-	-	-	2	-	-	2
Total	998	44	1007	19	1	9	2078

\* Du fait qu'elles se présentent de façon persistante en phase rugueuse.

Tableau 9. Distribution par espèces de 2078 souches de *Brucella*.

<i>B. melitensis</i>	2049	(98,60%)
<i>B. abortus</i>	20	(0,96%)
Non typables	9	(0,43%)
2078		

Tableau 10. Distribution par sérovars de 2049 souches de *B. melitensis*.

<i>B. melitensis</i>	serovar 1	998	(48,70%)
<i>B. melitensis</i>	serovar 2	44	(2,14%)
<i>B. melitensis</i>	serovar 3	1007	(49,19%)
2049			

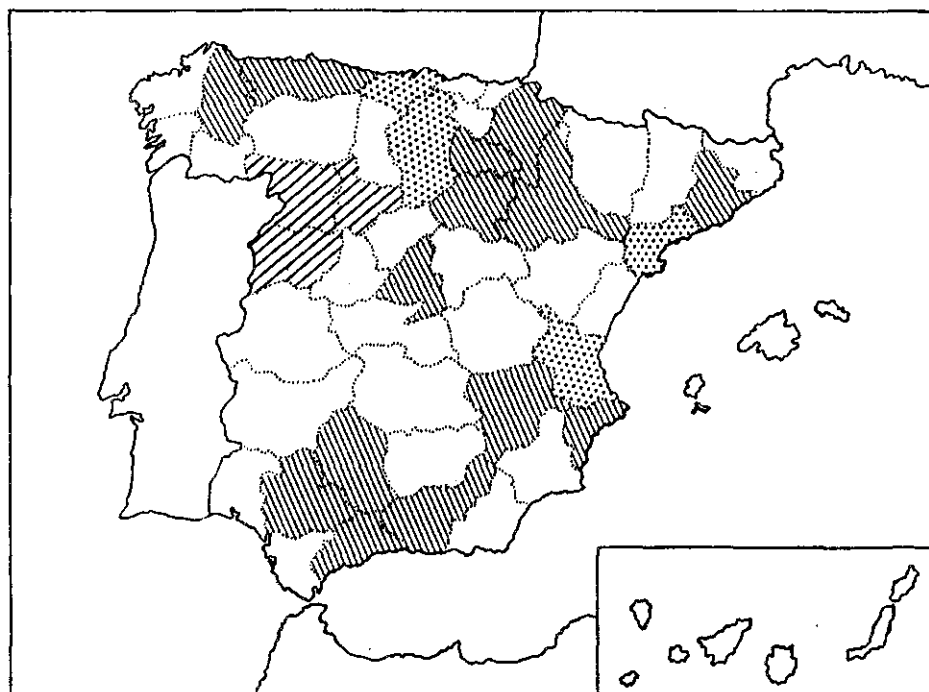





Figure 5. Distribution géographique des sérovars de *B. melitensis* dans la brucellose humaine en Espagne

-  Prédominance du sérovar 1.
-  Prédominance du sérovar 3.
-  Distribution similaire des sérovars 1 et 3.

Comme le montre le Tableau 9, 98,6 % des cas de brucellose humaine sont produits par *B. melitensis*. La brucellose humaine par *B. abortus* est très rare (moins de 1 %). Aucun cas de *B. suis* ni de *B. canis* n'a été enregistré.

Les sérovars 1 et 3 de *B. melitensis* sont beaucoup plus fréquents que le sérovar 2, qui cependant est également présent (Tableau 10). Bien que le nombre global de souches des sérovars 1 et 3 soit similaire, le nombre des souches du sérovar 3 est influencé par le nombre élevé des souches provenant de Valladolid. On en déduit que le sérovar 1 est, de loin, le plus fréquent en Espagne. La distribution géographique des sérovars 1 et 3 est différente. 21 provinces espagnoles ont envoyé un nombre suffisant de souches, ce qui nous permet d'estimer la distribution des sérovars de *B. melitensis* (voir Figure 5). Le sérovar 1 est la cause principale en Navarre, dans la Rioja, à Soria, à Saragosse, à Madrid, à Barcelone, à Albacete, à Alicante et en Andalousie, ainsi qu'aux Asturies et à Lugo. Le sérovar 3 par contre, est clairement prédominant dans le plateau nord (Castille et Léon), les chiffres étant très significatifs à Valladolid, Salamanque et Zamora. Les deux biovars 1 et 3 sont la cause de la brucellose humaine à parts égales à Tarragone et Valence, ainsi que dans une zone



Figure 6. Distribution géographique des cas à *B. abortus* dans la brucellose humaine en Espagne.

- ▲ Cas par biovar 1.
- Cas par biovar 3.



limitrophe représentée par Burgos et la Cantabrie. Le biovar 2 est isolé plus fréquemment en Catalogne (Barcelone et Tarragone) et à Malaga (Tableau 8).

Le premier cas de brucellose humaine par *B. abortus*, identifié de façon non équivoque, n'a pas été décrit jusqu'en 1978°. Depuis cette date, l'infection humaine par *B. abortus* a été confirmée dans notre laboratoire dans 20 cas (19 par le biovar 1 et 1 cas par le biovar 3). Sa distribution géographique (Figure 6) indique qu'il est plus fréquent dans la zone de la corniche cantabrique, région où l'élevage bovin est plus important. Les deux souches provenant des Canaries, archipel pratiquement indemne de brucellose, correspondent à un épisode ponctuel dû à une importation de bétail bovin.

Tout au long des 17 années d'étude, les biovars responsables de la brucellose humaine, ainsi que leur distribution, n'ont pas subi de variations significatives.

Il existe une bonne corrélation entre l'étiologie chez l'homme et dans le bétail. Notre expérience n'a pas détecté de cas humains par *B. abortus* 2 et 4 qui, par contre, ont été isolés dans le bétail (Tableau 4). Dans le bétail porcin, les biovars 1 et 2 de *B. suis* ont été isolés; le dernier n'étant pas pathogène pour l'homme, nous n'avons pas détecté d'infection humaine par *B. suis*, biovar 1. *B. ovis* qui infecte aussi le bétail ovin en Espagne n'est pas non plus pathogène chez l'homme.

Les rares cas de *B. abortus* chez l'homme, dont certains biovars ne sont pourtant pas rares dans le bétail surtout bovin, méritent un commentaire. Nous pourrions penser que ces cas sont plus rares à cause de la meilleure qualité d'hygiène et des dimensions plus adéquates des exploitations bovines, de la meilleure hygiène de leurs produits, ainsi que de la considérable réduction de la brucellose bovine, ces dernières années. Cependant, il se peut que les infections humaines par *B. abortus* soient sous-estimées parce que la bactériémie est peu intense dans l'infection causée par cette espèce, par le besoin de CO<sub>2</sub> pour isoler les biovars 1 à 4, et parce qu'un faible pourcentage des cas de brucellose est diagnostiqué par isolement, seul moyen permettant de préciser l'espèce et la variété.

## Références

- Aller B : Brucellosis in Spain. Int. J. Zoonoses, 1975, 2 : 10-15
- Crespo F., Rodriguez Ferri F., Cifuentes D., Marsilla B. : Contribucion al estudio de la epizootiologia de la brucelosis en cuatro regiones del Norte de Espana. Med. Vet., 1986, 3 : 617-622.
- Crespo F., Rodriguez Ferri F., Marsilla B. : Contribucion al estudio de la epizootiologia de la brucelosis en regiones del Centro y Sur de Espana. Med. Vet., 1986, 3 : 623-628.
- Blasco J.M. : Estado actual de la brucelosis bovina en Espana. Bovis, 1986, 9 : 13-17.
- Rodriguez Torres A. : Diagnostico de la brucelosis humana. Rev. Esp. Reumat., 1988; 15 : 203-214.
- Alton G.G., Jones L.M., Pietz D.E. : Laboratory Techniques in brucellosis. WHO Monograph series No. 55, 2nd Ed., WHO Geneva, 1975.
- Corbel M.J., Gill K.P.W., Thomas E.L. : Methods for the identification of *Brucella*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, 1983.
- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M. : Techniques for the brucelosis laboratory. INRA, Paris, 1988.
- Mellado A., Salesa R., Fernandez Mazarrasa C., Hernandez Mejia R., Landinez R., Rodriguez Torres A. : Aislamiento e identificacion de *B. abortus* biotipo 1 en un caso de neurobrucelosis humana. Laboratorio, 1979, 68 : 411-421.

# Epidemiology of human and animal brucellosis in Turkey

E. Istanbulluoglu

Director General, Protection and Control Directorate,  
Ministry of Agriculture, Forestry and Rural Affairs, Ankara, Turkey

## Abstract

The epidemiology of brucellosis (ovine, caprine and human) caused by *Brucella melitensis*, probably the most important zoonosis in Turkey, is discussed and the salient features of a national control and eradication program for ovine and caprine brucellosis are described.

## Introduction

Turkey has very large sheep and goat populations (41 and 11.3 million respectively). As in other countries of the Mediterranean and Arab Peninsula, brucellosis due to *Brucella melitensis* is the most important zoonosis. Although a decrease in the national level of ovine and caprine brucellosis infection continues, owing to a national control and eradication program, which commenced in 1984, final eradication needs more resources, better supervision, increased vaccine production and large scale disease control measures such as testing and slaughter.

In this paper the epidemiology of ovine-caprine-human brucellosis caused by *Brucella melitensis* in Turkey is discussed. Prevention and control measures are discussed and constraints affecting the efficacy of control and eradication program are defined.

## Brucellosis in sheep and goat

The first cases of ovine and caprine brucellosis were reported by Golem in 1943; Koyluoglu ve Altan Aktan 1944.

In 1952-63, a study conducted mainly at state farms, using the tube or rapid plate agglutination test, showed 2.6 % reactors.

Another survey conducted in 1960-1970 period at Karacabey State Farm showed that 5 % of the animals were positive.

During 1965-1966 a study of the Merino Sheep Breeding Farm demonstrated that 9 % of the animals were sero-positive.

A national survey conducted in 1970-1985 showed a reactor rate of 11.4% in sheep.

In 1988, serological testing of 1033 ewes which aborted showed 12.6 % reactors.

A recent survey by the Ministry of agriculture Forestry and Rural Affairs in 1989 gave an overall rate of 1.26 % positive reactors among sheep, ranging from nil to 10 % in different provinces.

A five year evaluation of *B. melitensis* infection in sheep and goats is given in Fig.1. Figure 2 shows regionally estimated prevalence of *B. melitensis* infection in the sheep and goat population.

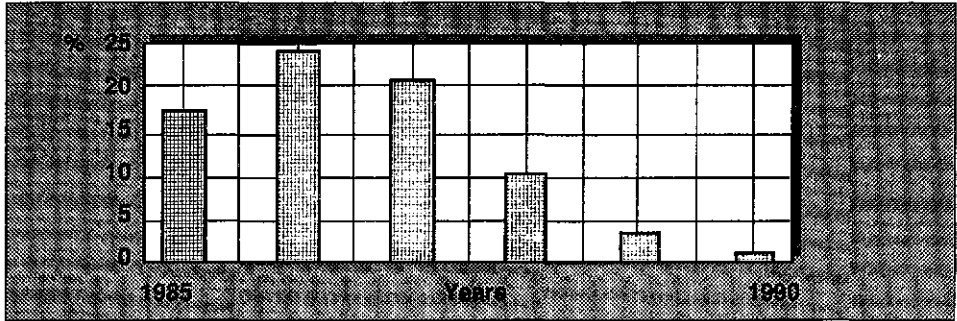


Figure 1. Ovine and caprine Brucellosis in Turkey (percentage of reactors between 1985 and 1990).

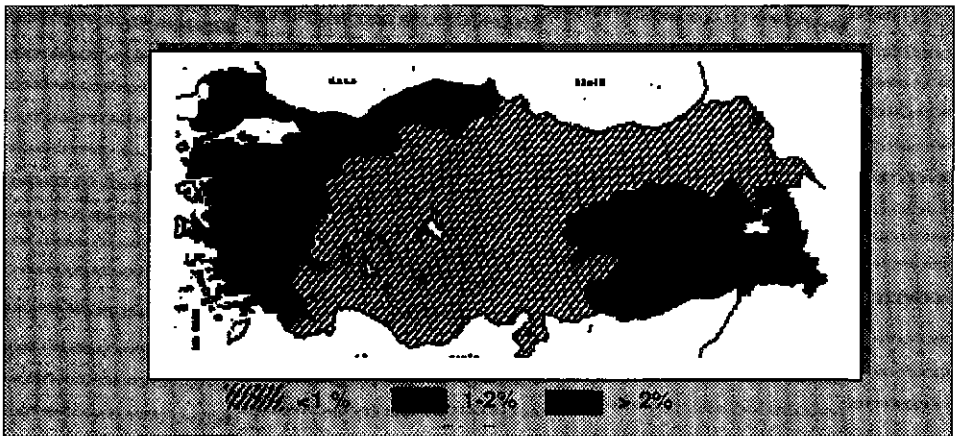


Figure 2. National survey on ovine and caprine brucellosis in Turkey (1990). Distribution of reactors.

### Brucellosis in man

Although, the first human case of brucellosis (a soldier) in Turkey was recorded in 1915, the epidemiology of human brucellosis was not defined accurately until 1989.

A survey carried out among workers at slaughter houses in Ankara in 1947 indicated that 10 % were infected. In a similar study, 7,8 % of persons living in the vicinity of slaughter houses were positive.

Up to 1968, official records indicated that serum from 11621 patients was tested and 1046 were positive to the agglutination test with *B. melitensis* antigen.

A serological survey conducted by Hacettepe (Faculty of Medicine, Ankara) indicated that the infection rate among people who live in Ankara and its vicinity was 7 %. A similar study conducted by the Medical Faculty of Aegean University indicated an infection rate of 5.5 %.

In 1985-1986, Ata *et al.* investigated hospital records of 308 patients and 18 were positive to the agglutination test.

Fazli *et al.* (1987) examined, between 1982 and 1986, 6586 sera from from suspected brucellosis cases and 9.9 % were positive.

To determine the incidence of brucellosis throughout the country, a large-scale survey was conducted by Cetin and his colleagues between 1984 and 1987. Thirteen teams were established, each working in a different region. 70009 sera were tested by SPOT and Rose-Bengal slide agglutination, tube agglutination, complement fixation, and by Coombs antiglobulin technique. The following results were reported.

- a. By SPOT test, 1,4 % of the sera (625 of 44780) and by Rose-Bengal test 3.3 % (843 of 25229) were positive.
- b. In a normal population (groups A and B in the text) 830 of 58707 samples were positive to the agglutination test. According to the tube agglutination results performed in a proportion of these samples, the expected seropositivity was calculated to be 1054 (1.8 %) in these groups.
- c. The highest seropositivity ratios were obtained in the Diyarbakir region, being 3.6 % in group A and 4.7 % in group B.
- d. The expected number of seropositives tube agglutination was calculated to be 225 (6%) in 3734 persons from the high risk occupation group.
- e. The expected number of seropositives among 7568 persons attending hospitals with complaints in conformity with brucellosis was 506 (6.7%).
- f. IgM type specific antibody was detected in 261 (16.6%) out of 1573 specimens by the Rivanol agglutination test.
- g. Out of 3893 specimens tested with Coombs reagent, incomplete antibodies were detected in 40 (1%). Out of the 8593 agglutination-negative specimens, 35 (0.4%) contained complement fixing-antibodies.
- h. According to these results it was calculated that some 1.75 million persons had contracted Brucellosis in Turkey.

Human brucellosis cases reported by the Ministry of Health in two-years periods is given in Fig. 3. While in 1970/71 there were 107 cases, in 1980/81 there were 624 and in 1988/89 5501 cases.

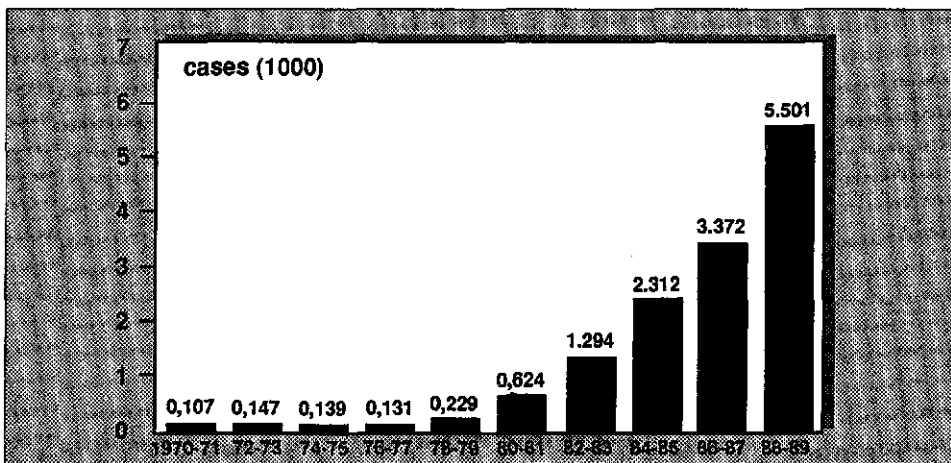


Figure 3. Human brucellosis in Turkey. Cases reported by two years.

## Prevention and control of ovine and caprine Brucellosis

Since brucellosis causes serious economic losses from abortions, infertility and decreased milk production as well as a debilitating disease in humans, the *B.abortus* infection in cattle was subject legislation in the 1930's. This was the first step in establishing a national programme.

A regulation enacted in 1960 made calf vaccination with strain S19 compulsory on state farms. Later, some private farms were included in the vaccination campaign.

In 1970 sheep, lambs, goats and kids on state farms were vaccinated with strain Rev.1 vaccine. From 1974 some private farms were also included in the campaign.

With the implementation of a National Brucellosis Control and Eradication Project on a regional basis in 1982, control activities have intensified. The project aims at total vaccination of calves (4/8 months old) with strain B-19 and sheep and goats and their lambs and kids (3/5 months old) with Rev.1 vaccine within 26 years.

As can be seen in Table 1, from 1982 to 1990 35 942 272 sheep and goats have been vaccinated in Turkey.

*Table 1. Ovine and caprine brucellosis in Turkey. (Number of vaccinated animals between 1982 and 1990)*

Year	Number of vaccinated animals
1982	522 000
1983	722 000
1984	8 038 000
1985	3 408 000
1986	3 728 000
1987	5 332 200
1988	4 022 000
1989	5 019 300
1990	5 161 672
Total	35 942 972

To improve the efficiency of the annual programs, a scheme for controlling the movement of animals was put into effect in 1990; check-points open for 24 hours have been established on main highways. Animals not of certified origin and vaccination status are confiscated and sent for slaughter; in addition certain penalties are given to the driver or to the owner.

Certain films, pamphlets and other publication have been prepared to increase awareness and inform farmers and the general public.

### Constraints

Human brucellosis was first reported in 1915, followed by the detection of brucellosis in cattle in 1931. Until the 1970's, brucellosis control programmes at both national and

regional level failed to meet expectations for strategic, economic and technical reasons. In the past decade, the approach to brucellosis control has been greatly refined. New concepts have been introduced. However, these concepts have not been adequately implemented yet, due to structure of livestock sector (small farm size) and insufficient financial resources. Consequently, as with many other zoonotic diseases, brucellosis control is far less efficient, less cost effective and less successful than it should be. In addition to carrying out control programmes, veterinary and public health services face considerable difficulties on account of :

1. Lack of coordination and collaboration between agencies for strategy development, planning, resource mobilization, impact and cost-benefit assessment studies, and creating full-scale community participation.
2. Lack of interministerial cooperation between the Ministries of Health and Agriculture very often results in responsible administrators have difficulty in persuading senior planners to provide sufficient funds for the control and eradication of zoonotic diseases.
3. Insufficient knowledge of epidemiology and the disease situation results in inefficient formulation of timely and well-conceived national or regional programmes for zoonotic diseases. Such programmes can be formulated only if up-to-date, relevant and accurate information on disease patterns and occurrence are available to, and are used by, programme planners. Collection and particularly processing of information about zoonotic diseases is generally unsatisfactory in developing countries, due to the lack of trained staff and infrastructure.
4. Since neither the Animal Health Service nor the Human Health Service have developed the concept of "veterinary public health", it is impossible to promote and implement the basic objectives of the WHO namely :
  - a.. Bringing veterinary research and related scientific findings, technical knowledge and experience closer to the field services in developing countries.
  - b. For veterinary services and veterinary professionals to participate in intersectoral cooperation and community participation activities.
  - c. Depart from the rather narrow disciplinary approach towards interministerial cooperation in the management of field programmes.
  - d. Establishment of efficient diagnosis and surveillance, and the production of vaccines and other biological products.
  - e. Establishment of effective international collaboration.

It is unfortunate that all these objectives or targets cannot be reached because of the constraints mentioned above.

### **International cooperation in brucellosis control**

Although international agencies, such as WHO and FAO, have long recognized the importance of brucellosis in developing countries, and have implemented several projects, these efforts may fail to create a brucellosis-free status in a given developing country because of socio-economic, technical and logistic problems.

The main reason for not attaining the expected objectives has been lack of cooperation and coordination between international agencies working in given countries. For example, FAO implemented a successful brucellosis control programme in the 1960's in Turkey, but none of the World Bank Livestock Development Programmes implemented in the 1970's included an appropriate animal health sub-unit. On the other hand, many zoonotic disease

organizations do not recognize either international jurisdictions or national boundaries.

A control programme for a disease such as brucellosis within a relatively small district can involve a measure of international cooperation if that district is on an international border. But today, especially in countries in the Near East region, there is a vacuum in the control of the disease. There are vast differences in livestock management, attitudes towards control of zoonoses, and resources available. In addition, standards of collecting and processing animal disease information are unsatisfactory. Consequently, policies are adopted in an information vacuum, and disease control often fails to meet expectations.

## References

1. Golem, S.B.(1943), Memleketimizde insan ve ehli hayvanlarda brucella bakımından serolojik tarama, Turk Hifzihs Tec. Biol Mec. 1:105.
2. Golem, S.B.(1949), Bruselloz'un memleketimizdeki durumu. Turk Hij.Tec.Biol.Derg. 9:32.
3. Dogruer, M. Yilmaz, S. (1963), Turkiye'de brucellosis. Etlik Vet. Bak.Enst.Derg. 2:1.
4. Arda, M. (1987), Turkiye'de Hayvan brucelloz'unun genel durumu ve Brucello Mucadele Projesi. I.Ulusal Inf.Hast.Kong.Kongre Kitabi. 166.
5. Eroglu, M. (1989), Significance of Brucellosis for Human Health in Turkey. Uluslararası Brucellosis Sempozyumu 18-20 Ekim 1988.44.
6. Altan, N. (1987), Bruselloz Epidemiyolojisi I.Ulusal Inf.Hast.Kong.Kongre Kitabi 179.
7. Anon. (1991), Ministry of Health Statistics
8. Anon. (1991), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Veterinary Statistics.

## **Session 2**

### **Human brucellosis, its diagnosis and treatment**



## **Intersectorial collaboration in brucellosis control programmes**

A. Mantovani<sup>1</sup>, R. Palombino<sup>2</sup>, F. Palumbo<sup>2</sup>, M. Scorziello<sup>1</sup>, O. Vitolini<sup>2</sup>

<sup>1</sup> WHO/FAO Collaborating Centre for Research and Training in Veterinary Public Health, Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

<sup>2</sup> Osservatorio Epidemiologico, Regione Campania, Napoli, Italy

### **Introduction**

Since 1978, the Health System in Italy has been governed by the law 833 "Establishment of the National Health Service" (NHS) which defines an integrated public system ensuring the provision of a health service for all citizens independently of economic levels or social conditions.

The NHS is based on principles of planning, participation and prevention, which reflect a health approach focused on the well-being of the whole population or groups of people.

Several factors are responsible for this development, among them the economic and socio-cultural evolution undergone by some societies during recent decades, promoting a greater awareness of health and well-being, shifting the main attention from the individual as a "patient" that needs cure, to the "community" which requires to practise prevention through environmental surveillance and risk control.

In Italy such an approach has resulted in a local health organization based on defined territorial entities, called Local Health Units (LHU), comprising preventive, curative and rehabilitation services and stressing the development of a local prevention services network in the sector of public and community health, such as those for: mother and child; the elderly; mental health; and drug addiction.

As far as public health is concerned, local services are concerned with environmental health, occupational health and veterinary services, and their tasks include the monitoring, surveillance and control of hazards in the living and working environment. These are supported by multi-zonal services (more than one LHU) with chemical, microbiological and toxicological laboratories. The national network of the "Istituti Zooprofilattici Sperimentali" serve mainly the veterinary services.

The veterinary services in Italy belong to the Health Administration. This emphasizes their role in public health.

In fact, both medical and veterinary contributions are necessary to promote health and environmental balance, particularly in zoonoses control, pollution from livestock, the monitoring of working conditions in agriculture and animal breeding, and in carcass disposal plants.

Even though there is a formal separation of tasks among the three above-mentioned services, they often overlap. Many activities may be integrated into a "coordinated multisectorial action", thus optimizing the use of available resources and ensuring their effectiveness.

In this way intersectorial collaboration becomes a very valuable tool for planning, implementing and evaluating common preventive actions.

### **Intersectorial collaboration in brucellosis control**

The relevance of intersectorial collaboration for the control of brucellosis and other zoonoses has been recognized for a long time, but so far only limited operational experiences have been reported, mainly concerning the Mediterranean area.

The importance of brucellosis varies from area to area, according to the type of farming and economic and other considerations specific for different areas.

The implementation of control programmes must be supported by intersectorial collaboration, involving all concerned services, above all public health and veterinary services directly engaged in brucellosis control.

Among other factors, this collaboration and brucellosis control in general, should be considered as an indicator of the efficiency and effectiveness of the various services involved.

It is necessary therefore to introduce innovative features to foster intersectorial action in zoonoses control programmes by a "health team" approach. Such teams comprise physicians, veterinarians and other health workers who must be prepared to coordinate their work from the planning stage, through the implementation and evaluation of all phases of the control programme, at local and at higher levels.

### **The experience of the Campania Region**

In spite of their usefulness and specific needs in some areas of the country, examples of interdisciplinary and intersectorial approaches to zoonoses surveillance, prevention and control are still rare.

An interesting approach has been adopted in the Campania Region of Italy.

During the past twenty years, laws and other regulations aiming at brucellosis control in certain animal species (cattle, sheep, goats, buffaloes) have been enacted in Italy. These, together with an epidemiological surveillance system (compulsory notification of brucellosis cases) have contributed to a decrease in the disease incidence in animals and man.

Nevertheless, in the Southern Regions of Italy, and among them Campania, the disease presents endemic features with limited epidemic spread. During the past decade, incidence has been much higher than those reported at the national level (see Table 1).

As a consequence, a project aiming at brucellosis control in the Campania Region was planned by the Regional Health Administration and the WHO/FAO Collaborating Centre for Research and Training in Veterinary Public Health (Istituto Superiore di Sanità, Rome) selecting the province of Caserta as a pilot area.

Aims of the project have been:

1. To improve knowledge of disease occurrence and those factors that can influence transmission and chances of dissemination.
2. To test control strategies in order to design a regional plan for eradicating the disease.

Activities carried out so far have been:

1. Training of veterinarians and physicians involved in the project, stressing intersectorial collaboration.
2. Experimentation of a data set for the epidemiological surveillance of human brucellosis.

*Table 1. Human brucellosis reported in the provinces of Campania compared with regional and national frequencies, 1984-1990 (No. of cases and rates x 100,000).*

	1984		1985		1986		1987		1988		1989		1990	
	No.	rate	No.	rate	No.	rate	No.	rate	No.	rate	No.	rate	No.	rate
Caserta	139	17.6	115	14.4	129	16.2	103	13.2	30	3.7	40	4.9	64	7.8
Benevento	30	10.8	44	14.8	52	17.4	52	16.2	15	5.0	21	7.0	31	9.6
Napoli	56	1.8	49	1.6	63	2.0	47	1.4	65	2.0	90	2.8	69	2.1
Avellino	42	9.4	30	6.7	53	11.8	29	6.7	25	5.5	21	4.7	87	20.2
Salerno	181	17.4	151	14.4	111	10.6	132	12.4	77	7.2	138	13.0	235	22.0
Campania	448	7.9	389	6.8	408	7.2	363	6.7	212	3.9	310	5.7	486	8.4
Italia	2741	4.9	2155	3.8	1810	3.2	1403	2.7	1164	2.2	1239	2.9	1491	---

Source: ISTAT (National Institute of Statistics)

3. Definition of methods and techniques for health education programmes suited to the local community.
4. Definition of a data sheet to collect information about the factors and conditions which determine disease frequencies and distribution, in a given geographical area.
5. Study of the processing of "mozzarella", typical fresh cheese produced from buffalo milk in the area, to identify risk factors for the dissemination of the disease, and measures to limit this dissemination.

An interdisciplinary team was formed in the first phase of project planning to discuss aims, objectives and proposed activities.

The initial step of project implementation was training of the health personnel involved. This training was done through a joint course for veterinarians and physicians engaged in the local public health services of the pilot area (1 veterinarian and 1 physician from each LHU of the province = 11 LHU).

The course was planned and conducted by the interdisciplinary team utilizing an interactive method, and its objectives were:

1. To foster the utilization of a common terminology in planning and implementing control programmes.
  2. To improve capacities in planning, control and surveillance of trends in the "event" (brucellosis) at local level.
  3. To constitute a "health worker team" capable of managing the project at local level.
- As a conclusion of the training experience, the data set for epidemiological surveillance of human brucellosis and the data sheet to collect information on risk factors, were presented. Permanent interdisciplinary teams were constituted.

In this way the training course became the central point to involve the health workers, leading them to practise a working method based on intersectorial collaboration. In fact, during the course, analysis of roles, functions and activities of each service, especially those aimed at brucellosis control, and the writing (as a team work, in small groups of 5 persons) of a control programme, allowed the participants to:

1. compare their different experiences and attitudes;

2. define the collaboration levels between services;
  3. test their capacity to work as a team;
  4. be aware of the need to integrate their different and specific skills in a common action.
- As a result, the work teams began a collaboration with those responsible for the regional project, aiming at the project implementation.

In particular, the data sheet to collect information on risk factors for brucellosis in each LHU was more accurately defined. The information collected has identified different needs in personnel and resources.

Another activity carried out by the groups was the elaboration of a health education programme, based always on intersectoral collaboration, which was approved and financed by the LHU of the pilot area.

Finally, better knowledge of the problem has produced a Regional Government ordinance that makes compulsory the pasteurization of milk produced by farms not yet certified free from brucellosis.

Other measures proposed are: an increase in the number of veterinarians engaged in brucellosis control and strengthening of *ad hoc* training, including health education for farmers and other workers at risk of infection, as well as the provision of improved knowledge of the dairy industries' processes in order to define relevant control measures.

## References

1. Biocca M., Bruno F., Costa G., Martignani A., Tonelli S. (1989) Introduzione all'analisi organizzativa dei Servizi di Prevenzione - Guida per la formazione degli operatori. Contributi No. 21 - "Prevenzioni nei luoghi di vita e di lavoro" - Emilia Romagna - USL 28 BO.
2. Calicchia M.C., Scorziello M. (1989) La formazione di operatori sanitari: medici e veterinari. Esperienze di utilizzazione di metodi interattivi. *Veterinary Public Health Reports / Rapporti di SanitàPubblica Veterinaria*. WHO/ISS/CC/89.4.
3. Guilbert J.J. (1986) Educational handbook for health personnel. Revised edition. WHO Offset Publication, 35. Geneva.
4. Palombino R., Palumbo F., Gigli L. (1989) Brucellosi nella Regione Campania. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 25(2): 309-314.
5. Palombino R., Palumbo F., Scorziello M., Vitolini O., Mantovani A. (1990) Programma di controllo della brucellosi nella Regione Campania (Italia). *Annali di Igiene, Medicina Preventiva e di Comunità*, 2(4): 241-249.
6. Scorziello M. (1990) Health education of the public for prevention and control of brucellosis. MZCP Training course on brucellosis diagnosis in human and animals, Thessaloniki, Greece, 7/11 May 1990 (Unpublished document).

# Antibiotic therapy for human brucellosis

J. Ariza

Infectious Disease Unit, Hospital de Bellvitge, University of Barcelona, Spain.

## Introduction

The capacity of *Brucella* organisms to survive inside macrophages of the phagocyte mononuclear system determines the chronic course of the disease and its tendency to relapse (1). The infection caused by *Brucella melitensis* is the most severe and most difficult human brucellosis to treat (1).

Appropriate antibiotics should be active *in vitro* and have good intracellular penetration. However, no antibiotic therapy achieves complete eradication of intracellular infection. Synergic or additive combinations are required, and antibiotic therapy should be prolonged in order to reduce the frequency of relapses. The *in vitro* susceptibility of *Brucella* to antibiotics has remained stable over time (2). In addition, the susceptibility of strains from patients with relapses remains identical to that of strains isolated during the initial episode (3).

## Tetracyclines

Tetracyclines are the most effective antibiotics against *Brucella* (2, 4, 5) and tetracycline-streptomycin combinations in different proportion have a synergic action, as has been demonstrated in experimental and clinical studies (6-9). Thus, this combination has withstood the test of time and is regarded as the best treatment for the disease. Further clinical practice has shown that treatment for longer than the three weeks recommended by WHO in 1971 (10) should be used (11-13). Doxycycline is indicated because of convenient dosage and few adverse gastric effects, permitting more comfortable and prolonged treatment for 45 days, which is generally accepted as the most appropriate.

A WHO technical report of 1986 (14) stated that "the use of tetracycline-streptomycin combination has been superseded as the treatment of choice in human brucellosis. Better results are achieved by doxycycline-rifampicin association prolonged for six weeks". However, this recommendation was based on a small number of non-homogeneous comparative studies, which were presented at the International Meeting on Brucellosis held in 1985 in Madrid (15-18), grouped and published later by Acocella *et al.* (19). In addition, we had previously demonstrated (20) that the conventional doxycycline-streptomycin combination gave better results than doxycycline-rifampicin over 30-day periods of treatment (7.1% and 38.8% of relapses respectively). Also, some recent reports have questioned this WHO recommendation (21, 22).

Thus, we undertook a prospective, randomized trial comparing doxycycline-rifampicin and doxycycline-streptomycin combinations for a 45-day period in patients with brucellosis. In order to minimize the subjectivity of evaluation, we conducted the study in a double-blind form, a method that as far as we know, has not been reported previously in human

brucellosis. We included 111 consecutive patients with brucellosis, without endocarditis or neurobrucellosis, admitted to Bellvitge Hospital between 1986 and 1989. Sixteen of them were excluded: 9 because they did not take the prescribed drugs correctly and 7 who were followed for less than 6 months. Eventually 95 patients were included: 68 men and 27 women, aged from 8 to 79 years (mean + SD: 39.1 + 16.5 yr). Eighty-one patients had positive blood cultures for *B. melitensis*. Sixteen patients had focal disease: 7 spondylitis, 10 sacroiliitis, 1 coxitis and 1 orchitis. Patients were randomized into one of two treatment groups:

- Forty-four patients in group A received doxycycline at an oral dose of 100 mg twice a day plus rifampicin at 15 mg/kg per day taken in a single morning dose, both for 45 days. In addition, a daily (placebo) intramuscular injection of 4 ml of saline solution was administered in place of streptomycin for 15 days.

- Fifty-one patients in group B received doxycycline at an oral dose of 100 mg twice a day for 45 days plus 1 g streptomycin intramuscularly for 15 days. In addition, an oral placebo was prescribed in place of rifampicin in a similar dosage as that specified for patients in group A. In order to obtain the darker coloured urine associated with rifampicin therapy, these placebo pills contained 5 mg of vitamin B2.

Characteristics of patients in both groups were similar. Patients were hospitalized during the first 15 days of therapy, and carefully evaluated during the remaining period of treatment. Samples for blood cultures were taken between the 7th and 15th day of treatment. After being discharged from the hospital, patients were asked to return as outpatients. Routine blood cultures and serological and clinical evaluations were done monthly during the first three months after therapy and every three months thereafter over 1 or 2 years; the post-treatment follow-up period ranged from 6 to 50 months (mean + SD: 15.7 + 6.3 months). Fever abated after a mean of 4.2 days (range 1-45 days) for patients in group A and 3.2 days (1-14 days) for patients in group B (not significant). Blood cultures obtained during treatment were negative in all cases. Two patients in group A and one in group B suffering from spondylitis had persistent back pain and low fever at the end of therapy and were regarded as therapeutic failures. Another three patients in group A, one of them with spondylitis, relapsed 1, 4 or 12 months after therapy, and blood cultures again became positive for *B. melitensis* in two of these patients.

On the other hand, two patients in group B relapsed 2 and 5 months and had newly-positive blood cultures for *B. melitensis*. Thus, treatment failed on five patients in group A and three in group B. Application of the Kaplan & Meier method showed an actuarial probability of failures of treatment at 12th month of follow-up of 14.4% in group A and 5.9% in group B (not significant). Of concern was the fact that the three patients with spondylitis in group A were failures, while only one of the four patients with spondylitis in group B were. Excluding patients with spondylitis, actuarial failure rate was 4.9% in group A and 4.3% in group B. These data suggest that a course of 45 days of doxycycline-rifampicin combination provides results which are as good as those obtained with the conventional doxycycline-streptomycin association in the majority of patients with brucellosis, although it might be less effective for patients with spondylitis.

### Other antibiotics

Despite good *in vitro* activity against *Brucella* (2, 23), co-trimoxazole (TMP-SMZ) gives worse results than the combinations mentioned above. We observed more than 40% of failures after a 45-day course of co-trimoxazole (24). The synergic activity of trimethoprim

and sulphamethoxazole against *Brucella* is probably not thoroughly achieved within the cells; trimethoprim, the component with greater intracellular penetration, has a weak activity against *Brucella*. Although co-trimoxazole continues to be used by some authors, we think it should only be administered when the first choice drugs cannot be employed.

Fluroquinolones have good *in vitro* activity (MIC 90: 0.5 µg/ml) (2, 25, 26) and very good intracellular penetration. No significant differences have been observed among diverse quinolones. However, experiments on mice by Díaz *et al.* (27) have given poor results, and the experience of treating human brucellosis is scanty and controversial. At least one case of development of ciprofloxacin resistance during treatment for *B. melitensis* infection has been reported by Badawi *et al.* (28) and a high number of relapses has been observed by Lang *et al.* (29). Because of that, and since the use of these antibiotics in children and pregnant women is not recommended, their role in the treatment of human brucellosis will probably not be relevant in the future.

Among new macrolides, azitromycin is more active than others (MIC 90: 0.5 µg/ml) (30), but no other information is available.

### Special clinical conditions

Treatment of brucellosis during pregnancy is difficult, because tetracyclines and aminoglycosides are unsuitable in this condition. Rifampicin for a minimum period of two months may be a reasonable choice, although therapeutic strategy may depend on the period of pregnancy in which the illness is diagnosed.

Brucellosis in children is usually a milder disease, although the frequency of relapses is similar to that of adults, if infancy is excluded. Tetracyclines can produce teeth stains in children younger than 8 years, so the main alternatives are co-trimoxazole and especially rifampicin. The efficacy of adding aminoglycosides in the first days of treatment to reduce the number of relapses, as was demonstrated by Lubani *et al.* (31), should be noted. A recommended combination in children may be: rifampicin 15 mg/kg per day in a single morning dose for 4-6 weeks plus 20 mg/kg per day of intramuscular streptomycin for a minimum of 7 days.

### Severe focal disease

The results of our comparative study indicate that the use of tetracyclines and aminoglycosides is advisable for patients with severe or complicated brucellosis. The contribution of aminoglycosides may be especially important in these cases.

Vertebral osteomyelitis: doxycycline and streptomycin as before indicated are recommended. Paraspinal abscess (present in 15% of cases) (32) should be excluded. If an abscess is diagnosed or clinical response is not good, doxycycline should be prolonged for a minimum of 8 weeks.

Endocarditis: a triple combination of doxycycline, aminoglycosides and rifampicin is recommended to increase serum bactericidal activity, although this has yet to be confirmed. Infection is difficult to control with antibiotic therapy, and haemodynamic instability often results when the aortic valve is involved. Current criteria for surgery and valve replacement are similar to those for other bacterial endocarditis. The period of treatment must not be less than two months (3 weeks for aminoglycosides) and should be prolonged for weeks after the insertion of a prosthesis. Gentamicin may be the preferred aminoglycoside in these cases.

Neurobrucellosis: despite their poor penetration across the blood-brain barrier, aminoglycosides are recommended for a three-week period, plus doxycycline and rifampicin for 45 days to several months, depending on the clinical condition. Third generation cephalosporins are widely used for other forms of bacterial meningitis, and have good *in vitro* activity against *Brucella* (MIC 90: 0.5 µg/ml) (2, 33), but clinical experience is scarce, and poor results were reported by Al-Idrissi *et al.* (34).

In conclusion, we have good and well-defined antibiotic therapy for patients with uncomplicated brucellosis, but the treatment for patients with some clinical conditions or severe focal disease is still unresolved.

## References

1. Spink W.W. (1964) Host-parasite relationship in brucellosis. *Lancet* (2), 161-164.
2. Bosch J., Liñares J., López de Goicoechea M.J., Ariza J., Cisnal M., Martín R. (1986) *In vitro* activity of ciprofloxacin, ceftriaxone and five other antimicrobial agents against 95 strains of *Brucella melitensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 17: 459-461.
3. Ariza J., Bosch J., Gudíol F., Liñares J., Fernández-Viladrich P., Martín R. (1986) Relevance of *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* to relapse rate in human brucellosis. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 30: 958-960.
4. Hall W.H. & Manion R.E. (1970) *In vitro* susceptibility of *Brucella* to various antibiotics. *Applied Microbiology* 20: 601-604.
5. Farrell I.D., Hinchliffe P.M., Robertson L. (1976) Sensitivity of *Brucella spp* to tetracycline and its analogues. *J. Clin. Path.* 29: 1097-1100.
6. Spink W.W., Bradley G.M. (1960) Persistent parasitism in experimental brucellosis: attempts to eliminate brucellae with long term tetracyclin therapy. *J. Lab. Clin. Med.* 55: 535-547.
7. Richardson M., Holt J.N. (1962) Synergistic action of streptomycin with other antibiotics on intracellular *Brucella abortus* *in vitro*. *J. Bacteriol.* 84: 638-646.
8. Magill G.B., Killough J.H. (1953) Oxytetracycline-streptomycin therapy in brucellosis due to *Brucella melitensis*. *Arch. Intern. Med.* 91: 204-211.
9. Bertrand A. (1974) Aspects actuels du traitement antibiotique de la brucellose. *Médecine d'Afrique Noire* 21: 449-457.
10. World Health Organization (1971) FAO-WHO expert Committee on Brucellosis (Fifth report). WHO Technical Report Series 464:82.
11. Ariza J. (1983) Tratamiento antimicrobiano actual de la brucelosis. *Med. Clin. (Barc.)* 81: 870-876.
12. Hall W.H. (1990) Modern chemotherapy for brucellosis in humans. *Rev. Infect. Dis.* 12: 1060-1099.
13. Cisneros J.M., Viciano P., Colmenero J., Pachon J., Martínez C., Alarcón A. (1990) Multicenter prospective study of treatment of *Brucella melitensis* brucellosis with doxycycline for 6 weeks plus streptomycin for 2 weeks. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 34: 881-883.
14. World Health Organization (1986) FAO-WHO Expert Committee on Brucellosis (Sixth report). WHO Technical Report Series 740: 56-57.
15. Kosmidis J., Karagounis A., Tselentis J., Daikos G.K. (1982) The combination rifampin-doxycycline in brucellosis is better than the WHO regimen. *Chemioterapia* 1# (Suppl. 4): 107.
16. Bertrand A. (1985) Estudio terapéutico en la brucelosis aguda mediante la asociación



- doxiciclina-rifampicina. In "International meeting on brucellosis", edited by F. Baquero & L. Buzón, Garsi SA, Madrid, 119-125.
17. García Rodríguez J.A., Portugal J. (1985) Comparación de tres regímenes diferentes en el tratamiento de la brucelosis aguda. In "International meeting on brucellosis", edited by F. Baquero & L. Buzón. Garsi SA, Madrid, 137-141.
  18. Rodríguez Zapata M., Gamo A., de la Morena J. (1985) Estudio controlado prospectivo en la brucelosis aguda. In "International meeting on brucellosis", edited by F. Baquero & L. Buzón. Garsi SA, Madrid, 143-152.
  19. Acocella G., Bertrand A., Beytout J., Durrande J.B., García-Rodríguez J.A., Kosmidis J., Micoud M., Rey M., Rodríguez-Zapata M., Roux J., Stahl J.P. (1989) Comparison of the three different regimens in the treatment of acute brucellosis: a multicenter multinational study. *J. Antimicrob. Chemother.* 23: 433-439.
  20. Ariza J., Gudíol F., Pallarés R., Ruff G., Fernández-Viladrich P. (1985) Comparative trial of rifampin-doxycycline versus tetracycline-streptomycin in the therapy of human brucellosis. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 28: 548-551.
  21. Colmenero J.D., Hernández S., Reguera J.M., Cabrera F., Rius F., Alonso A. (1989) Comparative trial of doxycycline plus streptomycin versus doxycycline plus rifampin for the therapy of human brucellosis. *Chemotherapy* 35: 146-152.
  22. Solera J., Medrano F., Rodríguez M., Geijo P., Paulino J. (1991) Ensayo terapéutico comparativo y multicéntrico de rifampicina y doxiciclina frente a estreptomicina y doxiciclina en la brucelosis humana. *Med. Clin. (Barc.)* 96: 649-653.
  23. Gutierrez A., Díez M., Peña P., Campos A. (1982) In vitro activity of N-formimidoyl thienamycin against 98 clinical isolates of *Brucella melitensis* compared with those of cefoxitin, rifampin, tetracycline, and co-trimoxazole. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 29: 182-183.
  24. Ariza J., Gudíol F., Pallarés R., Ruff G., Fernández-Viladrich P. (1985) Comparative trial of cotrimoxazol versus tetracycline-streptomycin in treating human brucellosis. *J. Infect. Dis.* 152: 1358-1359.
  25. Gobernado M., Cantón E., Santos M. (1984) In vitro activity of ciprofloxacin against *Brucella melitensis*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3: 371.
  26. Khan M.Y., Dizon M., Kiel F.W. (1989) Comparative in vitro activities of ofloxacin, difloxacin, ciprofloxacin and other selected antimicrobial agents against *Brucella melitensis*. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 33: 1409-1410.
  27. Díaz R., Rubio M., Moreno L., Frades H.C. (1988) Quinolonas: efecto sobre la multiplicación de *B. abortus* y *Yersinia enterocolitica* serotipo 0:8 "in vivo". III Congreso SEIMC, Granada, Mayo 8-11, 1988, Abstract 24-18.
  28. Badawi Al-Sibai M., Hussain Qadri S.M. (1990) Development of ciprofloxacin resistance in *Brucella melitensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 25: 302.
  29. Lang R., Raz R., Sacis T., Michel J., Shapira M. (1988) Failure of prolonged treatment of ciprofloxacin in acute brucellosis. Proceedings of the 28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract 386, Washington, DC: American Society for Microbiology.
  30. Liñares J., Loza E., Pulido A., Martínez-Beltrán J., Alonso T., Ariza J., Baquero F., Martín R. (1990) *Brucella melitensis*: in vitro susceptibility to 16 antimicrobial agents. Proc. 30th ICAAC Atlanta, October 21-24, 1990. Abstract 872.
  31. Lubani M.M., Dudin K.I., Sharda D.C., Mana Nihar D.S., Araj G.F., Hafez H.A., Al-saleh Q.A., Helin I., Salhi M.M. (1989) A multicenter therapeutic study of 1100 children with brucellosis. *Pediatr. Infect. Dis. J* 8: 75-78.

32. Ariza J., Gudiol F., Valverde J., Pallarés R., Fernández-Viladrich P., Ruff G., Espadaler L., Fernández-Nogués F. (1985) Brucellar spondylitis: a detailed analysis based on current findings. *Rev. Infect. Dis.* 7: 656-664.
33. Palenque E., Otero J.R., R. Noriega A. (1986) In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to new cephalosporins crossing the blood-brain barrier. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 29: 182-183.
34. Al-Idrissi H.Y., Uwaiydah A.K., Danso K.T., Kutub H., Al-Mousa M.S. (1989). Ceftriaxone in the treatment of acute and subacute human brucellosis. *J. International Med. Research* 17: 363-368.

# Laboratory diagnosis of human brucellosis

R. Díaz<sup>1,2</sup>, I. Moriyón<sup>1</sup>, C. Gamazo<sup>1</sup>, B. Alonso-Urmeneta<sup>1</sup> & M. de la Viuda<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Department of microbiology, Medical School; and <sup>2</sup> Department of microbiology, University Clinic, University of Navarra. Pamplona, Spain.

## Introduction

Human brucellosis presents a large variety of clinical forms. For this reason, it is always essential to perform laboratory tests to confirm any suspicion of brucellosis. These tests can be classified in two groups: those providing direct, unequivocal proof of an active *Brucella* infection, and those giving indirect evidence that the patient is or has been infected. The former consists of bacteriological culture of samples, and the latter includes the serological tests. However, such tests can mean an active infection, the presence of antibodies persisting after recovery, contact with *Brucella* not followed by the disease, or the exposure to immunological crossreacting bacteria. Thus while the isolation of *Brucella* has only one interpretation, the serological data have to be interpreted in the light of clinical (and bacteriological) data. For these reasons, bacteriological cultures for *Brucella* should be performed whenever possible.

## Bacteriological diagnosis of human brucellosis

### Samples

For routine purposes, blood broth culture in tryptic soy broth or similar media under an atmosphere of 10% CO<sub>2</sub> is the simplest and most often used procedure. The proportions of successful blood cultures reported in the literature vary between 85.5% (12) and 17% (18). In addition to possible methodological problems, at least two factors could explain such wide discrepancies. In the first place, although blood cultures should also be performed in afebrile patients suspected of brucellosis, it has been shown that they are less often positive than febrile patients.

For example, in an extensive study (81), 68.2% of 326 isolations of *Brucella melitensis* were from patients with febrile acute brucellosis, and the remaining 31.8% from patients without fever. This also holds true for relapsed patients. In another study, the percentages of positive blood cultures in relapsed patients with or without fever were 78% and 60%, respectively (4). An additional factor which could explain the differing success of blood cultures is the infecting species, *B. abortus* or *B. melitensis*. The percentages of successful blood cultures reported for Mediterranean countries and México, where *B. melitensis* is the commonest species infecting humans, are usually higher than those from countries where *B. abortus* is dominant. Thus, it has been suggested that blood cultures are more successful when *B. melitensis* is the infecting organism (18).

Conventional Castañeda blood cultures are seldom positive by the 4th day of incubation, the majority are positive between the 7th and 21st, and only 2% are positive after the 27th

day (80). For this reason, incubations should be carried out for at least 45 days before rejecting a blood culture as negative for *Brucella*.

In addition to blood, bone marrow has also been used for isolating *Brucella*. The use of bone marrow as a source of *Brucella* was evaluated by Gotuzzo *et al.* (49), who studied 50 patients and found that, while 35 were blood culture positive, 46 were bone marrow culture positive. Finally, some data seem to indicate that both blood culture and bone marrow culture could be improved by processing the samples by the lysis-concentration procedure (36).

Finally, although blood, and to less extent, bone marrow are the sources from which *Brucella* is more often isolated, the organism can be isolated from cerebrospinal and articular fluids, as well as from several tissues (86).

### Isolation and identification

Unless Castañeda's method is adopted, a broth culture suspected of *Brucella* has to be sampled and streaked out on solid media. When performed routinely, this step exposes laboratory personnel to a risk of infection and, therefore, the biphasic Castañeda's method is highly recommended. Several automated methods have been described that aim to prevent unnecessary sampling and streaking out of broth cultures. Many of these methods are based on the unspecific detection of bacterial growth by the release of CO<sub>2</sub> into the flask atmosphere. However, it has been reported that, as compared to most gram-negative bacteria, *Brucella* needs longer to be detected as positive by systems based on CO<sub>2</sub> detection by infrared spectroscopy (Bactec NR730) (84, 90). It seems possible that this problem could be solved by redesigning the culture broth used. We have found that CO<sub>2</sub> release by a representative strain of *B. melitensis* biotype 1 is increased in commercial vials (NR6) supplemented with sodium pyruvate or alanine, and whose pH was corrected to 6.2 (C. Gamazo *et al.*, manuscript in preparation). No extensive testing of this medium with clinic samples or with samples containing *B. abortus* has been performed yet.

After isolation, a bacteriological identification has to be performed. Although precise identification to species and biotype level is usually only possible in reference laboratories, identification at genus level can be achieved at any laboratory, most conveniently by serological methods. In our experience, coagglutination with staphylococci coated with rabbit antibody against smooth brucella colonies is a rapid, clear and inexpensive means for identification of smooth *Brucellae* (25).

Accidental injection or inhalation of the vaccine strain *B. melitensis* Rev. 1 by veterinarians performing sheep or goat vaccination is not, in our experience, a rare event. This strain is pathogenic for humans and it is characteristically resistant to streptomycin, one of the antibiotics of choice for treating brucellosis (see the article by Ariza in this book). In such cases, if it is not possible to perform a precise identification of the infecting brucella or at least to test its sensitivity to streptomycin, this antibiotic should be replaced by rifampicin.

### Serological diagnosis of human brucellosis

Many serological tests have been investigated for the diagnosis of brucellosis, but the ideal test is yet to be found. Such a test should be able to detect latent, acute and chronic infections and to differentiate patients with an active infection from those that have recovered. In addition, it should be able to differentiate patients infected with *Brucella* from those infected

with cross-reacting bacteria, such as *Yersinia enterocolitica* 0:9. Although all these aims are not achieved by any single existing serological test, it is possible to obtain a great deal of information with the present tests, provided we keep in mind that: (a) *Brucella* has a complex antigenic structure; (b) immunity is not equally stimulated by the different cell antigens; and (c) the serological immune response varies depending upon the course of the disease towards either recovery or chronicity.

### **Brucella antigens of diagnostic significance**

Electron microscopy has shown that the *Brucella* cell envelope is structurally similar to that of other gram-negative bacteria (35). A capsule has never been satisfactorily shown and, on the other hand, there is copious evidence showing that, in smooth strains, an outer membrane (OM) lipopolysaccharide (LPS) covers the cell surface and is exposed to the environment. It is known that this smooth LPS (S-LPS) is the molecule carrying the A and M antigens of Wilson and Miles (26) and the antigenic determinants cross-reacting with other gram-negative bacteria (17). LPS elicits a strong antibody response but, at least in animals, does not take part in delayed hypersensitivity reactions (57). In addition to the LPS, the OM of *Brucella* contains several major proteins (87). Infected animals develop antibodies to several OM proteins (77, 78). However, many healthy animals contain small amounts of antibodies to such proteins, and this could be due to cross-reactivity with OM proteins of other gram-negative bacteria (46, 87). Preliminary results obtained in our laboratory also show that serum from healthy humans contains antibodies reacting with *Brucella* OM proteins of group 3 by Western blot methods (M. de la Viuda, I. Moriyón and R. Díaz, unpublished results).

Extracts enriched in S-LPS can be obtained by several methods, some of which differ from those used with enterobacteria (7). Immunoelectrophoresis shows that these extracts contain S-LPS, proteins, and a polysaccharide (26). This polysaccharide, originally defined by its reactivity with immune sera, has been termed "component one" (26), "second polysaccharide" (22), "polysaccharide B" (23) and "native hapten" (68), depending on the author, strain and method of extraction. The antigenic determinants of this polysaccharide are all contained in the S-LPS, as absorption with the later completely removes the antibodies to the polysaccharide (1, 26, 68). In addition, refined chemical means cannot distinguish between this polysaccharide and the degraded polysaccharides (mostly O-chain) resulting from acid hydrolysis (acid haptens) of the S-LPS (67). However, the published evidence suggests that the polysaccharides and the acid haptens differ in their reactivity with serum from infected and vaccinated cattle (57). There are contradictory reports on the presence of LPS core sugars in this polysaccharide (67, 93), and although it might be derived from the LPS as an artifact brought about by the methods of extraction (93), its exact nature and relationship with the LPS remain open. Both animals and humans develop antibodies to this polysaccharide (8, 24, 32, 57).

Cytoplasmic proteins are the dominant components in soluble fractions of *Brucella*. The protein antigens in these fractions are shared by all species of *Brucella* (28). On the other hand, no cross reactions with cytoplasmic components of other gram-negative bacteria have been described (21, 27). Soluble proteins elicit a humoral immune response and take part in delayed hypersensitivity (59).

Serological tests can be classified into those in which whole smooth cells are used as antigens, and those in which antigenic extracts are employed. All serological tests with whole cells detect antibodies to cell surface antigens, of which the most important in human

brucellosis is the S-LPS. This group includes the serum agglutination test (SAT), the rose bengal (RB) test, the complement fixation test (CF), Coombs' test and immunofluorescence tests. Antibodies to the S-LPS are also demonstrated in a variety of other tests (radioimmunoassay (71), enzyme immunoassays (4, 20, 43, 47, 64, 65, 66, 72, 83, 85) or gel precipitation tests (22) that can be used with extracts containing S-LPS. With regard to the dominant antigen, such tests are equivalent to those that use whole cells.

The demonstration of antibodies to the native hapten polysaccharide has to be performed with cell extracts and by gel precipitation methods, most conveniently by a reverse radial immunodiffusion in which the polysaccharide is included in the gel (24). Other tests are difficult to perform since this polysaccharide does not sensitize red cells or bind to the plastics used for enzyme immunoassays unless they are chemically modified by partial acylation (1). Likewise, antibodies to cytoplasmic antigens are best revealed by gel precipitation (22), although CF (30) with extracts from rough strains devoid of the S-LPS determinants and hemagglutination (76) have also been used. A simple and fast method to detect antibodies to proteins is counterimmunoelectrophoresis (32).

### **Immunoglobulins and serological tests**

IgM antibodies are detectable in the SAT, CF, and RB tests, IgG in the SAT, CF, RB and Coombs tests, and IgA in SAT, RB and Coombs tests (4, 19, 32, 52, 61, 88, 92). The only tests that have been applied to human brucellosis and that allow a direct assessment of the classes of immunoglobulins are Coombs' test (32, 61), immunofluorescence tests (2,51), radioimmunoassay (71) and enzyme immunoassays (4a, 4b, 47, 65, 66, 83, 85).

### **Serological tests used in the diagnosis of human brucellosis**

#### ***Serum agglutination test (SAT)***

Because of its simplicity, SAT has been the most widely used of all serological tests. Wright was the first to describe the presence of agglutinins in sera from both animals and humans afflicted with brucellosis (cited by Spink [86]). However, soon after this demonstration, the specificity of the agglutination reaction was criticized on the grounds that *Brucella* whole cells could be agglutinated by serum from healthy individuals. We know today that this sort of unspecific agglutination is due to the use of suspensions of rough rather than smooth brucellas. Accordingly, extreme care should be taken with the antigenic suspensions used in SAT, and controls with standard sera of known titres should be performed whenever a new batch of antigen is used. In our experience, some commercial cell suspensions are of irregular quality. This precaution applies to all tests using whole cells.

Although prozones are described in the literature, they are of little practical importance. In the study of 65 sera from patients with brucellosis, we found only one serum with a 1/80 prozone (32). Foz *et al.* (40) also concluded that prozone is only occasionally observed and that when it happens it is seldom higher than the 1/20 dilution. In one serum with prozone investigated, IgA (but not IgM or IgG) was responsible for the agglutinating activity in both SAT and RB (32).

The problem pointed out by Spink (86) on the definition of a diagnostic titre which would indicate active infection has yet to be solved. In our opinion, it is not possible to determine such a titre. For example, Foz *et al.* (40) examined sera of 283 brucellosis patients and found that, if a diagnostic titre of 1/80 (100 I.U./ml) were to be used, 29.2% of the patients would

be considered as negative; furthermore, in this same study it was found that 3.4% of the sera had titres of 1/10 or below. In addition, the significant titre may vary depending upon the population examined. Based on his wide experience in Castilla province, Rodríguez-Torres suggested that a 1/80 titre could be of diagnostic value in urban or non-endemic areas, whereas in rural areas (where brucellosis is prevalent) higher diagnostic titres (up to 1/320) should be used (80). Buchanan *et al.* (9) tested 900 sera from slaughterhouse workers, 196 of which had suffered brucellosis, and concluded that 1/160 was the minimal indicative titre. However, these same authors also found two brucellosis cases in which agglutination was altogether negative. Spink (86) also considered 1/160 as the limiting titre.

The value of a given SAT titre must be considered with regard to the evolution of the infection (acute or chronic phase). Moreover, the diagnostic value of seroconversion, either in SAT or in other tests, is of little practical value, since in most cases it is not possible to take serum samples at a very early stage of infection. Ariza (4) found that a serological conversion in one or several serological tests (SAT included) during the first days of evolution was demonstrable in only 16% of patients.

### *Rose bengal (RB) test*

Agglutinating antibodies can also be demonstrated in the RB test, and statistical analysis shows a high degree of correlation ( $p < 0.001$ ) between SAT titres and titres obtained by testing serum dilutions in the RB test (32). The RB test is a modification of the "acid-plate-agglutination test" introduced by Pietz for screening cattle with brucellosis, and uses a suspension of *B. abortus* smooth cells stained with the rose bengal dye and buffered to pH 3.65. A study of its usefulness was recommended by the FAO/WHO Committee (14) and this test has replaced the rapid slide agglutination method of Huddelson which often yields false negative results (13, 32).

Buchanan *et al.* (9) found that 92% of 38 sera from patients with brucellosis were RB test positive, with no false positives in 46 healthy individuals. In our laboratory, out of 173 sera from patients with acute brucellosis, only one was both blood culture positive and RB test negative (31). The RB test can give false positive reactions with sera from patients infected with *Yersinia enterocolitica* 0:9 (32) or from healthy individuals that have had contact with smooth brucellae (82). Even though there are cross-reactions in the S-LPS, no false positive reactions have been found in the RB test with sera from patients afflicted with tularemia (*Francisella tularensis*) or in persons vaccinated against *Vibrio cholerae* (82).

To obtain consistent and reliable results, it is important to evaluate the RB reagent used, since false negative results can be due to an unsatisfactory preparation. For example, in a comparative study of five commercial RB reagents, we have found that the sensitivity may vary between 100% and 96% when tested with the same set of sera (R. Díaz, unpublished observations). The same observation has been made in cattle by Levieux who, in addition, showed that the results of several RB preparations of commercial origin related to their different ability to react with purified bovine IgM, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> (63).

### *Mercaptoethanol (2ME) test*

The main purpose of the 2ME test is to differentiate between IgM (2ME sensitive) and other immunoglobulin classes more resistant to reagents reducing disulfide bonds. In agreement with this, a positive correlation between antibodies sensitive to such agents and ELISA-IgM has been found (4b), and high levels of 2ME-sensitive antibodies occur in acute brucellosis.

However, a clear cut interpretation of results of the 2ME test in terms of IgM and IgG is doubtful. This is because the 2ME test used in human brucellosis (final 2ME concentration 50 mM) is the test described originally for cattle (3), and controls to determine to what degree human IgG is also affected by the conditions used have never been presented. In fact, when the data of Buchanan *et al.* (9) and Díaz *et al.* (32) are compared with the results of more refined tests, one reaches the conclusion that IgG activity is partly destroyed by the 2-ME reagent. This conclusion is also supported by Pellicer *et al.* (73) who showed that the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Coombs' test are superior to the dithiothreitol test for the evaluation of IgG and IgA class of antibodies.

Several authors have recommended the 2ME test to provide information on the "active" or "inactive" state of human brucellosis. Reddin *et al.* (75) tested sera from 7 patients with acute brucellosis, 6 with chronic infection and 11 from persons which had contact with *Brucella*. These authors concluded that there was a clear relationship between 2ME-resistant antibodies and infection, and that the test was useful to confirm an active brucellosis. Kerr *et al.* (60) concluded that "a diagnosis of brucellosis can be made with certainty only if IgG (2ME-resistant antibodies) is present". However, Buchanan *et al.* (9) examined 72 sera and found that the agglutinating activity of 3 sera from patients with acute brucellosis of less than seven days of evolution was abrogated by 2ME, and that both 2ME-sensitive and 2ME-resistant antibodies persisted for at least one year in treated patients. The data of Buchanan, along with those of the ELISA-IgM, also illustrate that patients recovered after antibiotic therapy may have 2-ME sensitive antibodies and that, therefore, the presence of such antibodies has to be interpreted with caution.

#### **Complement fixation (CF) test**

In addition to the SAT, CF and Coombs are the tests used more often. As early as 1938, Russian workers considered the CF test as the most specific and valuable serological test (10). Foz (38, 44) confirmed the usefulness of the CF and showed that, in general, SAT titres decrease as CF titres rise, particularly when brucellosis evolves towards chronicity. After studying 9800 brucellosis patients for more than 30 years, Foz has summarized his experience as follows: (a) in 91.7% of the cases both SAT and CF are positive; (b) after the 4th or the 5th week of evolution, and in the initial phase of chronic brucellosis, CF titres are higher than SAT titres; (c) a negative CF with a significant SAT titre is observed in 4.6% of the patients and corresponds to the first days, sometimes weeks, of evolution; and (d) a negative SAT with high CF titres is observed in 3.7 % of the cases, and these patients are either chronic or have recovered (42).

#### **Coombs test**

This test (15), and a high-speed centrifugation test (50), have been used to show non-agglutinating antibody. Although with a limited number of sera, the use of Coombs' test for the diagnosis of human brucellosis was described in 1951 (58, 89). In 1953, Hall & Manion (50) compared Coombs' and the speed centrifugation methods and concluded that: "The indirect Coombs antiglobulin method is a sensitive ... procedure" and that "High-speed centrifugation ... yields a sensitivity equal to or greater than the Coombs method...". This last conclusion was not confirmed by other authors (39), and Coombs' test is still the best method for measuring non-agglutinating antibodies. Foz & Garriga (39) found a close parallelism between CF and Coombs titres but not between SAT and Coombs titres, an



observation that has been repeatedly confirmed. In addition, there is no correlation between the titres in Coombs and RB tests (32).

From tests on 9800 serum samples, Foz (42) concluded that, in acute brucellosis, Coombs titres are usually 4 to 16 times higher than SAT titres, whereas in chronic forms they are 16 to 256 times higher. The same conclusions have also been reached by others (31, 70, 79).

### ***Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)***

Even though immunofluorescence and radioimmunoassay have also been used (51, 71), the best method for studying the class of immunoglobulin is the indirect ELISA. Usually, a suspension of smooth cells or extracts enriched in S-LPS are adsorbed to the polystyrene plates and both these antigenic preparations are probably equivalent. An ELISA with *Brucella* OM proteins has also been reported (53) but without careful characterization of the antigenic extracts. Cross-reactivity with serum from tularaemia patients was observed, suggesting that the results could be due, at least in part, to LPS tenaciously bound to *Brucella* OM proteins (69, 87).

Several authors have concluded that the ELISA is very specific and sensitive (4a, 4b, 47, 65, 66, 72, 83, 85). These studies have confirmed several aspects of the humoral immune response to smooth brucellas that could only be indirectly inferred from the results of the conventional serological tests. By ELISA, it has been conclusively shown: (a) that IgM, IgG and IgA appear quickly after infection; and (b) that while IgM tends to disappear, IgG and, to less extent IgA, persist as the infection evolves towards chronicity (4a, 4b).

There are few studies in which a significant number of patients has been followed by ELISA. Pellicer *et al.* (74) followed during a year 30 patients whose blood cultures were positive at the beginning of the study. In a similar study, Ariza (4) followed during a period of 18 months 75 patients whose blood cultures were positive at the beginning of the study. Both studies showed a positive correlation between ELISA-IgM and SAT titres in the initial stages of the disease, although IgG and IgA were also found as early as five days after the onset of clinical symptoms. Only 6.6% of the patients did not have detectable levels of IgM at the moment of hospitalization. Moreover, these same studies also showed that: (a) IgM decreased faster than IgA or IgG; (b) IgG was the most persistent immunoglobulin (85% of the patients had high titres of IgG and IgA 18 months after clinical recovery); (c) IgG and IgA correlated positively with the results of Coombs' test; and (d) IgG and IgA but not IgM increased after relapsing.

In summary, the ELISA data illustrate that IgG is the most important immunoglobulin in human brucellosis, an observation made previously by several authors (4a, 4b, 32, 61, 75). Also, it seems possible to replace all the serological tests discussed before by an indirect ELISA with S-LPS and anti-IgM and anti-IgG conjugates. We have to keep in mind that patients with significant IgG values may actually have recovered (4a, 4b, 9).

### ***Gel precipitation tests***

The first to apply gel precipitation methods to the diagnosis of human brucellosis were Zinneman *et al.* (91) and Glenchur *et al.* (48), who demonstrated precipitins against components of complex antigenic extracts in three chronic cases but not in three acute cases. It has to be stressed that, in contrast to the methods discussed so far, gel precipitation requires soluble antigenic extracts, and that it is essential to use well characterized antigens to

interpret the results correctly. In this way, gel precipitation has been used to study the humoral immune response to *Brucella* S-LPS, native hapten polysaccharide, and soluble proteins (22, 31, 32, 34).

With serum dilutions in double gel diffusion, SAT titres correlate with double gel diffusion titres when S-LPS or native hapten polysaccharides are used (22, 32). Therefore, since SAT is easier to perform, it would seem evident that double gel diffusion offers no particular advantage when used with those antigens. Although this is true for the S-LPS, it does not apply to precipitation tests with the native hapten polysaccharides, since active infection may be associated with precipitating antibody to the native hapten polysaccharides. This has been proven in cattle (24, 57) and in laboratory animals (33). Moreover, we have observed that, whereas 60% of the patients with blood culture positive had precipitins against the native hapten polysaccharides, only 16% of the blood culture negative brucellosis patients had such antibodies (32) (R. Díaz, unpublished results).

It is useful to demonstrate antibodies to soluble antigens (mostly cytoplasmic proteins) because such antibodies are not revealed by conventional tests. This is because these antigens are not exposed on the surface of the whole cells used in SAT, CF, RB and Coombs tests. To avoid any interference due to contaminant S-LPS, it is important to use extracts prepared from rough strains (32).

In our experience, these antigens bind poorly to the polystyrene usually employed as solid phase in indirect ELISAs, but gel precipitation methods such as double gel diffusion or counterimmunoelectrophoresis are adequate (22, 32, 62).

When 102 sera were tested by double gel diffusion (22), 82.3% contained antibodies to soluble proteins; similar results were obtained by counterimmunoelectrophoresis in 173 patients with acute brucellosis and 39 with chronic brucellosis (84.9% and 91.6% were positive, respectively) (31).

In cases of chronic infection the number of precipitin lines and the last serum dilution giving a positive result increased (32).

The diagnostic value of counterimmunoelectrophoresis has been confirmed (62), and its main advantage is that results can be obtained in two hours.

This same method can be used to show specific antibody in the spinal fluid of patients with neurobrucellosis (30).

### **Differential serological diagnosis of brucellosis and infections by *Yersinia enterocolitica* 0:9**

Among the gram-negative bacteria that show immunological cross-reactivity with smooth brucellas, *Y. enterocolitica* 0:9 is the most important one (5, 6, 16).

It is known that S-LPS is the molecule carrying the common antigenic determinants (29, 55) and recently the biochemical basis of the cross-reactivity has been elucidated (11). The cross reaction is observed in all tests that use whole cells or extracts containing S-LPS (22, 41, 45, 54, 85).

On the other hand, immunoelectrophoretic study of soluble protein antigens has demonstrated no antigenic relationship between *Brucella* and species of *Yersinia*, *Bordetella*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* and *Pseudomonas* (21, 28), so that in principle it must be accepted that antibodies against *Brucella* proteins are specific.

Consequently detection of antibodies against protein antigens can differentiate *Brucella* infections from those caused by *Y. enterocolitica* 0:9 and other gram-negative bacteria.

## Serology of recovered (asymptomatic) patients

Changes in the serological response of patients undergoing antibiotic therapy can be summarized as follows. Once clinical symptoms disappear, SAT titres decrease and become negative usually six months to two years later. The CF titres also decrease, although low titres may persist, always for longer times than SAT titres. The last conventional test to become negative is Coombs' test. When the results of the three classical tests (SAT, CF and Coombs) are taken together, serum seldom becomes negative by the 3rd month and antibodies often persist after the 8th month of evolution. In ELISA, IgM, IgA and IgG are negative by the first year in 65%, 25% and 3% of recovered patients (4). A relapse cannot be predicted from the results of serological tests. So far as it is known, the only safe serological criterion of recovery is a negative result in both SAT and CF, and persistent SAT titres may indicate the risk of a relapse due to a subclinical infection (42).

## Conclusions

- A. In our experience, nearly every case of human brucellosis can be diagnosed from the epidemiological, clinical, bacteriological and serological data.
- B. Since isolation of the causative organism is a conclusive proof of brucellosis, blood or bone marrow cultures should be performed whenever possible.
- C. For serological diagnosis, it is important to obtain information on the anti-*Brucella* IgM and IgG levels. Possible combinations of IgM plus IgG tests are SAT + Coombs, SAT + ELISA-IgG, ELISA-IgM + ELISA-IgG. The choice of particular tests has to be based on practical and economical considerations.
- D. The rose bengal test can be used as a quick, inexpensive test, though the results have to be confirmed by other tests.
- E. Demonstration of antibodies to soluble *Brucella* proteins can differentiate infections due to *Brucella* from those due to cross-reacting bacteria.

## Acknowledgements

Research at the laboratory of the authors is supported in part by the Spanish CICYT (grant GAN-90-0935-CO2-01) and FIS (grant 88/0889).

## References

1. Alonso-Urmeneta B., Moriyón I., Díaz R. and Blasco J.M. (1988) Enzyme-linked immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polysaccharide and smooth lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2642-2646.
2. Alvarez-Betés J. & Alvarez-Mosig J.M. (1977) Inmunofluorescencia brucelósica. *Rev. Diag. Biol.* 26: 195-200.
3. Anderson R.K., Jenness R., Brumfield H.P. and Gough P. (1964) *Brucella*-agglutinating antibodies: Relation of mercaptoethanol stability to complement fixation. *Science* 143: 1334-1335.
- 4a. Ariza J. (1988) Brucellosis: Perspectiva actual de la enfermedad. Perfil de las inmunoglobulinas específicas en el curso de su evolución. Tesis Doctoral, Facultad de Barcelona, Universidad Autónoma de Barcelona.
- 4b. Ariza J., Pellicer R., Pallarés R., Foz A. and Gudíol F. (1992) Specific antibody profile

- in human brucellosis. Clin. Infect. Dis. (in press).
5. Avhonen P. & Sievers K. (1969) *Yersinia enterocolitica* infection associated with *Brucella* agglutinins. Clinical Features of 24 patients. Acta Med. Scand. 185: 121-125.
  6. Avhonen P., Jansson E. & Aho K. (1969) Marked cross-agglutination between *Brucellae* and a subtype of *Yersinia enterocolitica*. Acta Path. Microbiol. Scand. 75: 291-295.
  7. Baker P.J. & Wilson J.B. (1965) Chemical composition and biological properties of the endotoxin of *Brucella abortus*. J. bacteriol. 90: 895-902.
  8. Blasco J.M., Díaz R., Moriyón I. & Salvo M.D. (1983) Evaluation of a radial immunodiffusion test for diagnosing brucellosis in sheep and its possible value for differentiating infected from *Brucella melitensis* Rev 1 vaccinated sheep. Develop. Biol. Standard. 56: 507-511.
  9. Buchanan T.M., Sulzer C.R., Frix M.K., Feldman R.A. (1974) Brucellosis in the United States, 1960-1972. An abattoir-associated disease. Medicine 53: 415-425.
  10. Burmakin A.M. (1950) Laboratornaia diagnostika brutsellesa. Sovetskaiia Meditsina 4: 14-16.
  11. Caroff M., Bundle M.B., Perry J.W., Cherwonogrodzky J.W. & Duncan J.R. (1984) Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. Infect. Immun. 46: 384-388.
  12. Castañeda M.R. (1961) Laboratory diagnosis of brucellosis in man. Bull. World health Organ. 24: 73-84.
  13. Cernyseva M.I., Knjazeva E.N. & Egorova L.S. (1977) Study of the plate agglutination test with rose bengal antigen for the diagnosis of human brucellosis. Bull. World Health Organ. 55: 669-674.
  14. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis (1970) Quinto informe. Serie de informes técnicos no. 464.
  15. Coombs R.R.A., Mourant A.E. & Race R.R. (1945) A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. Brit. J. Exp. Path. 26: 255-266.
  16. Corbel M.J. & Cullen G.A. (1970) Differentiation of the serological response to *Yersinia enterocolitica* and *Brucella abortus* in cattle. J. Hyg. 68: 519-530.
  17. Corbel M.J., Stuart F.A. & Brewer R.A. (1984) Observation on serological cross-reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. Rev. Develop. Biol. Stand. 56: 341-348.
  18. Dalrymple-Champneys W. (1960) *Brucella* infection and undulant fever in man. Chap. 8. Oxford University Press, London.
  19. Dana-Arie M. & Serre A. (1974) IgA sériques à propriétés particulières dans la brucellose humaine. Ann. Immunol. 125C: 523-526.
  20. De Klerk E. & Anderson R. (1985) Comparative evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the laboratory diagnosis on brucellosis. J. Clin. Microbiol. 21: 381-386.
  21. Díaz R. & Bosseray N. (1974) Estudio de las relaciones antigénicas entre *Yersinia enterocolitica* serotipo 9 y otras especies bacterianas gram-negativas. Microbiol. Españ. 27: 1-14.
  22. Díaz R. & Dorronsoro I. (1971) Contribución al diagnóstico serológico de la brucelosis y yersiniosis. I. Utilidad de la reacción de precipitación en gel. Rev. Clin. Españ. 121: 367-372.
  23. Díaz R. & Levieux D. (1972) Rôle respectif en sérologie de la brucellose bovine des antigènes et des immunoglobulines G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> dans les tests d'agglutination, de Coombs et au Rose Bengale ainsi que dans le phénomène de zone, C. R. Acad. Sci. (Paris), 274

- ser. D: 1593-1596.
24. Díaz R., Garatea P., Jones L.M. & Moriyón I. (1979) Radial immunodiffusion test with a brucella polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J. Clin. Microbiol.* 10: 37-41.
  25. Díaz R., Itoiz A.I., Dorronsoro I., Salvo M.D. & Pardo M.L. (1980) Aplicación de la técnica de coaglutinación para la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Brucella* y de los aglutinógenos A y M. *Laboratorio* 70: 509-525.
  26. Díaz R., Jones L.M., Leong D. & Wilson J.B. (1968) Surface antigens of smooth brucellae. *J. Bacteriol.* 96: 893-901.
  27. Díaz R., Jones L.M. & Wilson J.B. (1968) Antigenic relationship of the gram-negative organism causing canine abortion to smooth and rough brucellae. *J. Bacteriol.* 95: 618-624.
  28. Díaz R., Jones L.M. & Wilson J.B. (1967) Antigenic relationship of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *J. Bacteriol.* 93: 1262-1268.
  29. Díaz R., Lacalle R., Medrano M.P. & Leong D. (1970) Immunobiological activities of the endotoxin from *Yersinia enterocolitica* strain M.Y. 79. *Proc. Vth Int. Congr. Infect. Diseases, Vienna, Vol. 2, Bacteria I*, pp. 11-17.
  30. Díaz R., Maraví-Poma E., Delgado G. & Rivero A. (1978) Rose bengal plate agglutination test and counterimmunoelectrophoresis test on spinal fluid in the diagnosis of *Brucella meningitis*. *J. Clin. Microbiol.* 7: 236-237.
  31. Díaz R., Maraví-Poma E., Fernández S., García-Merlo S. & Rivero-Puente A.A. (1982) Brucellosis: estudio de 222 casos. Parte IV: diagnóstico de la brucelosis humana. *Rev. Clin. Españ.* 166: 107-110.
  32. Díaz R., Maraví-Poma E. & Rivero A. (1976) Comparison of counterimmuno-electrophoresis with other serological test in the diagnosis of human brucellosis. *Bull. World Health Organ.* 53: 417-424.
  33. Díaz R., Toyos J., Salvo M.D., Fernández-Lago L., Alonso B., Moriyón I. & Dorronsoro I. (1984) Studies of the polysaccharide B and native hapten of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* serotype 9. *Develop. Biol. Standard.* 56: 213-220.
  34. Díaz R. (1974) Valor de la prueba de rosa de Bengala y la demostración de anticuerpos anti-proteína de *Brucella* en el diagnóstico serológico de la brucelosis y yersiniosis. *Med. Clin.* 63: 463-466.
  35. Dubray G. & Plommet M. (1976) Structure et constituants des *Brucella*: propriétés biologiques et caractérisation des fractions. *Develop. Biol. Standard.* 31: 68-91.
  36. Etemadi H., Raissadat A., Pickett M.J., Zafari Y. & Vahedifar P. (1984) Isolation of *Brucella* spp. from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 20: 586.
  37. Fernández-Lago L. & Díaz R. (1986) Demonstration of antibodies against *Brucella melitensis* 16M lipopolysaccharide and native hapten in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 24: 76-80.
  38. Foz A. & Arcalis L. (1953) Die Komplementbindungs-Reaktion in der Diagnose der menschlichen Brucellose. *Z. Hyg.* 136: 55-66.
  39. Foz A. & Garriga S. (1954) Relation entre la fixation du complément et les "anticorps incomplets" (test de Coombs) dans la brucellose humaine. *Rev. Immunol.* 18: 288-298.
  40. Foz A., Arcalis L., Garriga S., Manzanares J. & Ortiz F. (1954) Valor de algunos métodos de laboratorio en el diagnóstico de la brucelosis humana. *Rev. Diag. biol.* 3: 349-383.
  41. Foz A., de Buen M.L. & Calicó I. (1971) Diagnóstico bacteriológico y serológico de la brucelosis. In: *Libro de Actas de la IX Reunión de la Sociedad Española de Medicina Interna. Monografías Médicas Liade. Madrid.*

42. Foz A. (1983) Brucellosis. In, J.E. Perea, Enfermedades Infecciosas. Patogénesis y diagnóstico. (chap. 26). Salvat, Barcelona.
43. Foz A., Pellicer T., Comerma J. & Ariza J. (1985) Specificity of ELISA enzyme-linked immunosorbent assay anti-immunoglobulin G conjugate in the diagnosis of human brucellosis. Eur. J. Clin. Microbiol. 4: 138-139.
44. Foz A. (1953) Valor de la reacción de fijación de complemento en el diagnóstico de la brucelosis humana. IV Congreso Internacional de Higiene y Medicina Mediterráneas. Brucellosis. Ariel, Barcelona.
45. Fribourg-Blanc A. (1971) Étude par immunofluorescence des antigènes somatiques de *Yersinia enterocolitica*. Ann. Biol. Clin. 29: 263-270.
46. Gamazo C., Winter A.J., Moriyón I., Riezu-Boj J.I., Blasco J.M. & Dfaz R. (1989) Comparative analysis of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. Infect. Immun. 57: 1419-1426.
47. Gilbert G.L. & Hawes L.A. (1981) The antibody response to *Brucella*: immunoglobulin response measured by enzyme-linked immunosorbent assay and conventional test. Aust. N. Z. J. Med. 11: 40-45.
48. Glenchur H., Seal U.S., Zinneman H.H. & Hall W.H. (1962) Serum precipitins in human and experimental brucellosis. J. Lab. Clin. Med. 9: 220-230.
49. Gotuzzo E., Carrillo C., Guerra J. & Llosa L. (1986) An evaluation of diagnostic methods for brucellosis. The value of bone marrow culture. J. Infect. Dis. 153: 122-125.
50. Hall W.H. & Manio R.E. (1953) Comparison of the Coombs test with other methods for brucella agglutinins in human serum. J. Clin. Invest. 32: 96-106.
51. Herdenson R.J., Hill D.M., Vickers A.A., Edwards J.M., Tillett H. (1976) Correlation between serological and immunofluorescence results in the investigation of brucellosis in veterinary surgeons. J. Clin. Pathol. 29: 35-38.
52. Heremans J.F., Vaerman J.P. & Vaerman C. (1963) Studies on the immunoglobulins of human serum. II. A study of the distribution of anti-brucella and anti-diphtheria antibody activities among gamma ss-, gamma 1M- and gamma 1A-globulin fractions. J. Immunol. 91: 11-17.
53. Hunter S.B., Bibb W.F., Shih C.N., Kaufmann A.F., Mitchell J.R. & McKinney R.M. (1986) Enzyme-linked immunosorbent assay with major outer membrane proteins of *Brucella melitensis* to measure immune response to *Brucella* species. J. Clin. Microbiol. 24: 566-572.
54. Hurvell B., Ahvonen P. & Thal E. (1971) Serological cross-reactions between different *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica*: agglutination and complement fixation. Acta Vet. Scand. 12: 86-94.
55. Hurvell B. & Lindberg A.A. (1973) Serological cross-reactions between different *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica*. Immunochemical studies on phenol-water extracted lipopolysaccharides from *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* type 9. Acta Path. Microbiol. Scand. Section B. 81: 113-119.
56. Jones L.M. & Berman D.T. (1976) Studies of *Brucella* lipopolysaccharide. Develop. Biol. Standard. 31: 62-67.
57. Jones L.M., Berman D.T., Moreno E., Deyoe L., Gilsford M.J., Huber J. & Nicoletti P. (1980) Evaluation of a radial immunodiffusion test with a polysaccharide B antigen for the diagnosis of bovine brucellosis. J. Clin. Microbiol. 12: 753-760.
58. Jones L.O. & Wilson M.M. (1951) Serum agglutinins in brucellosis. Nature 167: 558-559.

59. Jones L.M., Dfáz R. & Taylor A.G. (1973) Characterization of allergens prepared from smooth and rough strains of *Brucella melitensis*. Brit. J. exp. Path. 54: 492-508.
60. Kerr, W.R., McCaughey W.J., Goghlan J.D., Payne D.J.H., Quaife R.A., Robertson L. & Farrell D. (1968) Techniques and interpretations in the serological diagnosis of brucellosis in man. J. Med. Microbiol. 1: 181-193.
61. Kerr W.R., Payne D.J.H., Robertson L. & Coombs R.R.A. (1967) Immunoglobulin class of brucella antibodies in human sera. Immunology 13: 223-225.
62. Laudat P., Audurier A., Dubray G., De Gialluly C. & Loulergue J. (1983) Contre immunoelectrophorèse à l'antigène brucelline dans le diagnostic sérologique de la brucellose. Develop. Biol. Standard. 56: 447-450.
63. Levieux D. (1978) Bovine immunoglobulins and brucellosis. 3. Activity of IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> and IgM versus different commercial batches of rose bengal antigen. Ann. Rech. Vet. 9: 488-493.
64. Lindberg A.A., Haeggman S., Karsol K. & Carsson H.E. (1982) Enzyme immunoassay of the antibody response to *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 infections in humans. J. Hyg. 88: 295-307.
65. Magee J.T. (1980) An enzyme-labelled immunosorbent assay for *Brucella abortus* antibodies. J. Med. Microbiol. 13: 167-172.
66. Marmonier A., Stihol J.P., Micoud M. & LeNoc P. (1981) Application de la technique immunoenzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) au diagnostic sérologique des brucelloses humaines. II. Comparaison aux autres techniques sérologiques existantes. Pathol. Biol. 29: 83-87.
67. Moreno E., Mayer H. & Moriyón I. (1987) Characterization of a native polysaccharide hapten from *Brucella melitensis*. Infect. Immun. 55: 2850-2853.
68. Moreno E., Speth S.L., Jones L.M. & Berman D.T. (1981) Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. Infect. Immun. 31: 214-222.
69. Moriyón I. & Berman D.T. (1983) Isolation, purification and partial characterization of *Brucella abortus* matrix protein. Infect. Immun. 39: 394-402.
70. Otero J.R., Fuertes A., Palenque E. & Noriega A.R. (1982) Microtitre-adated method that facilitates the Coombs test for brucellosis. J. Clin. Microbiol. 16: 737-738.
71. Parratt D., Nielsen K.H., White R.G. & Payne D.J.H. (1977) Radioimmunoassay of IgM, IgG and IgA brucella antibodies. Lancet 1: 1075-1078.
72. Pellerin J.L., Géral M.F. & Lautié R. (1980) Le test immuno-enzymatique E.L.I.S.A. dans le diagnostic sérologique de la brucellose humaine. Rev. Méd. Vét. 131: 741-766.
73. Pellicer T., Ariza J., Foz A., Pallares R. & Gudiol F. (1988) Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. J. Infect. Dis. 157: 918-924.
74. Pellicer M.T., Foz A., Ariza J., Comerma J. & Gudiol J. (1983) Evolución de los anticuerpos anti-*Brucella* en el curso de la brucelosis humana. Microbiología 1983, Vol. 1, Tomo 1. Sociedad Española de Microbiología. Madrid.
75. Reddin L., Anderson R.K., Jeness R. & Spink W.W. (1965) Significance of 7S and macroglobulin brucella agglutinins in human brucellosis. New Engl. J. Med. 272: 1263-1268.
76. Renoux M. (1980) A passive hemagglutination test for the detection of *Brucella* infection. J. Immunol. Methods. 32: 349-355.
77. Riezu-Boj J.I., Moriyón I., Blasco J.M., Gamazo C. & Dfáz R. (1990) Analysis by immunoblot of the antibody response of sheep infected by smooth and rough brucellae to outer membrane proteins extracted with hot saline. Infect. Immun. 58: 489-494.

78. Riezu-Boj J.I., Moriyón I., Blasco J.M., Marín C.M. & Díaz R. (1978) Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J. Clin. Microbiol.* 23: 938-942.
79. Rodríguez-Torres A. & Feroso J. (1987) Brucellosis. *Medicine (Spanish Ed.)*. 76: 3165-3177.
80. Rodríguez-Torres A., Feroso J. & Landínez R. (1983) Brucellosis. *Medicine (Spanish Ed.)*. 48: 3126-3136.
81. Rodríguez-Torres A., Landínez R. & Hernández-Mejía R. (1977) Diagnóstico bacteriológico de la brucelosis humana. In: *Guía Práctica de diagnóstico de la brucelosis humana*. Sever-Cuesta, Valladolid.
82. Russel A.O., Patton C.M. & Kaufmann A.F. (1978) Evaluation of the card test for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 7: 454-458.
83. Saz J.V., Beltrán M., Díaz A., Agulla A., Merino F.J., Villasante P.A. & Velasco A.C. (1987) Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis. *Europ. J. Clin. Microbiol.* 6: 71-74.
84. Serrano M.L., Llosa J., Castells C., Mendoza J., Navarro J.M. & de la Rosa M. (1987) Detección radiométrica de bacteriemias por *Brucella*. *Enf. Infec. y Microbiol. Clin.* 5: 139-142.
85. Sippel J.E., El-Masry N.A. & Farid Z. (1982) Diagnosis of human brucellosis with ELISA. *Lancet* 2: 19-21.
86. Spink W.W. (1956) The nature of brucellosis, chap. 9. Minnesota, Minneapolis.
87. Verstrete D.R., Creasy N.T., Caveny C.L., Baldwin M.W., Blab M.W. & Winter A.J. (1982) Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *Infect. Immun.* 35: 979-989.
88. Wilkinson P.C. (1966) Immunoglobulin patterns of antibodies against brucella in man and animals. *J. Immunol.* 96: 457-463.
89. Wilson M.M. & Merrifield E.V.O. (1951) The antiglobulin (Coombs) test in brucellosis. *Lancet* 2: 913-914.
90. Zimmerman S.J., Gillikin S., Sofat N., Bartholomew W.R. & Amsterdam D. (1990) Case report and seeded blood culture study of *Brucella* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2139-2141.
91. Zinneman H.H., Glenchur H. & Hall W.H. (1961) Chronic renal brucellosis. Report of a case with studies of blocking antibodies and precipitins. *New Engl. J. Med.* 265: 872-875.
92. Zinneman H.H. (1964) Some molecular characteristics of blocking antibodies in human brucellosis. Soluble antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* 93: 993-1000.
93. Zygmunt M.S., Dubray G., Bundle D.R. & Perry M.B. (1988) Purified native haptens of *Brucella abortus* B19 and *B. melitensis* 16M reveal the lipopolysaccharide origin of the antigens. *Ann. Inst. Pasteur/microbiol.* 139: 421-423.



# Le diagnostic immunologique de la brucellose chronique

A. Serre

*Laboratoire d'Immunologie - Hôpital Lapeyronie et U.E.R. de Médecine  
Montpellier*

## Introduction

La symptomatologie clinique de l'infection brucellienne est d'une extrême diversité : la phase aigüe peut se traduire par le syndrome sudoro-algique classique ou par des manifestations beaucoup plus frustes, voire inapparentes. De même, au cours de l'évolution de la maladie, on peut assister à une résolution définitive ou à une focalisation de l'infection ou, enfin, à la persistance dans de rares cas de signes cliniques mal systématisés déjà identifiés par SPINK comme Brucellose chronique s'ils persistent au-delà de un an.

Les protocoles thérapeutiques utilisés de nos jours ont beaucoup réduit l'importance et la fréquence des formes compliquées. Néanmoins, le risque demeure encore d'une évolution défavorable, surtout dans les cas où la primo-infection est passée inaperçue et n'a donc pas fait l'objet de traitement spécifique.

Les problèmes de diagnostic de ces complications évolutives sont difficiles à résoudre, car la seule preuve indiscutable de l'infection brucellienne, l'isolement de la bactérie, est très généralement absente.

Il s'agira donc de faire appel à des preuves indirectes, essentiellement immunologiques, *in vivo* et *in vitro*, pour établir le diagnostic. Or, il existe, bien sûr, au décours de toute infection brucellienne une cicatrice immunologique qui persiste parfois longtemps. La question posée est de savoir s'il existe et si l'on peut trouver des critères immunologiques d'une infection défavorable. Cette question est évoquée depuis des décennies, quelle en est la réponse en 1991 ?

## Les anticorps circulants

La détection des anticorps circulants participe largement au diagnostic de la Brucellose aigüe, mais il est connu depuis longtemps que les anticorps persistent au décours de cette première phase. Plusieurs informations ont été obtenues sur l'évolution des anticorps, lors d'une évolution défavorable de l'infection : d'abord, au sujet du taux des anticorps, il a été rapporté que la réapparition ou le maintien d'anticorps à un taux élevé et notamment d'IgG indiquait une rechute ou la focalisation et la persistance de l'infection.

Notre expérience est en accord avec ces constatations, mais du fait de l'utilisation de tests très sensibles comme l'immunofluorescence indirecte ou l'Elisa, il faut remarquer que l'on détecte des anticorps pendant une période prolongée au terme d'une Brucellose aigüe correctement traitée.

La détermination de l'isotype des anticorps apporte une aide certaine : dans le cas général, les IgM sont absentes des formes prolongées de la maladie. Les IgG sont prédominantes à ce stade.

Il a été attribué aux IgA une importance qu'elles ne paraissent pas avoir quand on les explore par les méthodes actuelles (IFI ou ELISA) car elles accompagnent sans doute toutes les réponses immunitaires humorales. Enfin, les IgE qui ont été retrouvées par certains auteurs dont nous-mêmes, ne présentent pas d'intérêt diagnostique, semble-t-il.

Enfin, la fonction des anticorps a autrefois été évoquée : il a été attribué aux anticorps "bloquants" une importance qui doit certainement être atténuée, car ils ne sont trouvés que très exceptionnellement.

### **La réponse à médiation cellulaire**

La réponse joue une part importante au cours de l'infection brucellienne et participe pour une très large part à la physiopathologie de la maladie.

Elle est mise à profit dans le diagnostic par l'utilisation de tests *in vivo* d'hypersensibilité retardée très anciennement connus depuis la description du test à la mélitine par Burnet.

Ces tests ne sont pas encore correctement standardisés et surtout les antigènes que l'on utilise sont peu purifiés.

Cependant, on a corrélié depuis longtemps l'importance de la réaction cutanée aux antigènes brucelliens, évaluée par les dimensions de la zone inflammatoire, à la situation clinique et une très forte réaction évoque fréquemment la brucellose chronique afocale.

Dans notre expérience la plus récente (1983), en collaboration avec A. Bertrand, nous avons fait état des mêmes constatations en utilisant deux antigènes différents.

Les valeurs obtenues pour les tests *in vivo* sont beaucoup plus élevées dans le groupe de patients avec brucellose chronique afocale que dans tous les autres groupes de sujets infectés. Par contre, dans le groupe des brucelloses focalisées, les réactions sont faibles et parfois négatives s'il s'agit d'endocardites brucelliennes.

Les tests *in vitro* ont été utilisés par plusieurs équipes et notamment les tests de transformation lymphoblastique avec divers antigènes plus ou moins purifiés et dont beaucoup ont un pouvoir de mitogénicité non spécifique pour les lymphocytes humains, ce qui rend l'interprétation du test délicate.

Dans notre expérience, nous avons retrouvé une corrélation étroite entre les tests de transformation lymphoblastique et les tests cutanés et, par exemple, dans les brucelloses focalisées les index moyens de transformation sont moins élevés que chez les patients atteints de Brucellose aiguë et les tests sont souvent négatifs, comme les IDR, dans les cas d'endocardites.

Par contre, dans les 35 cas de brucellose chronique afocale que nous avons étudiés, les valeurs moyennes des index obtenus ne sont pas significativement différentes de ceux des sujets cliniquement guéris.

La réaction cutanée reste donc le meilleur argument en faveur d'un diagnostic de brucellose chronique.

Par contre, la défaillance de l'immunité cellulaire dans certains cas de focalisation peut représenter un piège diagnostique certain.

### **La production *in vitro* d'anticorps anti-brucelliens par les lymphocytes du sang périphérique**

Plusieurs équipes ont montré que, lors de l'immunisation par un antigène, ou lors d'une infection, les lymphocytes circulants sont capables de produire *in vitro* des anticorps spécifiques de l'antigène en cause. Cette production est active et transitoire car la majorité

des anticorps sériques produits in vivo sont synthétisés normalement par les plasmocytes des organes lymphoïdes, rate et ganglions.

Nous-mêmes avons montré que, au cours de l'infection HIV, le phénomène persiste sans interruption depuis le début de l'infection. Dans d'autres modèles infectieux comme la toxoplasmose et l'infection à cytomegalovirus, des lymphocytes circulants sécréteurs d'anticorps spécifiques existent aussi en corrélation avec la multiplication active du parasite ou du virus.

L'hypothèse a donc été avancée que le maintien dans la circulation de lymphocytes producteurs in vitro d'anticorps spécifiques est dépendant d'une stimulation antigénique active et dans le cas d'une infection, de la replication de l'agent infectieux.

C'est pourquoi, nous avons essayé d'appliquer ce test au diagnostic de la Brucellose. Nous avons obtenu les résultats suivants. Sur 6 patients atteints de Brucellose aiguë, le test est toujours positif avec une production très élevée d'anticorps dans les cultures de lymphocytes; chez 5 sujets souffrant de formes focalisées (sacroiléites, etc.) le test est toujours aussi positif.

Chez 13 sujets anciennement brucellisés, soit totalement guéris, soit alléguant une symptomatologie non spécifique qui pourrait relever d'une Brucellose chronique afocale, la production d'anticorps in vitro par les lymphocytes circulants (test IVAP) est, en général, nulle (ou très faible).

En conséquence, sous réserve d'obtenir des résultats différents sur un nombre plus important de cas, ces observations préliminaires laisseraient penser que la symptomatologie qui recouvre la brucellose chronique afocale ne relève pas d'un processus infectieux, évolutif, mais est peut être le témoin du maintien à un niveau élevé d'un état d'hypersensibilité entretenu par des contacts répétés avec un environnement chargé en antigènes. En outre, le test IVAP ne permet pas pour l'instant d'espérer une nouvelle approche diagnostique de la brucellose chronique; par contre il peut être d'un grand intérêt pour identifier des cas de focalisations au cours d'infections dont la phase septicémique a été mal ou non diagnostiquée.

En conclusion, le diagnostic biologique des formes évolutives défavorables de la brucellose humaine doit prendre en compte à la fois les recherches d'anticorps et de l'hypersensibilité retardée, le test cutané conservant toujours sa valeur, mais des progrès doivent être faits pour la standardisation de ce dernier. Le test IVAP qui met en évidence l'activation spécifique des lymphocytes B et reflète sans doute la présence active de l'agent infectieux, ne permet pas de diagnostiquer la brucellose chronique afocale.

### **Session 3**

**Prevention of brucellosis in animals: results achieved or anticipated; the role of veterinary services**

# Prevention of animal brucellosis (*Brucella melitensis*): The role of veterinary services

P. Nicoletti

College of Veterinary Medicine University of Florida Gainesville, Florida 32610

## Abstract

Brucellosis is a true zoonosis. Each case of the disease in humans has a direct or indirect animal source. Therefore, control of the disease is primarily a veterinary responsibility. Procedures for the control of brucellosis in animals must be selected which are practical and economical.

There is general agreement that vaccination is the most acceptable method of brucellosis control among small ruminants in most countries. There is also agreement that *Brucella melitensis* Rev. 1 is the superior vaccine. Limiting use of the vaccine to sexually immature female sheep and goats is not practical in many countries.

The rapidly increasing incidence of human brucellosis in Kuwait was justification for a widespread vaccination program. Rev. 1 vaccine was administered to young sheep and goats in the recommended dose and to sexually mature animals using a reduced dose of approximately  $10^7$ . Data of serologic tests on sheep and goats before and after vaccination were compared. These and the rapid reduction of human cases following vaccination were criteria of a very successful program.

Vaccination of all sheep and goats with Rev. 1 should be considered in areas where the incidence of infections with *B. melitensis* is high.

## Introduction

The relationship between animal and human brucellosis has been accepted for nearly a century. The disease is a true zoonosis and each case in humans has a direct or indirect animal origin. The prevalence of human brucellosis reflects that of animals. Therefore, control of the disease in humans will not be very successful unless veterinary services first control the disease in animals. Procedures which are selected must be practical, economical, and accepted by livestock owners.

Brucellosis in cattle has been eliminated or greatly reduced in many countries. Unfortunately, brucellosis in sheep and goats remains a major problem in many areas with a corresponding serious problem in humans. Lack of adequate resources including veterinary services, finances, nomadism and other management practices, political turmoil and many other factors contribute to this situation.

## Options for control

There are 3 general categories for control of brucellosis.

Optimal success occurs when these can be combined (1).

## **Test and slaughter**

The identification of diseased animals, primarily through serologic tests, and removal of them from the herd have mostly been applied to cattle brucellosis in economically developed countries. Few countries have attempted to eliminate brucellosis in sheep and goats by these methods. Logistical, economic, and technical difficulties usually prevent consideration of test and slaughter as a practical option.

## **Hygiene and management**

Due to the nature of brucellosis, it is often recommended that animals be isolated from others at parturition. Disinfection of facilities and proper disposal of possible contaminated materials are suggested. Other practices such as prevention of commingling of herds and purchase of replacement animals from *Brucella*-free herds are good management procedures.

Unfortunately, it is often not possible to follow these recommendations, especially in sheep and goat production.

## **Vaccination**

There is general agreement that the most practical and effective method to control brucellosis in sheep and goats is vaccination. *B. melitensis* Rev. 1 vaccine has some disadvantages but is considered to be superior to other vaccines.

Its use has been largely recommended for sexually immature female sheep and goats at a dose of  $10^9$  cells (2). While there are several reasons for this recommendation it limits the practical use in many situations. Limited studies by Alton (3) found reduced doses of Rev. 1 gave good protection. The practicality of reducing the dose of Rev. 1 and administering the vaccine to sexually mature sheep and goats was the basis of part of a program in Kuwait (4).

## **Brucellosis in Kuwait**

An epidemic of brucellosis in humans began in 1983 with a greater than fivefold increase in reported cases. The number of abortions and seropositive dairy cows was also increasing. No data were available for sheep and goat brucellosis.

The situation led to an invitation for a consultancy through the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. A widespread vaccination program for cattle, sheep and goats was recommended.

## **Brucellosis in humans**

Data from the Epidemiology Unit, Preventive Medicine Division, Ministry of Public Health are presented in Table 1.

All isolates from humans were *B. melitensis* and presumed to be mostly from sheep and goat sources since this species was not often isolated from cows. Raw milk was considered to be the source of approximately 83 percent of infections. There was a large reduction in human cases of brucellosis following vaccination of cattle, sheep and goats.

*Table 1. Number of cases of brucellosis per year.*

Year	Number of cases	Rate/100,000
1982	77	5.1
1983	430	26.8
1984	721	42.8
1985	1168	68.9
1986	1051	58.7
1987	747	39.9
1988	394	20.1
1989	264	12.9

### **Brucellosis in cows**

There were approximately 33 privately owned dairy herds containing approximately 12,000 cows from 1984 to 1989. Data were available on the incidence of seropositive cows, abortions and bacteriologic cultures before and after vaccination with *B. abortus* strain 19 at a dose of approximately  $3 \times 10^9$  (Table 2).

*Table 2. Incidence of seropositive cows, abortion and bacteriologic cultures before and after vaccination with B. abortus strain 19.*

Year	Seropositive (%)	Number Abortions	Number Positive	Culture (%)
1984	3.0	25	4	16.0
1985	7.9	95	12	12.6
1986	9.6	199	26	13.1
1987	no tests	248	33	13.3
1988	no tests	180	7	3.9
1989	5.2	130	2	1.5

The cows were vaccinated in December 1985 and 1986 and again in June 1988. The data show a large decrease in the number of abortions, especially those which were culture positive following vaccination of all cows in the herds.

### **Brucellosis in sheep and goats**

No data were available on the prevalence of brucellosis among sheep and goats in Kuwait prior to the vaccination campaign. Blood specimens were collected from approximately 10 percent of the adult animals at the time of vaccination. On the rose bengal test, 4119 (11.1 percent) of the 37 037 serums were positive.

Vaccination was performed between September 1987 and March 1988. Approximately one year following vaccination, a survey of 3724 serums found 10.6 percent positive. One year later, a survey of 3940 animals found 6.6 percent positive serums to the rose bengal and complement fixation tests.

### **The future**

There were extensive efforts to educate people living in Kuwait about brucellosis. It is difficult to measure the success of these in reducing the number of human cases. In general, it is not easy to change food and other customs. The most effective way to reduce brucellosis in humans is to reduce it among animal hosts. The data suggest that vaccination of animals was a major factor in Kuwait.

Brucellosis will continue to be a serious economic and zoonotic disease in many countries. Nomadism and movement across country boundaries is common. Implementation of animal health programs is difficult.

Vaccination of entire populations of animals is the most effective means of controlling brucellosis in primary and secondary hosts. Cooperation of veterinary and public health departments is essential for the maximum success of the prevention and control of brucellosis.



# Coordination des actions entre les services vétérinaires et les organismes d'éleveurs en France

*B. Dufour, F. Dion*

*F.N.G.D.S.B., 149, rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12*

## Introduction

La mise en oeuvre d'une prophylaxie collective réglementée contre une maladie contagieuse, implique, obligatoirement la mobilisation active des services vétérinaires.

Néanmoins pour une meilleure efficacité, l'adhésion des éleveurs aux mesures de lutte est une nécessité impérative.

En France, cette adhésion est obtenue par une participation des éleveurs depuis la conception des textes jusqu'à leur mise en oeuvre sur le terrain.

En effet, depuis 1954 les éleveurs français sont groupés départementalement en G.D.S. (Groupements de Défense Sanitaire) associations à but non lucratif se comportant comme des «syndicats sanitaires». Les 90 G.D.S. sont eux-mêmes regroupés au plan national, en une Fédération Nationale, la FNGDSB (Fédération Nationale des Groupements de Défense Sanitaire du Bétail).

L'histoire de la création de ces structures est intéressante dans la mesure où elle éclaire le rôle des G.D.S.

De 1951 à 1953, les mesures de lutte réglementaires mises en place contre la tuberculose bovine ne furent pratiquement pas appliquées en raison de la non adhésion des éleveurs à cette prophylaxie. Fort de l'expérience spontanée d'un département, la Vendée, l'Administration décida alors de promouvoir la création d'associations d'éleveurs afin que celles-ci les aident à expliquer les mesures et à inciter tous les éleveurs à appliquer la réglementation, postulant ainsi que pour convaincre un éleveur, un autre éleveur est infiniment mieux armé que le meilleur représentant des pouvoirs publics. Les G.D.S. étaient nés.

Leur particularité réside dans le fait qu'ils regroupent la presque totalité des éleveurs (98 % des éleveurs bovins). Très décentralisés, la plupart des G.D.S. ont en effet une organisation communale ou cantonale, la structure départementale étant, dans la plupart des cas, une fédération de groupements locaux. Ce remarquable «maillage» du terrain est particulièrement précieux pour faire circuler l'information.

A l'origine, bras de levier de l'Administration pour les prophylaxies réglementées, les G.D.S. ont depuis pris de la maturité ; grâce à la collecte d'une cotisation auprès de leurs adhérents, dont le montant est fixé chaque année dans chaque département par l'Assemblée Générale des adhérents. Ils se sont progressivement dotés de personnel administratif puis technique (il y a actuellement une vingtaine de vétérinaires salariés, et une vingtaine d'ingénieurs dans les 90 GDS) et se sont orientés vers un élargissement de leurs missions au profit de plans de lutte organisés collectivement contre d'autres maladies «contagieuses» (paratuberculose, hypodermose...) ou des maladies d'élevages (mammites, maladies

néonatales....).Le rôle des G.D.S. dans l'élaboration de la réglementation, la mise en place des mesures sur le terrain et le suivi des résultats obtenus mérite d'être illustré par un exemple !

## **Le rôle des organisations d'éleveurs dans la lutte contre la brucellose des petits ruminants en France**

### **La situation avant 1987**

En France, la première ébauche d'une réglementation contre la brucellose des petits ruminants date de 1979.

Il s'agissait alors d'une lutte collective, obligatoire pour les cheptels caprins, mais facultative pour les cheptels ovins. Ce n'est qu'en mars 1981, qu'un arrêté rendit obligatoire cette prophylaxie sur l'ensemble du territoire national.

Ce texte, dont l'objectif d'éradication n'était pas clairement affiché, paraissait néanmoins mieux adapté aux régions du nord de la France, exemptes de brucellose ovine et caprine qu'à la situation particulière d'infection (d'ailleurs à l'époque mal connue) du sud.

En effet, les mesures décrites incitaient assez nettement à une prophylaxie sanitaire, sans pour autant exclure la possibilité pour certaines zones de pratiquer une vaccination généralisée (jeunes et adultes) à l'aide notamment du H38, vaccin largement utilisé à cette époque. De plus, latitude était laissée à chaque directeur départemental des services vétérinaires (D.D.S.V.) de choisir, en fonction de la situation locale, entre une prophylaxie sanitaire et une prophylaxie médicale.

Les conséquences d'une mauvaise application de cette réglementation dans la région sud furent assez lourdes : tout d'abord le choix par chaque D.D.S.V. du type de prophylaxie à entreprendre ne fut pas toujours effectué avec la connaissance souhaitable de la situation épidémiologique locale (cette connaissance étant le plus souvent absente) ; par ailleurs, le voisinage de départements ayant opté pour des politiques différentes rendit la transhumance, indispensable à l'économie des élevages ovins de cette région, particulièrement difficile, les départements en prophylaxie sanitaire (le plus souvent départements d'accueil) s'opposant à la montée en estive de troupeaux vaccinés et donc de statut sanitaire incontrôlable.

Des conflits naquirent entre départements d'autant plus violents qu'ils ne furent par arbitrés, des arguments techniques côtoyant des arguments totalement irrationnels !

### **Le rôle des organisations d'éleveurs dans l'élaboration d'un nouveau texte**

Au début des années 1980, un nouveau vaccin, le Rev 1, avait fait son apparition sur le marché français.

Utilisé exclusivement pour les jeunes animaux, il ne nécessitait qu'une injection et présentait une efficacité supérieure au H38. Un certain nombre d'essais sur le terrain furent nécessaires pour prouver aux vétérinaires praticiens que ce vaccin «vivant» ne présentait pas les dangers que ses détracteurs voulaient lui attribuer. Il s'implanta alors progressivement dans les régions infectées.

Le Rev 1 présentait, en outre, un avantage inestimable par rapport aux autres vaccins, en permettant la mise en oeuvre d'une prophylaxie médico-sanitaire, à l'instar de ce que le B19 avait permis chez les bovins.

Par ailleurs, les conflits entre départements s'intensifiaient et bloquant toute évolution de la lutte, début 1985, les organismes d'élevage régionaux et nationaux (G.D.S., Chambres

d'Agricultures, Associations de sélectionneurs) décidèrent d'entamer une réflexion de fond sur la meilleure politique à mener en matière de lutte contre la brucellose ovine et caprine en France.

Cette réflexion, conduite avec les scientifiques compétents sur le sujet, aboutit à un objectif clairement affiché : l'éradication de la brucellose ovine et caprine, et à la reconnaissance de deux situations épidémiologiques différentes impliquant l'utilisation de deux outils : la prophylaxie sanitaire dans les zones peu ou pas infectées et la prophylaxie médico-sanitaire (vaccination des jeunes au Rev 1 et dépistage sérologique des adultes) dans les zones infectées.

Puis, ces organismes, représentant l'ensemble des éleveurs ovins français, demandèrent à l'Administration la mise en chantier d'une nouvelle réglementation sur ces bases.

Poussés par la volonté des représentants des éleveurs, et conscients que la prophylaxie de la brucellose des petits ruminants en France risquait de sombrer dans les conflits qui s'intensifiaient sur le terrain, les responsables de l'Administration élaborèrent un nouveau texte en étroite collaboration avec les organismes d'élevages.

Ce nouvel arrêté, en date du 20 août 1987, interdit le recours à une prophylaxie médicale seule et instaure dans les zones «à risques» l'obligation d'une prophylaxie médico-sanitaire utilisant le Rev 1.

### **Le rôle des organisations d'éleveurs dans la diffusion de l'information sur cette nouvelle réglementation**

Le plus dur restait à faire : expliquer à l'ensemble des acteurs de terrain (D.D.S.V., vétérinaires sanitaires, G.D.S., éleveurs concernés), les tenants et les aboutissants de ce nouveau texte, afin de les convaincre d'abandonner leurs anciennes querelles et de mettre en pratique ces nouvelles modalités de prophylaxie.

Dans ce but, les organisations régionales et nationale d'éleveurs, en collaboration avec l'Administration, élaborèrent deux plaquettes d'information et de sensibilisation : l'une à destination des «techniciens» (D.D.S.V., vétérinaires sanitaires, G.D.S., Chambres d'Agricultures, E.D.E.), l'autre à destination des éleveurs. Parallèlement, la démultiplication de l'information fut réalisée efficacement grâce aux nombreuses réunions organisées par les G.D.S. locaux.

Enfin des articles furent publiés dans la presse spécialisée départementale et nationale par les organismes d'élevages.

### **Le rôle des organisations d'éleveurs dans la mise en oeuvre de cette nouvelle réglementation sur le terrain**

Les différents acteurs locaux de la prophylaxie ayant été informés des nouvelles modalités de lutte, restait la mise en oeuvre sur le terrain.

Si les services vétérinaires organisèrent dans chaque département l'application des mesures prévues, il apparut rapidement nécessaire, compte-tenu des différences de situation entre départements, de coordonner les actions sur le plan régional, voir inter-régional, ne serait-ce que pour gérer les mouvements de transhumance.

A ce titre, l'exemple de la région sud-est est intéressant : aucune structure administrative n'étant opérationnelle pour une coordination inter-régionale, un vétérinaire de la Fédération Régionale des G.D.S. la plus concernée prit l'initiative de mettre en place une «charte brucellose» entre tous les partenaires ; en y adhérant, les différents organismes impliqués

reconnaissent la légitimité de cette coordination et s'engagent à mettre en oeuvre les mesures techniques minimales définies en commun avant chaque campagne (le principe d'un niveau de contraintes croissant d'année en année a été retenu).

Enfin, les G.D.S. apportent leur soutien financier à cette lutte en complétant (sur leurs fonds propres ou sur des fonds collectés auprès des collectivités locales) les subventions d'abattages et quelque fois les aides à la vaccination.

Quatre ans plus tard, les premiers bilans sont positifs : les querelles se sont globalement éteintes et les énergies se sont canalisées sur un objectif commun : l'éradication progressive de la brucellose des petits ruminants.

Par ailleurs, la transhumance s'effectue sans trop de difficultés et commence à s'organiser en fonction des risques réels de contamination. Dans les départements les plus infectés après 4 à 5 ans de vaccination des jeunes et la reprise des contrôles sérologiques, les premiers abattages ont été entrepris.

Beaucoup de travail reste encore à faire, mais une voie commune a pu être trouvée, dans laquelle les départements ayant des situations initiales différentes se sont néanmoins tous engagés. Ceci a été rendu possible grâce à la détermination et à l'investissement des organisations d'élevages, en collaboration étroite avec l'Administration vétérinaire.

L'exemple de la brucellose ovine et un certain nombre d'autres exemples (Leucose bovine enzootique, maladie d'Aujeszky...) ont permis de dégager des réflexions générales sur le rôle des organisations d'élevages dans les prophylaxies réglementées.

## **Le rôle des organisations d'éleveurs dans les prophylaxies réglementées**

### **Dans l'élaboration des textes**

Emanation directe des éleveurs, les organisations d'éleveurs sont absolument indispensables lors de la phase d'élaboration des textes réglementaires.

En effet, elles connaissent mieux que quiconque la situation et les contraintes du terrain. Or ces contraintes doivent être prises en compte dès l'élaboration d'une réglementation, sous peine d'importantes difficultés ultérieures dans son application ; elles peuvent être multiples : socio-économiques (la transhumance), économiques (nécessité de contrôler les troupeaux bovins par des tests de mélange et non par des tests individuels pour la brucellose ou la L.B.E.), psychologiques (angoisse des éleveurs de bovins devant l'arrêt de la vaccination contre la fièvre aphteuse) ou techniques (impossibilité d'isoler des groupes de vaches laitières les unes des autres en raison de la traite).

Par ailleurs, les organismes d'élevages, en tant que porte-parole des éleveurs, peuvent également exprimer leurs besoins réels ; c'est ainsi qu'ils ont été les moteurs dans l'élaboration de certaines réglementations revendiquées par les éleveurs eux-mêmes, par exemple pour la maladie d'Aujeszky.

Néanmoins, si les organismes d'élevages souhaitent jouer correctement leur rôle, ils doivent répondre à plusieurs conditions :

- une implantation réelle sur le terrain leur conférant une véritable représentativité ;
- une compétence technique nécessaire à un dialogue égalitaire avec l'Administration et les vétérinaires sanitaires.

Cette compétence technique, absolument indispensable, repose d'une part sur une bonne formation des animateurs de ces structures (à la F.N.G.D.S.B. sur une équipe de 8 personnes au total, il y a 2 vétérinaires et 2 ingénieurs), d'autre part sur des appuis scientifiques de

qualité. La F.N.G.D.S.B. s'est ainsi dotée d'une commission scientifique comprenant des scientifiques français et étrangers choisis personnellement pour leur compétence. C'est ainsi également que sur chaque dossier important la F.N.G.D.S.B. fait appel à des spécialistes compétents sur le sujet afin de définir sa «doctrine» technique.

### **Dans l'information et la diffusion**

L'exemple de la brucellose ovine illustre bien le rôle que doivent jouer les organisations d'éleveurs dans la diffusion des informations sur les mesures de lutte retenues : ils disposent, en effet d'un potentiel de confiance a priori de la part des éleveurs, et ceci d'autant plus qu'ils ont participé à l'élaboration des textes.

C'est également grâce à leur crédibilité que les organismes d'élevages peuvent faire accepter aux éleveurs des mesures impopulaires (abattages d'animaux infectés latents par exemple) sans qu'elles soient vécues comme des contraintes administratives.

Ceci passe nécessairement par la traduction en langage clair et compréhensible par les éleveurs, des textes réglementaires. Ce travail de traduction aboutit ainsi logiquement à un discours unique adapté à une diffusion massive, préalable nécessaire à toute action de sensibilisation. La F.N.G.D.S.B. a ainsi élaboré un jeu de transparents destinés aux G.D.S. départementaux ainsi que des plaquettes destinées aux éleveurs pour expliquer d'une manière simple et attractive les mesures de lutte contre plusieurs maladies : L.B.E., Brucellose ovine et caprine, CAEV...).

Enfin, le contact assuré par les G.D.S. avec la presque totalité des éleveurs par leurs structures locales décentralisées permet cette information permanente.

### **Dans la mise en place des actions sur le terrain**

La mise en œuvre sur le terrain d'une réglementation contre une maladie contagieuse est du ressort de l'Administration, aidée en cela par les vétérinaires sanitaires. Néanmoins, la souplesse de fonctionnement d'organismes associatifs tels que les G.D.S. peut être une aide efficace dans plusieurs domaines :

- La gestion informatique : c'est ainsi que quelques mois après le démarrage de la prophylaxie contre la L.B.E., les G.D.S. les plus dynamiques avaient conçu des logiciels permettant de gérer les exploitations infectées (date de prélèvement, date de notification, date d'abattage...). Ces fichiers ont constitué une aide importante pour l'Administration.

- Le financement complémentaire : sur leur fonds propres (cotisations) ou sur des fonds alloués par les collectivités locales, la plupart des G.D.S. ont apporté une aide complémentaire aux indemnités d'abattage réglementaires, jugées, la plupart du temps, insuffisantes par les éleveurs, en développant ainsi une de leurs options fondamentales : le mutualisme.

- L'identification des animaux : dans de nombreux départements, ce sont en effet les G.D.S. qui gèrent les fichiers départementaux et les mettent donc à la disposition de l'Administration pour effectuer les contrôles nécessaires au bon déroulement de la prophylaxie.

De nombreux autres exemples pourraient être cités, illustrant tous la nécessaire complémentarité entre une Administration maître d'œuvre d'une action réglementée et une structure associative représentant les éleveurs ; cette dernière, fonctionnant de façon plus souple peut en effet assurer la réalisation d'un certain nombre de tâches, indispensables au bon déroulement d'une prophylaxie, avec une efficacité supérieure et à un moindre coût.

## Conclusion

Il est évident que les organisations d'élevages, quels que soient leur dynamisme et leurs moyens, ont impérativement besoin de l'Administration vétérinaire dans la lutte contre certaines maladies contagieuses, en particulier afin d'assurer les fonctions de réglementation, de contrôle, de certification et de répression éventuelle. Toutefois, à la lumière de l'expérience française, la participation active des organismes d'élevages dans l'élaboration des textes, la sensibilisation, la mise en oeuvre et le suivi d'une prophylaxie paraît être un outil précieux pour l'efficacité des mesures de lutte retenues.

En effet, la responsabilisation des éleveurs dans des actions qui les concernent au premier chef conduit logiquement à une attitude active de leur part, forcément plus efficace et plus formatrice que s'ils se contentent de subir une réglementation qu'ils n'ont pas souhaité et dont ils comprennent mal les tenants et les aboutissants.

Un partenariat réel entre les organisations représentant les éleveurs et l'Administration vétérinaire constitue donc une synergie indispensable au meilleur déroulement de la lutte contre les maladies réglementées.

# Coordination between breeders and veterinary services in Turkey

A. Çoker

*Pendik Animal Diseases Central Research Institute, Brucella section, Istanbul, Turkey*

The Veterinary Services of Turkey are established within the Protection and Control Directorate of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, headed by a veterinarian as Director General, assisted by a Deputy Director General. Field services are organized by provincial animal health services which fall under the General Provincial Director of Agriculture representing the Ministry of Agriculture at provincial level. Each province is divided into several administrative districts having one or more veterinarians and veterinary technicians. There are also private veterinarians working at provincial and district level.

The provincial animal health services are responsible for implementing annual animal disease control and are monitored by the Protection and Control Directorate.

District Veterinary Services organize and carry out disease prevention, treatment programs and surveys of prevalence, in collaboration with regional animal health institutes. According to the 1986 statistics, the livestock populations are:

Sheep .....	42 791 000
Goats .....	13 000 000
Cattle .....	12 695 000
Buffaloes .....	554 000
Equides .....	2 091 000
Camels .....	2 740
Pigs .....	11 000
Poultry .....	60 000 000

In Turkey there are 23 governmental hospitals and dispensaries, and 376 private clinics.

There are institutes for research, diagnosis and vaccine production at central and regional levels:

- 1 Animal Disease Central Research Institute,
- 6 Animal Disease Research Institutes,
- 1 Foot and Mouth Disease Institute,
- 1 Poultry Diseases Research and Vaccine Production Institute,
- 1 Animal Vaccines Control Centre,
- 9 Provincial Control Laboratories, which are responsible for diagnosis.

The combined staff totals 1777 Veterinarians, 2611 Veterinary Health Technicians and 384 Laboratory technicians. If *Brucella melitensis* infection is detected according to a laboratory report, the veterinarians make a disease occurrence report. The Animal Health Control Commission decides whether to apply control measures and quarantine.

According to the Animal Health Control Law:

- A) Aborted animals are separated from the healthy animals; milk from these animals may be consumed after it has been boiled.

- B) To prevent the healthy animals from becoming infected, aborted materials are destroyed by burning.
- C) Sheep and goats which are exposed to the infection are vaccinated and animals are marked.
- D) Movement of the ruminants into an infected region is forbidden, which is placed in quarantine.
- E) Quarantine precautions are confined to the infected sheep flock or place.



# Control of brucellosis in small ruminants in Spain

*J.M. Blasco*

*Dpt. Pr. Animal, SIA/DGA, Ap. 727, 50080 Zaragoza.*

Spain has one of the highest levels of prevalence of human brucellosis of the Mediterranean countries. The human infection is due to *B. melitensis* mainly of ovine origin (about 25 million sheep) and to a lesser extent of caprine origin (about 3.6 million goats). Thus, the control of human brucellosis is dependent on the previous control of *B. melitensis* infection in sheep and goats.

The Spanish Government began to control brucellosis in small ruminants in 1976. The campaign was based on the immunization of all young replacements (3-6 months old) with live Rev. 1 vaccine and, in some exceptional cases, this program was complemented with test (rose bengal and complement fixation tests) and slaughter. The rate of replacement in both sheep and goats in Spain varies from 15% to 20% per year, so the program should have finished with all the small ruminant population vaccinated after 5-7 years, with an ensuing decrease of infection in both animals and humans. If we consider the actual moderate to high levels of infection in small ruminants (2% - 20% of positive animals and 10% - 90% of flocks affected, depending on the region), the conclusion is that the program based only on vaccination of young animals lacks efficacy. Although some failure could be attributable to the quality of vaccines employed (see N. Bosseray, this meeting), the main reason for low efficiency of the program is that the vaccine was not always applied in the field. The percentages of vaccination based on the total doses of Rev. 1 vaccine distributed by the Government (marketing of Rev. 1 is forbidden) have been low in the first period of the control campaign (Table 1)(2). Although the situation has improved (3.2 million doses of Rev. 1 delivered in 1990 to a population of about 5 million young replacements), an important proportion of sheep and goat populations remains unvaccinated, being in our opinion the main reason for maintaining the disease in Spain.

*Table 1. Percentages of animals vaccinated in relation to the total population of small ruminants in Spain.*

	Total reproducers <sup>1</sup>	Total vaccinated <sup>2</sup>	%
Sheep <sup>3</sup>	10 988 194	4 047 398	36.8
Goats <sup>4</sup>	1 976 959	386 877	19.6

<sup>1</sup>. Population of 1980.

<sup>2</sup>. According the vaccine doses delivered by the Government:

<sup>3</sup>. Sheep: From 1977 to 1981.

<sup>4</sup>. Goats: From 1978 to 1981.

In many Spanish regions the vaccination cannot be restricted to young replacements and has to be applied to all animals to obtain an effective decrease in the disease. With this in mind, together with experiments in goats (1), some vaccination trials were carried out under official control with reduced doses ( $10^6$  to  $10^8$  Rev. 1 microorganisms) applied subcutaneously. In some trials no problems attributable to vaccine were noted (3) and a clear decrease of human infection was observed in the following years (E. Esteban and F. Crespo, personal communication). However, in other trials the Rev. 1 vaccine produced a high proportion of abortions among pregnant animals (4). In recent trials it has been clearly demonstrated that the Rev. 1 vaccine can produce abortion in pregnant ewes (5; M. Plommet, personal communication). The number of abortions after vaccination appears to be unrelated to the dose of vaccine (doses as low as  $10^6$  administered subcutaneously have produced abortion in over 50% of vaccinated ewes). The pathogenic effect of Rev. 1 appears to be correlated mainly with the day of pregnancy at vaccination, and with the route of vaccine administration. The highest proportion of abortions is produced in ewes vaccinated subcutaneously during the second month of pregnancy, while the risk of abortion is reduced when sheep are vaccinated by the conjunctival route in the last month of pregnancy (5). Due to the pathogenic effect of Rev. 1 in pregnant sheep and to EC norms, whole flock vaccination has been forbidden in Spain, and vaccination remains restricted to the young replacements. This situation is inadequate in many Spanish regions, in which whole flock vaccination is the only valuable alternative to control brucellosis, even assuming some problems of abortions attributable to vaccine.

Further research is needed to find the optimal safety conditions to use Rev. 1 in adult animals and to test other theoretically less virulent vaccines (such as Strain 2) for the same purpose. In regions with low prevalence, the use of the conjunctival route for the administration of Rev. 1 to young replacements should be recommended, coupled with adequate interpretation of serological tests to avoid unnecessary slaughter of animals in eradication campaigns.

### **Acknowledgements**

The research in our Laboratory is financed in part by the CYCIT, the CONAI and the MAPA from Spain.

### **References**

1. Alton G.G. and Elberg S.S. (1967) *Vet. Bull.* 37: 793.
2. Anonymous (1985) Subdirección Gral. Sanidal Animal., Boletín informativo, 12.
3. Blasco J.M. et al. (1984) *Ann. Rech. Vét.*, 15: 533.
4. Blasco J.M. et al. (1990) *Brucellosis ovina. Monografía OVIS*, 8: 68.
5. Jiménez de Bagués M.P. et al. (1990) *Ann. Rech. Vét.* 20: 205.

# Prophylaxis and control of brucellosis due to *Brucella melitensis* in Italy: acquired and expected results

V. Caporale\*, D. Nannini\*, A. Giovannini\*, D. Morelli\*, M. Ramasco\*\*

\* Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell' Abruzzo e del Molise "G. Caporale".  
Centro Operativo Veterinario di Epidemiologia, Programmazione, Informazione  
(COVEPI), 64100 Teramo, Italia.

\*\* Ministero della Sanità, Direzione Generale dei Servizi Veterinari, Roma, Italia.

## Summary

Prophylaxis and control of ovine and caprine brucellosis in Italy is evaluated, on the basis of officially available Ministry of Health data.

Some indicators of epidemiological importance are discussed to explain regional differences observed in the results.

Serological positive titres which define infected animals according to EC Decision is also discussed in relation to its impact on a population massively vaccinated with Rev. 1.

## Introduction

The research work dealt with in this paper represents a continuation of a previous publication (Caporale *et al.*, 1985) on the epidemiology and control of ovine and caprine brucellosis in Italy.

From 1968 to 1985, despite an increase in diagnostic effort, the incidence and prevalence rate was still unknown in about 90% of the population, while human brucellosis yearly prevalence averaged 5.1 cases/100 000 people. Data collected from 1976 to 1982 (Caporale *et al.*, 1985), involved the whole populations under control, while those presented in this paper deal with the sheep and goat populations controlled each year by Veterinary Services.

Data reported in this paper are the official Italian Health Ministry Veterinary Service data generated from Annual Reports (from 1982 to 1988) submitted by the Regional Veterinary Services to the General Directorate.

## Prophylaxis of brucellosis in Italy

### Legislation

Law No. 615 of 9th June 1964, assigned to the Ministry of Health Veterinary Service the task of controlling bovine tuberculosis and bovine, ovine and caprine brucellosis. Prophylaxis of ovine and caprine brucellosis has since been regulated by this law, repeatedly amended, and by two series of Decrees concerning the application of the Law and providing for the preparation and implementation of Annual National Prophylaxis Plans, and payment of

indemnities to owners of infected animals slaughtered. Up to 1968, however, no specific control scheme was adopted. Control was based solely on the general rules regarding infectious diseases provided by the Veterinary Police Regulation approved in 1954.

In 1981 compulsory vaccination of all lambs and kids aged 3 to 7 month with Rev. 1 vaccine was introduced.

The EC Council, in its Decision dated 21st May 1990, allocated funds for brucellosis eradication in Member Countries upon their adoption of National Plans. The effects of Council Decision were introduced in the Italian Legislation by the Health Minister's Decree of February 19th 1991, rendering eradication measures compulsory over the whole country.

**Basic actions for prophylaxis and eradication provided for by present Italian legislation (1991 Minister of Health Decree).**

Prophylaxis and eradication is based on the following (in italic letters are reported those parts of Regulations applying before February 1991 that have been abolished by the Health Minister's decree):

- a. *compulsory* vaccination of all lambs and kids aged 3 to 7 month with Rev. 1 vaccine;
- b. compulsory notification to the veterinary service in the event of:
  - abortion or placental retention. Suspicion needs confirmation by isolating the pathogen or serological or *allergic testing*;
  - animals positive to serological or *allergic testing*;
  - animals epidemiologically connected to confirmed human cases;
- c. restrictions of movements of flocks and animals if infected;
- d. *compulsory prophylaxis of flocks*:
  - *confirmed as infected on the grounds reported under item b.*
  - *whenever the success of prophylactic measures against bovine brucellosis may be jeopardized.*
- e. *voluntary* prophylaxis (now compulsory) of flocks *within the plan upon request of their owners* based on:
  - identification of animals and flocks *entering the plan*;
  - periodic check of animals and flocks through serological or *allergic testing*;
  - qualifying of the flocks, after at least two negative tests of all individual animals, as "disease free" or "officially disease free" depending on whether they are vaccinated or unvaccinated;
  - cost sharing between Government and owners. All veterinary costs including vaccination and serological testing are paid by the Government, including compensation to cover production losses due to anticipated slaughter of animals found infected;
  - prohibition in *flocks taking part to the plan* of administering products which could alter serological tests. Any brucellosis therapy is strictly forbidden.
- f. periodical compulsory control of male animals serving as artificial and natural insemination sires;
- g. compulsory control of transhumant flocks whose milk is sold, *when local Authorities deem it necessary*;
- h. *voluntary* or compulsory slaughter of infected animals with payment of indemnities to owners when animals are *voluntarily or compulsorily* slaughtered;
- i. information and training for breeders and veterinarians.

## Italian populations of sheep and goats

The populations are not distributed evenly over the Country (Figure 1): 6.1% of the population is in the Northern Regions; 22.5% in the Central Regions; 28.5% in the Southern Regions and 42.1% in the Islands (Farina R., in press).

The population density is much higher in Central, Southern Italy and in the Islands, with a maximum of 124.78 head/km<sup>2</sup> in Sardinia, 46.09 head/km<sup>2</sup> in Latium, 42.81 head/km<sup>2</sup> in Abruzzo (Figure 2).

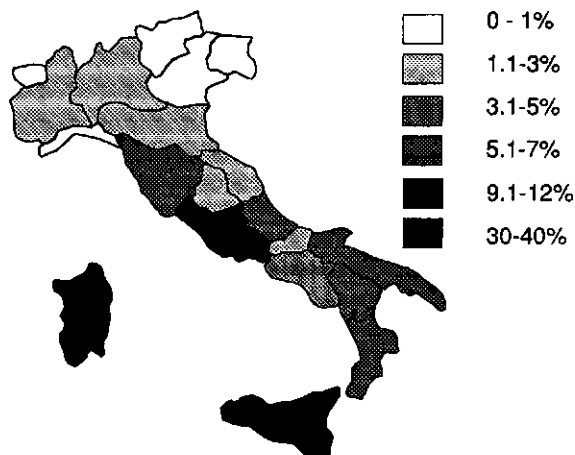


Fig. 1. Percentage of the total population of sheep and goats present in Italian Regions year 1988.

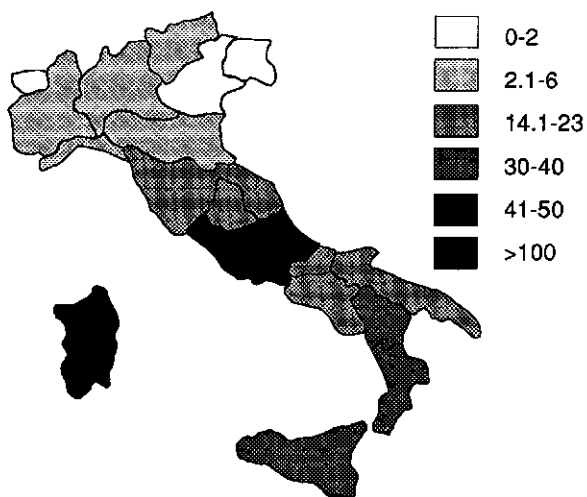


Fig. 2. Regional population density/km<sup>2</sup> of sheep and goats in Italy - year 1988.

## Economic data

In the period 1968 - 1979, total Government expenditure for bovine tuberculosis, bovine brucellosis and ovine and caprine brucellosis control campaigns was about 379,215 million lire at 1979 current prices (Caporale *et al.* 1980, Ghilardi *et al.* 1981). Of the total cost, only 2.46% (9 330 mill.) was due to the ovine-caprine campaigns, with an average amount of about 777 million lire yearly (at 1979 current prices).

In the period 1985 - 1988, the Italian Government spent a total of 6 904 mill. (at 1988 current prices) for the ovine-caprine control campaigns with an yearly average amount of about 1 726 million lire.

Since the cost of living index of 1988 compared with 1978 increased by a factor 3.115 and the increase of the 1988 index compared to the 1979 one is 2.6914, the total expenses met during the 1968 - 1979 period were 25 111 mill. (at 1988 current prices) and the yearly average amount is 2093 million lire.

The total yearly cost of the ovine-caprine campaign (at 1988 current prices) of about 5000 mill. in 1968 decreased in following years (Figure 3) so that in the period 1968 - 1988 the average expenditure was about 2000 mill./year and in years 1985 - 1988 decreased further to about 1726 mill./year. During the last four years, public expenditure on the campaign averaged 211.19 lire/head, with a maximum of 11 634 lire/head in Valle d'Aosta and a minimum of 39.6 lire/head in Calabria (Figure 4).

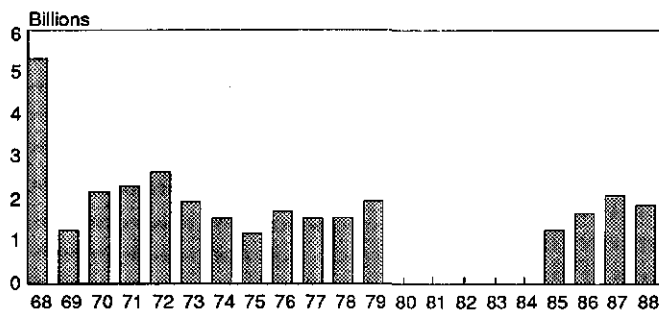


Fig. 3. Cost of prophylactic campaigns against brucellosis in sheep and goats (in Italian lire at 1988 current prices).

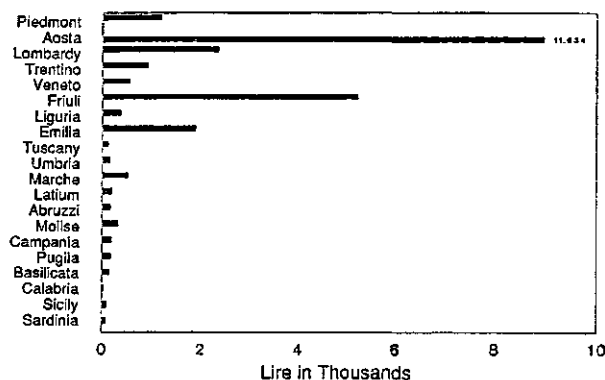
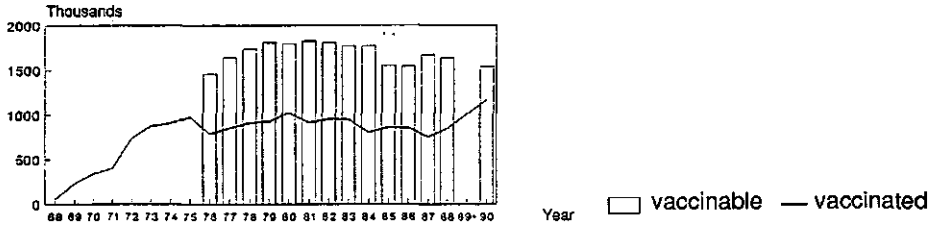


Fig. 4. Cost of controlling ovine and caprine brucellosis spent in the Italian Regions (lire per head of population).

## Vaccination

Calculation of the total number of animals to be theoretically vaccinated in Italy during the period 1976 - 1988, on the basis of a 20 % yearly restocking rate and the number actually vaccinated from 1968 to 1988 (Figure 5), shows that only half of the animals to be vaccinated every year have actually been vaccinated (mean = 51.8% for the period 1976 - 1988).

Great differences in the vaccination rate exist among Italian regions (Figure 6). In fact, vaccination rates are lowest in the southern regions, which contain about a quarter of the whole Italian population of sheep and goats.



• 1989 not available data No. of vaccinable heads estimated on a restocking rate 20%

Fig. 5. Number of vaccinated and vaccinable animals.

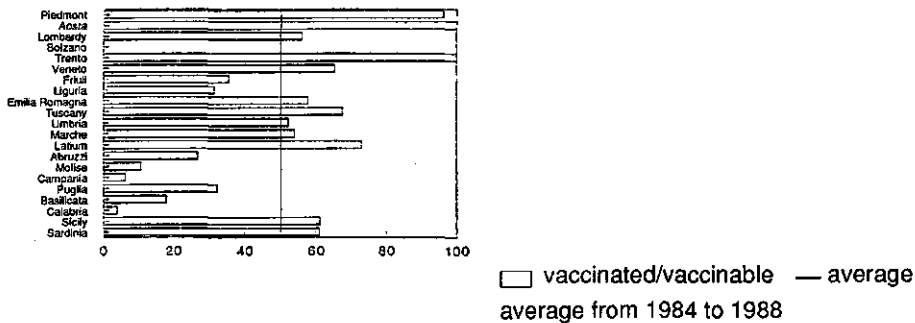


Fig. 6. Estimated percentage of vaccinated/vaccinable heads per region.

## Flocks controlled, disease free, officially disease free and infected on december 31st of each year

During the period 1976 - 1988, the number of flocks controlled increased from 22 252 to 30 342 (Figure 7).

The percentage of flocks actually controlled, remained quite low during the entire period. In fact, even though steady increase was recorded every year, the maximum value reached (Figure 8) was 24.2% in 1988 (30.5% in 1990).

In Figure 9 which shows the distribution of flocks controlled in 1988 in relation to the existing ones, a decrease in the percentage of controlled flocks from northern to southern regions and islands can be observed.

The percentage of "disease-free flocks" in relation to the number of controlled flocks rose from 10.08% in 1976 to 44.10% in 1988, while the percentage of "officially free flocks"

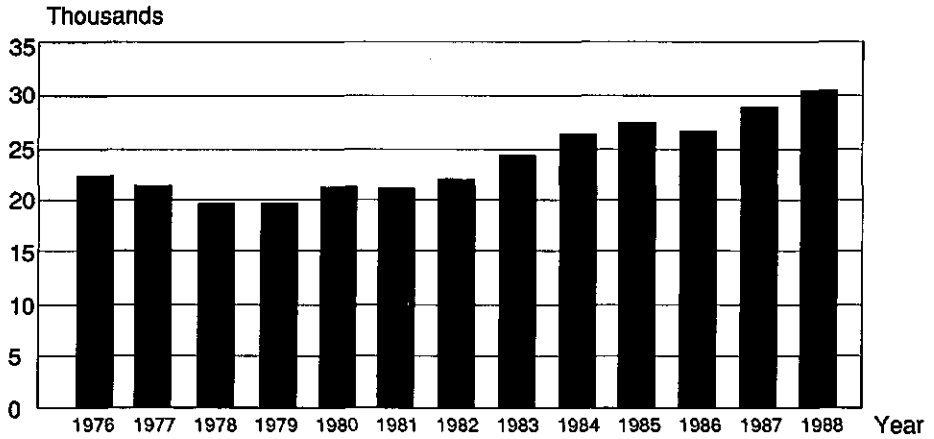


Fig. 7. Number of flocks controlled yearly.

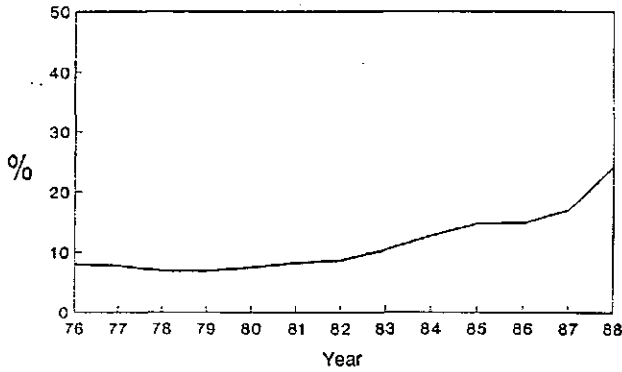


Fig. 8. Percentage of controlled/existing flocks.

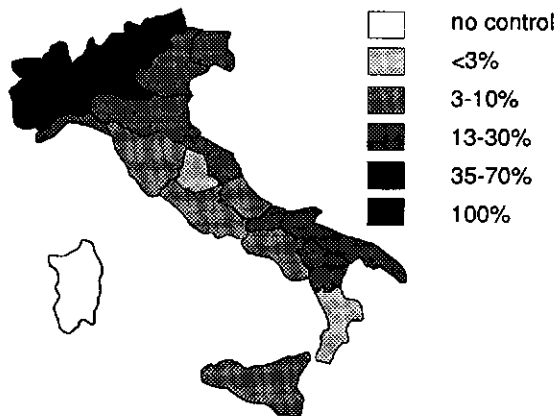


Fig. 9. Percentage of total flocks controlled in the Italian Regions - year 1988.



decreased from 39.08% in 1976 to 24.67% in 1988 (Figure 10). The number of "negative to the last control flocks", which showed a slight increase in 1981 - 1983, started to decrease in the subsequent year (31.95% in 1984) and reached 27.8% in 1988 (29.96% in 1990).

The distribution of "disease-free" and "officially disease-free" flocks varies widely from region to region. In fact 72% of the overall number of "disease-free flocks" and 95.4% of the "officially disease-free flocks" are in northern Italy, 20.6% and 0.6% respectively are in central Italy, while in the South only 7.4% of "disease-free" and 4% of "officially disease-free" flocks are present. In the islands there are no "officially disease-free flocks", while as few as 0.05% of the overall national number of "disease-free flocks" are recorded in Sicily. No data concerning Sardinia are available.

The number of flocks still infected at the end of every year (Figure 11) decreased from 4.8% in 1976 to 2.2% in 1983, and then rose to about 3.5% in 1988 (4.22% in 1990). The regional distribution of such flocks in 1988 (Figure 12) is characterized by the existence of areas in central and southern Italy where the percentage of flocks infected on December 31st is particularly high.

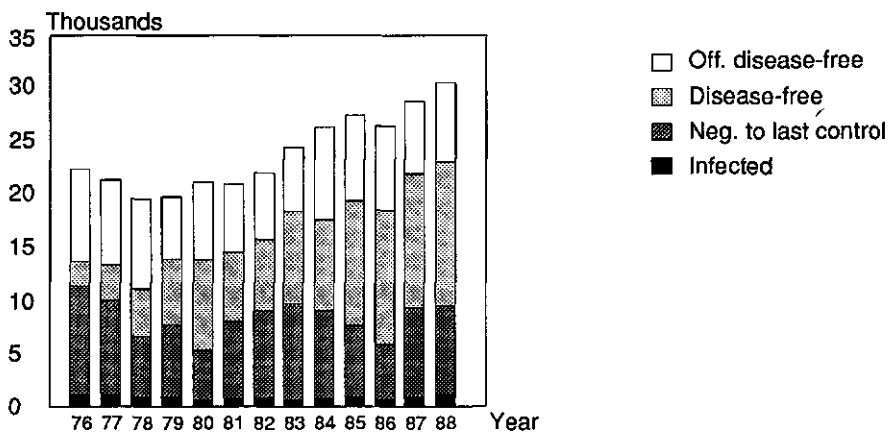


Fig. 10. Number of total flocks classified as infected, negative, disease-free and officially disease-free.

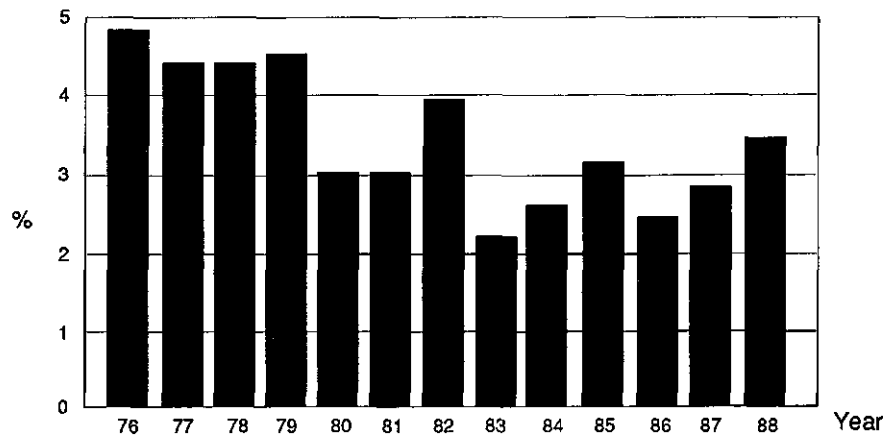


Fig. 11. Percentage of controlled flocks remaining infected on December 31st.

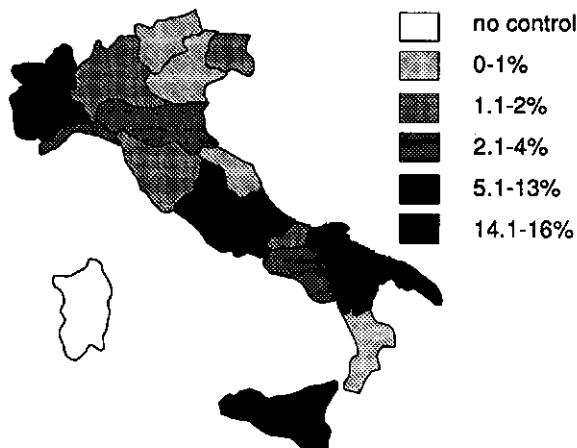


Fig. 12. Percentage of controlled flocks found infected in the Italian regions - situation at 31 December 1988.

### Controlled, disease-free and officially disease-free animals

Between 1976 and 1988 the number of animals controlled increased from 268,250 to 596,243 (Figure 13).

The percentage of controlled heads always remained very low: 3.68% of the total population in 1976, 7.3% in 1988 (10.73% in 1990) (Figure 14). Of the overall number of animals controlled in Italy, 48.6% belong to flocks from northern regions, whose total population in 1988 represented only the 6.1% of the national stock. In fact, in 1988 the distribution of controlled animals in relation to the population present in each region is quite uneven (Figure 15): the proportion of controlled animals in central-southern Italy and in the islands, which have most of the ovi-caprine population, is generally below 12% (Figure 1).

47.13% of the animals of disease-free flocks and 77.23% of those of officially free flocks are in northern regions; 34.7% of the animals of disease-free and 2.84% of the animals of

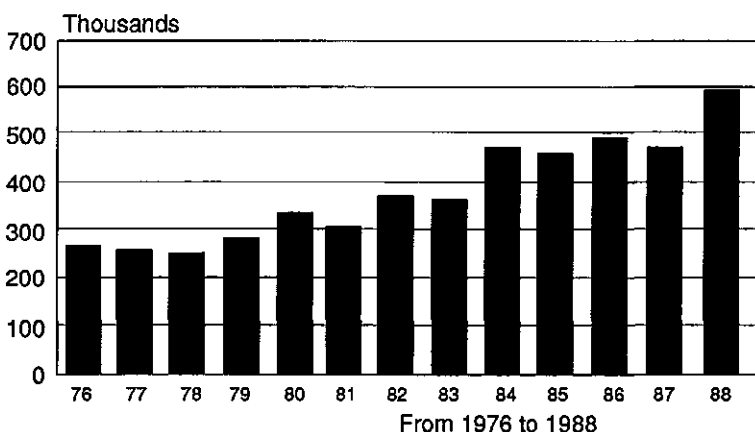


Fig. 13. Number of animals controlled yearly.



Fig. 14. Percentage of total population controlled yearly.

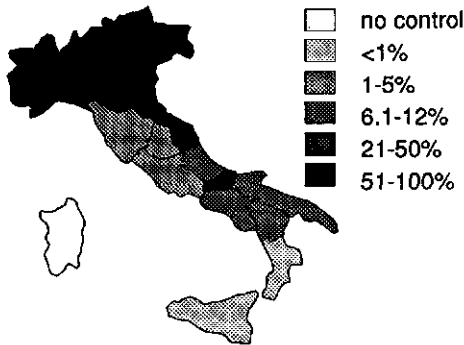


Fig. 15. Percentage of animals controlled in the Italian regions - year 1988.

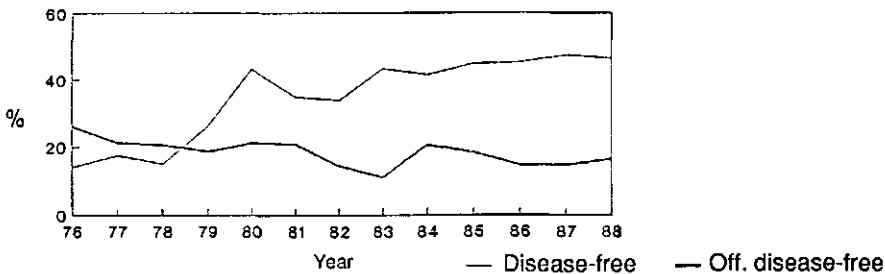


Fig. 16. Percentage of controlled sheep and goats present in disease-free and officially disease-free flocks.

officially free flocks are present in central Italy; 18.13% and 19.92%, respectively, belong to southern Italy. No officially disease-free flocks are present in Sicily, which has 2.66% of the disease-free animals. No data are available for Sardinia.

The percentage of animals belonging to officially disease-free flocks slowly decreased since 1984, with a little recovery in 1988, while the percentage of animals in disease-free flocks increased until 1987 and then slightly declined (Figure 16). On the whole, however, the percentage of sheep and goats belonging to disease-free or officially free flocks is only 4.6% of the total population.

## Infected and slaughtered animals

From 1976 to 1988 the number of animals found infected and slaughtered decreased from 8917 in 1976 to 6572 in 1987 (Figure 17); peaks in 1982 (21844 animals) and in 1988 (11088 animals) will be noticed.

Between 1976 and 1988 the percentage of animals infected left in the tested flock at the end of the year was 1.22%, and that of animals found infected and slaughtered was 2.07% of the controlled animals (Figure 18).

In the early 80's, Caporale et al. (1985) described a decrease of the animals found infected and remaining within flocks at the end of the every year, but in subsequent years (Figure 19) the trend shows an increase again; between 1976 and 1988 they represent the 37.1% of the animals found infected during the year.

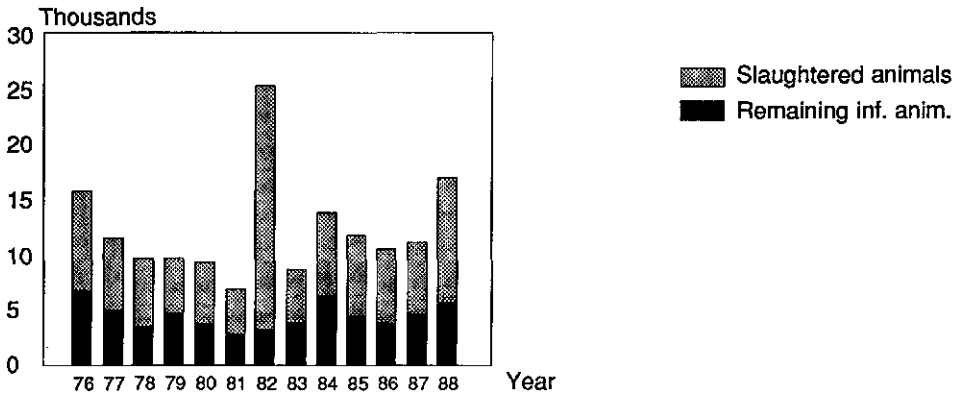


Fig. 17. Number of animals slaughtered and remaining infected at the end of each year (1976 - 1988).

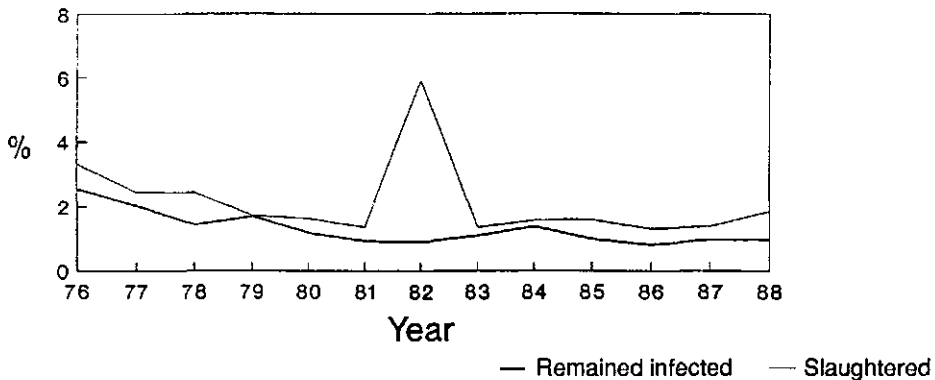


Fig. 18. Percentage of animals controlled and slaughtered or remaining infected at the end of each year.

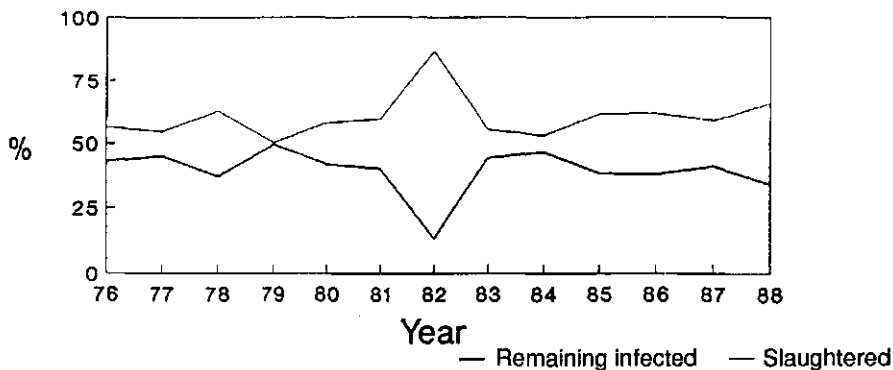


Fig. 19. Percentage of animals found infected and slaughtered or remaining in flocks at the end of each year.

### Outbreaks of ovine and caprine brucellosis in Italy between 1984 and 1990

Information about the number of outbreaks in the period 1984 - 1990 is incomplete, regarding only 5 regions out of 20 for the year 1984 (Figure 20) and 6 regions for subsequent years. The regions concerned are Lombardy and Emilia-Romagna in northern Italy; Tuscany, Umbria and Marche in central Italy; Abruzzo in southern Italy. All but Abruzzo are regions with small populations of sheep and goats (Figure 2); they have a percentage of vaccinated animals higher than national average (Figure 6), and low rates of human brucellosis incidence. In the same regions, however, distributions of the controlled flocks and animals vary widely (Figures 9 and 15).

The number of Italian regions for which information is available is objectively low; in any case the number of brucellosis outbreaks, notifications and prophylaxis activity are not a good indicator of infection prevalence. Human brucellosis incidence rate appears to be a better indicator of prevalence.

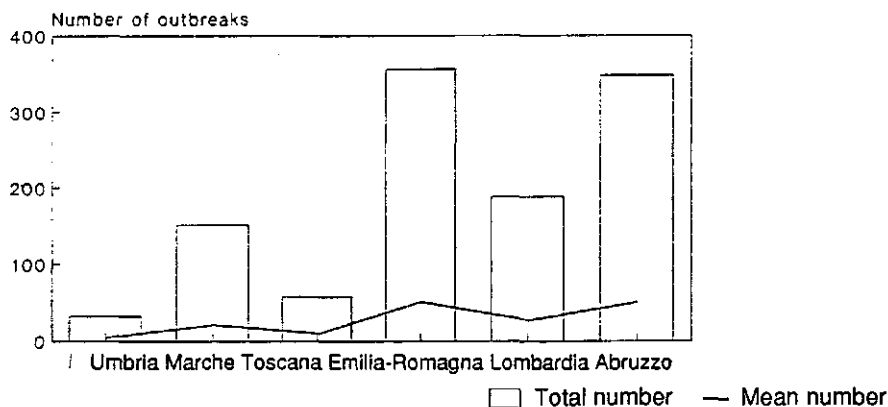


Fig. 20. Total and mean number of brucellosis outbreaks from 1984 to 1990.

## Incidence and geographic distribution of human brucellosis

From 1981 to 1990, 99% of *Brucella* strains isolated from humans belonged to *B. melitensis* biovar 2 (Farina R. et al., in press). So human infection can be considered a good indicator of *B. melitensis* infection in sheep and goats.

During the period 1965 - 1968 the number of cases of human brucellosis was 19 300, with a yearly incidence rate of 9.2 cases/100 000 (Farina and Bellani, 1974); from 1968 to 1972, the number of cases was 13 476 with an incidence rate of 5 cases/100 000; this figure remained virtually unchanged through 1982, with an yearly average incidence rate of 5.1 cases/100 000 (Caporale et al., 1985).

From 1983 to 1989 the total number of cases was 13 356 with a mean yearly incidence of 3.34 cases/100 000. If the pattern of incidence during those years (Figure 21) is considered, there was an overall decrease of the incidence from 5.3 cases/100 000 in 1982 to 2.54 in 1989. During the last four years considered, the incidence rate remained below the period average (3.34). Mean incidence rates and distribution in Italian regions for the period 1983 - 1989 is shown in Figure 22.

If one compares the distribution of mean incidence rates and public resource investment for brucellosis prophylaxis (Figure 23) one can see that in central and southern regions, where disease incidence is highest, expenses are the lowest.

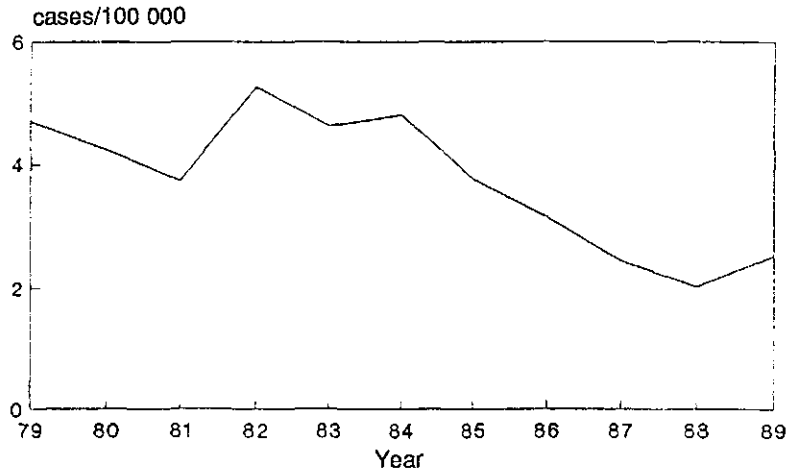


Fig. 21. Human brucellosis incidence rate per 100 000 in Italy between 1979 and 1989.

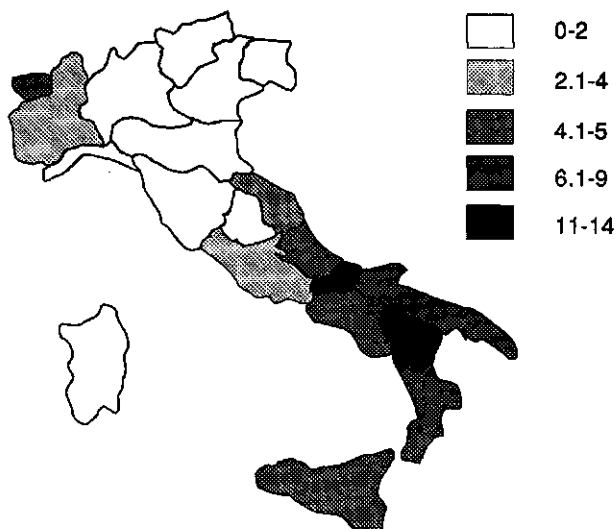


Fig. 22. Human brucellosis incidence rates per 100 000 in Italy per region in the years 1983 - 1989.

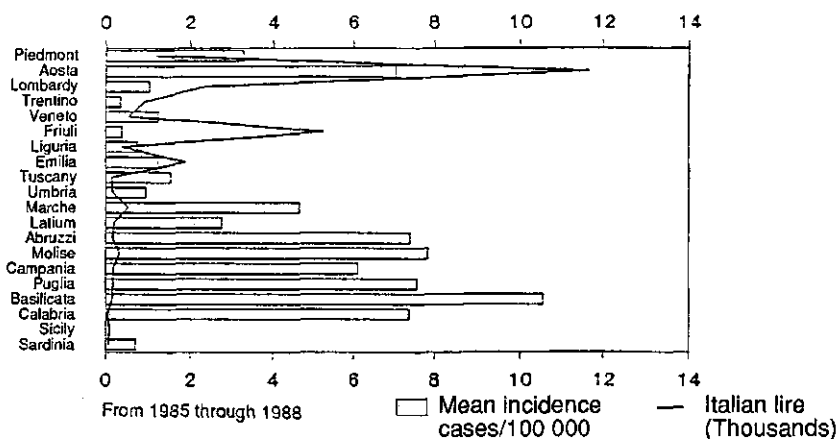


Fig. 23. Human brucellosis incidence and expenditure for controlling ovine-caprine brucellosis.

## Discussion

The history of prophylaxis and control of ovine and caprine brucellosis in Italy may be subdivided into two main periods. In the first one (from 1968 to 1980) participation to prophylactic plans was voluntary, while during the second one (from 1981 through 1990) vaccination of replacement animals was compulsory.

During both periods, the aim of prophylaxis was to lessen damage caused by the disease and to reduce the incidence of *B. melitensis* infection, without a firm eradication strategy.

This strategy was associated with reduced resource investment during the whole period considered (Figure 3). The investment of 5000 million lire in 1968, the first year of the plan, fell to a mean value of about 2000 millions/year from 1969 to 1979, and then to 1700 millions from 1985 to 1988.

A number of shortcomings can be identified in the prophylactic activities.

- After more than 20 years the prevalence and incidence of brucellosis are practically unknown; this is particularly true for central-southern regions and the islands, where the numbers of animals and population densities are the highest (Figures 1 and 2).
- Systematic control of flocks is restricted to a few northern regions (Figure 9), while in central and southern regions and in Sicily control activities seem to be confined to the follow-up of infected flocks (Figure 12). Indeed, in these regions less than 12% of the population was under control in 1988 (Figure 15), only exception being Molise where the percentage controlled has been 30.8%.
- The percentage of animals found infected and remaining in the tested flock at the end of each year in relation to the total number of animals found infected during the year, after a decrease during the early 80's, rose again at the end of the decade to the values recorded at the end of the 70's (Figure 19). The failure to slaughter more than one third (37.1%) of the animals found infected during the year represents a risk of infection that could render all efforts aimed at identifying infected animals useless.
- The planned objective of indirect prophylaxis after the enforcement of compulsory vaccination did not take place. Indeed, the percentage of vaccinated animals remained nearly constant from 1983 to 1988 (mean# 51.8%) and well below the assumed total population coverage. An increase in this value was recorded in 1990 when, because of the EC Directive, a decrease was to be expected.

Moreover, the mean number of animals vaccinated in the period 1984 - 1988 was lower than the national mean value in most of the southern regions (Figure 6), where a quarter of Italian sheep and goats live and where the incidence rates of human brucellosis were highest (Figure 22).

Despite of these shortcomings, the incidence rate of human brucellosis from 1982 to 1988 decreased from 5.1 to 2.03 cases/100 000 (Figure 21).

Considering low public investment for prophylactic activities, and taking the human brucellosis incidence rate as an indicator of brucellosis prevalence in sheep and goats, it can be stated that the prophylactic campaign had some efficacy, although there are considerable local differences. The existence of risk areas where the incidence of human brucellosis is higher than the national average (3.34 cases/100 000 in 1983 - 1989) indicates hyperendemic levels of infection in the reservoir population (Figure 22). In these very areas the investment/head for brucellosis of sheep and goats has been lowest (Figure 23). There are also some areas where human brucellosis incidence is very low.

For the purpose of brucellosis, Italy may be subdivided in four geographical areas: north, centre, south (including Sicily) and Sardinia. In these areas, epidemiology and diffusion pattern of brucellosis in human and animal population differ considerably.

Evaluation of the efficacy of prophylactic campaigns within these four geographical areas should take into account regional differences in terms of general socio-economic factors, veterinary services organization, skill of farmers, and the role of sheep and goats in the local economy.

In Table 1, some factors relating to differences among geographical areas are reported:

- a) brucellosis incidence rate in humans as an indicator of the infection level of flocks;
- b) Gross domestic product/inhabitant as an indicator of local socio-economic welfare;



*Table 1. Comparison among some indicators of epidemiological importance in relation to ovi-caprine brucellosis prophylaxis.*

Region	G.D.P./ inhabitant (2) (3) (7)	mean flock size (4) (8)	sheep and goat density (5) (8)	prophyl. expenditure /head (5) (8)	human bruc. prevalence /100.000 In. (6) (7)	% of the national cattle popul. (9)
North	13531.75	17.11	3.99	1633.56	1.56	69.5
Centre	10894.00	71.33	28.98	257.57	2.87	10.3
South (1)	7435.71	27.66	36.29	157.42	7.26	16.8
Sardinia	8090.00	126.59	127.96	58.23	0.91	3.3
Italy	10598.50	42.96	29.35	226.42	3.34	100.0

Notes:

(1) Including Sicily

(2) \*1000 Lit.

Period considered:

(3) Gross domestic product (G.D.P.) market prices - year 1984

(4) Year 1984

(5) Year 1988

(6) Mean values within 1983 - 1989

Sources of information:

(7) ISTAT 1989 (Central Institute of Statistics)

(8) Ministry of Health

(9) ISTAT 1988 (Central Institute of Statistics)

- c) flock size as an indicator of shepherding skill;
- d) animal population density as an indicator of the importance of sheep and goats in the regional economy;
- e) per capita investment as an indicator of the amount of veterinary services activity in relation to brucellosis prophylaxis;
- f) the percentage of cattle in relation to the national cattle population as an indicator of resources given to veterinary services in the region (Local veterinary services are mainly funded according to the cattle equivalent).

Apart from Sardinia, it can be seen (Table 1) that, where sheep and goat population density is high, investment for brucellosis prophylaxis, socio-economic welfare and resources for veterinary services are low and human brucellosis incidence is high.

In northern regions, where the incidence of brucellosis in humans is 1.6 cases/100 000, the socio-economic welfare is the highest. In these regions breeding of sheep and goats has a quite low importance and is controlled by well-organized local animal health services. Despite of the lesser importance of sheep and goats compared with cattle and pigs, in these regions the per capita investment for brucellosis prophylaxis is about 7 times higher than the national average.

Finally, control is easier than in central and southern regions, in fact the number of animals and flocks are lower and migratory or transhumant grazing is not practised.

Moreover, relationships between veterinary services and sheep owners is rather difficult. This due to the fact that the majority of sheep owners have rather poor levels of expertise

and, consequently a low interest in the health status of their animals (especially disease not openly disabling animals such as brucellosis). On the other hand, when sheep owners themselves are "shepherds" they frequently have an historical tradition of individualism and distrust in public institutions that make enforcement of veterinary regulations a difficult task.

In central-southern regions (including Sicily) medium and large sized flocks are extensively reared, and transhumant and wandering grazing are practised. This makes controls more difficult from both the operational and organization points of view: supervision of moving flocks is difficult owing to their continuous displacement and problems arising from territorial jurisdiction. Other factors are, however, relevant, as shown by the difference in incidence rates in the Centre and in the South. The incidence in central regions is closer to that of the North than to Southern Italy. In the Centre the mean flock size is quite high, demanding a greater skill by shepherds. Public expenditure for prophylactic activities is higher than that in the South and these facts may explain the lower incidence of brucellosis.

The situation in Sardinia is completely different situation from that in other regions: it has the highest population density and flock size, a G.D.P./inhabitant lower than northern regions and slightly higher than southern regions, the lowest investment/head. Despite this and the absence of any serological examination of flocks for brucellosis, its incidence in humans is the lowest in Italy (0.91 cases/100 000). This favourable situation may be explained by the adoption of a strict vaccination policy in the absence of any serological evidence of the extent of infection. In fact, serological control of such a large population of sheep and goats as the Sardinian one would require an effort too costly in relation to available resources. Moreover, the Sardinian economy is highly dependent upon sheep farming: shepherds have reached very high levels of skill and are very concerned about the welfare of their animals, which are one of the main economic resources of the Island. The mean flock size in Sardinia is 127 and the low level of brucellosis observed in humans (0.91/100 000 inhabitants) confirms the assumption that flock size is a good indicator of the expertise of shepherds which, in turn, favours the success of prophylaxis. The contrary happens in southern Italy where incidence of the disease in humans (7.26 cases/100 000) is highest and the flock size (27 heads/flock) is the lowest in the nation, with the exception of the North.

## Conclusion

Until 1991, the control of ovine and caprine brucellosis in Italy, was aimed at limiting damage caused by disease, rather than systematically reducing its incidence as a step towards eradication.

The haphazard testing and slaughter of infected animals, together with insufficient overall financial investment, caught the regions with a largest population of sheep and goats unprepared to face the EC Decision, particularly in relation to the strictness of both serology and operative standards required by the latter.

The minimum positive serological titre, according to the EC Decision, is based upon sensitivity and specificity levels (animals with titres of 20 international complement fixing units or above are considered to be infected) which are definitely inadequate populations massively vaccinated with Rev.1.

Under experimental and field conditions a consistent percentage of uninfected animals vaccinated at different ages with Rev. 1 developed antibody titres exceeding the limit defined by the EC Decision 18, and the antibody may persist for 30 months after vaccination. (Caporale V. *et al.* in press).

The results observed in animals experimentally vaccinated are shown in Table 2.

The EC Decision can be considered adequate for testing unvaccinated populations, but is definitely unacceptable for populations massively vaccinated up to 7 months of age, as is the case with the Italian ovine population.

In Italy, with the exception of the Bolzano province which is the only officially disease-free one, the Decision would lead, on average, to the slaughter of over 7% of sheep and goats that, although uninfected, would show antibody titres over 20 CF IU due to vaccination (Table 3).

*Table 2. Percentage of vaccinated animals serologically positive at different time after vaccination.*

Vaccination age	Time from vaccination					
	13 Months		25 Months		37 Months	
	RBPT	CFT	RBPT	CFT	RBPT	CFT
3-4 Months	57.0% (1)	5.0% (1) (2)	--	--	--	--
5½ Months	44.2%	23.3% (3)	14.3%	7.1% (4)	16.8% (5)	5.6% (4)

**Legenda**

(1) Sampling at 10 months

(2) Titre between 20 and 35 CF IU

(3) Of which: 14% with a titre between 20 and 40 CF IU; 2.3% with a titre between 40 and 80 CF IU; 7% with a titre over 80 CF IU

(4) Titre between 40 and 80 CF IU

(5) Increase of positivity due to the loss of some negative animals

*Table 3. False positive results to be expected in serological testing of sheep and goats in Italy according to EC standard (data in thousands).*

Total population	Restocking rate	Time after vaccination								
		12 Months			25 Months			37 Months		
		Total no.	Positive RBPT	Positive CFT	Total no.	Positive RBPT	Positive CFT	Total no.	Positive RBPT	Positive CFT
8174 (1)	20%	1635	723	381	1635	234	117	1635	234	92

Total RBPT positive: 1190 thousand (14.56% of the population)

Total CFT positive: 588 thousand (7.2% of the population)

(1) Source: Ministry of Health 1988

The impact of unnecessary slaughter would be very harmful, leading sheep owners from central and southern regions (Sicily included) to reject the plan; the same applies in Sardinia where presence of ovine-caprine brucellosis is at present very low indeed. Without owners' cooperation the efficacy of any action would be annulled.

Furthermore assuming that the distribution of serological positive results due to vaccination in the sheep and goat population is random and considering that: 1) the Italian mean flock size is 59; 2) one needs to CF test all animals present in the flocks where 5% of animals are RBPT positive; 3) the percentage of vaccinated animals is 51.8%; 71.5% of the total controllable population is expected to be CF tested. This involves an expenditure of 4370 million lire for serological tests only; that is double the total 1988 expenditure.

The latter has been confirmed by field testing in two regions (Abruzzo and Molise) with a mean of 34 animals/flock. So far 59.44% of the population tested belongs to flocks with a RBPT positivity of 5% or above.

## Perspectives

The success of ovine-caprine brucellosis eradication in Italy will depend upon:

- 1) Ability to adopt uniform efforts aimed at improving prophylactic standards throughout the country. To this end it seems necessary:
  - to balance the available financial resources among different geographical zones;
  - to design the eradication plan according to the different territorial conditions;
- 2) the responsible participation and cooperation of all categories concerned both at central and local levels.
- 3) Ability of the veterinary services to explain the usefulness of the actions connected with the plan. A significant effort aimed to train and inform veterinarians and sheep owners in order to make them understand that the strategy of the European Market, based upon the defence of production quality, is mandatory. Without quality there will be neither market warranty nor hopes of any income. Quality is a nonsense if breeding hygiene and health standards are inadequate.
- 4) Determination to exclude vaccination as soon as trace-back and slaughter of infected animals begins. Although vaccination is essential in the disease control stage, and represents an indispensable preliminary phase in eradication, it becomes inconsistent with eradication strategy when test and slaughter begin, and therefore has to be discontinued.

## References

1. Farina R., Bellani L. (1974): Diagnostic, controle et éradication de la brucellose des petits ruminants en Italie. Bull. Off. int. Epiz., 82: 41-44.
2. Caporale V.P., Battelli G., Ghilardi G., Biancardi V. (1980): Evaluation of the cost and benefit of the control campaigns against bovine tuberculosis, brucellosis, foot and mouth and swine fever in Italy. Bull. Off. int. Epiz., 92: 291-304.
3. Ghilardi G., Caporale V.P., Battelli G., Cavrini C. (1981): Updating of the economic evaluation of the control campaigns against bovine tuberculosis, brucellosis, foot-and-mouth disease and swine fever in Italy. Bull. Off. int. Epiz., 93 (5-6): 1015-1021.
4. Caporale V., Nannini D., Petracca G., Paganico G. (1985): Epidemiology and control of *Brucella melitensis* in Italy. In "*Brucella melitensis*" edited by M. Verger and M. Plommet. Martinus Nijhoff. Series: Current Topics in Veterinary Medicine and Animal

- Science. EEC Seminar, Bruxelles 14-16 Novembre 1984: pp. 51-83.
5. Farina R., Andreani E., Gargani G., Cerri D., Ramasco M. (in press): Epidemiologie de la Brucellose humaine et animale en Italie.

## **Lutte contre la brucellose animale à *B. melitensis*: Résultats acquis et attendus**

*D. Yantzis*

*Institut Vétérinaire des Maladies Infectieuses et Parasitaires  
66, rue du 26 Octobre  
546 27 Thessalonique - Grèce*

Dès 1977, un programme systématique d'éradication accélérée de la brucellose chez les bovins est appliqué, sur base du décret 332/77 et conformément à la directive 77/391 de la C.E.(4).

Les mesures mises en oeuvre dans le cadre de l'application du programme de lutte contre la brucellose des bovins, sont essentiellement les suivantes :

1. Recensement et marquage, par tatouage, à l'oreille gauche de tous les bovins élevés dans le pays, âgés de 6 semaines et plus.
2. Prélèvement de sang, sur tous les bovins âgés de 12 mois et plus. Ces prélèvements sont expédiés aux laboratoires officiels régionaux pour examen sérologique.
3. Les bovins révélés positifs par les tests sérologiques, sont isolés jusqu'à l'abattage, qui doit avoir lieu dans un délai de 30 jours maximum. Les propriétaires sont indemnisés de la valeur marchande des animaux abattus. Les exploitations infectées sont mises sous contrôle officiel, par l'Autorité Vétérinaire locale.

Les exploitations d'élevage bovin sont classées, selon leur situation sanitaire vis à vis de la brucellose, parmi l'une des catégories suivantes : Catégories B1 (positive), B2 (négative), B3 (indemne) et B4 (officiellement indemne). (Figure 1) (4).

En ce qui concerne la brucellose des ovins et des caprins, un programme de vaccination obligatoire des agneaux et des chevreaux, âgés de 3 à 6 mois, par le vaccin Rev.1, a été lancé en 1975 (2).

Aujourd'hui, un pourcentage de 80 à 90 % des animaux sont vaccinés.

En dehors de la vaccination, des mesures sanitaires sont prises pour empêcher l'extension de la maladie (contrôle des importations d'animaux au sein d'un troupeau; contrôle des paturages; réglementation des transhumances; déclaration obligatoire des avortements auprès des Services Vétérinaires; déclaration obligatoire des cas de contamination humaine aux Services de santé en enquêtes épizootiologiques).

Après quinze années de vaccination systématique, une diminution significative du nombre d'avortements chez les animaux adultes a été observée.

La vaccination à l'aide du Rev.1, constitue une méthode efficace pour le progrès de la lutte contre la brucellose.

Nous avons en effet enregistré une régression de l'infection chez les petits ruminants. Parallèlement, le taux de morbidité humaine, liée aux brucelloses caprine et ovine, a considérablement baissé.

Les résultats obtenus depuis le début de la campagne de vaccination sont donc très encourageants. En effet :

1. Recensement et marquage de tous les bovins (six semaines et plus)
2. Prélèvements de sang sur tous les bovins, âgés de 12 mois et plus. Epreuves sérologique.
3. Les exploitations sont classées selon leur situation sanitaire vis à vis de Brucellose, parmi l'une de categories suivantes:

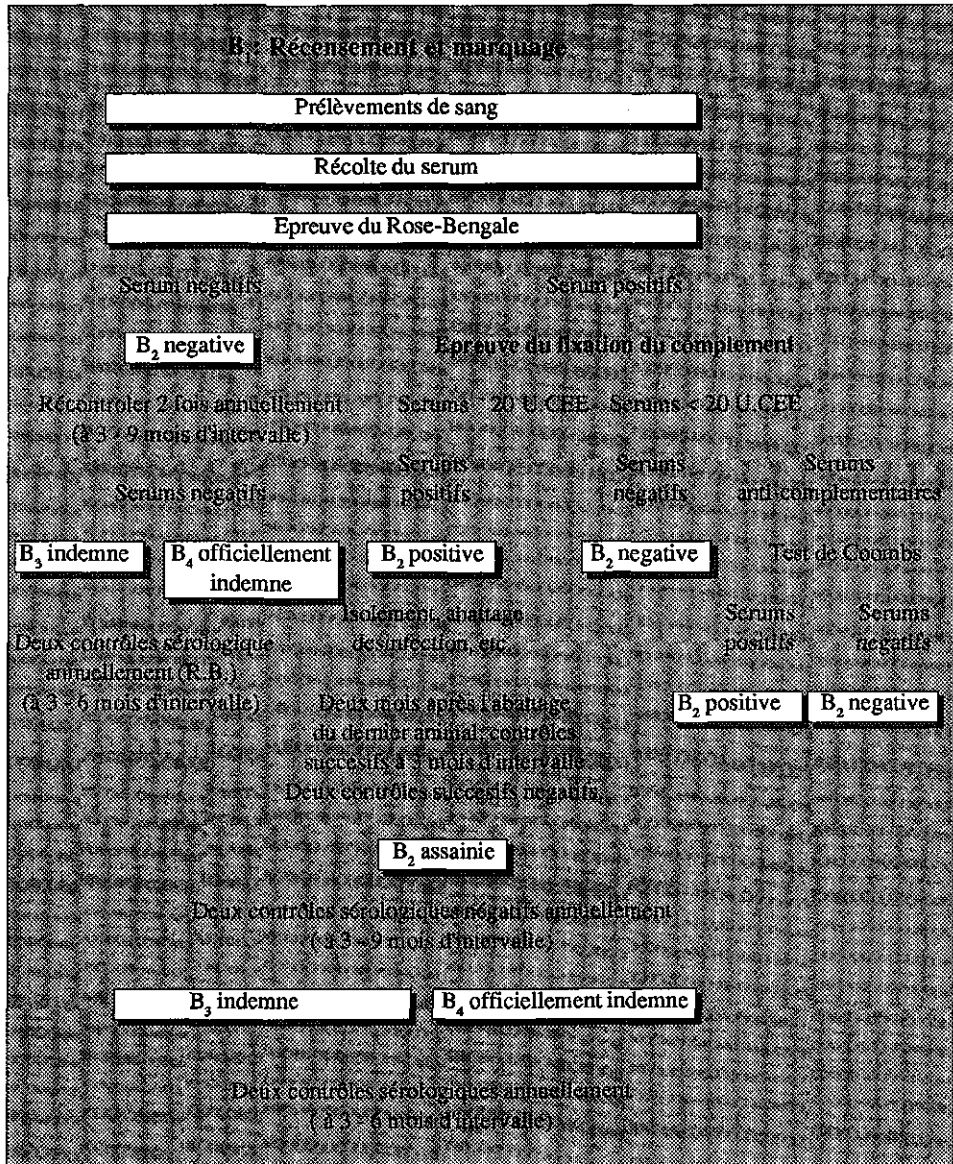


Figure 1. Programme de lutte contre la Brucellose de bovins. Qualification des cheptels.

*Tableau 1. Taux des avortements brucelliques chez les ovins et caprins.*

Années	Nbre de troupeaux examinés	Nbre de troupeaux positifs	% de positivité
1976	89	44	49
1977	110	33	30
1978	110	33	30
1979	157	34	21
1980	151	23	15
1981	98	8	8
1982	160	20	12,5
1983	166	5	3
1984	213	6	2,8
1985	132	3	2,2
1986	188	8	4,2
1987	195	9	4,6
1988	232	6	2,5
1989	158	10	6,3
1990	122	6	4,9

*Tableau 2. Nombre des cas de brucellose humaine déclaré au cours des années 1980 à 1990 et indice de morbidité.*

Année	Nbre de cas de brucellose	Indice de morbidité
1980	1081	12,0
1981	948	9,8
1982	674	6,9
1983	558	5,6
1984	514	5,1
1985	485	4,8
1986	444	4,4
1987	345	3,4
1988	269	2,6
1989	230	2,3
1990	187	1,8

1. Le pourcentage d'avortements chez les petits ruminants, dûs à *Brucella*, est passé de 49 % en 1976, à 15 % en 1980 et à 4,9 % en 1990 (Tableau 1 et figure 2) et le pourcentage d'infection est tombé à 3,4 % chez les ovins et 2,7 % chez les caprins (3).
2. Le nombre de cas de Brucellose humaine, est passé de 1081 en 1980 à 187 en 1990, et l'indice de morbidité, de 12/100 000 en 1980, à 1,8/100 000 en 1990 (Tableau 2 et Figure 3) (1).
3. Enfin dans le cas des bovins, le pourcentage de positivité est passé de 1,22 % en 1980 à 0,70 % en 1990 pour les animaux, et de 2,35 % en 1980 à 0,70 % en 1990 pour les exploitations (Tableau 3) (4).



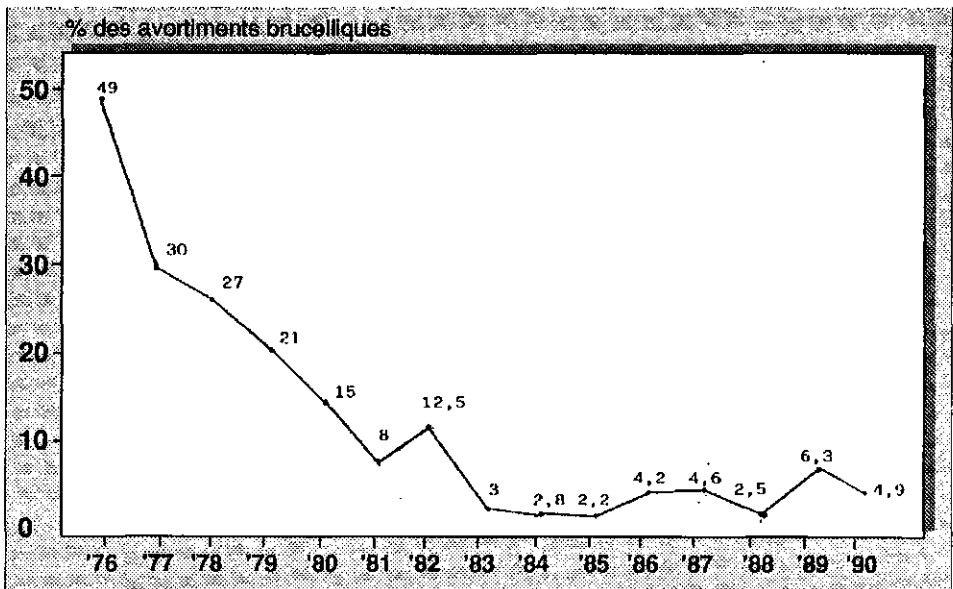


Figure 2. Evolution par % du taux des avortements Brucelliques au cours des années 1976 à 1990

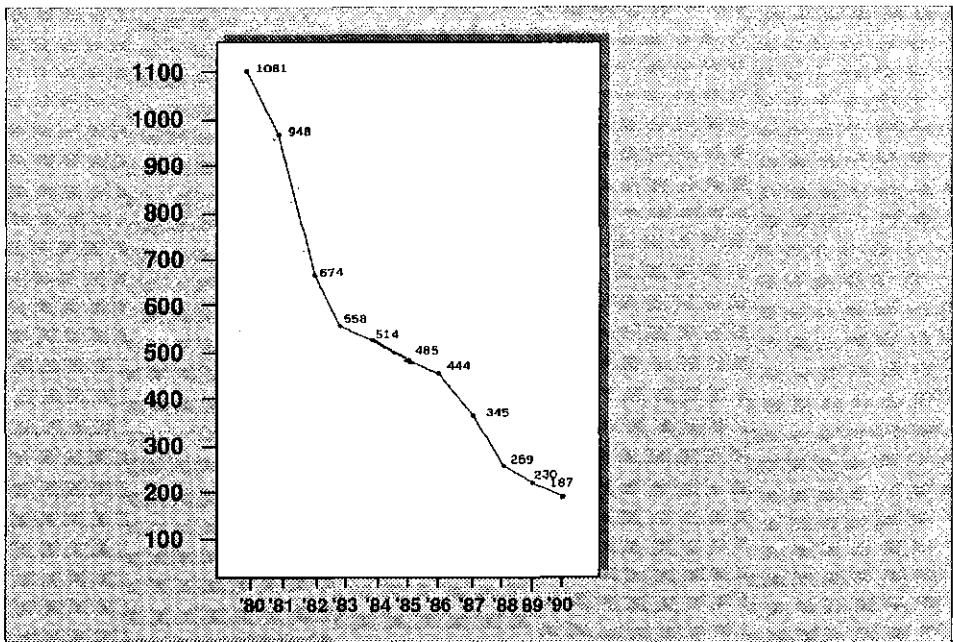


Figure 3. Evolution de cas de Brucellose humaine déclarés au cours des années 1980 à 1990.

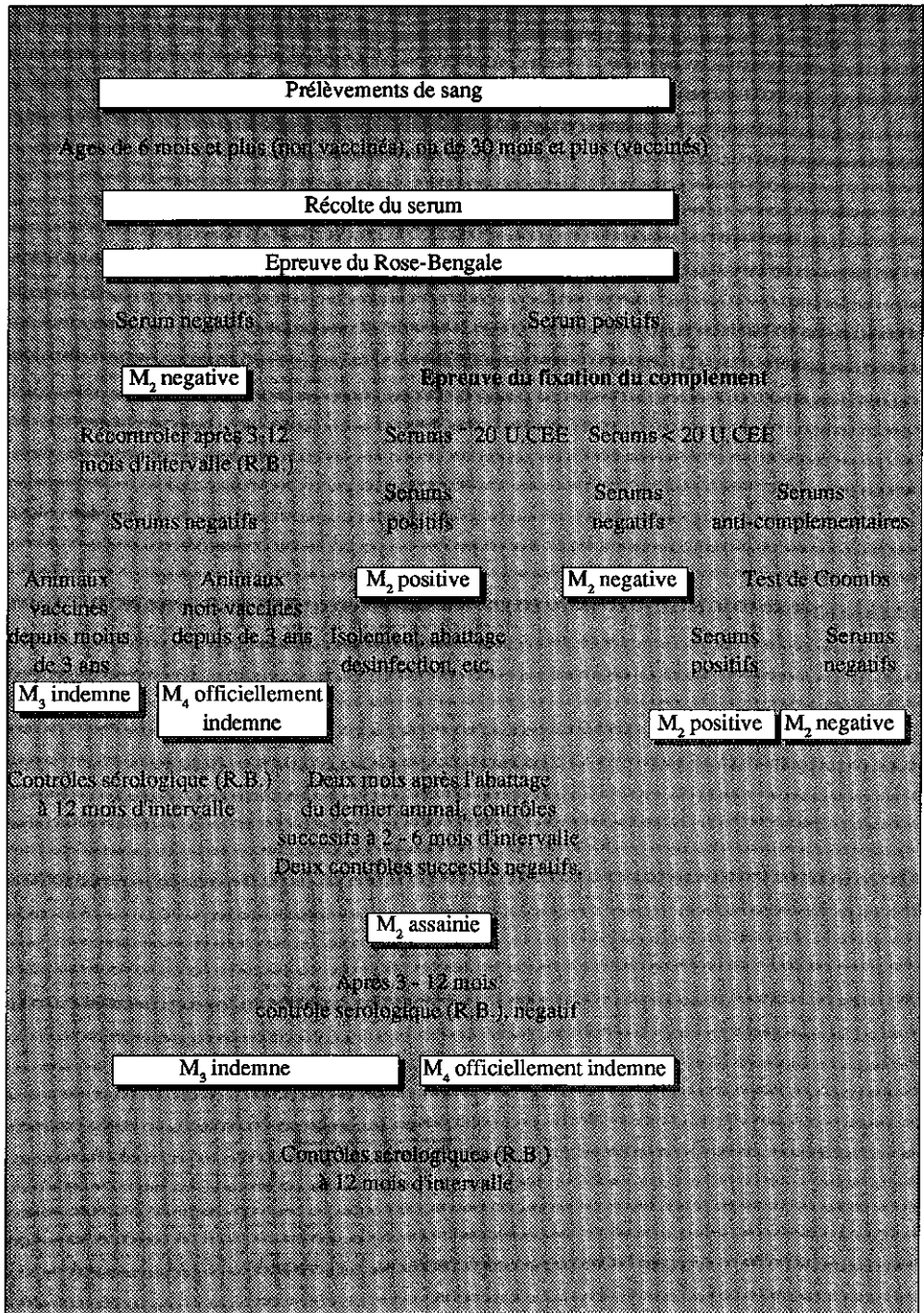


Figure 4. Programme de lutte contre la Brucellose de petits ruminants. Qualification des cheptels (30/7/1991).

Tableau 3. Pourcentage de positivité chez les bovins.

Années	% de positivité / animaux	% de positivité / exploitations
1980	1,22	2,35
1981	1,19	1,80
1982	0,82	1,36
1983	0,61	1,03
1984	0,51	0,77
1985	0,55	0,89
1986	0,46	0,74
1987	0,55	0,67
1988	0,75	0,76
1989	0,89	0,74
1990	0,70	0,70

On peut considérer qu'aujourd'hui, les brucelloses sont bien contrôlées en Grèce, mais la brucellose chez les petits ruminants, continue de poser des problèmes.

La question est difficile à résoudre. L'éradication de la maladie nécessite du temps, de l'argent et l'application d'un programme spécifique.

Le conseil des Communautés Européennes, a arrêté la décision, que, la France, la Grèce, l'Italie, l'Espagne et le Portugal, doivent présenter un plan d'éradication de la brucellose chez les ovins et caprins.

Suite à cette décision, le Ministère de l'Agriculture en Grèce, a élaboré un programme d'éradication de la brucellose chez les petits ruminants (Fig.4).

Cette lutte se fonde sur:

- a. le contrôle sérologique de tous les animaux, agés de plus de six mois (non vaccinés) ou 30 mois (vaccinés),
- b. l'élimination de ceux qui sont infectés,
- c. la répétition périodique des tests sérologiques, le programme devant se poursuivre jusqu'à la constitution de troupeaux "indemnes" ou "officiellement indemnes" de brucellose.

## Références

1. Stefanou, Th., Violaki-Paraskeya, M., (1987): Epidemiological observations on brucellosis in Greece. *Acta Microbiologica Hellenica*, 32, 300-324.
2. Yantzi, D., (1985) : *Brucella Melitensis* in Greece : Current situation report. *Brucella Melitensis*; Verger, J.M., Plommet, M., editors, 43-46.
3. Yantzi, D., (1986) : La lutte contre la brucellose des bovins, ovins et caprins en Grèce. La rage et la brucellose, dans le bassin méditerranéen et la Péninsule Arabe. Montpellier-France, 329-334.
4. Yantzi, D., (1987) : Application des programmes d'assainissement des maladies infectieuses bovines en Grèce. *Revue de Zootechnie*, n° 3, 146-166.

# Planning and management of brucellosis control programmes

*G. Papadopoulos*

*Mediterranean Zoonoses Control Centre, Athens, Greece*

## Introduction

It is globally true that zoonoses are increasingly becoming recognized as having much impact on human and animal health, economic development, agriculture, trade and tourism.

The significance and importance of zoonoses, including foodborne diseases of animal origin, is growing and their health and socio-economic impacts are being increasingly felt by many countries. For many years, and in many countries, zoonoses and foodborne diseases, with their reservoir in domestic and wild animals, have imposed and are still imposing a very heavy burden, especially among the vast number of people living and working in rural areas. However, the great changes of the past decades, especially the increasing urbanization (not always well planned or having taken into account the balance of ecological situations), large movements of populations, the accelerated trade of meat, milk and other animal products, the vastly increasing number and speed of means of transport and even tourism, have all contributed to make the problem of zoonoses not only rural and characteristic of well defined areas, but really world-wide. There is no doubt that today zoonoses are a growing threat to human health.

Zoonotic infections cause various kinds of losses to mankind. One of the most important outcomes is deterioration of human health, thus shortening the life span and the capacity for work of affected persons. Another important consequence is the loss associated with animal diseases, especially in agricultural animals, which adversely affect their useful work and productivity, and their important contribution to the world's scarce food supply. Zoonoses also cause heavy losses of high-quality protein food (meat, fish, eggs) which seems to be increasingly scarce among the population groups which mostly need them, particularly children. Major zoonoses such as brucellosis, hydatidosis, rabies and salmonellosis, common to so many developing countries, have not yet been successfully controlled by national programmes. This is due to the lack of adequate expertise and specialized services within each individual country, although throughout the world there are a number of excellent facilities, research centres and expert teams. If brought together, these could form the basis for comprehensive projects of zoonoses control.

Socio-economic losses from zoonoses, though significant, are difficult to quantify completely because, as with other human diseases, the costs in terms of lives and suffering cannot be measured. Losses from specific zoonoses are easier to quantify in animals than in man, although reliable statistics are not available from many countries. Annual losses have been estimated at the equivalent of US\$ 25 million from brucellosis in the USA, US\$ 100 million from bovine tuberculosis and US\$ 600 million from brucellosis in Latin America and the Caribbean.

The economic benefits of zoonoses control have been proved. Certain zoonoses control

programmes have shown favourable cost/benefit ratios; for instance, in the USA the bovine brucellosis control/eradication programme showed a cost/benefit ratio of 1:5 to 1:8, while in Latin America, similar programmes showed cost/benefit ratios ranging from 1:6 to 1:140. In Paraguay it was found that brucellosis, tuberculosis, and bovine rabies control programmes showed an "internal rate of return" (or a rate of return on investment) of 71%, 52% and 84% respectively, the rate for the overall zoonoses control programme being 70%. Meaningful data of this kind are needed for local use in all countries, but are all too rare.

Zoonoses stunt the economic growth of the countries where they are endemic and inhibit the generation of the capital needed for investment.

Factors affecting the spread of zoonoses:

- 1) Changes in the size and density of human and animal population.
- 2) Increasing movements of human and animal population.
- 3) Increased trade in animal products.
- 4) Environmental changes created by human activities.
- 5) Handling animal by-products and wastes.
- 6) Cultural-anthropological patterns, habit and custom's changes.

Several major zoonoses have been successfully brought under control in countries at different levels of socio-economic development. Among the numerous examples are the control of brucellosis in Mongolia, of Japanese encephalitis in Japan, rabies in Malaysia and Taiwan, etc.

### **Planning and management of zoonoses control programmes**

Planning and management of zoonoses control programmes including brucellosis is the most laborious and complex task of preventive medicine. It is often a very theoretical or even abstract exercise, which as a rule requires the collaboration of physicians, veterinarians, ecologists, sanitary engineers, etc. This collaboration in modern systems of administration can be ensured only through a very clear scheme of responsibilities, decision-making processes, programme implementation and supervision. The tactics of zoonoses control must be adapted to the specific natural and socio-economic conditions of the country.

#### **The managerial tools for planning a brucellosis control programme**

##### *Determination of factors influencing the occurrence and spread of brucellosis*

Some of these factors are:

- a) The accelerating trend towards larger and more compact operations which increases animal population densities and animal stress;
- b) herd management and breeding practices;
- c) local food habits, methods of processing milk and its products, processing raw materials of animal origin, social customs, standards of personal, environmental hygiene, etc.

##### *Determination of the objectives of a national brucellosis control programme.*

Reference was made in the preceding paragraph to the importance of determining factors influencing the occurrence and spread of brucellosis. It is the task of the planner to analyse each factor from the aspect of its vulnerability to possible interventions. This makes it possible to determine the objectives and approaches of a control programme.

The optimum objectives are ramified, but they broadly consist of:

- a) coordination of existing control activities in order to upgrade their functions and achievements,
- b) establishment of surveillance programmes,
- c) control of spread by animals,
- d) control of spread by vehicles,
- e) detection, prevention and treatment of disease in man.

Of course, different countries and ecologically distinct areas within countries require different strategies for the prevention and control of brucellosis in the populations of various animal species, depending on the prevailing epidemiological and socio-economic conditions.

### ***Programme description***

The description of a comprehensive national programme for the control and elimination of brucellosis includes the following sections:

#### ***Preamble***

This may summarize on one page the main elements of the programme for the benefit of executing agencies, the phases for its implementation, the budgetary consequences, the expected effect, the advisability of supplementary projects and the persons who contributed to the preparation of the plan.

#### ***Objectives of the project***

These may be subdivided into long-term, medium-term and immediate objectives. In projects extending over a period of years with well-defined phases of project development, the objectives of each phase should be clearly defined.

#### ***Special considerations***

The government resolutions that led to the programme and relevant initiatives at subgovernmental and at international levels can be referred to the Thirty-First World Health Assembly on "Prevention and control of zoonoses and foodborne diseases due to animal products".

#### ***Background and justification***

- Geographical and basic data on populations (of man and animals) and national services (e.g., institutions, manpower, surveillance and production capacities);
- epidemiological observations;
- socio-economic consequences;
- current status of disease control;
- other essential information (e.g., conditions in neighbouring countries, and/or services of existing programmes of international technical cooperation).

#### ***Institutional framework***

All contributing components in the national structure must be clearly identified.

Comprehensive plans generally include, at governmental level, two components:

- one interministerial organ responsible for the overall programme (programme, budget, personnel, equipment);
- a national executing organ with its director or directorate for programme execution.

The institutional framework also includes central and peripheral laboratory services (e.g. for vaccine and reagent production or diagnosis), national institutions of education, training, research, field investigation, etc. In addition, international and national institutions outside the country may become an integral part of a comprehensive programme for zoonoses control.

#### *Activities*

The description of the activities offers the possibility of assigning, without ambiguity, responsibilities to each of the components of the institutional framework. This section is therefore of the utmost importance and can help avoid otherwise often serious problems of competence and responsibility. It is essential to study every condition most carefully at all levels and obtain suggestions from the people and their political representatives, and from administrative authorities and technical services.

#### *Work plan*

The work plan describes the major activities in the sequence of expected events chronologically and contains all the elements needed to define major targets.

#### *Project organization and management*

Lines of communication, supervision, and reporting, as well as general coordination within the overall programme, should be considered. The components of the institutional framework (administrative and scientific bodies, and individual offices and officers) and their interrelationship, should also be considered. A simple chart showing the institutional framework with its essential lines of programme execution is most useful to detect and deal with gaps, overlapping, ambiguities, hierarchical tangles, and other discrepancies in the overall programme.

#### *Project and funding*

This section, with its usual tables showing

- (a) project budget covering government contributions in cash,
- (b) project budget covering government counterpart contributions in kind, and
- (c) project budget covering cosponsors' contributions, requires special detailed estimates of the numerous activities involved.

The preparation of this section is often particularly difficult. Budgetary provisions should, however, be calculated with the utmost accuracy, since the total will be the basis of a cost-effectiveness analysis for the whole project and thus crucial for the government's decision on its implementation.

Besides the layout of the project document as described above, different planning tools can be used in order to ensure that the programme will be comprehensive and effective. The identification of factors influencing the occurrence and spread of individual zoonoses may be very useful in order to determine which of these factors may, in terms of inputs or time required, be changed easily, or with great difficulty, or not at all, by countermeasures.

In zoonoses control, numerous indicators can be used for project planning, execution, and evaluation. There are first the usual health indicators (e.g. incidence, prevalence, rates per capita, case frequency per km<sup>2</sup>). Secondly, there are service indicators such as number of animals examined or treated or destroyed, number of persons trained, amount of information material distributed, number of villages visited, number of vaccine doses produced, and percentage of animals slaughtered with proper meat inspection.

### ***Execution of programmes***

The initiation of a national control programme can seldom be carried through effectively without a committed and enthusiastic leader. Usually this person has had the status of Chief Veterinary Officer.

The execution of a control programme requires multidisciplinary cooperation. By its very nature, brucellosis involves the medical and veterinary professions.

### ***Evaluation during and on completion of programmes***

Evaluation is vital to maintain impetus and progress. It should be linked to cost/benefit assessment in order to ensure continuation of funding. Projections must be made of the likely costs and benefits for the programme according to whether it proceeds at a fast or at a slow speed. Preferably, an epidemiological unit should be used to monitor disease incidence and to provide information on progress.

Evaluation on completion of the programme is especially important. First, there is a need to verify that the objectives have been completely attained. Secondly, evaluation provides an important basis for decision on future control programmes.

If the original venture is successful and clearly beneficial in relation to cost, then the experience gained may be applied elsewhere. Even costly failures can provide valuable lessons for the future.

### ***Basis rules of programme planning***

As mentioned in the introduction, the failure and success of national control programmes teach us some basic rules which should be kept in mind when decisions are taken on planning and implementation of zoonoses control programmes. The rules which can be applied for brucellosis control are:

- 1) Establish an intersectoral group of coordinators: a Zoonoses Committee in which the different services of different sectors directly involved in brucellosis control should participate.
- 2) Motivate the above committee through socio-economic analyses.
- 3) Obtain agreement for a simple and effective structure ensuring the strict implementation of brucellosis programme from the government.
- 4) Obtain and ensure the consensus of the special groups involved.
- 5) Ensure community participation.
- 6) Make sure that relevant regulations are accepted by the people and observed at all implementation levels.

### ***Planning aids and implementation schemes at different levels***

As a first step in planning we should consider whether and how we can combine the complexity of the programme with the simplicity of a plan.

Brucellosis is one of the zoonotic diseases that can be prevented and brought under control with the active participation of the community.

The communities should identify all available resources at different organizational and administrative levels for the prevention of brucellosis and for the protection of high-risk groups.



### ***Schemes initiated and sustained by the community***

- a. Designation of a responsible person for hygiene of animals and animal products.
- b. The responsible person should locate the resources at community level and proceed according to a simple plan.
- c. The community council should examine annually whether the planned activities have been implemented and how the measures can be improved and expanded.
- d. When the basis of general measures has been achieved the community may ask the next higher administrative service (district or province) to help with more specific measures.

### ***Government-assisted community-initiated schemes***

- a. The government elaborates guidelines in the form of a simple decision-making process that should be followed by the animal and human health specialist at an appropriate administrative level (e.g. the district veterinary or livestock development officer).
- b. Responsible officers at the appropriate levels (e.g. district) should organize a zoonoses control committee that can help communities, on request, to formulate local action plans. These may include (1) a simple epidemiological survey; (2) education and information tools and procedures for personal hygiene; (3) immunization programmes, and/or (4) animal replacement schemes.

Suggestions for cooperative projects among farmers concerning farm management, husbandry, milk and meat hygiene, and marketing, require the expertise of different disciplines and different administrative levels.

- c. Peripheral governmental services should be prepared to assist the communities or local cooperative projects in respect of (1) diagnostic services; (2) vaccine provision; (3) use of a cold chain; (4) improvement of technologies in milk and meat hygiene and animal waste disposal or rendering, as well as in education and in adequate treatment of human patients.

Peripheral governmental services should report regularly to the central government about the progress of community initiatives. Moreover, these government services may elaborate suggestions for a country-wide programme of brucellosis control, including procedures for the control of the movement of animals and the provision of brucellosis-free animals for replacement of positive animals.

### ***Comprehensive national programmes***

The gradual development of comprehensive national programmes for brucellosis control is recommended. This should include:

- Establishment of an interministerial committee.
- Designation of a national programme directory.
- Preparation of guidelines for (a) community activities; (b) supporting services, and (c) a comprehensive national plan.
- Review and, if necessary, improve legal provisions.
- Formulation of the country-wide programme of brucellosis control, and endorsement (at cabinet level).

Establishment of the institutional framework, if not already existing, including components of community-based activities.

- Resources mobilization.
- Programme implementation, harmonizing phases of development in respect of (a) geographical coverage; (b) technologies; and (c) manpower.
- Programme monitoring, periodic evaluation, and review.

An important task of a national programme director should be the elaboration of guidelines for community initiatives and for planning and management assistance by the technical services. Other activities concern the availability of diagnostic services, technological support, provision of vaccines, and educational schemes for those communities that are prepared and wish to take more specific measures of brucellosis assessment and control. If the national programme is to be effective it is essential that every group concerned with brucellosis control, from the ministerial level to that of the local farmer and his family, should understand and actively support the campaign.

### Conclusions and recommendations

- 1) FAO and WHO, together with the other international agencies concerned and with Member States, should participate in developing a programme for the prevention and control of brucellosis in man and animals; the success of such a programme would depend, to a large extent, on the energetic application of primary health care practices. Activities at all levels should be organized systematically and made as effective as possible at the lowest cost feasible. Activities at the higher organizational levels should provide support to those at the primary health care level, and should be directed towards accelerating programme development, promoting the health status and productivity of people, and reducing morbidity and mortality.
- 2) Biosafety programmes with regard to brucellosis still need to be improved upon, although great progress has been made in this area.
- 3) Global surveillance should be strengthened for both human and animal brucellosis, with a view to providing valuable indicators that could assist the global and national programme.
- 4) Prevention and control programmes should be strengthened in many countries, in particular in those where the incidence of brucellosis is quite high, or where its existence is persistent.
- 5) Standardization and control of diagnostic reagents, antigens, and vaccines are required for the establishment of international standards. Biologicals for use in brucellosis control, produced by different manufacturers for export, should be tested according to the above standards by an independent testing laboratory, possibly supervised by the state or by an international agency (e.g., FAO or WHO).
- 6) WHO should consider issuing a statement that emphasizes the need for heat treatment of dairy products, especially milk.
- 7) International cooperation, technology transfer, training and exchange of personnel should be continued and encouraged by all the international organizations concerned (e.g., FAO, OIE and WHO) and by Member States.
- 8) International agencies within the United Nations system, such as FAO and WHO, as well as other international organizations, such as OIE, should take a more active part in disseminating information on brucellosis control as part of WHO's efforts to achieve health for all by the year 2000. Such information should be understandable by laymen so as to be suitable for distribution at regional and community level. There are two zoonoses centres, one in Argentina and one in Athens which can provide excellent

scientific assistance and several Collaborating Centres within the United Nations system. The work of at least some of these institutions could be directed towards providing more information and advice on control methods appropriate to the type of brucellosis and husbandry practices in their regions.

## References

- USSR/UNEP Project "UNEP publications and information support programme in the USSR-Zoonoses Control-Collection of Teaching Aids for International Training Course". Vol. 182, 1982.
- WHO Technical Report Series "Bacterial and Viral Zoonoses". No. 682, 1982.
- WHO Technical Report Series "Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis". No. 740, 1986.
- "Bovine brucellosis - An International Symposium". Edited by R.P. Crawford and R. Hidalgo. Texas A and M University Press, 1977.

## **Lutte contre la brucellose à *Brucella melitensis*: choix d'une stratégie. Résultats attendus**

*M. Plommet,*

*INRA, 37380 Nouzilly, France*

### **Les raisons d'un échec**

Il faut se demander pourquoi la brucellose ovine-caprine, connue depuis plus d'un siècle, n'a pas été éradiquée des pays méditerranéens, alors que :

1. la brucellose bovine dont les caractéristiques essentielles sont semblables a été éliminée ou est en cours, d'un nombre croissant de pays,
2. les moyens de lutte sont disponibles depuis longtemps,
3. les premières mesures de prophylaxie officielle remontent à un demi siècle,
4. la maladie est chez l'homme plus grave que celle d'origine bovine.

Il faut y voir plusieurs raisons : d'abord une différence de culture entre le Nord et le Sud, entre l'éleveur bovin et l'éleveur ovin : une perception différente de la maladie, de son impact sur la santé humaine et sur l'économie du troupeau, ainsi qu'un certain pessimisme ou fatalisme du berger qui accepte comme normal un taux d'avortement de 2 à 5 % chez les primipares.

Ensuite un manque de volonté politique des éleveurs et des pouvoirs publics, les premiers individualistes fortement réfractaires aux contraintes d'une action collective, les seconds intimidés par les difficultés de la tâche, sans recours à l'exemple, et à la pression, des pays voisins comme c'est le cas en brucellose bovine.

Enfin l'absence, ou l'inadéquation, d'une stratégie offensive clairement définie, prenant en compte les caractères propres de l'épidémiologie et de la pathogénie de la maladie. L'attitude purement défensive, qui a été la nôtre pendant 50 ans, ne pouvait que conduire à l'échec et au désintérêt des éleveurs.

### **Eléments d'une stratégie**

#### **Pathogénie**

Chacun sait qu'un animal mis en contact avec une *Brucella* peut ou bien résister ou bien s'infecter, et dans ce cas, guérir et s'immuniser ou, au contraire, exprimer la maladie clinique : infection de la mamelle et du placenta avec avortement ou naissance à terme d'un fœtus lui-même sain ou infecté. L'excrétion des *Brucella* par les trois voies, lait, sécrétions génitales et fœtus contamine les autres animaux, l'environnement et, éventuellement, l'homme. Les petits congénitalement infectés peuvent mourir les tout premiers jours, mais, s'ils survivent, ils ont ensuite une croissance normale. Certains d'entre eux restent infectés latents, c'est-à-dire qu'ils restent ou deviennent négatifs aux tests usuels du diagnostic, mais restent néanmoins infectés, avec réveil de l'infection à l'occasion de leur première

gestation, suivie ou non d'avortement : ainsi est bouclé le cycle de la transmission d'une génération à la suivante.

### Diagnostic

Entre le contact initial contaminant et la réponse diagnostique, le laps de temps qui s'écoule, appelé selon le cas, phase de latence, phase inapparente ou encore période d'incubation, est plus ou moins long : de quelques jours à plusieurs années - dans le cas extrême de l'infection congénitale par exemple - selon le niveau de la contamination initiale, la résistance de l'animal et son stade de gestation. Cette donnée diagnostique est d'importance majeure : un animal pris individuellement ne peut être certifié indemne de Brucellose sans répétitions d'examen sophistiqués, qui sont en dehors du champ des moyens normaux en médecine vétérinaire. D'où une première règle, du diagnostic par filiation : *"un animal ne peut être considéré comme indemne que s'il vient d'un troupeau lui même indemne, reconnu par des tests périodiques portant sur un échantillon statistique valable"*. Ceci implique en pratique un système correct pour l'identification des troupeaux et une organisation sanitaire structurée.

### Epidémiologie

La contagion, à l'intérieur du troupeau, est difficilement maîtrisable: que ce soit dans un système d'élevage moderne, intensif, ou traditionnel, extensif, la séparation des lots à risque ne peut être absolue quand on sait l'intensité de l'excrétion génitale - un seul avortement peut libérer assez de *Brucella* pour contaminer plusieurs milliers de commensaux - et la permanence de l'excrétion mammaire. La contagion entre les troupeaux, ce mot étant pris au sens large de communauté animale, qui est selon le cas un village, un alpage, un groupe nomade, est en revanche maîtrisable : il suffit, si l'on peut dire, d'éviter les contacts directs et indirects entre les troupeaux. D'où une deuxième règle, de la communauté d'action : *"l'unité de prophylaxie est le troupeau, ou la communauté animale"*. C'est bien sûr une difficulté majeure en élevage méditerranéen où les communautés se font et se défont, selon des traditions ancestrales aux motivations diverses, par exemple : suivre les ressources alimentaires, ou fuir les contraintes fiscales ou ... sanitaires.

### Prophylaxie

De ces deux règles, on peut déjà tirer des *mesures défensives* de prophylaxie collective : identifier les troupeaux indemnes, établir des barrières sanitaires autour d'eux et, par extension, autour des zones qu'ils occupent. Ceci néanmoins ne suffit ni pour protéger les troupeaux dans les zones où les barrières ne sont ou ne peuvent être étanches, ni pour éliminer la brucellose des troupeaux non indemnes. Dans une collectivité infectée, la maladie se perpétue, en effet, indéfiniment sous une alternance d'épisodes aigus et de phases silencieuses.

La prophylaxie doit donc recourir à des *mesures offensives* de deux types, l'abattage et la vaccination. Il va de soi que l'abattage n'est efficace que s'il élimine tous les animaux infectés, ce qui, en application des règles I et II, et en l'absence de vaccination, veut dire la totalité du troupeau. Cette mesure extrême n'est bien sûr applicable qu'en des cas limites. La vaccination est en revanche d'un usage plus général pour protéger soit des troupeaux indemnes, soit les animaux indemnes des troupeaux infectés.

## Vaccination

La vaccination est donc l'arme principale de la prophylaxie. Elle doit pour cela remplir plusieurs conditions qu'aucun vaccin actuel ne remplit pleinement. Les travaux en cours, rapportés par d'autres, pourraient d'ici quelques années résoudre la quadrature : efficacité, absence d'interférence diagnostique, absence de contre-indication majeure, coût bas. Le vaccin vivant Rev.1 est actuellement le plus approchant, malgré quelques inconvénients concernant :

1. la stabilité, la fabrication et le contrôle, discutés dans d'autres exposés.
2. la limitation d'emploi aux jeunes et aux non gestants, ceci pour limiter la durée de la réaction sérologique et éviter les incidents d'avortement; ces deux inconvénients peuvent être réduits par le choix de l'administration conjonctivale.
3. l'efficacité, enfin, bonne mais non absolue.

Ce dernier point mérite une discussion serrée : il y a, en effet, souvent confusion dans l'esprit des vaccinologues sur la notion d'efficacité. Pour des raisons expérimentales faciles à comprendre, on mesure l'efficacité par la protection conférée, dans certaines conditions, à l'espèce hôte soumise à une inoculation standard unique calculée pour infecter 95 à 100 % des témoins.

Dans ces conditions, le vaccin Rev.1 protège, disons, 50 % des brebis. Ceci correspond, dans les conditions "naturelles" de contamination c'est-à-dire de contacts infectants moindres mais répétés, à une protection bien plus élevée, mais plus subtile. Et qu'il convient de bien comprendre pour tirer complètement parti de la vaccination dans l'objectif "éradication".

Trois phénomènes, en partie contraires, s'enchevêtrent :

1. le classique effet troupeau des immunologistes. La (petite) fraction non vaccinée d'une population bénéficie de la protection vaccinale de la majorité, par la réduction du nombre de sujets "relais" de l'infection.
2. l'effet "immunité incomplète". La fraction vaccinée, mais non totalement immune, de la population, peut s'infecter (ceci est fonction du niveau de la contamination) mais résister cliniquement, sans avortement, donc moindre risque immédiat pour l'entourage. Mais risque différé pour la génération suivante par l'accroissement des naissances à terme d'individus infectés.
3. l'effet "relai" joué par les individus non-vaccinés. En Brucellose, à l'inverse de ce qui se passe dans l'effet "troupeau" classique, les sujets "oubliés" de la vaccination -sans doute en partie protégés par l'amélioration générale- sont aussi des relais particulièrement vulnérables et dangereux.

Un très petit nombre d'animaux non vaccinés suffit, en effet, dans la pratique pour entretenir l'infection dans un troupeau.

Dans les opérations sur le terrain, ces trois phénomènes jouent simultanément, d'où un effet bénéfique immédiat spectaculaire de la vaccination, suivi d'une stagnation, puis dès que l'on relâche la pression vaccinale, d'un retour de la maladie, donc d'un échec de l'éradication. D'où une troisième règle, de l'exhaustivité de la vaccination : *"Pour tendre vers l'éradication dans une communauté, la vaccination doit :*

1. *utiliser un vaccin reconnu, dûment contrôlé,*
2. *porter sur toute la population (en fonction du mode d'emploi du vaccin),*
3. *être intégralement poursuivie sur au moins deux générations.*

## Stratégie

### Objectif

L'objectif est bien naturellement la protection des zones indemnes, puis par actions coordonnées dans l'espace et le temps, l'éradication définitive de la maladie de zones progressivement étendues. Dans l'état actuel des choses, cet objectif final est probablement inaccessible à moyen terme dans de nombreuses zones. Aussi, dans ces zones, est-il plus sage de se fixer un objectif intermédiaire plus réaliste, plus modeste, consistant à généraliser d'une part la vaccination, d'autre part le contrôle et la surveillance des mouvements des animaux. Puis, dans un deuxième temps, quand les moyens et conditions requis par les actions d'éradication auront été obtenus, revenir à l'objectif définitif.

### Démarche

En Brucellose ovine, comme les rapports par pays le montrent, nous n'avons guère d'expérience définitive : nous savons, comme le rapporte P. Nicoletti, que la vaccination systématique confère une quasi-totale maîtrise de l'infection, bénéfique tant au plan santé humaine qu'économie du troupeau. Nous savons aussi grâce à Polydorou que l'éradication est possible, quand, comme à Chypre, les conditions sont réunies, prévalence minime, service vétérinaire efficace et motivé.

Ces résultats sont néanmoins suffisamment convaincants pour que la démarche en trois phases, suivie avec succès contre la brucellose bovine, puisse, moyennant quelques ajustements, servir de modèle pour la lutte contre la brucellose ovine.

- La première phase instaure la vaccination généralisée.
- La deuxième introduit la détection et l'élimination des animaux infectés.
- La troisième, dite de "test and slaughter" prohibe la vaccination pour concentrer les efforts sur la détection et l'élimination des derniers infectés.

Selon la situation de départ, les moyens disponibles et les progrès enregistrés, on passe dans le temps et par zone, d'une phase à la suivante, dans l'ordre 1,2,3 ou 2,3 ou d'emblée 3. Pour logique qu'elle soit, cette démarche est difficile à faire passer dans les esprits et dans les faits : elle semble se contredire en imposant puis en interdisant la vaccination; chaque phase est sous-tendue par une "obsession" différente, l'exhaustivité en phase I, le débusquement des dernières *Brucella* en phase III, une articulation un peu subtile en phase II, d'où une "philosophie" différente; enfin, il arrive malheureusement que, faute d'une appréciation correcte, on soit amené à revenir en arrière. Après avoir interdit la vaccination, y revenir. D'où confusion -et naturellement incompréhension des parties concernées.

Il importe donc de bien comprendre la logique de la démarche, et surtout pourquoi on en vient à interdire la vaccination. La raison en est qu'avec les vaccins actuels, des infections résiduelles latentes peuvent être bloquées et masquées par la vaccination. La sagesse est donc bien de prohiber la vaccination à un certain stade. Encore faut-il apprécier ce moment avec une froide objectivité et non en fonction de pulsions ou de mode venant d'instances irresponsables.

### Etapas

Le schéma I donne l'articulation logique des étapes de la stratégie. Aux trois questions, 5 réponses pour orienter l'action :

1. Y-a-t-il de la Brucellose dans la zone ?

Si non, protéger cette zone et assurer par là même une source d'animaux indemnes.

Si oui, choisir le niveau auquel, en fonction des considérations épidémiologiques locales, on devra agir.

2. Dispose-t-on, ou peut-on disposer, d'un système de surveillance correct ?

Si non, la vaccination reste le seul moyen d'action.

3. Si oui, quel niveau de prévalence y-a-t-il dans la zone ? A prévalence très basse, le "test and slaughter" est sûrement l'action de choix. A prévalence élevée, la vaccination s'impose pour une période assez longue, au moins 5 ans, sinon 10 ans (2 générations). A prévalence d'emblée intermédiaire, ou atteinte grâce à la vaccination, introduire progressivement, par zones et étapes, la politique d'abattage des infectés, de manière à accélérer et préparer le passage à l'étape définitive.

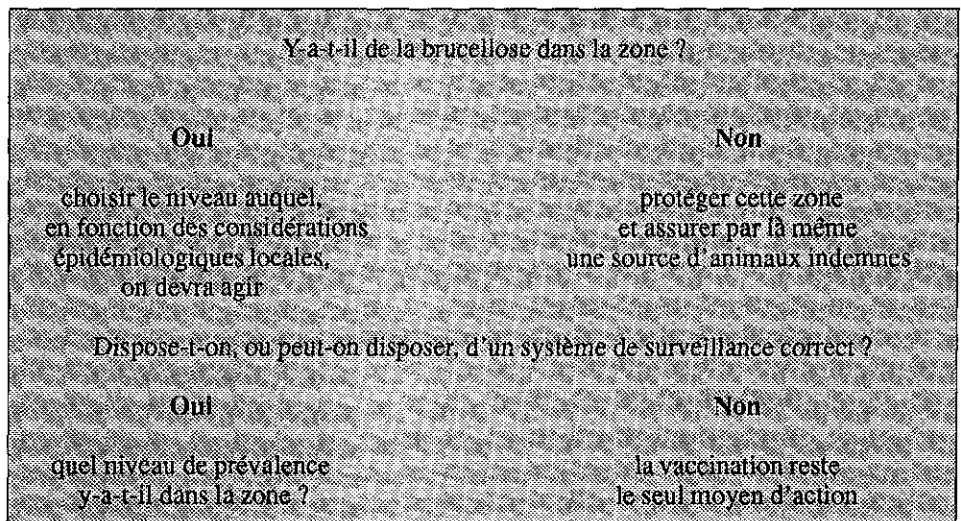


Figure 1. L'articulation logique des étapes de la stratégie

### Choix et solutions

Tout ceci est, certes, logique mais assez compliqué tant dans la conception que dans l'application. Devant ce qu'il faut bien appeler l'échec global de la prophylaxie dans les pays méditerranéens, et compte tenu des structures de cet élevage, on peut se demander si des choix plus simples, sans complications inutiles ne seraient pas, tout comptes faits, plus expéditifs (mais des comptes de cost/effectiveness n'existent pas. Ils seraient d'ailleurs totalement illusoire). Par exemple ne retenir que l'option "test and slaughter", qui, s'appliquant à la totalité des troupeaux non indemnes serait, certes, efficace. Mais est-elle politiquement acceptable au delà du seuil de 1% ? A l'inverse, l'option vaccination seule, pour une durée indéfinie, ne serait-elle pas suffisante pour qu'à terme la maladie ait totalement disparue ? Oui, sans doute, par application de la règle III. Mais est-il réaliste de croire que l'on maintiendra une vaccination, obligatoire et exhaustive, alors que la maladie



semblera maîtrisée ? et que d'autres maladies abortives auront pris la place, faisant paraître la prophylaxie comme un échec ?

Ayant posé ce problème, nous avons à l'INRA envisagé deux solutions :

1. un vaccin polyvalent contre les principales maladies abortives, brucellose incluse qui, comme en médecine humaine, serait administré à toutes les jeunes femelles, indéfiniment. Notre vaccin trivalent (Salmonellose, chlamydirose, brucellose) est, certes, une prouesse technique... mais il s'est égaré dans les méandres politico-commerciaux. Ce qui n'encourage pas à développer d'autres valences.
2. un nouveau vaccin brucellose, étudié par Dubray et son équipe, et qui débarrassé des inconvénients du Rev.1 pourrait être utilisé sur tous les animaux, jeunes et adultes, même en gestation, sans interférences diagnostiques. Un tel vaccin permettra sans doute de repenser la prophylaxie sur des bases plus simples et plus ponctuelles.

Nous n'en sommes pas là. Faute de mieux, la stratégie par étapes, ajustée à la situation épidémiologique, aux moyens disponibles, à la capacité de coordination et de coopération des services, des vétérinaires et des éleveurs me paraît, à l'heure actuelle, la seule raisonnable. A chaque région de faire une analyse objective et honnête de sa situation, en évitant à la fois les projets impossibles et l'optimisme facile.

### Résultats attendus

Que peut-on attendre de cette stratégie ? Un calcul arithmétique un peu théorique, basé sur les éléments du 1er chapitre d'une part, l'évolution des prévalences par troupeau observées chez les bovins et les ovins dans les zones où la prophylaxie a été bien conduite d'autre part, montrent avec une assez bonne précision ce que l'on peut attendre :

Dès l'instauration de la vaccination, le gain de prévalence est, outre la quasi-disparition de la maladie clinique, de plusieurs points par an. En 5 ans, on peut passer de 30 à 5 % par exemple. Puis, le progrès ralentit, avec un gain de, environ, 1 point par an. Enfin, en phase d'éradication, en dessous de 1 %, on ne gagne plus que quelques dixièmes par an, soit de 5 à 10 ans pour atteindre zéro.

On voit, selon cette loi, que, dans une zone donnée, partant d'une prévalence de 25 %, il faudrait 13 ans au minimum pour approcher de zéro, et encore 5 ans pour atteindre l'éradication. Et ceci en supposant que les trois règles et la stratégie soient correctement respectées. On peut sans doute faire mieux et plus vite dans des zones homogènes, restreintes, dans la mesure où les moyens sont déjà en place et bien rodés. Le plus souvent, ce sera plutôt moins bien, faute d'une claire perception des choses, d'une coordination imparfaite et des inévitables bavures.

## **Session 4**

### **Recent progress in the knowledge of *Brucella*: microbiology and vaccines**

# **Vaccins issus de la biotechnologie: Normes et directives applicables à leur enregistrement**

*F. Milward & J. Lechenet*

*Rhône Merieux, Laboratoire IFFA, 254, rue Marcel Mérieux, 69342 Lyon Cedex 07  
France*

## **Introduction**

Proposer une définition précise au terme biotechnologie est difficile tant le champ d'application est vaste et s'étend continuellement car tous les progrès réalisés dans le domaine de la biologie sont rapides.

Pour la clarté et la commodité de cet exposé, nous nous limiterons à décrire le cas des vaccins issus des techniques de la biologie moléculaire (manipulation dirigée de l'ADN ou de l'ARN). Nous nous attacherons à montrer comment les différentes parties intéressées (chercheurs, industriels, public, autorités politiques) ont tenté de construire un ensemble réglementaire permettant de tirer profit des avantages importants de ces techniques tout en réduisant les risques potentiels associés à leur utilisation et en conservant la confiance du public face à une technologie qui peut à de nombreux égards paraître mystérieuse ou dangereuse.

## **Applications de la biologie moléculaire dans le domaine des vaccins vétérinaires**

Les applications des méthodes de la biotechnologie dans le domaine vétérinaire et plus particulièrement de la biologie moléculaire ont été récemment revues par Blancou. La biologie moléculaire a permis de modifier, souvent radicalement, les moyens d'obtention des antigènes vaccinaux. Trois types de vaccins peuvent être décrits : vaccins inactivés, vaccins vivants et vaccins vivant vecteurs.

### **Vaccins inactivés**

L'insertion de gènes étrangers à l'intérieur d'un système d'expression hôte a d'abord été utilisée pour la préparation de vaccins inactivés. Ainsi l'insertion des gènes codant pour les facteurs d'attachement K88 ou K99 des colibacilles entérotoxigènes a permis l'obtention d'un vaccin recombinant de la diarrhée néonatale du porcelet. Dans ce cas, l'intérêt de la recombinaison est de permettre un niveau d'expression de l'antigène plus élevé et plus stable qu'avec les souches sauvages correspondantes.

Une telle approche peut être utilisée pour l'obtention d'antigènes dont la rareté, la complexité de préparation et le coût rendent la production par des moyens classiques difficile ou impossible (ex : protéines de membranes bactériennes).

Plus récemment, d'autres applications ont été proposées. Ainsi, l'insertion dans *E. coli* d'un gène convenablement modifié d'une toxine de *Pasteurella multocida* (toxine

dermonécrotique) a permis l'expression directe d'une "anatoxine" sans nécessité d'inactivation chimique.

La connaissance précise d'épitopes induisant une réponse immunitaire protectrice a permis l'insertion de la séquence nucléotidique correspondante à l'intérieur de cette d'une protéine bactérienne. Les flagelles, les pili d'attachement ainsi que d'autres protéines (mal E, lamb B, protéine A...) ont été utilisés pour obtenir ces protéines hybrides. Dans ce cas, l'hybridation permet, non seulement une obtention simple et peu coûteuse des peptides, mais les rend également immunogènes sans nécessité de recours au couplage chimique. Cette approche ouvre également une nouvelle voie pour l'obtention de vaccins multivalents.

Dans une récente application de la biologie moléculaire, la délétion de gènes codant pour des protéines autres que des facteurs de virulence a été proposée pour l'obtention d'une réponse sérologique caractéristique de la souche vaccinale et différentiable de celle associée à l'infection (ex : souche GI négative de l'herpèsvirus de la maladie d'Aujeszky). Cette approche peut concerner aussi bien un vaccin vivant qu'inactivé.

### Vaccins vivants

Jusqu'à une époque récente, les souches vaccinales vivantes furent obtenues par isolement des souches naturellement atténuées (ex : vaccin de la brucellose B19) par passages successifs *in vitro* (ex : vaccin de la brucellose Rev.1) ou par mutation induite au laboratoire (ex : vaccin de la brucellose Rev.1). Il s'agissait d'une approche empirique et l'on constatait plus que l'on ne contrôlait l'atténuation. Aujourd'hui de très nombreux travaux nous donnent progressivement une meilleure idée des mécanismes de virulence des germes et ceci à l'échelle moléculaire. La biologie moléculaire, par la précision qu'elle permet dans l'excision des gènes, a grandement facilité ces travaux de recherche. Elle a également permis la construction de souches atténuées dont les modifications génétiques sont parfaitement décrites. Ainsi la délétion du gène Tk (Thymidine kinase) dans la génome de l'herpèsvirus porcin a permis l'obtention d'une souche vaccinale atténuée de la maladie d'Aujeszky qui continue d'exprimer à sa surface les antigènes responsables de la réponse immunitaire (glycoprotéines). Dans le domaine des salmonelloses, plusieurs souches vivantes modifiées ont été proposées: délétions dans les gènes gal E (galactose epimerase), aro (synthèse des dérivés aromatiques), cya et crp (adénylatecyclase et récepteur de l'ADNc). De telles souches présentent des caractères de virulence très atténués. La délétion de parties importantes du génome rend très improbable la réparation *in vivo*. Enfin, de telles souches pourraient être utilisées par voie orale. Cependant, un excès d'atténuation compromet leur immunogénicité et l'équilibre entre ces deux caractéristiques pourrait s'avérer difficile à trouver.

### Vaccins vivants vecteurs

L'utilisation de souches vivantes atténuées comme vecteur d'expression d'antigènes étrangers découle naturellement des deux applications précédentes. De tels vaccins pourraient être utilisés pour la vaccination orale et pourraient permettre la préparation de vaccins multivalents. L'exemple, aujourd'hui le plus connu, est celui de la vaccine-rage. La souche hôte utilisée est le virus vaccine (souche vaccinale de la variole). La souche a été choisie parmi celles disponibles pour son haut degré d'atténuation. De plus l'insertion d'un gène codant pour la glycoprotéine du virus rage dans le gène Tk de la vaccine renforce encore l'atténuation de cette dernière. La souche hybride ainsi constituée permet l'immunisation

contre la rage par voie orale et a été le premier vaccin recombinant utilisé dans la nature pour la protection de la faune sauvage.

Les souches atténuées de *Salmonelle* pourraient également constituer de bons vecteurs d'antigènes étrangers. De nombreux exemples ont été décrits. Mais aujourd'hui aucune de ces constructions n'a encore été développée jusqu'au stade de l'utilisation à grande échelle.

Cette liste d'applications de la biologie moléculaire au domaine du vaccin vétérinaire est très loin d'être exhaustive. Elle a simplement pour but d'illustrer la diversité des applications possibles et de servir de base pour l'explication de l'évolution de la réglementation dans ce domaine.

### **Réglementation du développement et de l'enregistrement des vaccins issus de la biologie moléculaire**

La diversité des techniques utilisées, leur nouveauté ainsi que des effets négatifs potentiels ont suscité dans tous les pays où ces recherches sont conduites une réflexion et le développement d'un code réglementaire. Quoique contraignant, ce cadre est nécessaire pour permettre un développement serein des applications en donnant une opportunité d'expression à toutes les parties concernées. Aujourd'hui le chercheur et l'industriel ne travaillent plus isolés du monde, la technologie n'est pas automatiquement admirée et respectée. Les développeurs doivent tenir compte de l'avis de la société dans leur façon de travailler (éthique, expérimentation animale, biologie moléculaire, déchets...).

#### **Situation des Etats Unis**

La réglementation américaine a été récemment revue en détail par Espeseth et Shibley lors de la dernière conférence sur la brucellose au Texas. L'USDA utilise la réglementation de base concernant l'enregistrement des produits biologiques (Virus Serum Toxin Act). Les aménagements spécifiques concernant les produits issus de la biologie moléculaire tiennent compte de leur risque pour l'environnement.

Les produits sont classés en trois catégories (Tableau 1)

*Tableau 1. Catégories de produits issus de la biologie moléculaire (Espeseth 1990).*

Catégorie	Caractéristiques
1	vaccins inactivés ou sous-unités anticorps monoclonaux
2	vaccins vivants modifiés obtenus par addition ou délétion de gènes
3	vaccins à vecteurs vivants

Les produits de catégorie 1 ne représentent aucun risque quel que soit le produit et le niveau de confinement. Par contre, les laboratoires manipulant des organismes modifiés génétiquement doivent se conformer à un certain nombre de règles concernant les bonnes pratiques de laboratoire, le confinement à tous les stades de manipulation des germes vivants précédant leur inactivation, la formation du personnel (normes NIH, comité de sécurité biologique). Les produits sont évalués comme des produits classiques (essais en

laboratoire et en station, demande d'autorisation d'essai clinique, demande d'autorisation de mise sur le marché).

Pour les produits des catégories 2 et 3, un certain nombre d'exigences supplémentaires sont demandées. Tout d'abord les modifications génétiques apportées ne doivent conférer au micro-organisme aucune caractéristique nouvelle nocive (augmentation de la colonisation, de la virulence, de la pathogénéité). Ensuite des autorisations officielles sont nécessaires à chaque changement de niveau de confinement (Tableau 2).

*Tableau 2. Les niveaux de confinement aux différents stades de la recherche et du développement pour les produits de catégorie 2 et 3 imposés par la réglementation américaine (Espeseth 1990).*

Niveau	Description	Autorisation
4	confinement complet au laboratoire	normes applicables la biologie moléculaire
3	étude sur animaux en station expérimentale	idem + autorisation officielle
2	essai clinique limité contrôlé	étude d'impact autorisation officielle
1	distribution libre	étude d'impact autorisation de mise sur le marché

*Tableau 3. Informations techniques nécessaires pour obtenir l'autorisation de changement de niveau de confinement pour les produits de catégorie 2 et 3.*

danger pour l'homme  
 impact sur l'environnement  
 caractérisation complète de la souche vaccinale  
 innocuité pour les espèces cibles et autres

Quatre types d'information scientifique doivent être fournies (Tableau3).

Pour les passages de la station à l'essai clinique limité puis à la distribution, le demandeur doit fournir les informations nécessaires pour que l'USDA puisse préparer l'étude d'impact sur l'environnement (Environmental Assessment -EA-, Environmental Impact Assessment -EIA-)

Ce document central d'une grande importance comporte les chapitres suivants :

- Objectif et nécessité de l'essai.

- Solutions alternatives.
- Environnement affecté.
- Conséquences pour l'environnement (comparaison avec les produits conventionnels).
- Consultation : avis du public et de groupes d'intérêt.
- Conclusions.

Il faut particulièrement noter que l'USDA, lors de cette étude, doit obtenir l'autorisation des autorités locales et recueillir l'avis du public et des organisation et associations concernées, garantissant ainsi une grande transparence de la procédure. S'il y a consensus sur la conduite de l'essai, une conclusion d'absence d'impact négatif sur l'environnement (FONSI) est publiée et l'autorisation de conduire l'essai clinique ou de distribuer le produit pourra être accordée. Une telle autorisation a été ainsi obtenue pour chaque essai du vaccin recombinant vaccine aux Etats Unis. L'étude d'impact réalisée était un document d'environ 150 pages regroupant les informations de nombreuses années de travail; parmi d'autres informations l'étude de sensibilité de 44 espèces de mammifères et d'oiseaux à la souche vaccinale au laboratoire était décrite.

#### **Situation de la CEE (Cantley M.F, 1990)**

Trois textes principaux décrivent la réglementation des enregistrements de produits issus de la biotechnologie (Tableau 4).

*Tableau 4. Textes européens réglementant les vaccins issus de la biologie moléculaire.*

---

Directive 87 / 22 / CEE:	Médicaments de haute technologie. Avis du comité du médicament vétérinaire.
Directive 90 / 219 / CEE:	Utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés (OGM). - classification - confinement
Directive 90 / 220 / CEE:	- notification - impact sur l'environnement

---

La directive 87/22/CEE prévoit que tout dossier d'enregistrement d'un produit issu de la biotechnologie (en particulier tout vaccin inactivé ou vivant issu de technique de la biologie moléculaire annexe A de la directive-) doit être présenté pour avis à la Commission du Médicament Vétérinaire par les autorités d'enregistrement du premier pays où le dossier est déposé. Les questions éventuelles sont adressées au demandeur en une liste unique. Après avis de la commission, chaque pays membre dispose d'un délai de 30 jours pour statuer sur le recevabilité du projet et accorder ou refuser l'autorisation de mise sur le marché. A l'avenir, cet avis pourrait devenir une décision.

Les directives 90/219/CEE et 90/220/CEE réglementent les phases de recherche et développement utilisant les organismes génétiquement modifiés :

- la directive 90/219/CEE concerne l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés en locaux confinés et décrit les niveaux de confinement nécessaires. Cette directive a été

récemment complétée par le classement des microorganismes en fonction de leur risque potentiel (91/448/CEE).

- la directive 90/220/CEE concerne l'utilisation non confinée (essais ou mise sur le marché) d'organismes génétiquement modifiés. En particulier les annexes 2 et 3 de ce document décrivent la structure du dossier d'étude d'impact sur l'environnement.

Ces directives renvoient à des autorités nationales compétentes. La traduction de ces directives dans les différents droits nationaux est en cours.

### **Situation de la France**

Dans l'attente de la mise en place d'une réglementation contraignante basée sur les directives CEE, deux commissions fonctionnent et peuvent être consultées lors des étapes de développement et d'enregistrement des vaccins issus de la biologie moléculaire.

- Commission du génie génétique : (décret 89/306 du 11/05/89). Cette commission définit à la demande le classement et donc les niveaux de confinement ainsi que les précautions particulières à appliquer à chaque projet de recherche. La commission étudie un dossier comprenant tous les renseignements décrivant complètement les techniques utilisées.
- Commission du génie biomoléculaire : (arrêté du 4/11/86). Cette commission émet un avis avant la diffusion d'organismes génétiquement modifiés en dehors des laboratoires et stations confinés. Cet avis est en particulier émis dans le cadre de la demande obligatoire d'autorisation d'essai clinique.

Cette commission étudie le dossier décrivant la nature du recombinant, son effet sur l'espèce ciblée (innocuité), son effet sur l'environnement et les protocoles envisagés. Le passage devant cette commission deviendra probablement obligatoire et son avis contraignant dans le cadre de l'application des directives européennes.

A noter que la composition de cette commission est très ouverte puisqu'aux cotés des spécialistes siègent des représentants du droit, des associations de consommateurs, des organisations professionnelles et syndicales.

### **Conclusion**

Pour conclure, il faut bien constater que les produits issus des techniques de recombinaison génétiques se sont avérés plus longs et plus compliqués à développer et à mettre sur le marché que cela n'avait été imaginé et d'ailleurs largement vulgarisé dans les années 70.

Sur le plan technique d'abord, notre absence de connaissances sur les facteurs de virulence, sur les antigènes importants, sur la nature de la réponse immunitaire induisant une protection a conduit souvent, en matière de vaccins, à des résultats décevants. Si ces vides se comblent progressivement, les vaccins traditionnels, malgré leurs imperfections tiendront probablement encore longtemps leur place.

Sur le plan réglementaire ensuite, l'inquiétude du public devant une technologie galopante, perçue comme mal maîtrisée (après les années d'émerveillement 50 et 60) a nécessité la mise en place de règles contrôlant l'utilisation au laboratoire et sur le terrain des organismes modifiés génétiquement. Ces règles laissent une place de plus en plus large aux non spécialistes garants de la transparence du système. Ces règles, souvent sources de frustration pour le chercheur et l'industriel, sont néanmoins nécessaires et s'avèrent salutaires.



## Références

- Blancou J., 1990. Utilisation et contrôle des méthodes biotechnologiques dans le domaine vétérinaire. Rev.Sci.Tech.Off. Int. Epiz. 9 (3) : 621-640.
- Cantley M.F., 1990. Regulatory aspects of biotechnology in Europe, with particular reference to veterinary science. Revue sci. Tech. Off. Int. Epiz.9 (3) : 695-713.
- Espeseth D.A. and Shibley G.P., 1989. Regulatory policies for field testing experimental recombinant-derived veterinary biological products in Advances in Brucellosis Research, ed G. Adams, Texas AM.

### *Principaux textes réglementaires :*

- USA**
- \* Title 9, Code of Federal Regulations, part 103.3.
  - \* 21 USC n° 151-158
  - \* Federal Register, December 31, (1984) 49 (252) : 50856-50907.
  - \* Federal Register, June 26, (1986) 51 (123) : 23302-23350.
  - \* Federal Register, June 26, (1986) 51 (123) : 23339.
- CEE**
- \* Directive 87/22/CEE (JO CE du 17/01/87)
  - \* Directive 90/219/CEE (JO CE du 08/05/90)
  - \* Directive 90/220/CEE (JO CE du 08/05/90)
  - \* Directive 91/448/CEE (JO CE du 28/08/91)
- France**
- \* Décret 89/306 au 11/05/89 (J.O. du 13/05/89)
  - \* Arrêté du 4/04/86 (J.O. du 25/11/86)

# **Contrôle officiel du vaccin Rev.1 en France**

## **Modalités - Critères - Sanction**

*B. Garin-Bastuji*

*Laboratoire National de Référence des Brucelloses Animales  
Laboratoire de Référence O.I.E. pour les Brucelloses Bovine, Ovine et Caprine  
C.N.E.V.A. - Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires  
B.P. 67, 94703 Maisons-Alfort Cedex, FRANCE*

### **Résumé**

L'auteur présente les modalités, critères et sanction proposés pour le contrôle du vaccin Rev.1 en France. Ce contrôle a pour objet de disposer de vaccins d'une qualité plus fiable sur le terrain dans le cadre actuel de généralisation de la prophylaxie médico-sanitaire en zone infectée. Au contrôle "allégé" classique systématique sur produit fini (portant sur l'identité, la pureté, le dénombrement et la dissociation) est associé un contrôle renforcé, systématique pour les lots de semence et occasionnel pour les lots de produit fini, incluant un contrôle de virulence résiduelle et d'immunogénicité sur souris.

### **Introduction**

Les vaccins vétérinaires, comme l'ensemble des médicaments et autres produits biologiques utilisés *in vivo* doivent, en France, faire l'objet d'une autorisation de mise sur le marché (AMM). La procédure d'AMM consiste, (1) en l'instruction par une commission nationale indépendante d'un dossier comprenant, outre la description du produit et des procédés de fabrication, un rapport d'expertises clinique et pharmaco-toxicologique et un dossier analytique et (2) le contrôle effectif du produit au laboratoire.

Jusqu'à présent, les vaccins anti-brucelliques suivaient la même règle et le contrôle officiel par le laboratoire national de référence ne concernait qu'un lot final du produit au moment de l'instruction de la demande d'AMM et lors de son renouvellement (tous les 5 ans). Or, en terme de rapport coût / efficacité le vaccin Rev.1 est le premier des moyens de lutte contre la brucellose des petits-ruminants en zone infectée. Devant les échecs vaccinaux constatés parfois et la démonstration que certains lots circulant sur le terrain (2) pouvaient ne pas présenter toutes les garanties de qualité requises, nous avons souhaité qu'un contrôle approfondi systématique des lots de semence, et au moins occasionnel, des lots finaux puisse être effectué. L'ensemble des procédures de contrôle (modalités du contrôle, modèle animal utilisé) est donc en cours de révision au niveau national. Les modalités, critères et sanction du contrôle du vaccin Rev.1 présentées ici sont celles qui devraient être prochainement appliquées en France. Elles ont en outre fait l'objet d'une proposition récente de la France à la Pharmacopée Européenne.

## Stratégie du contrôle

Les qualités vaccinales de la souche Rev.1 de *Brucella melitensis* biovar 1 utilisée à dose normale ( $1 \text{ à } 2 \times 10^9$ ) par voie sous-cutanée ou par voie conjonctivale chez les petits-ruminants sont désormais bien connues et reconnues en termes d'innocuité et d'efficacité. Les contrôles d'efficacité et d'innocuité sur espèce cible exigés pour de nouveaux vaccins (ou de nouvelles présentations ou voies d'inoculation) ne sont donc pas nécessaires pour le vaccin Rev.1 classique. Il est cependant impératif de s'assurer que tout lot de semence produit présente des caractéristiques conformes à celles de la souche initiale, notamment du point de vue immunogénicité et virulence résiduelle. En revanche, en l'absence d'incident sur le terrain, un contrôle occasionnel du produit fini restreint à l'identité, à la pureté, au dénombrement et à la phase de dissociation semble devoir suffire.

## Modalités et normes du contrôle

### Dispositions générales

Tous les contrôles sont effectués par le Laboratoire National de Référence des Brucelloses Animales, l'ensemble des vaccins utilisés sur le territoire français étant produits par des instituts privés.

Les contrôles communs aux lots de semence et aux lots finaux sont les suivants :

- absence de contaminants biologiques,
- identité de la souche vaccinale,
- détermination du taux de dissociation.

Chaque lot de semence est en plus soumis aux contrôles suivants :

- virulence résiduelle (temps de persistance 50% sur souris),
- immunogénicité (sur souris)

Les lots finaux contrôlés sont soumis en outre à un contrôle de viabilité avec dénombrement des germes revivifiables et à un contrôle d'étiquette et de notice.

Enfin, un contrôle incluant une épreuve de virulence résiduelle et une épreuve d'immunogénicité peut en outre être déclenché à tout moment du délai de validité sur tout lot final à l'initiative du laboratoire contrôleur.

Le contrôle effectué sur lot de semence est réalisé 4 mois au moins avant la mise en fabrication du premier lot final. Le contrôle du lot final est réalisé 1 mois avant la commercialisation et à tout moment, pendant la période de validité à l'initiative du laboratoire contrôleur.

Enfin, l'envoi d'échantillons pour contrôle officiel au laboratoire de référence doit être accompagné de documents décrivant les contrôles de conformité internes à l'entreprise productrice et les résultats obtenus pour le lot considéré.

### Etiquetage et notice

Chaque flacon de vaccin (lot final) doit être muni d'une étiquette reproduite sur l'emballage et comportant les renseignements prévus par la norme "Vaccins à usage vétérinaire" de la Pharmacopée Européenne et être accompagné d'une notice d'emploi conforme à ladite norme et préconisant l'emploi du produit dans les conditions fixées par la réglementation en vigueur (voie d'administration, dose, espèce de destination, tranche d'âge des animaux vaccinés, risques pour l'environnement et l'homme).

## Contrôle de pureté

Cet essai (dérivé de la norme "Stérilité" de la Pharmacopée Européenne) est destiné au contrôle de l'absence d'agents microbiens contaminants (bactéries, aérobies et anaérobies, et champignons). Il est réalisé dans des conditions permettant d'éviter les contaminations microbiennes. Les milieux utilisés (AC medium, milieux liquides au thioglycolate, et de Sabouraud et milieu solide Columbia) sont contrôlés préalablement avec les souches témoins suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes* et *Candida albicans*.

L'examen d'un frottis par la méthode de Gram doit au préalable révéler la seule présence d'une population homogène de coccobacilles à Gram négatif à l'exclusion de tout autre agent bactérien ou fongique.

## Contrôle d'identité

Les *Brucella* présentes dans le vaccin doivent posséder les caractéristiques morphologiques, culturales et sérologiques que partage la souche Rev.1 avec la souche 16M de *B. melitensis* biovar 1 et celles qui l'en différencient (1, 4, 5) (Tabl. 1 et 2).

Tableau 1. Caractéristiques communes de *B. melitensis* biovar 1 souche 16M et de la souche Rev.1 contrôlées.

Phase	Oxydase	Exigence en CO <sub>2</sub>	Production d'H <sub>2</sub> S	Sérum anti- <sup>a</sup>			Phage <sup>b</sup>		
				A	M	R	Tb	Wb	Iz1
S	+	-	-	-	+	-	-	-	+

<sup>a</sup> : Agglutination par les sérums monospécifiques anti-A (A), -M (M) ou -R (R)

<sup>b</sup> : Lyse par les bactériophages Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb) ou Izatnager1 (Iz1)

Tableau 2. Caractéristiques différentielles de *B. melitensis* biovar 1 souche 16M et de la souche Rev.1 contrôlées.

Souches	Taille des colonies (mm) <sup>a</sup>	Thionine 20µg/ml	Croissance en présence de		
			Fuchsine basique 20µg/ml	Benzyl-pénicilline 5 UI/ml	Streptomycine 2,5µg/ml
16M	1-2	+	+	+	-
Rev.1	0,5-1	-	-	-	+

<sup>a</sup> : Milieu BAB ; incubation en atmosphère normale pendant 4 jours à 37°C.

### **Contrôle de viabilité (dénombrement) (1, 4, 5)**

Cet essai est réalisé par dénombrement des bactéries vivantes après ensemencement de dilutions sur milieu solide et incubation 5 jours à 37°C.

Le dénombrement total et le pourcentage de bactéries viables ne peuvent actuellement être réalisés par néphélométrie compte tenu de l'opacité de l'excipient stabilisant. Un excès éventuel de bactéries mortes vraisemblablement préjudiciable à l'efficacité du vaccin n'est donc pas contrôlable.

### **Contrôle du taux de dissociation (1)**

La souche vaccinale doit développer des colonies en phase lisse (S), sans dissociation vers des phases intermédiaires (I) ou rugueuses (R). La dissociation est étudiée d'une part par isolement sur 5 boîtes de milieu solide permettant l'observation de colonies isolées et de zones confluentes et d'autre part en nappe pour l'établissement du pourcentage de dissociation sur au moins 100 à 200 colonies isolées. Le taux de dissociation  $(R + I / S + R + I)$  doit être inférieur à 1% pour les lots de semence et 5% pour les lots finaux.

### **Contrôle de virulence résiduelle (3)**

L'objet de ce contrôle est de vérifier que la souche vaccinale a conservé un niveau de virulence résiduelle acceptable.

Un groupe de 32 souris femelles CD1, âgées de 5 à 6 semaines, reçoivent par voie sous-cutanée une suspension contenant  $10^8$  organismes viables de vaccin à contrôler. Pour le produit fini, la dilution s'effectue sur le produit cryodésséché reconstitué au moment de l'essai dans le diluant du fabricant, sur la base du titre en bactéries vivantes annoncé par le fabricant. Le nombre exact de bactéries injectées est contrôlé a posteriori par ensemencement de 4 boîtes de milieu solide par 0,2 ml d'une dilution appropriée. Les animaux sont sacrifiés (par lot de huit randomisé) 3, 6, 9 et 12 semaines plus tard. Les rates sont prélevées individuellement et broyées stérilement dans 10 volumes de diluant PBS (pH = 6,8). La suspension obtenue est étalée à la surface de boîtes de milieu solide, à raison de 0,4 ml par boîte et de 3 boîtes au moins. Ceci assure un niveau minimal de détection inférieur à 5 bactéries par rate. Le temps de persistance 50 pour cent (TP50) est calculé au moyen du test de transformation probit de Bonet-Maury (8 souris par point, totaux cumulés puis analyse graphique sur papier log-probit, échelle temps arithmétique). Le vaccin est conforme à la définition de la souche Rev.1 lorsque le TP50 ne diffère pas significativement du TP50 de la souche mère de référence ( $7,9 \pm 1,2$  semaines).

### **Contrôle d'immunogénicité (2, 3, 4, 6)**

Le modèle utilisé pour ce contrôle est le modèle souris développé par l'INRA (2, 3, 6).

On utilise 6 lots randomisés de 6 souris femelles CD1 âgées de 5 à 7 semaines soit 4 lots destinés au contrôle de la souche Rev.1 ou du vaccin, 1 lot témoin non vacciné et 1 lot référence vacciné avec un vaccin de référence *B. abortus* souche B19 (souche de référence entretenue par le L.P.I.I. de l'INRA).

Chaque souris vaccinée reçoit par voie sous-cutanée  $10^5$  unités formant colonie (UFC) du vaccin à contrôler. Pour le produit fini, la dilution s'effectue sur le produit cryodésséché reconstitué au moment de l'essai dans le diluant du fabricant, sur la base du titre en bactéries

vivantes annoncé par le fabricant. Chaque souris du lot référence reçoit  $10^5$  UFC de la souche B19 de référence. Le nombre exact de bactéries injectées est contrôlé a posteriori par ensemencement de 4 boîtes de milieu solide. Au jour 30 après vaccination, chaque souris reçoit par voie intra-péritonéale  $2 \times 10^5$  UFC de la souche 544 de *B. abortus* CO2-dépendante. Chaque souris est mise à jeun 16 heures auparavant pour assurer une injection de bonne qualité. Le nombre exact de bactéries inoculées est contrôlé a posteriori par ensemencement de 4 boîtes de milieu avec 0,2ml d'une dilution au 1/1000 de l'inoculum.

Au jour 45 après vaccination (15 jours après épreuve), les souris sont sacrifiées, les rates individuellement prélevées, dégraissées et pesées. Elles peuvent être conservées à  $-20^\circ\text{C}$  de 24 heures à 7 semaines. Celles-ci sont ensuite broyées en présence de 9 fois (ou 19 fois lorsque leur poids est inférieur à 120mg) leur poids de PBS de manière à obtenir après broyage une suspension au 1/10 (ou 1/20). Deux fractions de 0,2ml de cette suspension et de ses dilutions au 1/10, 1/100 et 1/1000 sont ensemencées chacune sur une boîte de milieu. Pour inhiber la croissance des souches vaccinales pouvant subsister après l'épreuve, le milieu est additionné d'érythritol (1g/l) qui inhibe la souche B19 ou de benzylpénicilline (3mg/l) qui inhibe la souche Rev.1. Le dénombrement des colonies de *B. abortus* 544 est effectué après 5 jours d'incubation à  $37^\circ\text{C}$  en atmosphère enrichie à 10 pour cent en  $\text{CO}_2$ , sur les boîtes comportant moins de 300 UFC.

Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries par rate. En l'absence de colonies, on considère que la rate était infectée par 5 UFC. Le nombre X de *B. abortus* 544 est transformé en Y par la formule :

$$Y = \log_{10}(X/\log_{10}X)$$

La moyenne et l'écart-type des Y sont ensuite calculés pour chaque lot de 6 souris. Les conditions du contrôle sont conformes aux limites du modèle si la réponse (moyenne des Y) des souris témoins non vaccinées est supérieure ou égale à 4,5; la réponse des souris vaccinées avec le vaccin de référence est inférieure à 2,5; et l'écart-type résiduel calculé sur ces deux réponses (exprimé par unité de 6 souris) est inférieur à la valeur critique de 0,8. Le vaccin ou la souche Rev.1 ont une immunogénicité convenable si la réponse calculée sur les 4 lots est inférieure ou égale à 2,5. En cas de réponse marginale et lorsqu'aucune raison objective qui conduirait à un refus du lot (dissociation, perte de virulence résiduelle,...) ne peut être invoquée, l'essai est de nouveau réalisé.

### Sanctions du contrôle

Lorsqu'un lot de semence ou un lot final de vaccin n'a pas satisfait à l'un ou l'autre des contrôles, le laboratoire contrôleur en informe dans les meilleurs délais le fabricant. Ce dernier doit sans délai, dans le cas d'un lot de semence procéder à la destruction dudit lot, et dans le cas d'un lot final, suspendre toute commercialisation de ce lot en informant les services vétérinaires utilisateurs de sa non-conformité.

L'avis favorable du laboratoire de contrôle est en revanche immédiatement libératoire.

### Conclusion

La qualité réelle (efficacité et innocuité) -dont l'assurance est une des conditions de l'efficacité des plans de prophylaxie médico-sanitaire des brucelloses ovine et caprine- d'un vaccin Rev.1 devrait en toute logique pouvoir être appréciée, si possible dans les conditions naturelles, par des études sur l'espèce cible. Le coût et la durée de telles études, indispensables

lors de la mise sur le marché d'un nouveau produit, les rendent inutilisables en pratique pour le contrôle régulier de qualité des lots de fabrication de vaccins.

Les contrôles sont néanmoins indispensables pour garantir une efficacité régulière des produits utilisés. Des méthodes de laboratoire sont alors nécessaires. Celles décrites ici permettent de contrôler que les vaccins commercialisés sont conformes à la souche d'origine dont l'efficacité et l'innocuité sont depuis longtemps reconnues.

On doit cependant noter que ces contrôles ne sont pas sans poser quelques difficultés, car ils restent lourds, assez longs et coûteux. Ils nécessitent tout d'abord la présence d'un personnel bien expérimenté à la fois en bactériologie des *Brucella* mais aussi pour les interventions sur souris. Ils exigent ensuite de disposer de locaux et de matériel adapté, permettant notamment une réalisation de ces contrôles dans de bonnes conditions de qualité et de sécurité. Enfin, ils impliquent de pouvoir disposer facilement et d'entretenir, sans dérive notable de leurs caractéristiques, les souches de référence 16M et Rev.1, la souche 544 d'épreuve et le vaccin référence B19.

## Références

- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., and Verger J.M., 1988. Techniques for the Brucellosis laboratory, INRA, Paris.
- Bosseray N., 1985. Quality control of four Rev.1 vaccines, In *Brucella melitensis*, Verger J.M. and Plommet M. Eds, Martinus Nijhoff, Dordrecht, 229-236.
- Bosseray N., and Plommet M., 1990. *Brucella suis* S2, *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* S19 living vaccines : residual virulence and immunity induced against three *Brucella* species challenge strains in mice, *Vaccine*, 8, 462-468.
- Comite Mixte D'Experts FAO/OMS de la brucellose, 1986. 6ème rapport, Série de rapports techniques 740.
- Comite OMS d'Experts de la Standardisation Biologique, 1977. 28ème rapport, Normes relatives au vaccin *Brucella melitensis* souche Rev.1, Norme N°25, N°610.
- Plommet M. et Bosseray N., 1984. Propositions pour une méthode générale de contrôle d'activité des vaccins antibrucelliques, *Dev. Biol. Standard.*, 56, 247-255.

# Le vaccin Rev.1 : Dérive des caractères d'immunogénicité et de virulence indépendante des marqueurs classiques

N. Bosseray

Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie  
Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France

## Introduction

La souche vaccinale hypovirulente *B. melitensis* Rev.1 (Rev.1) a été obtenue par une méthode empirique de mutation-réversion en présence de streptomycine(1). Le support génétique de cette mutation n'ayant pas été identifié, la conservation des propriétés de Rev.1 ne peut donc pas être contrôlée par la recherche directe du ou des gène(s) muté(s). Seuls des tests indirects de conformité des souches actuelles par rapport aux propriétés de la souche originale sont utilisables. Or, dans ces conditions, une mutation de la souche peut ne pas modifier les propriétés contrôlées. La sécurité et l'efficacité de la vaccination par Rev.1 dépend donc des tests choisis pour son contrôle. Ce contrôle repose (a) sur l'analyse de marqueurs classiques -colonies en phase lisse et diamètre < 1,2 mm, sensibilité à 5 µi (3 µg/ml) de pénicilline et résistance à 2,5 µg/ml de streptomycine (2)et (b) sur la mesure des activités biologiques -virulence résiduelle et immunogénicité (pouvoir protecteur)-.

L'activité biologique des lots de vaccin ne peut pas être contrôlée systématiquement sur hôtes naturels. Des modèles sur animaux de laboratoire, précis, reproductibles et selon des protocoles aussi proches que possible des conditions naturelles d'infection, sont donc nécessaires. Des modèles sur cobaye ont longtemps été, et sont encore, utilisés (3). Toutefois, la standardisation imparfaite des tests, les effectifs nécessaires pour observer une dérive de la souche, le coût et la durée des expériences se prêtent mal à des contrôles systématiques. Deux tests sur souris, qui s'appliquent à tous les vaccins anti-brucella ont été proposés. Ils peuvent désormais remplacer les essais sur cobaye. Ce sont :

- (a) le test d'immunogénicité qui mesure l'aptitude des souris vaccinées à maîtriser l'infection splénique consécutive une inoculation virulente d'épreuve, comparativement au vaccin référence, (4,5)
- (b) le test de virulence résiduelle qui mesure la persistance de Rev.1 dans la rate de souris vaccinées, exprimée par le temps nécessaire à la guérison de 50 % des rates (recovery time : RT<sub>50</sub>)(6).

La comparaison des caractères marqueurs et des activités biologiques de 3 souches de Rev.1 distribuées dans le monde avec la souche d'origine a démontré la variabilité des souches (7), constatée depuis par ailleurs (8,9). Une dérive similaire de l'activité biologique des souches utilisées sur le terrain pourrait être à l'origine de l'échec encore inexplicé de certaines campagnes de vaccinations (10).

Cinq vaccins commerciaux dont 3 développaient en primoculture plus de 20 % de colonies en phase non-lisse (non-S), forme anormale pour un Rev.1, ont servi à la purification de souches représentatives des différents types de colonies. Ces souches ont été comparées à la souche originale pour (a) évaluer la dérive des marqueurs classiques et des



caractéristiques biologiques dès leur purification, (b) mesurer la stabilité des caractères au cours de la conservation par subculture ou lyophilisation ou après passage sur souris et (c) déterminer la dépendance entre les résultats des différents tests.

## Matériel et méthode

La souche Rev.1 originale a été fournie par le Pr. Elberg (Berkeley, USA). Elle a été cultivée une fois au laboratoire sur boîtes de Pétri de gélose Trypcase Soja (TSA Bio-Mérieux) avant d'être lyophilisée. Une ampoule de ce lot a été remise en culture pour chaque essai pour servir de référence.

Cinq vaccins commerciaux d'origine différente ont été ensemencés sur boîtes de Pétri TSA de manière à observer des colonies isolées après 5 jours d'incubation à 37°C, en atmosphère normale. Après un contrôle de la phase par transillumination oblique et coloration de White et Wilson (3), 16 souches représentatives des différents types de colonies ont été purifiées. Elles ont été testées *in vitro* (taille et phase des colonies, antibiorésistance) et/ou *in vivo* (virulence et immunogénicité) soit : (a) après purification, (b) après 9 subcultures successives sur géloses inclinées TSA conservées 2 mois à +4°C entre chaque repiquage, soit (c) après passage sur souris (souches réisolées de la rate 3-9 semaines après inoculation).

L'antibiorésistance a été contrôlée selon une technique déjà décrite (7). Brièvement, des dilutions au 1/2 des antibiotiques sont incorporées dans la gélose TSA avant de la couler dans des boîtes de Pétri. Chaque suspension bactérienne étalonée à 10<sup>9</sup> bactéries/ml est encemencée en strie sur chaque concentration d'antibiotique et sur un milieu TSA normal pris comme témoin. La croissance bactérienne après 5 jours d'incubation à 37°C est notée par rapport à la croissance sur milieu TSA.

Les tests de virulence résiduelle et d'immunogénicité sont décrits en détail par ailleurs (4,5,6).

## Résultats

### Dérive de la phase et des caractères de résistance à la pénicilline et à la streptomycine par rapport à la souche originale. Conservation de ces marqueurs après subculture, lyophilisation ou passage sur souris

Sur 16 souches contrôlées après purification, seulement 9 répondaient à la définition d'un Rev.1. Sept souches différaient soit par la taille des colonies (diamètre  $\geq 1,5$  mm : 3 souches S-G), soit par leur phase (2 souches non-S), soit par leur phase et leur sensibilité aux antibiotiques (2 souches non-S).

Les différences par rapport à la souche originale ont été affinées en exprimant l'antibiorésistance par la plus grande concentration d'antibiotique permettant une croissance significative, soit : 0,37 µg/ml de pénicilline et 2,5 µg/ml de streptomycine pour la souche originale. Ainsi, 4/9 souches en phase S et 2/4 en phase non-S avaient une antibiorésistance normale. Les autres souches S étaient plus sensibles à la pénicilline (0,18 µg/ml), les 3 souches S-G résistaient mieux à la streptomycine (5,0 µg/ml), 2 souches non-S étaient inhibées par 1,2 µg/ml de streptomycine et l'une d'elles ne résistait qu'à 0,18 µg/ml de pénicilline.

Ces caractéristiques ont été conservées par 15/26 souche (58 %) testées après subculture (8/12 souches), lyophilisation (4/8) ou passage sur souris (3/6). Les 11 réponses modifiées

comprenaient : 6 souches non-S ayant muté vers la phase S sans modification significative de leur antibiorésistance, 5 souches S ayant recouvré une antibiorésistance normale. Les résultats d'ensemble des 42 souches contrôlées après purification, conservation et passage sont présentés sur le Tableau 1. A l'évidence, il n'existe aucune corrélation entre les différents marqueurs *in vitro* du Rev.1.

*Tableau 1. Répartition globale des souches en fonction des résultats des test classiques in vitro et des contrôles in vivo. Les réponses sont exprimées par rapport à celles de la souche Rev.1 originale, testée au même moment et prise comme référence.*

*Les test d'antibiorésistance n'ont aucune valeur prédictive de l'activité biologique d'un vaccin Rev.1. Les souches en phase non-S ne sont en revanche ni virulentes ni immunogènes.*

Tests classiques			Virulence résiduelle / Immunogénicité			
Phase (a)	Péni./Strepto (b)	Nb. souches	Nb. souches testées (c)	N/N (d)	</N (d)	</< (d)
S	N / N	13	6	0	3	3
	N / <	2	2	0	1	1
	< / N	10	6	0	4	2
	< / <	3	2	0	1	1
	Total	28	16	0	9	7
S-G	N / >	8	3	3	0	0
non-S	N / N	3	3	0	0	3
	N / <	1	1	0	0	1
	< / N	1	0			
	< / <	1	1	0	0	1
Total		6	5	0	0	5

- a S = phase lisse, S-G = colonies, S d'un diamètre  $\approx$  1,5 mm, non-S = non lisse (phase intermédiaire, mucoïde ou rugueuse).
- b Seuils de résistance à la pénicilline et à la streptomycine exprimés par rapport à la souche originale (N, équivalente, < inférieure ou > supérieure). Valeurs normales (N/N): 0,37 µg/ml de pénicilline et 25 µg/ml de streptomycine.
- c Souches représentatives des réponses aux tests classiques.
- d Virulence résiduelle (RT50) et immunogénicité (niveau moyen d'infection splénique après infection d'épreuve) exprimées par rapport à la souche originale. Valeurs normales (N/N): RT50 incluse dans les limites  $7,6 \pm 1,3$  semaines et immunogénicité =  $2,0 \pm 0,7$ .

### Virulence résiduelle et immunogénicité

Sur les 8 souches représentatives testées après purification (4 souches S, 1 souche S-G et 3 non-S), une seule (S-G) avait une virulence résiduelle normale et 7 une virulence résiduelle nulle ou inférieure à celle de la souche originale. Par ailleurs, 4 souches (3 souches S et 1

souche S-G) avaient une immunogénicité analogue à celle de la souche originale, les autres induisaient une protection significativement inférieure ou nulle. Considérant simultanément les résultats de 2 tests, seule 1 souche (S-G) se comportait comme la souche originale. Trois souches S avaient une virulence résiduelle trop faible mais étaient immunogènes, les autres (3 non-S et 1 S) n'étaient ni normalement virulentes ni immunogènes.

Ces caractéristiques ont été conservées après lyophilisation (8/8 souches) et subcultures (5/8). Les modifications des 3 réponses après subculture concernaient 1 souche S et 2 non-S qui ont réverté vers la phase S et retrouvé une immunogénicité équivalente à la souche originale. Le bilan des 24 contrôles *in vivo* (Tableau 1) montre que l'association du test de virulence résiduelle à la mesure de l'immunogénicité augmente le pouvoir discriminant des contrôles puisque 9 souches qui auraient été déclarées immunogènes avaient une virulence résiduelle trop faible ou nulle.

### **Relation entre les résultats des tests *in vitro* et les réponses *in vivo***

A l'évidence, aucune relation entre les résultats des contrôles de phase et de résistance aux antibiotiques et les résultats des tests de virulence résiduelle/immunogénicité n'a été observée (Tableau 1). Les tests *in vitro* n'ont donc aucune valeur prédictive pour l'activité biologique des souches de Rev.1.

### **Discussion**

La faible immunogénicité, l'absence quasi totale de virulence résiduelle de certaines souches purifiées et, plus encore, la fréquence anormale de colonies non-S (plus de 20 %) dans 3 des 5 vaccins contrôlés qui aurait dû conduire à un rejet immédiat de ces lots dès les premiers contrôles, démontrent que tous les vaccins Rev.1 commercialisés ne sont pas encore contrôlés avec une rigueur suffisante. Les dérives observées sont telles qu'elles peuvent être préjudiciables à certaines campagnes de vaccination. La principale dérive, outre la présence de colonies non-S, est une trop grande atténuation des souches (diminution de la virulence résiduelle associée ou non à une perte d'immunogénicité chez la souris) qui peut les empêcher de persister assez longtemps chez l'hôte naturel pour induire une immunité durable. En l'absence de corrélation entre les résultats des tests d'antibiorésistance et ceux de virulence résiduelle:immunogénicité sur souris, seuls ces derniers contrôles doivent décider, en définitive, du rejet ou de l'acceptation d'un lot de vaccin.

La relative stabilité des caractères au cours de la conservation ou du passage des souches sur souris - hormis les changements associés à une réversion de souches non-S vers une phase S- indiquent que les mutations de la souche Rev.1 sont discrètes et progressives. Une surveillance rigoureuse des marqueurs classiques - en particulier phase et taille des colonies- des lots de semence et des vaccins pendant la fabrication permettrait d'observer les dérives dès leur première manifestation. S'il est clair qu'une modification de l'antibiorésistance n'est pas synonyme d'une modification des propriétés biologiques du Rev.1, une dérive révèle une modification de la souche par rapport à la souche originale et devrait donc être considérée comme un signal d'alarme.

### **Recommandations**

La fabrication d'un bon vaccin Rev.1 repose sur quelques règles essentielles. Les plus importantes sont :

- 1 L'usage systématique d'une souche certifiée, fournie par le laboratoire national. Elle sert à produire les lots de semence du fabricant.
- 2 Le contrôle rigoureux du taux de dissociation vers les phases non-S et de la taille des colonies à tous les stades de la fabrication. Elimination des lots de semence et des lots de vaccin contenant respectivement plus de 1 % et 5 % de colonies non-S.
- 3 Le contrôle sur souris des activités biologiques de chaque lot de semence avant sa première utilisation. Contrôle régulier des produits finis par les services officiels.

## Références

1. Elberg SS, Faunce KJR, 1957. Immunization against *Brucella* infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. J. Bact. 73 : 211-217.
2. Alton GG, Elberg SS, 1967. Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. A review of ten years of study. Vet Bull . 37 : 793-800.
3. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, 1988 . Techniques for the brucellosis laboratory. Paris : INRA, 37-42 and 151-156.
4. Bosseray N, Plommet AM, Plommet M, 1984. Theoretical, practical and statistical basis for a general control method of activity for anti-*Brucella* vaccines. Dev Biol Stand, 56: 257-270.
5. Plommet M Bosseray N, 1977. Le contrôle des vaccins antibrucelliques par dénombrement des *Brucella* dans la rate de souris, vaccinées ou non, inoculées par voie intrapéritonéale. J Biol Stand, 5 : 261-274.
6. Bosseray N, Plommet M, 1990. *Brucella suis* S2, *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* S 19 living vaccines : residual virulence and immunity induced against three *Brucella* species challenge strains in mice. Vaccine 8: 462-468.
7. Bosseray N, 1985. Quality control of four Rev.1 anti-*Brucella* vaccines. In : Verger JM, Plommet M eds. *Brucella melitensis*. Dordrecht : M. Nijhoff, 229-236.
8. Pieterse PM, Gummow B, Pefanis S, Venter CG, Herr S, 1988. The characteristics of a variant strain of *Brucella melitensis* Rev.1 Onderstepoort J. vet. Res., 55 : 15-17.
9. Hunter P, Pefanis SM, Williamson CG, Botha WJS, van Schalkwyk MS, 1989. Horizontal transmission in sheep and delayed clearance in guinea pigs and mice of a *Brucella melitensis* Rev.1 mutant. J. of the South African Vet. Assoc., 60, 92-94.
10. Elberg SS, 1981. Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. Part II 1968-1980. Vet Bull, 51 : 67-73.

# Contribution de la biologie moléculaire à la taxonomie du genre *Brucella*

J.M. Verger et M. Grayon

Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie,  
Institut National de la Recherche Agronomique, Nouzilly, France

## Introduction

Lorsque Bruce, en 1887, isole l'agent de la Fièvre de Malte (9), élevé plus tard au rang d'espèce sous le nom de *Brucella melitensis* par Meyer et Shaw en 1920 (31), il n'imagine sans doute pas que cette bactérie est la première née d'un genre dont l'histoire sera régulièrement émaillée de vives controverses taxonomiques. Le nombre restreint des caractères, exclusivement phénotypiques, qui fondent la classification des *Brucella* (15) et le poids prédominant généralement accordé à l'hôte naturel préférentiel pour la définition de l'espèce, sont, en raison du degré de subjectivité qui leur est inhérent, les causes de cette situation controversable. L'étude relativement récente des *Brucella* par les techniques de la biologie moléculaire a fait progresser la connaissance de la structure génomique de ces bactéries, dont l'homogénéité entre les 6 espèces du genre s'est avérée tout à fait remarquable. Paradoxalement ces données nouvelles, plus objectives par nature que celles fournies par l'étude phénotypique traditionnelle, n'ont pas tari la source des controverses entre "brucellistes" qui, 104 ans après la découverte de Bruce, polémiquent toujours à propos de la définition de l'espèce chez les *Brucella*.

## Rappel de la classification phénotypique traditionnelle, ses qualités et ses limites

La classification actuelle du genre *Brucella* Meyer et Shaw, 1920 a été élaborée par le Sous-Comité de la Taxonomie de ces bactéries au cours des réunions successives qu'il a tenues depuis 1962 (11, 12, 14, 27, 28, 39, 47). Elle reconnaît 6 espèces, *Brucella melitensis* (Hughes, 1893; Meyer et Shaw, 1920), *Brucella abortus* (Schmidt, 1901; Meyer et Shaw, 1920), *Brucella suis* (Huddleson, 1929), *Brucella ovis* (Buddle, 1956), *Brucella neotomae* (Stoenner et Lackman, 1957) et *Brucella canis* (Carmichael et Bruner, 1968) (15, 38).

La différenciation de ces espèces repose, en pratique courante, sur le profil lysotypique vis-à-vis des bactériophages Tb, Wb, Iz, R/C, et sur quelques caractères simples d'orientation (type morphologique des colonies, exigence en sérum, oxydase, uréase) (Tableau 1) (2). *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* sont en outre subdivisées en biovars, respectivement 3, 7 et 5, sur la base de quatre épreuves complémentaires : l'exigence en gaz carbonique (CO<sub>2</sub>), la production d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S), la sensibilité à la thionine et à la fuschine basique et l'agglutination par les sérums "monospécifiques" anti-A et anti-M (Tableau 2) (3).

L'application des méthodes recommandées par le Sous-Comité de la Taxonomie des *Brucella* ne soulève généralement pas de difficulté majeure lorsque l'identification repose sur un clonage rigoureux des souches étudiées, associé à une standardisation et à un contrôle

régulier des épreuves de caractérisation. Dans ces conditions, la proportion des souches dont l'identification est d'interprétation délicate - 7 sur un échantillon de 4040 originaires du monde entier, soit 0,2 % (Verger et Grayon, résultats non publiés) - est en pratique négligeable. Ce pourcentage infime souligne la valeur effective, pour l'identification, de l'actuel schéma de classification qui permet de distinguer clairement, dans la majorité des cas, les différents types de *Brucella* responsables de la brucellose animale et humaine.

Cette classification qui a fait, et qui fait toujours, ses preuves n'échappe pourtant pas aux 3 inconvénients majeurs inhérents à tout système taxonomique fondé exclusivement sur des critères phénotypiques.

Tableau 1. Epreuves de différenciation des espèces de *Brucella*

Espèce	Lyse à la DCE <sup>a</sup> par les phages			Type morphologique R/C des colonies	Exigence en sérum	Oxydase	Uréase	Hôte préférentiel	
	Tb	Wb	Iz						
<i>B. melitensis</i>	-	-	+	-	smooth	-	+	+b	mouton, chèvre
<i>B. abortus</i>	+	+	+	-	smooth	-c	+d	+e	bovins
<i>B. suis</i>	-	+	+	-	smooth	-	+	+f	biovar1: porc biovar2: lièvre, porc biovar3: porc biovar4: renne biovar5: rongeurs sauvages
<i>B. neotamiae</i>	-g	+	+	-	smooth	-	-	+f	rat du désert
<i>B. ovis</i>	-	-	-	+	rough	+	-	-	bélier
<i>B. canis</i>	-	-	-	+	rough	-	+	+f	chien

<sup>a</sup> DCE= Dilution courante d'épreuve

<sup>b</sup> Vitesse de la réaction variable, très rapide chez quelques souches

<sup>c</sup> Sauf *B. abortus* biovar 2 qui est généralement sérophile strict à l'isolement primaire

<sup>d</sup> Sauf les souches de *B. abortus* biovar 3 isolées au Sénégal et en Guinée Bissau qui sont négatives

<sup>e</sup> Sauf la souche de référence 544 et de rares souches sauvages qui sont négatives

<sup>f</sup> Réaction intense et rapide

<sup>g</sup> Plages minuscules à peine visibles à l'oeil nu

Le premier de ces inconvénients est lié à la "plasticité phénotypique" des *Brucella*, particulièrement *B. abortus* (33), au niveau des caractères pris en compte pour l'identification des espèces et des biovars. Cette instabilité des phénotypes fait périodiquement l'objet de publications qui décrivent des souches atypiques par rapport au schéma de classification (parmi les plus récentes : 5, 17 et 44). L'analyse globale du profil inhabituel, portant sur l'ensemble des caractères, permet toutefois de rattacher la plupart de ces souches atypiques à un biovar existant. (5, 44). Plus rarement, l'ambiguïté du profil s'oppose à une détermination précise. C'est le cas, par exemple, de certaines souches de *B. abortus* isolées au Canada et aux Etats-Unis dont les caractères sont intermédiaires entre ceux des biovars 2 et 4 de cette espèce (17). Quoiqu'il en soit, dans la mesure où elles ne résultent pas de l'étude de cultures impures, ces variations ont, en tant que marqueurs épidémiologiques, un intérêt évident (43) qui compense les difficultés qu'elles peuvent occasionner au niveau de l'identification.

Tableau 2. Epreuves de différenciation des biovars de *Brucella*

Espèce	Biovar	Exigence en CO <sub>2</sub>	Production d'H <sub>2</sub> S	Croissance en présence de		Agglutination par les sérums	
				Thionine <sup>a</sup>	Fuschine basique <sup>a</sup>	A <sup>b</sup>	M <sup>b</sup>
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+
	2	-	-	+	+	+	-
	3	-	-	+	+	+	+
<i>B. abortus</i>	1	+c	+	-	+	+	-
	2	+c	+	-	-	+	-
	3	+c	+	+	+	+	-
	4	+c	+	-	+d	-	+
	5	-	-	+	+	-	+
	6	-	-	+	+	+	-
	9	+ou-	+	+	+	-	+
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	-e	+	-
	2	-	-	+	-	+	-
	3	-	-	+	+	+	-
	4	-	-	+	-f	+	+
	5	-	-	+	-	-	+
<i>B. neotomae</i>	-	+	-g	-	+	-	
<i>B. ovis</i>	+	-	+	-f	-	-	
<i>B. canis</i>	-	-	+	-f	-	-	

<sup>a</sup> Concentration de colorant, 20 µg/ml de milieu sérum dextrose agar (1 : 50 000)

<sup>b</sup> A = sérum monospécifique anti-A; M = sérum monospécifique anti-M

<sup>c</sup> Positive pour la plupart des souches

<sup>d</sup> Quelques souches isolées au Canada, en Grande Bretagne et aux USA sont inhibées par la fuschine basique

<sup>e</sup> Quelques souches résistantes à la fuschine basique ont été isolées en Amérique du Sud et dans le sud-est asiatique

<sup>f</sup> Négative pour la plupart des souches

<sup>g</sup> Croissance à une concentration en thionine de 10 µg/ml (1 : 100 000)

Le deuxième inconvénient est lié à la nature subjective des critères de la définition de l'espèce chez les *Brucella*. Ceux-ci basés essentiellement sur des similitudes phénotypiques et sur l'hôte naturel préférentiel, ne pouvaient que soulever des controverses concernant la classification de certains taxons. Ainsi, les souches de *Brucella* rough isolées chez le chien ont été proposées soit comme biovar de *B. suis* (32), soit comme espèce nouvelle sous le nom de *B. canis* (10). Le Sous-Comité de la Taxonomie des *Brucella* a finalement entériné la deuxième proposition et la nature de l'hôte animal, le chien, a lourdement pesé dans sa décision. Par contre, le même Sous-Comité considère que les souches de *Brucella* isolées chez le renne constituent le biovar 4 de *B. suis* (11) alors que les auteurs soviétiques les proposent comme membres d'une espèce nouvelle, *B. rangiferi*, sur la base de l'hôte animal préférentiel (37). Ces 2 exemples illustrent bien le fait que, faute de critères scientifiques, la classification phénotypique des *Brucella* est incapable de dégager une définition objective de l'espèce, assortie d'une nomenclature reconnue par tous.

Enfin, troisième inconvénient, cette classification, faute de marqueurs phylogénétiques, ne rend nullement compte de l'évolution et des relations taxonomiques entre les différents groupes (espèces et biovars) actuellement définis au sein du genre *Brucella*.

Le caractère très pathogène des *Brucella* n'a pas incité les biologistes moléculaires à s'intéresser d'emblée à ces bactéries. Aussi est-ce avec retard, lorsque les "brucellistes" ont pris conscience de l'impuissance de la classification phénotypique traditionnelle à répondre à toutes leurs questions, que peu à peu les techniques de la taxonomie moléculaire ont été appliquées aux *Brucella*.

### **Le génome des *Brucella* : homogénéité et polymorphisme**

La première mention d'une application des techniques de la biologie moléculaire aux *Brucella* remonte à 1960, lorsque Belozersky et Spirin rapportent, pour une souche de *B. abortus*, un pourcentage moyen guanine + cytosine (GC %) égal à 57,9 (6). Depuis, la mise en oeuvre de techniques de plus en plus sophistiquées, allant des hybridations ADN - ADN jusqu'à l'utilisation toute récente de sondes oligonucléotidiques clonées, a dévoilé la structure du génome des *Brucella* et en a précisé tout à la fois l'homogénéité, qui est remarquable, et le degré de polymorphisme interne.

#### **Composition de l'ADN en bases nucléiques**

Le génome des *Brucella* a d'abord été exploré sous l'angle de sa composition en bases nucléiques qui a fait l'objet de quelques travaux publiés pour l'essentiel entre 1960 et 1968 (13). Ceux-ci généralement limités à l'étude de quelques souches, ont tous conclu à la grande homogénéité des 6 espèces du genre *Brucella* caractérisées par un GC % compris entre 55 et 58. Une étude plus récente de De Ley *et al* confirme cette homogénéité mais fait état, pour les 12 souches de *Brucella* étudiées (4 *B. abortus*, 3 *B. melitensis*, 2 *B. suis*, 1 *B. ovis*, 1 *B. canis* et 1 *B. neotomae*), de valeurs de GC % comprises entre 57,9 et 59,3 donc légèrement supérieures à celles publiées entre 1960 et 1968 (16).

#### **Taille du génome**

La connaissance de la taille du génome des *Brucella* est relativement récente. Les quelques valeurs publiées, résultant soit d'une mesure précise du poids moléculaire calculé d'après les taux de renaturation de l'ADN dénaturé (16) soit d'une estimation de la taille en kilobases (Kb) à partir d'un profil de restriction (1), traduisent une très grande homogénéité entre les 6 espèces de *Brucella*. Les poids moléculaires des ADN de 8 souches, représentatives de ces dernières, s'échelonnent en effet dans un éventail très étroit de valeurs allant de  $2,37 \times 10^9$  à  $2,82 \times 10^9$  (moyenne  $2,61 \times 10^9 \pm 8 \%$ ), indiquant selon De Ley *et al* que le genre *Brucella* ne contient qu'une seule espèce (16). Allardet-Servent *et al*, à partir de l'analyse de restriction des ADN de *B. abortus* 544 et de *B. melitensis* 16M digérés par l'endonucléase *Xba*I, estiment à environ 2600 Kb la taille du génome des 2 espèces (1). Dans une étude plus récente (2), les mêmes auteurs réévaluent à 3130 Kb la taille du génome de *B. melitensis* 16 M, ce qui correspond à un poids moléculaire approximatif de  $1,9 \times 10^9$ .

#### **Homologie des séquences polynucléotidiques de l'ADN**

En 1968, pour la première fois, Hoyer et McCullough appliquent aux *Brucella* la méthodo-



logie de l'hybridation ADN-ADN (25, 26). Ces auteurs, utilisant des techniques d'hybridation compétitive sur support solide (agar et filtre de nitrocellulose), montrent que les 6 souches qui constituent leur échantillon, une de chaque espèce de *Brucella*, présentent une très grande similitude de structure génomique. En effet, dans les limites de sensibilité des techniques compétitives utilisées, aucune différence ne peut être décelée entre les séquences polynucléotidiques des ADN de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae* et *B. canis*. Par contre l'efficacité compétitive légèrement plus faible, de l'ordre de 6 à 7 %, de l'ADN de *B. ovis* suggère que celui-ci est dépourvu d'une petite proportion des séquences présentes dans les ADN des 5 autres espèces mais qu'il partage néanmoins avec ces derniers une similitude supérieure à 90 %. Le travail de Hoyer et Mc Cullough a malheureusement eu un impact limité sur la taxonomie du genre *Brucella*, probablement parce que la technologie de l'hybridation ADN-ADN et son interprétation n'avaient pas alors atteint l'état de développement qu'elles ont maintenant et aussi parce que l'étude portait sur un nombre très restreint de souches dont deux seulement de référence (*B. melitensis* 16 M et *B. canis* RM 6/66).

Près de 20 ans s'écoulent ensuite avant qu'une méthode d'hybridation ADN-ADN en solution (à la nucléase S1) soit appliquée à 51 souches de *Brucella* représentatives des 6 espèces et de leurs biovars, en vue de mesurer leur pourcentage d'homologie génomique ainsi que la stabilité thermique ( $\Delta T_m$ ) de l'ADN des hybrides (45). Les résultats montrent que toutes les souches forment un seul groupe d'hybridation ADN-ADN caractérisé par (a) un pourcentage relatif moyen de réassociation égal à  $96 \pm 5\%$  avec des  $\Delta T_m$  inférieurs à 1°C entre l'ADN de référence radioactif de la souche type *B. melitensis* 16M et les ADN non marqués des 50 autres souches, (b) des pourcentages d'homologie supérieurs à 87 % entre les souches types des 6 espèces conventionnelles (hybridations réciproques). Par contre, cette étude ne confirme pas la faible délétion décelée dans le génome d'une souche de *B. ovis* par Hoyer et Mc Cullough (25, 26).

Plus récemment De Ley *et al.*, utilisant une méthode spectrophotométrique de mesure de l'homologie de l'ADN montrent que celle-ci est, entre les 12 souches de *Brucella* étudiées, représentatives des 6 espèces, voisine de 100 % (16).

L'ensemble de ces travaux indique donc sans ambiguïté que les membres de toutes les espèces du genre *Brucella* constituent un groupe d'hybridation ADN-ADN remarquablement homogène, assimilable à une seule et même espèce (16, 45).

### Homologie des séquences polynucléotidiques de l'ADN et de l'ARN ribosomal (ARNr)

Le degré d'homologie entre ADN et ARNr est généralement exprimé par deux paramètres (16) : la *stabilité thermique des hybrides* ou  $T_{m(e)}$  c'est-à-dire la température à laquelle 50 % de ceux-ci sont dénaturés et le *pourcentage d'ARN lié* c'est-à-dire la quantité en microgrammes ( $\mu g$ ) d'ARN marqué hybridé à 100  $\mu g$  d'ADN fixé sur le filtre, après traitement par la ribonucléase. Calculés pour l'ADN de 12 souches représentatives, hybridé avec l'ARNr marqué de *B. abortus* 544, ils confirment l'étroite parenté génomique des *Brucella* caractérisées par des  $T_{m(e)}$  compris entre 79,2 et 80,5°C et des pourcentages d'ARN lié entre 0,166 et 0,188 % (16).

### Les profils de restriction enzymatiques

L'électrophorèse des fragments générés par la digestion de l'ADN total des bactéries par les

endonucléases de restriction a été proposée pour différencier les souches ou les espèces. Cette méthode appliquée à l'ADN des *Brucella* dans quelques laboratoires (4, 30, 35, 36, 48) a permis, dans quelques cas, de détecter de petites différences entre souches, au niveau de certaines bandes. Malheureusement, chez les *Brucella*, comme chez la plupart des bactéries, le nombre de fragments d'ADN générés par les endonucléases classiques, à haute fréquence de coupure, est généralement trop élevé pour que le profil électrophorétique soit aisément lisible et donc sérieusement interprétable. Il ne s'agit donc pas, excepté pour les bactéries ayant un génome de petite taille, d'un outil taxonomique idéal. Quoiqu'il en soit, les résultats de ce type d'analyse font apparaître une similitude globale des profils des 6 espèces de *Brucella* qui confirme leur très étroite parenté génomique.

Récemment Allardet-Servent *et al* (1) ont étudié le génome des *Brucella* coupé par *Xba*I, une enzyme à basse fréquence de clivage, puis séparé les fragments d'ADN par la technique d'électrophorèse en champ pulsé. Leurs résultats font apparaître pour la souche type de chacune de 5 des 6 espèces de *Brucella*, un profil spécifique. Cependant le nombre de souches étudiées est très limité et les auteurs eux-mêmes écrivent que leurs résultats, bien qu'ils confirment l'utilisation de l'hôte naturel comme critère phénotypique de classification des *Brucella*, ne sont pas suffisants pour invalider la proposition faite par d'autres (45) de ne reconnaître qu'une seule espèce au sein de ce genre bactérien.

#### **Profils de restriction des gènes codant pour les acides ribonucléiques ribosomaux**

L'utilisation des profils de restriction des gènes codant pour les acides ribonucléiques ribosomaux s'est révélée très utile pour la taxonomie intragénérique de nombreuses bactéries et tout spécialement comme critère objectif de la définition de l'espèce (22). Un profil caractéristique d'un groupe de souches est en effet généralement corrélé avec un pourcentage d'homologie ADN-ADN très élevé et un taux de divergence génomique ( $\Delta T_m$ ) quasiment nul. Cette méthode a été appliquée à toutes les souches types et de référence des espèces et biovars de *Brucella*. Après clivage par diverses endonucléases puis électrophorèse en gel d'agarose, les fragments d'ADN ont été transférés sur des filtres de nylon. Ceux portant les gènes codant pour les ARN ribosomaux ont été localisés sur les filtres par hybridation avec un ARNr 16 + 23 S de *Escherichia coli* marqué au <sup>32</sup>P. Toutes les espèces et biovars de *Brucella* présentent un profil unique de restriction pour chaque enzyme utilisé (*Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Sma*I et *Xho*I) (23, 46), confirmant ainsi leur très grande homogénéité génomique.

#### **L'analyse du polymorphisme du génome des *Brucella* par l'utilisation de sondes oligonucléotidiques clonées**

La remarquable homogénéité génomique des *Brucella*, qui ressort des travaux qui viennent d'être présentés, a naturellement orienté les chercheurs vers les techniques de clonage et de séquençage du génome, plus aptes à détecter de petites différences entre espèces et/ou biovars.

#### **Sondes oligonucléotidiques clonées au hasard**

Tompkins *et al.* ont proposé l'utilisation de fragments d'ADN chromosomiques clonés au hasard comme sondes pour le typage moléculaire des bactéries (41). Cette méthode a été appliquée récemment à 112 souches de *Brucella* représentatives des 6 espèces

conventionnelles et de tous leurs biovars (23). Des fragments d'ADN (10-20 Kb) de *B. melitensis* 16M ont été clonés au hasard dans le vecteur phagique Lambda EMBL3 et utilisés comme sondes radioactives (32P) pour visualiser des profils de restriction de l'ADN des *Brucella*, après clivage de l'ADN total par *Bam*HI, transfert de Southern, hybridation et autoradiographie. Trente clones phagiques recombinants ont été sélectionnés et hybridés avec l'ADN clivé des 112 souches de *Brucella* testées. La majorité des clones (20 sur 30) donne chacun un unique profil de restriction - *Bam*HI pour les 112 ADN, ce qui confirme l'étonnante homogénéité génomique des *Brucella*. Les 10 autres clones par contre permettent chacun de visualiser 3 à 12 profils de restriction différents au sein des 112 ADN testés. Certains profils sont en corrélation avec un ou plusieurs biovars de la classification conventionnelle et parfois, au sein d'un même biovar, avec une origine géographique déterminée, associée à une réponse inhabituelle des souches correspondantes aux épreuves classiques de typage. Ces sondes ont un intérêt évident pour l'identification des *Brucella*. Quatre d'entre elles, suffisantes en pratique pour différencier les espèces et biovars les plus courants, sont en cours de marquage par l'acetylaminofluorène afin de rendre accessible aux laboratoires de référence le système de typage proposé. Sur un plan plus fondamental, ces résultats soulignent comme chez *Legionella pneumophila* (42), la supériorité de ce type de sondes clonées sur la sonde universelle ARNr 16 + 23 S pour détecter un polymorphisme au sein de souches de bactéries génomiquement très homogènes.

#### ***Polymorphisme du locus BCSP31***

BCSP 31 (40) est une protéine immunogène de la surface des *Brucella*, d'une masse moléculaire de 31 KDa, qui est très conservée chez les espèces du genre. Seul *B. ovis* n'en exprime pas de quantités décelables (8). Une étude récente de Halling et Zehr montre que ce manque apparent d'expression est corrélé avec la présence d'une séquence d'insertion hautement répétitive au niveau du locus BCSP31 de cette espèce (24). Brièvement, les ADN de 12 souches de *B. ovis* ont, après digestion par *Hind*III et transfert de Southern, été hybridés avec un fragment *Hind*III cloné de 1,3 Kb codant pour la BCSP 31 de *B. abortus*. La sonde hybride avec les 12 ADN au niveau d'un fragment *Hind*III de 1,6 Kb, ce qui montre, qu'en dépit d'un manque d'expression décelable, le gène BCSP 31 est présent chez *B. ovis* mais sur un plus grand fragment de restriction *Hind*III. Le même type d'analyse révèle que celui-ci est lui-même contenu dans un fragment *Eco*RI de 5,1 Kb alors que, chez *B. abortus*, le fragment *Eco*RI correspondant, qui comporte la séquence *Hind*III de 1,3 Kb codant pour BCSP31, ne mesure que 4,2 Kb. La cartographie de restriction du fragment *Eco*RI de 5,1 Kb de *B. ovis*, cloné dans le vecteur plasmidique pUC12, confirme que le polymorphisme est dû à la présence d'une séquence d'insertion d'environ 0,9 Kb située immédiatement en aval de la région codant pour BCSP31.

L'utilisation comme sonde du fragment polymorphique *B. ovis* - *Hind*III de 1,6 Kb vis-à-vis des ADN de *B. ovis* et de *B. abortus* clivés par *Hind*III révèle respectivement dans les 2 espèces au moins 24 et 6 fragments d'hybridation. Le caractère hautement répétitif de l'ADN inséré et son nombre variable de copies entre les 2 espèces suggèrent aux auteurs qu'ils ont découvert un élément mobile du génome des *Brucella*, source possible d'instabilité génomique mais aussi outil potentiel de différenciation de *B. abortus* et de *B. ovis*.

#### ***Polymorphisme du locus omp2***

Le locus *omp2* de *B. abortus* code pour une protéine majeure (36 KDa) de la membrane

externe. Il contient 2 gènes présentant une grande homologie, omp2a et omp2b, orientés en sens contraire et séparés par 900 paires de bases (18, 19). Chez *B. abortus*, le locus omp2 réside au niveau d'un fragment *Bam*HI de 6,5 Kb. La digestion de celui-ci par *Pst*I génère 7 fragments de restriction dont deux, de 650 et 880 pb, respectivement situés dans omp2a et omp2b, permettent de différencier ces 2 gènes. Ficht *et al.* (21) ont mis à profit cette particularité de la carte de restriction du locus omp2 de *B. abortus* pour analyser l'arrangement des 2 gènes dans les souches de référence des 6 espèces de *Brucella* et de tous les biovars de *B. abortus*. Les ADN de celles-ci ont, après digestion par *Bam*HI ou par *Pst*I, puis transfert de Southern, été hybridés avec des sondes constituées soit par le locus omp2 complet de *B. abortus* (cloné dans le plasmide pBR322), soit par certains de ses fragments, 350, 550, 650 et 880 pb. Les résultats indiquent que toutes les souches de *Brucella* testées ont conservé le locus omp2 sur un fragment *Bam*HI de 6,5 Kb et que l'arrangement des 2 gènes constitutifs en est identique. L'existence d'un polymorphisme interne permet néanmoins de subdiviser les 6 espèces en 5 groupes. Les biovars de *B. abortus* se répartissent dans les groupes 1 (biovars 1, 2 et 4) et 2 (biovars 3, 5, 6 et 9). *B. melitensis* est la seule représentante du groupe 3. *B. suis*, *B. canis* et *B. neotomae* constituent le groupe 4, et *B. ovis* le groupe 5. Il apparaît que les *Brucella* des groupes 2, 3, 4 et 5, toutes résistantes à la thionine, possèdent dans le gène omp2a une séquence de 120 paires de bases que n'ont pas les *Brucella* du groupe 1, sensibles à ce colorant. L'analyse du polymorphisme révèle aussi que les 2 gènes du locus omp2 de *B. ovis* ont des séquences de type omp2a, orientées en sens contraire, et que l'ADN de cette espèce est dépourvu des séquences spécifiques de omp2b.

### Implication des données de la biologie moléculaire sur la classification et la nomenclature des *Brucella*

Mandel a écrit que "like cigars, a good species and a good classification is one which satisfies (29). Il est indéniable que la classification phénotypique des *Brucella* en 6 espèces, est d'une certaine manière, lorsqu'elle est appliquée à des cultures pures, un excellent cigare. Néanmoins si l'on croit que la taxonomie est une science, il convient que la nomenclature soit en accord avec cette science. Or, aujourd'hui, les données de la biologie moléculaire remettent en cause le découpage du genre *Brucella* en 6 espèces distinctes. Celles-ci, compte tenu de leur très étroite parenté génomique, reconnue par tous les auteurs, sont plutôt des biovars ou groupes de biovars au sein d'une espèce unique, *B. melitensis*, dont les épithètes *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* et *B. canis* sont des synonymes subjectifs. Nous avons donc, sur la base des pourcentages d'homologie très élevés (>90%) et des valeurs de  $\Delta T_m$  excessivement faibles (<1°C), proposé qu'une seule espèce, *B. melitensis* soit reconnue au sein du genre *Brucella* et que les autres épithètes spécifiques soient dorénavant utilisés pour la désignation des biovars et, comme tels, écrits en caractères romains, par exemple *B. melitensis* biovar Abortus 1 (45). Cette proposition à laquelle souscrivent pleinement De Ley *et al.* (16) est par contre vigoureusement combattue par d'autres auteurs qui assurent qu'elle a rencontré une opposition considérable (20) ou encore la qualifient de "terribly misleading" (34). Ceci est d'autant plus paradoxal que les mêmes auteurs soulignent par ailleurs "the exquisite closeness of the genetic relationship among all *Brucellae*" (34).

Ces réactions illustrent bien le fait qu'en matière de taxonomie bactérienne il y a parfois loin d'une convergence sur le fond - ici, l'extraordinaire homogénéité génomique des *Brucella* - à l'élaboration d'une nomenclature adaptée, reconnue par tous. C'est là l'une des

faiblesses de la taxonomie, science plus que d'autres menacée par la subjectivité. Nous pensons que le polymorphisme réel mais ponctuel, décelé par les outils les plus fins de la biologie moléculaire (a) ne contredit nullement l'homogénéité génomique globale de l'ADN des *Brucella*, qui est remarquable, (b) est plus en corrélation avec le concept de biovar qu'avec celui d'espèce. Aussi, en accord avec la définition de l'espèce bactérienne, largement admise aujourd'hui, fondée sur les caractéristiques "objectives" de l'ADN génomique (taille, GC%, homologie,  $\Delta T_m$ ) (7), la reconnaissance d'une seule espèce, *B. melitensis*, au sein du genre *Brucella* est une solution taxonomique raisonnable qui ne nie nullement par ailleurs la réalité des anciennes espèces en tant qu'entités pathogéniques et épidémiologiques.

## Références

1. Allardet-Servent A., Bourg G., Ramuz M., Pages M., Bellis M. & Roizes G. 1988. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. J. Bacteriol. 170:4603-4607.
2. Allardet-Servent A., Carles-Nurit M.J., Bourg G., Michaux S. and Ramuz M. 1991. Physical map of the *Brucella melitensis* 16M chromosome. J. Bacteriol. 173:2219-2224.
3. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. and Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Inra, Paris.
4. Bailey K.M. and West D.M. 1987. Restriction endonuclease (*EcoRI*) analysis of *Brucella ovis* DNA. New Zealand Vet. J. 35:161:162.
5. Banai M.M., Mayer I. and Cohen A. 1990. Isolation, identification and characterization in Israël of *Brucella melitensis* biovar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. J. Clin. Microbiol. 28:1057-1059.
6. Belozersky A.N. et Spirin A.S. 1960. In E. Chargaff and J.N. Davidson (ed.), The nucleic acids, vol.3, p.147. Academic Press, New York.
7. Brenner D.J. 1981. Introduction to the family *Enterobacteriaceae*, p 1105-1127. In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows and H.G. Schlegel (ed.), The Prokaryotes. A handbook on habitat, isolation and identification of bacteria, vol.2. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
8. Bricker B.J., Tabatabai L.B., Deyoe B.L. and Mayfield J.E. 1988. Conservation of antigenicity in a 31-KDa *Brucella* protein. Vet. Microbiol. 18: 313-325.
9. Bruce D. 1887. Note on the discovery of a microorganism in Malta fever. the Practitioner, 39:161-170.
10. Carmichael L.E. and Bruner D.W. 1968. Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortion. Cornell Vet., 58:579-592.
11. Corbel M.J. 1982. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on Taxonomy of *Brucella*. Minutes of the Meeting, 4 and 5 september 1978. Int. J. Syst. Bacteriol., 32:260-261.
12. Corbel M.J. 1984. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on Taxonomy of *Brucella*. Minutes of the Meeting, 10 August 1982. Int. J. Syst. Bacteriol., 34:366-367.
13. Corbel M.J. 1985. DNA analysis of *Brucella* : present and future, p. 21-27. In J.M. Verger and M. Plommet (ed.), Martinus Nijhoff Publ., The Hague.
14. Corbel M.J. 1988. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. Report of the Meeting, 5 September 1986. Int. J. Syst. bacteriol., 38:450-452.

15. Corbel M.J. and Brinley-Morgan W.J. 1984. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL, p. 377-388. In N.R. Krieg et J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol.1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
16. De Ley J., Mannheim W., Segers P., Lievens A., Denijn M., Vanhoucke M. and Gillis M. 1987. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC groupe Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:35-42.
17. Ewalt D.R. and Forbes L.B. 1987. Atypical isolates of *Brucella abortus* from Canada and the United States characterized as dye sensitive with M antigen dominant. *J. Clin. Microbiol.*, 25:698-701.
18. Ficht T.A., Bearden S.W., Sowa B.A. and Adams L.G., 1988. A 36-Kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA. *Infect. Immun.* 56:2036-2046.
19. Ficht T.A., Bearden S.W., Sowa B.A. and Adams L.G. 1989. DNA sequence and expression from the 36KDa outer membrane protein gene locus of *B. abortus*. *Infect. Immun.* 57:3282-3291.
20. Ficht T.A., Bearden S.W. and Marquis H. 1990. Phylogenetic markers to describe the *Brucellae*, p.36-52. In L.G. Adams (ed.), *Advances in Brucellosis research*, Texas A & M University Press, College Station.
21. Ficht T.A., Bearden S.W., Sowa B.A. and Marquis H. 1990. Genetic variation at the omp2 porin locus of the *Brucellae* : species-specific markers. *Mol. Microbiol.*, 4:1135-1142.
22. Grimont F. and Grimont P.A.D. 1986. Ribosomal ribonucleic acid genes restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 137B:165-175.
23. Grimont F., Verger J.M., Cornelis P., Limet J., Lefevre M., Grayon M., Regnault B., Van Broeck J. and Grimont P.A.D. 1991. Molecular typing of *Brucella* with cloned DNA probes. *Res. Microbiol.* (sous presse).
24. Halling S.M. and Zehr E. 1990. Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly r repeated DNA. *J. Bacteriol.* 172:6637-6640.
25. Hoyer B.H. and Mc Cullough N.B. 1968. Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids. *J. Bacteriol.* 95:444-448.
26. Hoyer B.H. and Mc Cullough N.B. 1968. Homologies of deoxyribonucleic acids from *Brucella ovis*, canine abortion organism, and other *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 96:1783-1790.
27. Jones L.M. 1967. Report to the International Committee on Nomenclature of Bacteria by the Subcommittee on Taxonomy of *Brucellae*. Minutes of Meeting, July 1966. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 17:371-375.
28. Jones L.M. and Wundt W. 1971. International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. Minutes of Meeting, 7 August 1970. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21:126-128.
29. Mandel M. 1969. New approaches in bacterial taxonomy : perspective and prospects. *Annu. Rev. Microbiol.*, 23:239-275.
30. McGillivray D.J., Webber J.J. and Edwards L.D. 1988. Restriction endonuclease analysis of *Brucella abortus*. *Res. Vet. Sci.* 45:251-252.
31. Meyer K.F. and Shaw E.B. 1920. A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*. *Studies on the genus Brucella nov. gen. J. inf. dis.*, 27:173-184.
32. Meyer M.E. 1969. *Brucella* organisms isolated from dogs : comparison of characteristics of members of the genus *Brucella*. *Amer. J. Vet. res.* 30:1751-1756.
33. Meyer M.E. 1976. Evolution and taxonomy in the genus *Brucella* : contemporary

- evolutionary status of the species *Brucella abortus*. Amer. J. vet. Res. 37:203-205.
34. Meyer M.E. 1990. Evolutionary development and taxonomy of the genus *Brucella*, p. 12-35. In L.G. Adams (ed.), Advances in brucellosis research, Texas A & M University Press, College Station.
  35. Muzny D.M., Ficht T.A., Templeton J.W. and Adams L.G. 1989. DNA homology of *Brucella abortus* strains 19 and 2308. Am. J. Vet. Res. 50:655-661.
  36. O'Hara M.J., Collins D.M. and De Lisle G.M. 1985. Restriction endonuclease analysis of *Brucella ovis* and other *Brucella* species. Vet. Microbiol. 10:425-429.
  37. Pinigin A.F., Petukhova O.S. and Merinov S.P. 1983. Taxonomic status of *Brucella* strains from reindeer. Zh Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., n°11:103-105.
  38. Skerman V.B.D., Mc Gowan V. and Sneath P.H.A. (ed.) 1980. Approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol. 30:225-420.
  39. Stableforth A.W. and Jones L.M. 1963. Report of the Subcommittee on Taxonomy of the genus *Brucella*. Speciation in the genus *Brucella*. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 13:145-148.
  40. Tabatabai L.B., Deyoe B.L. and Ritchie A.E. 1979. Isolation and characterization of toxic fractions from *Brucella abortus*. Infect. Immun., 26:668-679.
  41. Tompkins L.S., Troup N., Labigne-Roussel A. and Cohen M.L. 1986. Cloned random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species. J. Infect. dis., 154:156-162.
  42. Tram C., Simonet M., Nicolas M.H., Offredo C., Grimont F., Lefevre M., Ageron E., Debure A. and Grimont P.A.D. 1990. Molecular typing of nosocomial isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 3. J. Clin. Microbiol., 28:242-245.
  43. Verger J.M. 1977. Identification et typage des *Brucella* : intérêt épidémiologique. In "Primera reunion nacional sobre brucellosis", Sociedad Espanola de Microbiologia (ed.), p.69-91, Sever Cuesta, Valladolid.
  44. Verger J.M. et Grayon M. 1984. Caractéristiques de 273 souches de *Brucella abortus* d'origine africaine. Dev. Biol. Stand. 56:63-71.
  45. Verger J.M., Grimont F., Grimont P.A.D. and Grayon M. 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int. J. syst. Bacteriol. 35:292-295.
  46. Verger J.M., Grimont F., Grimont P.A.D. and Grayon M., 1987. Taxonomy of the genus *Brucella*. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138:235-238.
  47. Wundt W. and Brinley-Morgan W.J. 1975. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on Taxonomy of *Brucella*. Minutes of the Meeting, 3 September 1974. Int. J. Syst. Bacteriol., 25:235-236.
  48. Zehr E.S. and Halling S.M. 1990. A comparison of proteins and genomic DNA of species and biovars of *Brucella*, p.477-478. In L.G. Adams (ed.), Advances in brucellosis research, Texas A & M University Press, College Station.

# Evolution of *Brucella*

E. Moreno

Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

## Abstract

This paper speculates on the time of divergence between an ancestral Proteobacterium of the alpha-2 subdivision, living in close association with eukaryotic cells, and the present *Brucella* species. The association of this lineage with eukaryotic cells seems to be related to ancestral properties which can be reconstructed according to the present characteristics of the group.

An evolution of the brucellar phenotype and genotype is proposed. The pathogenic mechanisms mediated by *Brucella abortus* may due not so much to exotoxins, plasmids, capsules, endotoxins, resistant forms, thick cell walls or antigenic variation, but rather it may have developed as a consequence of the close interaction established during million of years between the evolving bacteria and host cells.

Epidemiological, clinical and immunological evidence reveals a good equilibrium between brucellas and preferred host.

## Introduction

Since the first *Brucella* species was isolated by Bruce in 1887 from patients dying of "Malta fever", the taxonomic and phylogenetic position of the genus has remained controversial (18, 19). According to a recent comparison of 16S rRNA sequences (33, 77), rRNA cistron similarity (22), and membrane lipid comparison (13, 77), *Brucella* species are closer to bacteria associated with eukaryotic cells of the genera *Rochalimaea*, *Ochrobactrum*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Phyllobacterium* than to phototrophic and other free-living chemo-organotrophic organisms of the alpha-2 subdivision of the Class Proteobacteria (95).

Nucleic acid hybridization studies have suggested that members of the genus *Brucella* comprise a single species, *B. melitensis*. All other specific epithets could apply only to a vernacular biovar designation (22, 101).

However, DNA restriction fragment studies of the brucellar genome (1, 39, 81) have supported the conventional taxonomy based on host preference, antigenic structure, phage typing and metabolic characteristics.

The time of divergence between the brucellae-rochalimae-rhizobiae-agrobacteria ancestor to the present animal- and plant-associated procaryotic organisms may be related to ancestral properties harboured by the bacterial group.

The pathogenic mechanisms of *Brucella* organisms in their natural hosts may have resulted from a close interaction between the evolving bacteria and host cells over millions of years.



## Methods

### Construction of phylogenetic trees and dendrograms.

A phylogenetic tree based on 16S rRNA catalogues or sequences of the class Proteobacteria of the alpha-2 subdivision was constructed following the criteria of Woese (107, 108), using 'Sab' values from published works (41, 95) or deriving them from their putative T-resistant oligonucleotides of the 16S rRNA sequence (21, 33, 77, 103, 104, 109).

Table 1. Phenotypic characteristics of *Brucella* spp. used to construct dendograms\*.

Characteristic	References
Type	Number
Lipopolysaccharide sugars	perosamine, quinovosamine and core type(b) (6, 70, 75)
Phage susceptibility	TB/RTD and TB/RTD10 (56, 110)
Outer membrane proteins	class a, o, c and m (44, Santos et al. 1984)
Skin reaction(c)	class a/m/s/c and o (57)
Immunoelectrophoretic patterns(d)	class a, m, s, n, c, o and a/m/s/c (29, 31, 42)
DNA Xba1 restriction maps	class a, m, s, s, c, o, a/m, a/m/s/c and s/c (1)
DNA Hind III restriction maps	class o, and a/m/s/c (81)
DNA omp 2 locus restriction maps	sites P1P, EP, KP, P, PK, PE, PP1 (39)
DNA polymorphism	class o and a/m/s/c (49)
Oxidative utilization of substrates	DL-ornithine, DL-citruline, L-arginine, L-ribose, D-glucose and L-erythritol (19, 56, 110)
Phospholipid fatty acids	C15:0, C16:1, C17:0 and 19:0 cyclic (16, 27, 28, 97)
31Kd protein epitope	types o and a/m/s/n/c (7)
Others	oxidase, nitrate reduction, and urease (19, 56, 110)

\* See Fig. 2, types *B. abortus* (a), *B. melitensis* (m), *B. suis* (s), *B. neotomae* (n), *B. canis* (c) and *B. ovis*

(b) Perosamine is present in the O chain (70) while quinovosamine is part of the core polysaccharide (75). The core type has been characterized immunochemically (75).

(c) The skin reaction with *B. ovis* extracts could be dissociated from those produced by other brucellae extracts.

(d) Immunoelectrophoresis with homologous antisera is always stronger than with heterologous antisera.

Table 2. Characteristics of eucaryotic cell associated *Proteobacteria*\*.

Characteristic	<i>Brucella</i>	<i>Rochalimaea</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Agro-bacterium</i>	<i>Ochro-bactrum</i>	<i>Bradyr-hizobian</i>	<i>Esche-richia</i>
<b>GENOTYPIC</b>							
Proteobacteria 16SrRNA Tm(e) with <i>Brucella</i> RNA DNA hybridization with <i>Brucella</i>	alpha-2 80	alpha-2 ?(b)	alpha-2 72	alpha-2 73	alpha-2 78	alpha-2 68	gamma-3 53
Genome size x 10 <sup>6</sup> bp	2.6	2.3	5.5	6.0	3.5	6.3	4.7
Mol % guanine + cytosine	58-59	39-40	61-62	60-61	56-59	63-64	48-50
Number of plasmids	0	0	1-2	1-2	?	1-2	1-40
Bacteriophages	+	-	+++	+++	?	++	+++
Lysogenic bacteriophages	-	-	+++	+++	?	+++	+++
Plasmid size (100 x Kb)	-	-	2-10	1-3	+(?)	2-6	0.2-0.3
Transformation efficiency	+	+	+++	+++	?	+	++
Genetic variability	+	+/-	+++	+++	+++	+++	++
Recurrent DNA segments	+	+	+++	+++	?	+++	++
Approx number of strains	6-20	2	>100	>100	56	>100	50-80
Generation time (hours)	2.5-3	4-7	1-2	1-3	1-2	1-3	0.2-0.5
<b>CELL ENVELOPE</b>							
Flagella	-	-	+c	+	+	+c	+++
Exopolysaccharide	-	-	+++	+++	-	+++	+/-
Periplasmic cycloglucan	+++	+++	+++	+++	?	+++	-
Cytochrome c size	medium	?	medium	medium	?	medium	small
Cu++Zn++SOD	++	?	++	++	?	(+)	-
Catalase	+	-	+	+	+	+	-
Ubiquinone	Q10	-	Q10	Q10	Q10	Q10	Q8
Ornithine-containing lipid	+++	?	+++	+++	+++	+++	-
LPS core heptose	-	?	+/-	+/-	?	-	+
Lipid A backbone sugars	GlcN, DAG	?	GlcN	GlcN	?	GlcN, DAG	GlcN
<b>Lipid A fatty acids</b>							
amide-linked OH-C12:0	++	?	++	+	?	+	-
amide-linked OH-C14:0	++	++	++	++	+++	++	+++
amide-linked OH-C16:0	++	?	++	++	?	+	-
ester-linked OH-C18:0	+	?	+	+	?	+	-
ester-linked OH-C28:0	++	?	++	++	?	++	-
ester-linked C16:0	+++	?	+++	+	++	++	-
ester-linked C18:0	+	?	+	+	?	++	-
ester-linked acyl-oxyacyl	-	?	-	-	?	-	+
<b>Phospholipid fatty acids</b>							
C18:1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+/-
Cyclic C19:0	+++	+	+++	+++	+++	+++	-
Phosphatidylcholine	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<b>METABOLISM</b>							
O <sub>2</sub> requirements	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
CO <sub>2</sub> requirements	+	+	+	+	?	+	-
Nitrate reduction	+	-	-	+	+	-	+
Acid produced from ASS	+/-	-	+++	+++	+++	+++	+++
Gas production	-	-	-	-	-	-	+
Utilization of aminoacids	+/-	+/-	+++	+++	+++	+++	+++
Utilization of organic acids	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Utilization of alditols	+	-	+++	+++	+++	+++	+++
Utilization of sugars	+	-	+++	+++	+++	+++	+++
Vitamins required	++	+++	+	+	+	+	+
Urea hydrolysis	+	?	-	+	+	?	+/-
Nitrogen fixation	-	-	+++	-	-	+++	-
Photosynthetic strains	-	-	+	-	-	-	-
Functional glycolysis	-	-	+	+/-	?	+/-	+++
Hexose monophosphate shunt	+++	-	++	+	?	+/-	++
Entner-Doudoroff pathway	-	-	+++	+++	+++	+++	+/-
Optimal temperature range (°C)	36-38	35-37	25-30	25-30	25-28	20-37	20-37

\* The characteristics have been described elsewhere (references 8, 13, 14, 19, 22, 32, 36, 41, 50, 52, 58, 62, 64, 67, 71, 77, 87, 97, 98, 102, 103, 104, 105, 111; see also Bhat 1991, Keen 1988, Moore et al. 1990, Myers & Weissman 1980) (b) Not known (?), not detected (-), detected in variable quantities (+ to +++), glucosamine (GlcN), diaminoglucose (DAG).

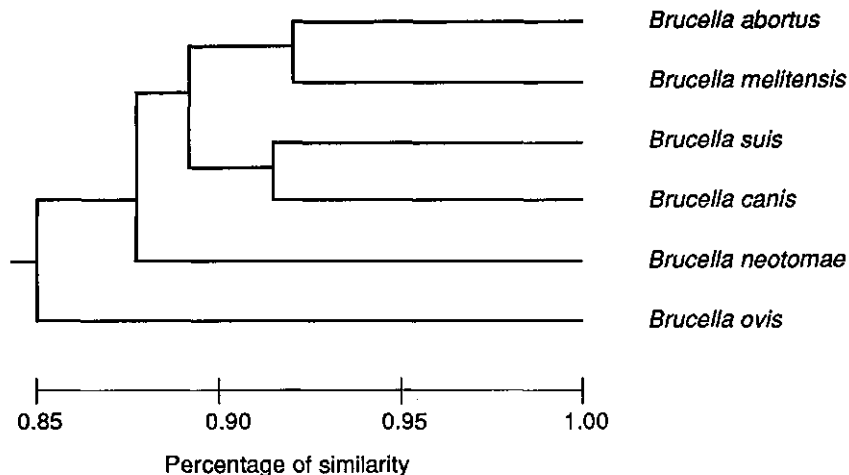


Fig. 1. Dendrogram showing the relative dispersion of *Brucella* species. *Agrobacterium tumefaciens* was used as an outgroup (not shown).

*Escherichia coli* was used as a representative of an external group in the phylogenetic analysis (21, 40).

A dendrogram for the dispersion of the genus *Brucella* into different species was constructed from 155 phenotypic characteristics (52, Tables 1 and 2). One hundred characteristics were common to all 6 *Brucella* species and were necessary only to fix the percentage of similarity between bacteria of an external group (*Agrobacterium tumefaciens*) and the different *Brucella* species. 55 characteristics (Table 1), in which at least one of them is absent in up to five of the six *Brucella* species, were used to construct the dendrogram shown in Fig 1. The general similarity coefficients of Gower (46), which include negative matches for the two-state characters, was used to construct dendrograms. The data were coded as 0 (negative) or 1 (positive). The strains were clustered by using unweighted pair group average linkage, and by single linkage cluster analysis (93). Calculations were done on an AT IBM computer, using a University of Costa Rica program.

### Temporal calibration

In order to calibrate points for dating the branching events in bacterial evolution, the strategy of Ochman & Wilson (82) was followed. This method constructs a temporal scale for bacterial evolution by linking ecological events that took place at known times in the geological past to specific branch points in the geological tree relating the 16S rRNAs of eubacteria and endosymbionts.

Briefly, the upper and lower time ranges in millions of years for the separation between two bacteria have to be established; then the limits are included in a plot relating time against the percentage of 16S rRNA divergence ( $\% \text{ divergence} = -75 \ln [4/3\text{Sab}0.21-1/3]$ ). A line corresponding to a divergence rate of 1%/50 million of years satisfying all dates is obtained (82). By using the equation  $t = -3750 \ln [4/3\text{Sab}0.21-1/3]$  the nodes corresponding to 'Sab' values of the phylogenetic tree of bacteria can be converted to time, in millions of years (Fig

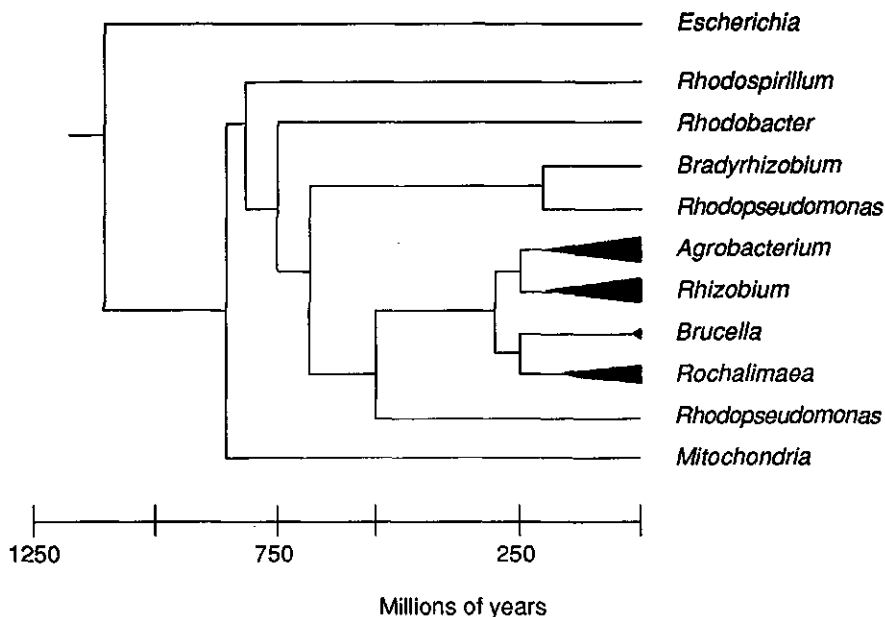


Fig. 2. Time scale for the dispersion of Class Proteobacteria of the alpha-2 subdivision. The order of branching of the lineages is based on Sab values between pairs of bacteria. The time scale was developed according to Ochman and Wilson (1987). The vertex of the dark cones indicate the time of speciation.

2). In a similar approach, time ranges can be calculated from the 'Sab' values estimated from a plot constructed by relating the DNA-rRNA  $T_m(e)$  obtained by one laboratory (22, 23, 24, 26, 55, 100) to the 'Sab' values of different bacteria (40, 41, 95). The strategy argues that average substitution rate at synonymous sites is nearly the same per year for cellular genomes in bacteria, plants and mammals.

#### Derivation of ancestral characteristics

The phenotypic properties of the ancestors were derived by clustering the common characteristics (Tables 2-4) between nodes that divide the different bacterial groups in the phylogenetic tree (107). In the first place, the most ancestral trait considered was that shared by the major number of the organisms; in the second place, the most ancestral trait considered was the one most likely be lost during evolution by different lineages according to the complexity of functions, and comparative phylogeny among the different bacterial groups (107). Broad diversity in substrate utilization and energy conversion was considered ancestral with respect to restricted possibilities. Similarly, larger genomes and the presence of extrachromosomal DNA was considered ancestral with respect to reduced chromosomal size and absence of extrachromosomal DNA. Finally, the presence of accessory cell wall structures such as capsules, flagella, pili and fimbriae was considered ancestral with respect to their absence.

Table 3. Host characteristics of eucaryotic cell associated Proteobacteria of the alpha subdivision\*.

Characteristic	<i>Rickettsia</i>	<i>Rochalimaea</i>		<i>Rhizobium</i>		<i>Phyllobacterium</i>		
	<i>prowazekii</i>	<i>Brucella</i>	<i>quintana</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>leguminosarum</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>myrsinacearum</i>	
		<i>abortus</i>		<i>anthropi</i>		<i>tumefaciens</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	
							<i>japonicum</i>	
Preferred host	human	bovine	human	human	legumes	dicotyledones	sugar beet	legumes
Arthropod vector	louse	(thicks)	louse	none(?)	none	none	none	none
Pathogenicity in preferred host	high	medium	medium	low	none/low	high	medium	low
Transovarial transmission	no	yes	no	-	-	-	-	-
Pathogenicity for arthropod	high	none	none	-	-	-	-	-
Ability to live in soil	none	low	none	low(?)	high	high	high	high
Cultivation in vitro	no	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes
Host versatility	none	medium	none	low(?)	high	high	medium	high
Parasitic status	strict	strict	strict	commensal	symbiont	strict	strict	symbiont
Preferred tissue	blood	placenta	blood	blood(?)	root	crown stem	leaf	root
Target cell	endothelial	trophoblast	endothelial	PMN, M(?)	epidermal	epidermal	epidermal	epidermal
Cell association	intracell.	intracell.	pericell.	?	intracell.	pericell.	intracell.	intracell.
Habitat in cell	cytoplasm	vacuoles	membrane	?	vacuoles	membrane	membrane	vacuoles
Basic lesion	vasculitis	abortion	vasculitis	suppurative	nodules	tumors	nodules, tumors	nodules
Incubation time (weeks)	1-2	1-4	2-4	?	1-6	1-8	1-8	2-12

\*With exception of *R. prowazekii*, all bacteria belong to the alpha-2 subdivision.

## Results and discussion

### Ancestral Proteobacteria of the alpha-2 subdivision associated with eukaryotic cells

The conserved lipid composition and structure of the cell envelope, together with other characteristics shared by obligate and facultative pericellular or intracellular Proteobacteria of the alpha-2 subdivision (Tables 2-4), might explain the tendency of these organisms to live in association with eukaryotic cells, and could help to trace properties possessed by the common ancestor of the subcluster (77). Thus the ancestor of brucellae, rochalimae, ochrobacteria, agrobacteria, and rhizobiae was probably similar to a photosynthetic agrobacterium living in soil, that is a gram-negative, motile (with one or two flagella), aerobic, photoheterotrophic organism, requiring CO<sub>2</sub> and capable of using a wide variety of organic compounds as the sole carbon source. The principal mechanisms of glucose catabolism would have been the Entner-Doudoroff pathway and the pentose cycle. As part of the cell envelope, this ancestral bacterium would have been surrounded by an extracellular acidic polysaccharide.

With a photosystem-I, the internal photosynthetic membranes were probably present as lamellae underlying and parallel to cytoplasmic membrane possessing bacterial chlorophyll 'a' or 'b'. The inner membrane would have been composed mainly of diphosphatidylglycerol (DG) and phosphatidylethanolamine (PE) substituted with C18:1 and cyclic C19:0 fatty

Table 4. Pathogenic mechanisms of eucaryotic cell associated Proteobacteria.

Characteristic	R.p	B.a	R.q	O.a	R.l	A.t	P.m	B.j
Extracellular layer	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
Exotoxins	-	-	-	-	-	-	-	-
Endotoxic lipopolysaccharide	+	+	+	?	++	++	?	++
Toxicity by killed bacteria	+	+	+	?	++	++	?	++
Cell adherent structures	?	++	?	+	+++	+++	?	+++
Parasitic plasmid genes	-	-	-	?	+++	+++	+++	+++
Antigenic variation	-	-	-	?	++	++	?	++
Urease	?	++	?	++	-	++	-	-
Haemolysin	++	-	-	-	-	-	-	-
Release of proteases	-	-	-	?	-	-	-	-
Release of glycosidases	-	-	-	+/-	+	+	+	+
Catalase	-	+	-	++	+	+	+	+
Cu++Zn++ SOD	?	+	?	?	+	+	?	(+)
Inhibition to internalization	-	-	+++	?	-	+++	-	-
Inhibition to digestion	-	++	-	?	+++	-	+++	+++
Resistance to digestion	-	++	-	?	?	-	?	?
Escape to the cytoplasm	+	-	-	?	-	-	-	-
Escape to RER	-	+	-	?	-	-	-	-

- With exception of *R. prowazekii* all other bacteria belong to the alpha-2 subdivision.

- *Rickettsia prowazekii* (R.p), *Brucella abortus* (B. a), *Rochalimaea quintana* (R. q), *Ochrobactrum anthropi* (O. a), *Rhizobium leguminosarum* (R. l), *Agrobacterium tumefaciens* (A. t), *Phyllobacterium myrsinacearum* (P. m), *Bradyrhizobium japonicum* (B. j).

acids, respiratory cytochromes, NADH-oxidase complex, succinate dehydrogenase, and ubiquinone Q10 as a respiratory coenzyme. The periplasmic space would have contained a cyclic glucan and a high concentration of medium-sized class II cytochrome c, cupro-zinc superoxide dismutase (Cu-Zn SOD) and catalase enzymes as some of the components of the respiratory chain of aerobically grown cells. The outer membrane, in addition to the characteristic DG, PE, outer membrane proteins (probably trilaminar porins, and major OMP) and peptidoglycan bound lipoprotein, would have had relatively large quantities of phosphatidylcholine, (substituted by C18:1 and cyclic C19:0 fatty acids), ornithine-containing lipids (OCL) and lipopolysaccharide (LPS) with a "mixed" lipid A moiety substituted with amide-linked 3-OH-C14:0, and long-chain ester-linked 27-OH-C28:0 fatty acids. The peptidoglycan sacculle would have been of a single layer with a cross linkage of 50% (as in most Proteobacteria studied). The chromosome would have been circular, close to 6000 Kb, with a mol% G+C of the DNA between 57-63, ancestral 'Sym-Ti' sequences and recurrent nucleotide sequences occurring outside open reading frames. This bacteria

would have harboured antibiotic resistant megaplasmids, bacteriophages and insertion sequences as accessory genetic elements. This ancestor would have been initially associated pericellularly with plant cells and eventually with vertebrate hosts and arthropod vectors. According to the temporal calibration, this ancestor was already present 300 million years ago (see below).

### Divergence between plant- and animal-associated bacteria

In the absence of fossil record for most of the bacterial groups, calibration of phylogenetic trees with geological data has been used as the only parameter for dating evolution of bacteria (82), but this is open to several sources of error. For instance, although it has been proposed that eubacteria evolved at a constant rate, we do not know the different rates at which rRNA cistrons diverged. There is some evidence that bacterial symbionts and perhaps parasites evolve at higher rate than their free-living relatives. In consequence, the branch lengths in a dendrogram based on 'Sab' values do not necessarily reflect constant evolutionary rates, and fast evolving symbionts and intracellular parasites may appear to branch off deeper than they should. Despite these shortcomings, timing phylogenetic trees might contribute to an understanding some of the events that took place during selection of the different bacterial lineages.

From the tree presented in Fig. 1, the divergence of the plant-associated (rhizobiae-agrobacteria) from the animal-associated bacteria (brucellae-rochalimae) of the alpha-2 subdivision occurred 300 million years ago. The proposed divergence between the brucellae and rochalimae from a common ancestor occurred about 230 million years ago during the Triassic period, close to the time when *R. leguminosarum* and *B. japonicum* separated from their non-rhizobial counterparts *A. tumefaciens* and *Rhodopseudomonas palustris* respectively (82). The common ancestor of *Brucella* species might have separated from an ancestor of the related human pathogenic bacteria *O. anthropi* close to 160 million years ago.

The ranges for the separation between *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species from their respective non-root-nodule forming relatives *Agrobacterium* and *Rhodopseudomonas* can be estimated by the appearance of legumes at about 110 million years ago, and the origin of roots about 415 million years ago, dates that mark the upper and lower limits for the divergence between these two groups (82). Members of Rochalimaea are mainly parasites of lice, alternating their life cycle in human or vole hosts (105). On the other hand, *Brucella* species have a definitive preference for mammalian cells, with strong affinity for ungulates, although members of *Brucella* retain the ability to reproduce in ticks (8, 19, 51, 74, 110). Therefore the lower divergence between brucellae and rochalimae can be estimated about 300 million years ago, when the fossil record indicates that land arthropods and vertebrates were radiating, and arthropod ectoparasitism on vertebrates probably became fully developed (11, 12, 61).

Similarly, the upper limit of divergence between these two animal pathogenic bacteria can be marked about 75 million years ago, when the common ancestor of ungulates, primates and rodents radiated, and the first fossils of parasitic ticks and lice appeared (47). Finally, members of the genus *Brucella* have preference for placental mammals (51, 56, 73, 74), although they can grow and be transovarially transmitted in vector ticks (8). Their strong affinity for placental tissues and their requirement of erythritol, a sugar found in relatively abundant quantities only in the placenta of ungulates (5, 84, 106), strengthens the epidemiological evidence of a preference for placental mammals. In this respect, it may be that the common brucella ancestor separated from the human pathogen *Ochrobactrum*

*anthropi* between 180 and 75 M years ago, a period marked by the appearance of mammals and ungulates (47).

### Radiation of *Brucella* organisms

A dendrogram showing the dispersion of *Brucella* species is presented in Fig. 2. It is not intended to strengthen the idea of *Brucella* speciation, but rather to give an indication of the possible radiation of the group (either as biovars or species, depending upon the definition). *B. ovis* was probably the first to diverge from other brucellas. This is supported by the fact that *B. ovis* has strong preference for male ovine reproductive organs (ram epididymitis) and seldom infects other animals, while most other *Brucella* species have a preference for placental tissues and have a wider range of susceptible animal species (51, 56, 72, 74). In addition to the 55 characteristics (Table 1) used to construct the dendrogram, DNA hybridization studies have suggested slightly lower complementary values between *B. ovis* and other *Brucella* species (53). However, this result has been questioned by authors who claim that there are no significant differences in DNA hybridization values among *Brucella* (101). Since the fossil record and the molecular studies indicate that bovines diverged from ovines between 22 to 12 million years ago (47), it is feasible to propose this range as the upper limit for the time when the *Brucella* archetype diverged into *B. ovis* and the other *Brucella* species.

The position of *B. canis* and *B. neotomae* in the dendrogram tree shown in Fig. 2 raises a drawback to the hypothesis that bovidae were the common ancestral host for the bacteria from which *Brucella* radiated. An alternative hypothesis proposes that the radiation of *Brucella* into different species occurred about 75 M years ago, a time which marks the separation of ungulates from other mammals (47), and in consequence, before the separation of *B. ovis* from other *Brucella* species. In this case, *B. ovis* would have evolved at a different rate from other brucellae, since this organism is the most diverse species. On the other hand it could be speculated that, after *B. ovis* separated from other brucellas, strains parasitic in swine and bovines (rather than parasites of a common ungulate-carnivore-rodent ancestor) adapted independently and evolved as parasites of dogs (*B. canis*) and wood rats (*B. neotomae*). This is partly supported by epidemiological evidence that canines and rats are the non-ungulates most commonly infected with brucellas by eating tissues from infected animals (51, 72, 74).

Assuming a constant rate of evolution for the group (82), then a relatively short time may be expected for the divergence into different species, and this is suggested by studies on DNA hybridization and similarities in ribosomal RNA cistron among different *Brucella* species (22, 101). In this case *Brucella* would have a recent monophyletic origin in comparison with related bacteria such as rochalimae, ochrobacteria, rhizobiae and agrobacteria, which evidently diverged earlier into different species after radiation from the common ancestors of rochalimae-brucellae and rhizobiae-agrobacteria (20, 22, 24, 55, 105).

### Evolution of phenotype and genotype in *Brucella* species

In contrast to their plant-associated bacterial relatives, Rochalimaea and *Brucella* species do not possess extracellular polysaccharide or flagella. They have narrow metabolic alternatives for utilizing carbon components, and their genetic variation is more restricted. These differences correlate well with the absence of plasmids and small chromosome size



(2300 to 2600 Kb) of bacteria pathogenic for animals, and the presence of megaplasmids (150 to 900 Kb) and large chromosomes (5000 to 6000 Kb) in rhizobiae and agrobacteria. The phenotypic and genotypic differences are also consistent with adaptation to parasitic life in animal cells, where nutrition, protection, reproduction and transmission are restricted to the relatively stable internal environment of the host. In contrast, the plant-associated bacteria, having part of their life cycle in a diverse open environment (the soil) probably require extensive genetic information, including large accessory genetic elements and large chromosomes (62, 107).

The presence of antibiotic resistance on plasmids rather than in chromosomes is consistent with a bacterial ancestor living in contact with antibiotics in restricted localities, e.g. the rhizosphere (35). This is supported by the presence of plasmids in Proteobacteria of the alpha-2 subdivision which radiated earlier (e.g. the slow-growing *Bradyrhizobium*) from the rhizobia-agrobacteria-rochalimae-brucellae subcluster (58). The divergence into plant or animal cell associations could have been accompanied by the incorporation of nitrogen-fixing or tumorigenic genes into plasmids rather than in chromosomes (89, 35). For instance, association with a system free from antibiotics (e.g. inside animal cells) without a land cycle, could have favoured the loss of plasmids capable of conferring resistance to antibiotics (66). In this respect, it is known that in the absence of positive selection, unpaired segregation and loss of megaplasmids may occur (66).

The absence of interchangeable accessory genetic elements which promote conjugation, together with a life cycle in a more restricted environment, would have favoured the loss of the recurrent DNA sequences necessary for maintaining strain diversity (62, 66) and may have reduced the possibilities for phage lysogeny (66). The lack of a life cycle in an "open" environment and on plant cells would have selected for the loss of those genes coding for flagella and an extracellular layer necessary for motility and specific adhesion to plant cells (9, 68).

Association with organelles which produce polycations capable of disturbing the structure of the bacterial outer membrane (stabilized by divalent cations) could have selected for surface molecules devoid of strong negative charges (e.g. OCL, phosphate-free lipid A and low KDO core structures). This would have eventually favoured strong hydrophobic interactions, limiting the exchange of extrachromosomal elements (thereby restricting diversity even more), and hampering the action of hydrolytic enzymes on the outer membrane.

Finally, access to ready-made substrates in animal cells for generating energy and synthetic metabolism would have selected bacteria capable of incorporating them directly into cycles. This event would favour reduction of the genome through loss of the information used to produce these substrates (62).

Despite the close relationship between *B. abortus* and *R. quintana*, these species differ in nucleotide composition. While *Brucella* species contain 55-58% of G+C content, only slightly lower than in most of the Proteobacteria of the alpha-2 subdivision (60-62%), the *Rochalimaea* species have a G+C content of 38-39%, a value that is close to the rickettsias (20-33%). In general, comparison of nucleotide sequences in bacteria reveals that codon composition correlates with overall genomic composition, and that differences in codon composition occur most often in the third base position (62), an indication of redundancy in the genetic code. Differences in nucleotide composition cannot be attributed solely to differences in gene contents among the two bacteria, since the difference in genome size between *B. abortus* and *R. quintana* is only 300 Kb. Codon bias seems to originate mainly through an intrinsic mutational bias and a context bias (62). The former is viewed as an

inherent feature of the replication process of a particular bacterium. An important aspect of mutational bias is that it is manifested in the absence of selection. The variation of G+C content observed between closely related animal bacteria could reflect differences in the inherent mutational pressure and probably the structure of the translational machinery (62). In this respect the unusual G+C content of *Rochalimae* is not because of a remote phylogeny, but because their mode of evolution has for some reason been atypical in comparison with other members of the lineage. This case seems to be similar to the relationship between mycoplasmas and their close gram-positive sporulated relatives (107).

### **Evolution of pathogenic mechanisms.**

Here *B. abortus* will be considered, because it is the best studied brucella. This bacterium adheres specifically to polymorphonuclear and non-activated mononuclear cells. The adherence is mediated by lectin-like interactions and is stabilized by bacterial lipids. The adsorbed bacterium promotes phagocytosis, then it enters the cell, remaining inside vacuoles where it can reproduce while avoiding microbicidal mechanisms, inhibition of lysosomal fusion and destruction mediated by digestive substances. In the bovine, phagocytic cells are not primary targets but merely a vehicle for transporting the bacteria to the placenta. *Brucella* organisms preferentially penetrate the chorionic trophoblasts, gaining access to the rough endoplasmic reticulum, which seems to be the preferential niche for extensive multiplication. Finally, tissue damage results from starvation and mechanical disruption of cells, reactive immune mechanisms and direct action of hormones induced by bacterial subproducts.

### **Adsorption to eukaryotic cells**

Like their close relatives, *Brucella* organisms do not possess antiphagocytic capsules, but instead have evolved mechanisms for adhesion to membranes of host cells. It seems that the initial adsorption of *A. tumefaciens* and *R. leguminosarum* to plant cells is mediated by lectin-like structures on the surface of the host cell, and by bacterial polysaccharide molecules such as the outer membrane LPS, periplasmic cyclic-1,2-glucan and extracellular polysaccharides (9, 34, 68). In addition, the cell envelope of rhizobiae and agrobacteria possesses an ornithine-containing lipid (OCL), which is implicated in the adherence of bacteria to eukaryotic cells (13, 59, 60). *B. abortus* has the ability to adsorb onto mononuclear cells by specific lectin-like interactions which can be inhibited by LPS preparations (65; Moreno, unpublished results). Furthermore, *Brucella* species also possess a periplasmic cyclic-1,2-glucan and membrane OCL as part of the cell envelope (Table 2).

### **Association with eukaryotic cells.**

In this subcluster of bacteria at least two different strategies for association with eukaryotic cells have developed. Both *Rochalimaea* and *Agrobacterium* species live pericellularly in strong association with the cytoplasmic membrane of the host cells, and seem to have mechanisms for avoiding extensive incorporation into cells (45, 58, 71). In contrast, *Brucella* and *Rhizobium* species rapidly enter the eukaryotic cell and replicate inside vacuoles; in this respect the phagocytosis seems to be promoted by structures located on the surface of the bacteria. This is supported by experiments which indicate that the uptake and intracellular replication of rough and smooth attenuated *B. abortus* is different from that of

the pathogenic smooth organisms (25). In some instances a few forms of rochalimae and agrobacteria can be seen inside phagocytic vacuoles of animal or plant cells, but the bacteria appear to be degenerating and not replicating (54, 45). In contrast, brucellae and rhizobiae actively divide inside vacuoles of eukaryotic cells without extensive damage to either party, suggesting a good adaptation of these bacteria to the intracellular environment (25, 45). It would seem that intracellular life requires somewhat more elaborate adaptations than pericellular life, reflected in the different strategies evolved for survival inside cells.

### Intracellular survival

In the case of *B. abortus*, intracellular survival differs in phagocytic and non-phagocytic cells. In polymorphonuclear leukocytes and macrophages the bacteria multiply inside phagosomes, while in the trophoblast it occurs within rough endoplasmic reticulum (RER). In this respect, survival inside phagocytic cells necessitates evasion of digestive mechanisms. On the other hand the RER of trophoblasts might be a privileged site for brucellar multiplication, since in these cisternae the fusion with lysosomes is normally hampered by cellular mechanisms (3).

In phagocytes, cell respiration involves a series of enzymatic reactions which convert oxygen to active metabolites, some of which exhibit microbicidal activities. Opsonized *B. abortus* organisms exposed to activated phagocytic cells stimulate significant levels of both oxygen production and myeloperoxidase-hydrogen peroxide halide activity. However, ingestion of non-opsonized *B. abortus* produces little or no stimulation of the respiratory burst of phagocytic cells (86). Experiments with enterobacterial LPS have shown that this molecule can stimulate the respiratory burst of phagocytic cells by direct action or by activating complement (15, 94, 79). These mechanisms contribute to the destruction of intracellular bacteria (91). In contrast to other endotoxins, *Brucella* LPS induces a low oxidative burst and decreased lysozyme release by phagocytic cells. Furthermore *Brucella* LPS produces little or no complement activation, and induces very little release of interferon, both of which enhance oxidative microbicidal mechanisms (13, 76). Finally, brucella produces a periplasmic Cu-Zn SOD and catalase, enzymes which might be involved in protecting the bacteria against free superoxide radicals produced by phagocytic cells (2, 4, 56).

Some of these properties are also shared by the close relatives of *Brucella* species. For instance, LPS from the human pathogen *Rochalimaea quintana* is poorly toxic, and large quantities are needed to induce some of the biological activities observed with enterobacterial LPS (90).

*Rhizobium* organisms are also able to bypass microbicidal mechanisms, and they also possess a periplasmic Cu-Zn SOD and catalase enzymes which might protect the bacteria from the phagocytic oxidative metabolism mediated by plant cells (58). In this respect, no information is available for *Ochrobactrum* and *Agrobacterium*.

*B. abortus* inhibits the degranulation of primary and secondary granules in cells (10, 63). It seems that bacterial viability is not necessary for inhibiting degranulation, since the exposure of phagocytic cells to glutaraldehyde-killed rough brucellae also results in decreased release of primary and secondary granules. This property is linked to cell wall components (13) and to nucleotides produced by the bacteria (5' GMP and adenine), which hamper the ability of phagocytic cells to iodinate proteins by inhibiting primary granule fusion, in a way similar to that reported for other intracellular bacteria (10). However, in contrast to some intracellular parasites such as *Legionella* and *Leishmania*, brucellas release

a phosphomonoesterase that produces adenine, but does not block the production of superoxide anion ( $O_2^-$ ), or hydrolyse PIP<sub>2</sub> or IP<sub>3</sub> (89).

Oxygen-independent killing mechanisms may not contribute appreciably to the destruction of *B. abortus* by phagocytic cells (63, 88, 92). In Enterobacteriaceae, divalent cation chelators (e.g. EDTA and EGTA), polycations (e.g. polymyxins and aminoglycosides) as well as some cationic lysosomal substances (lysozyme, defensins, bactericin, seminal plasmin, neutrophil BPI/CAP and polyamines) have much higher affinity for negatively charged sites of the LPS than divalent cations ( $Ca^{++}$  and  $Mg^{++}$ ), which usually stabilize this molecule on the outer membrane (48). Being bulkier than the cations they displace, polycations change the packing order of LPS and increase the permeability of the outer membrane to a variety of molecules (48). Polycations might increase their own uptake (48). In this respect neither smooth nor rough brucellas are susceptible to the concentration of polymorphonuclear granules which kill *Salmonella typhimurium* (63, 88). For instance, brucellae are resistant to cationic substances and lysosomal cationic proteins, and they may be able to deplete phagocytic vacuoles of iron (13, 63, 76; Moriyon, personal communication). In addition, cell envelopes are not only extremely resistant to proteolytic action of enzymes, but are relatively more resistant to the disruptive action of detergents and divalent cation chelators (78).

In its lipid composition, the outer membrane of brucellas differs considerably from that of other gram-negative bacteria, although it is similar to their close relatives, agrobacteria, rhizobiae, ochrobacteria and rochalimae (Table 2). The differences are reflected mainly in the small amount of KDO molecules and of phosphate groups linked to lipid A; also the presence of unusual wax esters, OCL, large quantities of phosphatidylcholine (commonly absent from bacteria) and an "unusual" lipid A moiety of the LPS. Lipoprotein exposed to the cell surface and long chain fatty acids (some of which might span the outer membrane) could substitute these molecules (13, 77). The instability of LPS produced by divalent cations and the strong interactions among proteins, phospholipids, OCL and LPS are factors which contribute to a high hydrophobicity of the cell envelopes, and to the maintenance of close associations among the macromolecules in the outer membrane of brucellas (a property that might account for the resistance to decoloration by weak acids). The outcome is an overall resistance to microbicidal activities (48).

### Mechanisms of virulence

In contrast to other intracellular pathogens, brucellas do not possess plasmids or lysogenic bacteriophages which could confer invading or virulence properties. They do not produce exotoxins, have antiphagocytic capsules, occur in resistant forms, have thick cell walls, possess fimbriae or show antigenic variation (Table 2).

Furthermore, *Brucella* lipopolysaccharide (LPS) is of low toxicity, with mild complement consumption and poor activation of phagocytic and immune cells (13, 76), a fact that is commonly ignored when pathogenic mechanisms are discussed (92).

It has been suggested that LPS from the surface of smooth *Brucella* is responsible for enhancing intracellular survival and for mediating most of the pathogenic mechanisms of *Brucella* (92), because smooth *Brucella* are more resistant to microbicidal mechanisms than rough strains (63, 88), and in contrast to the biological activities mediated by enterobacterial endotoxins (43). There are several points against this hypothesis. For instance, both smooth and rough strains of brucellas contain similar amounts of LPS on their surface, and the composition of the lipid A moiety, responsible for biological activity, is very similar (77).

Furthermore there are naturally occurring rough brucellas (*B. ovis* and *B. canis*) which are fully pathogenic, in contrast to some smooth strains (*B. neotomae*) which are not pathogenic (2). The fact that membrane properties such as hydrophobicity, charge, staining properties, adherence to cells, immunogenicity, susceptibility to phages, frequency to transformation, and susceptibility to antibiotics are considerably altered in the rough mutant strains (2, 25, 57, 63, 65, 75, 78), strongly suggest that the maintenance of membrane integrity is more important than the mere presence or absence of smooth type LPS. The low biological activity of brucellar LPS (13, 76) argues against this type of virulence mechanism. In this respect it is important to recognize the differences in the chemical and biological properties of LPS from bacteria of different phylogenetic lineages (69).

As discussed above, the capability of brucellae to adhere, penetrate and replicate while resisting microbicidal mechanisms is probably due to a combination of different mechanisms, related to the general metabolism of the bacteria (e.g. phosphomonoesterase activity, requirement of erythritol and oxidative respiration) and to the overall bacterial cell envelope structure rather than to direct action of exotoxins or endotoxins. Other characteristics that deserve more investigation, such as urease activity which generates ammonium ions, and adhesion of fibronectin which could favour the uptake of bacteria, might also be virulence factors generated by brucellas. It is interesting to note that several metabolic characteristics (including the hydrolysis of urea) and membrane properties are shared by close relatives of *Brucella*, being retained throughout the evolution of the line (Table 2).

The location and number of brucellae within chorionic trophoblasts differ markedly from the relatively small number of bacteria located within phagosomes of macrophages and polymorphs. Trophoblast cells, in addition to being non-phagocytic, are metabolically active and capable of producing a variety of hormones and factors which may stimulate the growth of brucellas. During a late stage of infection, the very large number of intracellular brucellas cause necrosis of the trophoblasts accompanied by ulceration and inflammation of the chorioallantoic membrane.

Placentitis probably impairs placental function, preventing the delivery of oxygen and nutrients to the fetus, and/or preventing the removal of waste products from the fetus. Although brucella LPS has low toxicity (13, 76), large quantities of brucellae endotoxin can cause abortion in laboratory animals (76). This might be the result of a heavy placental infection.

### Adaptation to the host

The occurrence of *Brucella* infections in secondary hosts is incidental and of minor epidemiological importance (19, 51, 56, 73, 74, 110). *Brucella* species are not readily transmitted from the preferred host to a dissimilar one, and when a species does induce disease in a non-preferred host, the organisms usually become localized in the mammary gland and the reticulo-endothelial system; shedding seldom occurs and the bacterial cell cycle is interrupted (56, 110).

The fact that *B. abortus* organisms survive and reproduce inside phagosomes of non-activated phagocytic cells, but are readily destroyed by immune-activated cells, suggests that the former might act primarily as a vehicle to reach the reproductive organs, especially the gravid uterus. Such viscerotropism might depend in part on the presence of erythritol, a factor which stimulates the growth of most pathogenic *B. abortus* strains (84). The extensive bacterial division inside RER indicates that placental cells fulfil the nutritional requirements of the "predatory" intracellular brucellae (3). Accumulation of large numbers

of brucella inside vacuoles could induce mechanical disruption of the cells, with release of bacteria which would readily infect other cells (37). The milk, placental fluids, the chorion and the fetus constitute the main source of infection, and therefore the natural route for bacterial spread (37). Infection in the natural host is seldom fatal, and most of the animals recover as a result of an efficient immune response, during which the bacteria are destroyed by activated mononuclear cells in combination with opsonizing antibodies (38,99). Cellular immunity plays a critical role in the disease, and several of the symptoms are most probably a consequence of immune reactive mechanisms (80).

In conclusion, brucellas are excellently adapted to their natural hosts. Their final target is most probably the RER cisternae of placental cells, which provide a secure environment and a rich nutritional milieu, with adequate oxygen tension for these strictly aerobic bacteria. The gravid uterus is also a restricted site for immune cells, a factor that might contribute to the replication and spread of the bacteria. Infection of, and limited division in non-activated phagocytic cells guarantees transit to their final target, the placenta. Abortion ensures an efficient mechanism for dispersion of the bacteria. Finally the efficient immune response ensures survival of the host, while chronic infections favour persistence of the bacteria for transmission to new targets. In the same way as their close relatives from the alpha-2 subdivision, the fine adaptation of brucellas to their host seems to have resulted from prolonged association between both parties. This in general reflects a good equilibrium between the bacterium and its host.

### Acknowledgments

We thank Dr. William G. Eberhard (Smithsonian Tropical Research Institute and Biology School, University of Costa Rica) for his patient and helpful comments during the course of writing this manuscript. E. Moreno was a recipient of the Costa Rican National Council for Scientific and Technological Research Support Program to Researchers. This investigation was supported by grant TWAS RG BC898-126.

### References

1. Allardert-Servent, T. A., Bourg, G., Ramuz, M., Pages, M., Bellis, M. & Roizes, G. (1988) DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 170: 4603-4607.
2. Alton, G. G., Jones, L. M. & Pietz, D. E. (1975) Laboratory techniques in brucellosis. World Health Organization Monograph Series, second edition, WHO, Geneva.
3. Anderson, T. D. & Cheville, N. F. (1986) Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. *Amer. J. Pathol.* 124:226-2232.
4. Beck, B. L., Tabatabai, L. B. & Mayfield E. (1990) A protein isolated from *Brucella abortus* is a Cu-Zn superoxide dismutase. *Amer. Chem. Soc.* 29:372-376.
5. Bosseray, N. (1987) *Brucella* infection and immunity in placenta. *Annals Inst. Pasteur/ Microbiol.* 138:110-112.
6. Bowser, D. V., Wheat, R. W., Foster, J. W. & Leong, D. (1974) Occurrence of quinovosamine in lipopolysaccharides of *Brucella* species. *Infect. Immun.* 9:772-774.
7. Bricker, B. J., Tabatabai, L. B., Deyoe, B. L. & Mayfield, J. E. (1988) Conservation of antigenicity in a 31-KDa *Brucella* protein. *Vet. Microbiol.* 18:313-325.
8. Burgdorfer, W. (1967) Trans-stadial and transovarial development of disease agents in arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 12:347-376.

9. Cangelosi, G., Hung, L., Puvanesarajah, B., Stacey, G., Ozga, D. A., Leigh, J. A. & Nestor, E. W. (1987) Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions. *J. Bacteriol.* 169:2086-2091.
10. Canning, P. C., Roth, J. A. & Deyoe, B. L. (1986) Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in intracellular survival of the bacteria. *J. Infect. Dis.* 154:464-470.
11. Carpenter, F. M. (1977) Geological history and evolution of insects. *Proc. 15th Int. Cong. Entomol.* pp. 63-70.
12. Carpenter, F. M. & Burnham, L. (1985) The geological record of insects. *Annual Review Earth Planetary Sci.* 13:297-314.
13. Cherwonogrodzky, J. W., Dubray, G., Moreno, E. & Mayer, H. (1990) Antigens of *Brucella*. In "Animal brucellosis" edited by K. Nielsen & B. Duncan. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, USA. pp.19-64
14. Chester, B. & Cooper, L. H. (1979) *Achromobacter* species (CDC group Vd): morphological and biochemical characterization. *J. Clin. Microbiol.* 9:425-436.
15. Cline, M. J., Melmon, K. L., Davies, W. C. & William, H. E. (1968) Mechanism of endotoxin interaction with human leucocytes. *Brit. J. Haematol.* 15:539-547.
16. Coloe, P. J., Sinclair, A. J., Slattery, J. F. & Burke, D. (1984) Differentiation of *Brucella ovis* from *Brucella abortus* by gas liquid chromatographic analysis of cellular fatty acids. *J. Clin. Microbiol.* 19:896-898.
17. Coplin, D. L. (1989) Plasmids and their role in evolution of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27:187-212.
18. Corbel, M. J. (1984) International committee of systematic bacteriology subcommittee on taxonomy of *Brucella*. Minutes of meeting, 10 August 1982. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:366-367.
19. Corbel, M. J. & Brinley-Morgan, W. J. (1984) Genus *Brucella* Meyer and Shaw, 1920, 173, p. 377-388. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1, edited by N. R. Krieg & J. C. Holt. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
20. Crow, V. L., Jarvis, B. D. W. & Greenwood, R. M. (1981) Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing strains of *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31:152-172.
21. Dams, E., Hendriks, L., Vande Peer, Y., Neefs, J., Smits, G., Vandembempt, I. & De Wachter, R. (1988) Compilation of small subunit RNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 16:87-173.
22. De-Ley, J., Mannheim, W., Segers, P., Lievens, A., Denijn, M., Vanhoucke, M. & Gills, M. (1987) Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:35-42.
23. De-Ley, J., Segers, P., Kersters, K., Mannheim, W. & Livens, A. 1986. Intra- and intergeneric similarities of the *Bordetella* ribosomal ribonucleic acid cistrons: proposal for a new family, *Alcaligenaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:405-414.
24. De-Smedt, J. & De-Ley, J. (1977) Intra- and intergeneric similarities of *Agrobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27:222-240.
25. Dettleux, P. G., Deyoe, B. L. & Cheville, N. F. (1990) Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect. Immun.* 58:2320-2328.
26. De Vos, P., Goor, M. & De-Ley, J. (1985) Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:169-184.

27. Dess, S. B., Hollis, D. G., Weaver, R. E. & Moss, W. (1981) Cellular fatty acids of *Brucella canis* and *Brucella ovis*. *J. Clin. Microbiol.* 14:111-112.
28. Dess, S. B., Thanabalasundrum, S., Moss, C. W., Hollins, D. G. & Weaver, R. E. (1980) Cellular fatty acid composition of group IVe, nonsaccharolytic organisms from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* 11:664-668.
29. Diaz, R. & Chordi, A. (1966) Immunoelectrophoretic analysis of *Brucella suis*. *Experientia* 22:825-826.
30. Diaz, R., Jones, L. M., Leong, D. & Wilson, J. B. (1968) Surface antigens of smooth brucellae. *J. Bacteriol.* 96:893-901.
31. Diaz, R., Jones, L. M. & Wilson, J. B. (1967) Antigenic relationship of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *J. Bacteriol.* 93:1262-1268.
32. Dickerson, R. E. (1980) Cytochrome *c* and the evolution of energy metabolism. *Scientific American* 242:136-153.
33. Dorsch, M., Moreno, E. & Stackebrandt, E. (1989) Nucleotide sequence of 16S rRNA from *Brucella abortus*. *Nucl. Acids Res.* 17:1765.
34. Douglas, C. J., Staneloni, R. J., Rubin, R. A. & Nester, E. W. (1985) Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.* 161: 850-860.
35. Eberhard, W. G. (1989) Why do bacterial plasmids carry some genes and not others?. *Plasmid* 21:167-174.
36. Eck, R. V. & Dayhoff, M. O. (1966) Atlas of protein sequence and structure. 1966. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland, U. S. A.
37. Enright, F. M. (1990a) The pathogenesis and pathobiology of Brucella infection in domestic animals. Antigens of Brucella. In "Animal brucellosis" edited by K. Nielsen & B. Duncan. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, USA. pp.301-320
38. Enright, F. M. (1990b) Mechanisms of self cure in *Brucella abortus*-infected cattle. In "Advances in brucellosis research" edited by L. G. Adams. Texas A & M University Press, College Station. USA. pp.191-198
39. Ficht T. A., Bearden, S. W. & Marquis, H. (1990) Phylogenetic markers to describe *Brucella abortus*. In "Advances in brucellosis research" edited by L. G. Adams. Texas A & M University Press, College Station. USA. pp.36-54.
40. Fox G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zablen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D.-A., Luehrens, K. R., Chen, K. N. & Woese, C. R. (1980) The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209:457-463.
41. Fox, D. E., Pechman, K. J. & Woese, C. R. (1977) Comparative cataloguing of ribosomal ribonucleic acid: a molecular approach to prokaryotic systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27:44-57.
42. Freeman, B. A., McGhee, J. R. & Baughn, R. E. (1970) Some physical, chemical and taxonomic features of the soluble antigens of the Brucellae. *J. Infect. Dis.* 121:522-527.
43. Galanos, C., Rietschel, E. T., Lüderitz, O. & Westphal, O. (1972) Biological activities of lipid A complexed with bovine serum albumin. *Eur. J. Biochem.* 31:230-233.
44. Gamazo, C., Winter, A. J., Moriyón, I., Riezu-Boj, J. I., Blasco, J. M. & Díaz, R. (1989) Comparative analysis of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 57:1419-1426.
45. Giles, K. L. & Atherly, A. G. (Eds) (1981) Biology of Rhizobaceae. *Int. Rev. Cytol.*, Supplement 13.



46. Gower, J. C. (1971) A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* 27:222-240.
47. Goodman, M., Weiss, M. L. & Czelusniak, J. (1982) Molecular evolution above the species level: branching pattern, rates and mechanisms. *Syst. Zool.* 31:376-399.
48. Hancock, R. E. W. (1991) Bacterial outer membranes: evolving concepts. *Amer. Soc. Microbiol. News* 57:175-182.
49. Halling, S. M. & Zeher, E. S. (1990) Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA. *J. Bacteriol.* 172:6637-6640.
50. Hattermann, D. R. & Stacey, G. (1990) Efficient DNA transformation of *Bradyrhizobium japonicum* by electrophoration. *Appl. Envir. Microbiol.* 56:833-836.
51. Hayes, F. A. (1977) Wildlife reservoirs of brucellosis. In "Bovine brucellosis" edited by R. P. Crawford and R. J. Hidalgo. Texas A & M University Press. pp. 269-276.
52. Holmes, B., Popoff, M., Kiredjian, M. & Kersters, K. (1988) *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:406-416.
53. Hoyer, B. H. & McCullough, N. B. (1968) Homologies of deoxyribonucleic acids from *Brucella ovis*, canine abortion organisms, and other *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 96:1783-1790.
54. Ito, S. & Vison, J. W. (1965) Fine structure of *Rickettsia quintana* cultivated in vitro and in the louse. *J. Bacteriol.* 89:481-495.
55. Jarvis, B. D. W., Gills, M. & De-Ley, J. (1986) Intra- and Intergeneric similarities between the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:129-138.
56. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, fifth report (1971) *World Health Organization Technical Report Series* N° 464. Geneva, Switzerland.
57. Jones, L. M., Diaz, R. & Taylor, A. G. (1973) Characterization of allergens prepared from smooth and rough strains of *Brucella melitensis*. *Brit. J. Exp. Path.* 54:492-508.
58. Jordan, D. C. (1984) Family III. Rhizobaceae Conn 1938, 32 AL. In "Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 1" edited by N. R. Krieg & J. C. Holst pp. 2324-256. Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
59. Kawai, Y. & Yano, I. (1983) Ornithine-containing lipid of *Bordetella pertusis*, a new type of hemagglutinin. *Eur. J. Biochem.* 136:531-536.
60. Kawai, Y., Suzuki, K. & Hagiwara, T. (1985) Phosphatidylserine and ornithine-containing lipids of *Bordetella pertusis*. Hemagglutinins of lipoamino acid structure, and their control in biomembranes. *Eur. J. Biochem.* 147:367-372.
61. Kim, K. C. (Editor) (1985) Coevolution of parasitic arthropods and mammals. Wiley-Interscience, New York, U.S.A.
62. Krawiec, S. & Riley, M. (1990) Organization of bacterial chromosomes. *Microbiol. Rev.* 54:502-539.
63. Kreutzer, D.L., Deyfus, L. A. & Robertson, D. C. (1979) Interactions of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 23:737-742.
64. Lambert, B., Joos, H., Dierickx, S., Vantomme, R., Swings, J., Kersters, K. & Van Montagu, M. (1990) Identification and plant interaction of *Phyllobacterium* sp., a predominant rhizobacterium of young sugar beet plants. *Appl. Envir. Microbiol.* 56:1093-1102.
65. Lee, C. M., Mayer, E. P., Molnar, J. & Teodorescu, M. (1983) The mechanism of natural

- binding of bacteria to human lymphocyte subpopulations. *J. Clin. Lab. Immunol.* 11:87-94.
66. Levin, B. R. & Lenski, R. E. (1983) Coevolution in bacteria and their viruses and plasmids. In "Coevolution" edited by D. J. Futuyama & M. Statkin. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA. pp.99-127.
  67. Long, S. R. (1989) Rhizobium genetics. *Ann. Rev. Genetics.* 23:483-506.
  68. Mattysse, A. G. (1987) Surface interactions between gram negative bacteria and plants. In "Molecular determinants of plant diseases" edited by S. Nishimura, C. Vance & N. Doke. Springer-Verlag, Berlin
  69. Mayer, H., Krauss, J., H., Yokota, A. & Weckesser, J. (1990) Natural variants of lipid A. In "Endotoxin" edited by H. Friedman and others. Plenum Publishing Corporation.
  70. Meikle, P. J., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J. W. & Bundle, D. R. (1989) Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars. *Infect. Immun.* 57:2822-2828.
  71. Merrel, B. R., Weiss, E. & Dasch, G. A. (1978) Morphological and cell association characteristics of *Rochalimea quintana*: comparison of the Vole and Fuller strains. *J. Bacteriol.* 135:633-640.
  72. Meyer, M. E. (1976) Evolution and taxonomy in the genus *Brucella*: brucellosis of rodents. *Theriogenology.* 6:263-273.
  73. Meyer, M. E. (1977) Epidemiological odds and ends. In "Bovine brucellosis" edited by R. P. Crawford & R. J. Hidalgo. Texas A & M University Press. pp. 135-142.
  74. Moore, C. G. & Schnurrenberger, P. R. (1981) A review of naturally occurring *Brucella* abortus infections in wild mammals. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 179:779-782.
  75. Moreno, E., Jones, L. M. & Berman, D. T. (1984) Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 43:779-782.
  76. Moreno, E., Berman, D. T. & Boettcher, L. A. (1981) Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 31: 362,369.
  77. Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. & Mayer, H. (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the Class Proteobacteria. *J. Bacteriol.* 172: 3569-3576.
  78. Moriyon, I. & Berman, D. T. (1982) Effects of nonionic, ionic, and dipolar detergents and EDTA on *Brucella* cell envelope. *J. Bacteriol.* 152:822-831
  79. Morrison, D. C. & Kline, L. F. (1977) Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J. Immunol.* 118:362-369.
  80. Nicoletti, P. & Winter, A. J. (1990) The immune response to *Brucella abortus*-The cell-mediated response to infections. Antigens of *Brucella*. In "Animal brucellosis" edited by K. Nielsen & B. Duncan. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA. pp.83-95
  81. O'Hara, M. J., Collins, D. M. & De-Lisle, G. W. (1985) Restriction endonuclease analysis of *Brucella ovis* and other *Brucella* species. *Vet. Microbiol.* 10:425-429.
  82. Ochman, H. & Wilson, A. C. (1987) Evolution in bacteria: evidence for universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.* 26:74-86.
  83. Oliver, J. H. (1989) Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodidae). *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 20:397-450.
  84. Pearce, J. H., Williams, A. E., Harris-Smith, P. W., Fitzgeorge, R. B. & Smith, H. (1962) The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. II. Erythritol, a constituent of bovine foetal fluids which stimulates the growth of *Brucella abortus* in bovine phagocytes. *Brit. J. Exp. Path.* 43:230-237.
  85. Prakosh, R. K., and Schilperoort, R. A. 1982. The relationship between *nif* plasmids of

- fast growing Rhizobium species and Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 149:1129-1134.
86. Rasool, O., Freer, E., Moreno, E. & Jarstrand, C. (1991) Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on the oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect. Immun.* (submitted)
  87. Reschke, D. K., Frazier, M. E. & Mallavia, L. P. (1990) Transformation of *Rochalimaea quintana*, a member of the family Rickettsiaceae. *J. Bacteriol.* 172:5130-5134.
  88. Riley, I. K. & Robertson, D. C. (1984) Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 46: 224-230
  89. Saha, A. K., Mukhopadhyay, N. K., Dowling J. N., Ficht, T. A., L. Adams & R. H. Glew. (1990) Characterization of a phosphomonoesterase from *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 58:1153-1158.
  90. Schramek, S., Brezina, R. & Kazar, J. (1977) Some biological properties of endotoxin lipopolysaccharide from typhus group rickettsia *Acta Virol. (Praha)*. 21:439-441
  91. Silverstein, S. C. & Steinberg, T. H. (1990) Host defense against bacterial and fungal infections. In "Microbiology" edited by D. B. Davies and others. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, USA. Fourth edition, pp 485-505.
  92. Smith, L. D. & Ficht, T. A. (1990) Pathogenesis of *Brucella*. *Critical Rev. Microbiol.* 17:209-230.
  93. Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. (1973) Numerical taxonomy. W. H. Freeman & Co., San Francisco, USA.
  94. Springer, G. F. & Adye, J. (1975) Endotoxin-binding substances from human leukocytes and platelets. *Infect. Immun.* 12:978-986.
  95. Stackebrandt, E., Fisher, A., Roggentin, T., Wehmeyer, U., Bomar, O. & Smida (1988a) A phylogenetic survey of budding and or prosthecate, non-phototrophic eubacteria. *Arch. Microbiol.* 149:547-556.
  96. Stackebrandt, E., Murray, R. G. E. & Truper, H. G. (1988b) Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "Purple Bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:321-325.
  97. Tanaka, S., Suto, T., Isayama, Y., Azuma, R. & Hataykeyama, H. (1977) Chemo-taxonomical studies on fatty acids of *Brucella* species. *Ann. Sclavo* 19:67-82.
  98. Tempst, P. & Van Beeumen, J. (1983) The complete amino-acid sequence of the low-spin class II cytochrome c-556 from *Agrobacterium tumefaciens* strain B2a. *Eur. J. Biochem.* 129:603-614.
  99. Templeton, J. W. & Adams, L. G. (1990) Natural resistance to bovine brucellosis. In "Advances in brucellosis research" edited by L. G. Adams. Texas A & M University Press, College Station. USA.
  100. Van-Landschoot, A., Rossau, R. & De Ley, J. (1986) Intra- intergeneric similarities of ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acinobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:150-160.
  101. Verger, J., Grimont, F., Grimont, P. A. D. & Grayon, M. 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:292-295.
  102. Vershilova, P. A., Dranovskaya, E. A. & Kushnarev, V. M. 1972. An additional method of determination of bacterial reference to *Brucella* genus. *Zhurnal Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 49:98-101.
  103. Weisburg, W. G., Woese, C. R., Dobson, M. E. & Weiss, E. (1985) A common origin of rickettsia and certain plant pathogens. *Science* 230:556-558.

104. Weisburg, W. G., Dobson, M. E., Samuel, J. E., Dasch, G. A., Mallavia, L. P., Baca, O., Mandelo, L., Sechrest, J. E., Weiss, E. & Woese, C. R. (1989) Phylogenetic diversity of the rickettsiae. *J. Bacteriol.* 171:4202-4206.
105. Weiss, E. & Moulder, J. W. (1984) Tribe 1. Rickettsiaceae Philip, 1953, 486AL p.688-701. In "Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 1" edited by N. R. Krieg & J. C. Holt. William & Wilkins Co., Baltimore, USA.
106. Williams, A. E., Keppie, J. & Smith, H. (1962) The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus* in pregnant cows. *Brit. J. Exp. Path.* 43:530-537.
107. Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.
108. Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, R. V. J., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. H. & Fox, G. E.. (1984) The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5:315-326.
109. Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J. & Woese, C. R. (1985) Mitochondrial origins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82:4443-4447.
110. Young, E. J. & Corbel M. J. (1989) Brucellosis, clinical and laboratory aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
111. Zambryski, P. (1988) Basic processes underlying agrobacteria-mediated DNA transfer to plant cells. *Ann. Rev. Genetics* 22:1-30.

# Production et controle du vaccin Rev 1

R. Forletta

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Sezione di Pisa  
56100, Via Lucchese, 2, Italie*

## Introduction

Le vaccin idéal contre la brucellose devrait répondre aux exigences suivantes :

- a. donner un degré élevé de protection.
- b. offrir une bonne immunité avec une seule inoculation.
- c. ne pas provoquer de lésions à l'endroit de l'inoculation.
- d. être utilisable à n'importe quelle période de la vie de l'animal.
- e. avoir une production facile et à bon marché.
- f. ne pas être dangereux pour l'utilisateur.
- g. ne pas être à l'origine d'un taux d'anticorps, qui persiste au point d'entraver l'interprétation des tests diagnostiques.

Jusqu'à présent, aucun produit ne répond à toutes ces conditions sauf le vaccin Rev.1 qui, s'il est correctement utilisé, semble posséder les qualités requises.

En 1984, lors d'un séminaire sur la *Brucella melitensis* (A Seminar in the CEC Programme of Co-ordination of Research on Animal Pathology, held in Brussels at the Commission of the European Communities, 14-15 Novembre 1984), parmi les conclusions et les recommandations de la Session sur la prophylaxie des vaccins, on affirmait : le Rev.1 est un vaccin recommandé pour la protection des brebis et des chèvres contre l'infection due à *B.melitensis*.

En Italie, on préfère le vaccin Rev.1 qui, déjà en 1966, a été l'objet d'une vaste expérimentation, pour les raisons suivantes déjà exposées en 1975 à l'International Symposium on Brucellosis, Rabat :

1. excellent pouvoir d'immunisation et stabilité de la souche.
2. possibilité d'obtenir par une seule inoculation du vaccin une protection de longue durée.
3. faibles répercussions sérologiques et allergiques.
4. possibilité de disposer par lyophilisation d'un vaccin à longue conservation.

En Italie, on a commencé à vacciner avec le Rev.1 en 1968. Au début, la vaccination était prévue seulement dans les zones les plus gravement frappées par la brucellose humaine et animale.

Pendant la première année de campagne de vaccination, en 1968, 59.000 sujets furent soumis à un traitement d'immunisation ; leur nombre passa à 209.000 en 1969 puis à 870.000 en 1973.

La conséquence fut la diminution des avortements dûs à la brucellose chez les ovins et les caprins et des foyers de brucellose humaine et bovine. Chez l'homme, les cas de maladie baissèrent de 9,2/100.000 habitants par an pendant la période 1965-1968 à 5/100.000 habitants dans les années 1968/1972.

Par la suite, une mesure datant de 1981 a prévu la vaccination obligatoire de tous les sujets âgés de 3 à 7 mois et destinés au renouvellement.

On calcule qu'un fort pourcentage de sujets n'est pas vacciné et cela contribue à la persistance de l'infection.

### **Caractéristiques de la souche du vaccin Rev1**

La souche Rev.1 est une mutation non-dépendante sélectionnée à partir d'une population streptomycine-dépendante de *B.melitensis*. Isolée par Herzberg et Elberg en 1955, elle fut choisie à cause de sa virulence réduite sur le rat et le cobaye et de sa capacité à les immuniser. La stabilité de l'atténuation de la souche Rev.1 a été largement démontrée chez les cobayes, les brebis et les chèvres.

*B.melitensis* et la souche Rev.1 ont des caractéristiques communes : croissance sans addition de CO<sub>2</sub>, absence de production de H<sub>2</sub>S, activité d'uréogenèse minime.

Il y a également des différences importantes : la croissance de la souche Rev.1 est plus lente par rapport à la *B.melitensis*, les colonies sont visibles après 4-5 jours d'incubation et sont plus petites par rapport aux autres souches.

Les cobayes auxquels on inocule environ 1.000 cellules Rev.1 ne présentent plus d'infection en l'espace de 3 à 5 mois ; les souches sauvages persistent pendant au moins 6 mois. Le Rev.1 provoque chez les brebis et les chèvres une immunité de longue durée bien que les animaux demeurent sérologiquement positifs durant un certain temps. Cela ne compromet pas la prophylaxie sérologique si on se conforme aux programmes de vaccination qui prévoient des inoculations seulement chez les sujets âgés de 3 à 7 mois. La présence d'anticorps provenant du vaccin chez des sujets de plus de 18-24 mois est souvent due à des vaccinations faites à un âge non approprié car supérieur à 7 mois.

### **Production et contrôle**

La production du vaccin Rev.1 peut être effectuée sur gélose ou en fermenteur.

La culture continue assure de meilleurs rendements et n'influe pas sur les caractéristiques de la souche. En outre, cela nécessite moins de personnel et de contrôle.

La production sur gélose requiert une attention particulière de la part du personnel, les contrôles sont plus nombreux mais elle peut être facilement utilisée pour des productions plus réduites. Dans notre Institut, la production du vaccin est limitée aux exigences de la prophylaxie obligatoire de la Brucellose ovine et caprine qui, en Italie, prévoit la vaccination de tous les sujets âgés de 3 à 7 mois et destinés au renouvellement.

### **Souche de référence**

Plusieurs Laboratoires sont chargés de la distribution des lots d'ensemencement. La conservation des caractéristiques des souches est en effet une opération particulièrement délicate.

Le laboratoire qui produit le vaccin dans notre Institut obtient la souche de l'Institut National de la Recherche Agronomique - Nouzilly - France qui fournit la souche qui dérive directement de la souche originelle du Prof. S.S. Elberg.

La souche PR/81 que nous procure l'INRA, est caractérisée par une faible dissociation difficile à mettre en évidence. En général, la dissociation est plus importante dans les grandes colonies que dans les petites (avec un pourcentage d'une grande colonie pour 10<sup>3</sup>

petites). La préparation des lots d'ensemencement est donc effectuée après une sélection des petites colonies.

### **Préparation des matrices pour la production**

La souche de référence lyophilisée, parvenue dans le laboratoire de production du vaccin, est reconstituée avec une solution physiologique stérile et semée sur des boîtes de Petri avec du Trypticase soy agar additionné de 5 % de sérum de cheval (pH final 7,2).

Après 5 jours à 37 degrés, on effectue la sélection des colonies pour les matrices après avoir vérifié la présence de dissociation.

Les colonies sont directement observées au microscope à la lumière incidente. Ensuite on effectue la coloration des boîtes avec du cristal-violet (Méthode de White et Wilson). On laisse sur les boîtes la solution mère de cristal-violet, diluée 1:40 dans de l'eau distillée, pendant environ 20". Après avoir éliminé le colorant, on observe les colonies : si le nombre des colonies dissociées est supérieur à 1 %, la culture est écartée.

On effectue un contrôle ultérieur de la dissociation bactérienne au moyen du test à l'acriflavine (Méthode de Btuan et Bonestel). Les colonies sélectionnées, après les tests que l'ont vient de voir, sont semées dans des éprouvettes avec du Trypticase Soy agar additionné à 5 % de sérum de cheval : elles constitueront ainsi les matrices pour la production du lot de vaccin.

### **Production sur gélose**

Pour la production, nous utilisons Brucella Broth auquel on ajoute Bacto agar et 1 % de Glucose (pH final 6,8-7).

Le milieu est réparti en bouteilles Roux : environ 150 ml par bouteille Roux et dans les éprouvettes pour l'ensemencement des Roux.

Après les avoir ensemencées, les Roux sont mises en incubation pendant 3 jours.

On recueille ensuite la couche bactérienne en introduisant dans les Roux une substance protectrice qu'on utilise lors de la lyophilisation : Casitone 2,5 %, Saccharose 5 %, Glutamate de sodium 1 %.

Les Roux sont placées dans un agitateur automatique jusqu'au détachement complet de la couche.

### **Contrôle du produit a lyophiliser**

Avant la lyophilisation, le produit est soumis à un contrôle de pureté.

### **Lyophilisation**

La lyophilisation s'effectue dans des flacons de 5-10-20 doses. La substance protectrice est utilisée aussi pour le prélèvement de la souche bactérienne des Roux que nous venons de décrire.

La lyophilisation s'effectue en 24 heures environ :

- a. refroidissement à -55 pendant 3 heures.
- b. sublimation à partir de -50 jusqu'à -8.
- c. réchauffement sous vide final de -8 à +37.

Le stoppering est effectué avec un vide de 15 microns.

## Contrôle du produit fini

Après la lyophilisation, le vaccin est soumis aux contrôles suivants :

1. *Pureté* : ce contrôle doit vérifier l'absence de corps étrangers, bactériens ou mycosiques. On utilise les milieux suivants : bouillon Andrade, Agar triptosio, milieu liquide au thioglycolate, Sabouraud. La durée de ce contrôle est de 10 jours.
2. *Contrôle de la charge microbienne* : le nombre de brucella Rev.1 doit correspondre à au moins  $2 \times 10^9$  par dose.
3. *Contrôle de la phase* : on admet la présence d'1 % de colonies dissociées. Nous avons déjà décrit les systèmes de contrôle de la phase.

On répète ces contrôles pour chaque lot qui est lyophilisé, au moyen de prélèvement d'échantillons.

Avant l'étiquetage, chaque flacon est soumis à la vérification du vide.

Pour chaque série de vaccin, on effectue en outre les contrôles suivants :

1. *Innocuité sur les agnelles* : n.2 agnelles âgées de 3-7 mois sont vaccinées avec double dose ( $4 \times 10^9$ ). Les animaux doivent présenter seulement une faible hyperthermie sans manifestation d'ordre général et une légère réaction à l'endroit de l'inoculation. Ces symptômes disparaissent en 6-7 jours au maximum.
2. *Innocuité sur les cobayes* : on pratique une injection sous-cutanée à n.4 cobayes avec 3.000 cellules Rev.1. Après 12 semaines, on compte les cellules bactériennes pour chaque gramme de rate, ensuite on effectue l'examen sérologique.
3. *Efficacité sur les cobayes* : les cobayes vaccinés avec 3.000 cellules Rev.1, infectés avec une souche virulente de *Brucella melitensis*, présentent par gramme de rate un nombre de brucella très inférieur par rapport aux cobayes non vaccinés (Tableau 1).
4. *Immunogénicité sur le cobaye* : on vaccine les cobayes avec 3.000 cellules Rev.1. 14 jours après, on prélève des échantillons de sang et on les soumet au test de séroagglutination lente. La réaction se situe entre 320 UI et 1.280 UI par ml.

Chaque série est donc soumise aux contrôles suivants par les Laboratoires de Médecine Vétérinaire de l'Institut Supérieur de la Santé : contrôle de pureté, contrôle de la charge bactérienne, contrôle de la dissociation bactérienne.

Tableau 1. Réactions chez le cobaye après inoculation du vaccin et de souches virulentes de *Brucella*

	Rev.1	Souches virulentes
Splénomégalie/nodules	absent	présent
Poids de la rate	environ 1 gr.	> 2 gr.
Moyenne des colonies/ gramme de la rate	<100	> 1.000
Rapport poids de la rate/ poids du corps du cobaye	environ 0,15	> 0,2



# **Rev.1 and B19 vaccine control in Spain. Observations on the handling and effectiveness of Rev.1 vaccine and the immune response**

*F. Garrido-Abellan*

*Laboratorio de Sanidad Animal del Estado Centro Nacional de Brucelosis Animales  
Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, Santa Fe (Granada) - SPAIN*

## **Introduction**

Brucellosis is one of the foremost diseases of ruminants in several regions of Spain. It occurred in 3014 human beings during 1990.

The programming, implementation and funding of material and human resources to control and eradicate brucellosis are the direct responsibility of the public authorities, and involve animal vaccination, serodiagnosis and slaughter. Vaccination has been mandatory since 1978. B.19 vaccine is injected into cattle at 3-9 months of age, and Rev.1 vaccine in sheep and goats at 3-6 months of age.

As in all highly-contagious diseases, vaccination increases in effectiveness the greater the coverage of the animal population. Erratic administration of vaccines or their use without adequate quality control is not effective. Adequate protection is only possible if the quality is good and if vaccines are administered to at least 80 % of the animals at risk.

In administering brucellosis vaccines in an area of half a million square kilometres and to 25 million ruminants, maintaining minimum quality standards poses two types of problems :

1. Vaccine stability during refrigerated storage (4°C).
  2. Maintaining the necessary refrigeration between local distribution and vaccination.
- Under optimum conditions of stability, freeze-drying and storage, there is an appreciable drop in the viability Rev.1 and B.19 strains with time. Spanish regulations establish a general expiry date of 1 year for bacterial vaccines.

In practical terms, because of the drop in viability during storage and distribution, these vaccines should be used during a short period of time, and therefore the production of brucellosis vaccines requires an annual planning programme which considers the factors of overall demand, local distribution and storage.

The Spanish administration has commended vaccine production and distribution at the provincial level to private enterprises. Brucellosis vaccines are therefore controlled by the government and their sale to the public is prohibited. Veterinary clinics and official vaccine teams transport the vaccines from local distribution centres in portable refrigerators, and are ultimately responsible for maintaining the stipulated storage conditions until the vaccines are administered.

## Vaccine control

The public authorities are responsible for controlling the entire process at 4 levels :

1. Setting up regulations for B.19 and Rev.1 vaccines concerning their production, inspection, bottling, labelling, quality control, stability, distribution and storage. These are based on the Regulations for Biological Substances published by WHO (R.B.S. #20, #25, and Reports 22 & 27) and on the "Laboratory techniques for brucellosis" by Alton *et al.* (1988). The strains used are supplied to the manufacturer by the National Brucellosis Reference Centre, which is in turn stocked by the WHO Reference Centres. Rev.1 vaccine should contain between 1 and  $2 \times 10^9$  viable bacteria/dose. B.19 vaccine should contain between 40 and  $120 \times 10^9$  viable bacteria/dose.
2. *In situ* process inspection by the Official Inspectors. They are also responsible for collecting bottled samples of every vaccine batch and sending them to the National Brucellosis Reference Centre together with the results of the laboratory production control test.
3. Quality control for each vaccine batch produced. In the above-mentioned National Centre the following control tests are routinely performed : strain identity, sterility, purity, dissociation, and determination of the number of viable microorganisms. Moreover, at the onset of every vaccine campaign, reactivity and antigenicity, and immunogenicity tests in guinea pigs are performed.
4. Quality control subsequent to storage and local distribution. These checks are routinely performed in diagnostic laboratories solely responsible for purity, viable bacterial count and dissociation tests.

### Results of viability control of Rev.1 and B.19 vaccines

The results of national viability tests performed in the Animal Brucellosis Reference Centre for vaccine batches sent from producing laboratories during 1989-1990 and 1991 are shown

*Table 1. Results of the viability National Control on 58 Rev 1 vaccine batches from 1989 to 1991.*

Rev 1	Number	Cell count average
suitable	76 (89,4%)	$1,89 \times 10^9$
unsuitable	9 (10,6%)	$0,61 \times 10^9$

*Table 2. Results of the viability National Control of 101 B19 vaccine batches from 1989 to 1991.*

B19	Number	Cell count average
suitable	93 (92,1%)	$101 \times 10^9$
unsuitable	8 (7,9%)	$39 \times 10^9$

Samples taken from the manufacturing Laboratories by the official Inspections Services, and tested in the National Brucellosis Reference Centre, Santa Fe (Granada) Spain.

in Tables 1 and 2. In this study, 10.6 % of Rev.1 vaccine batches and 7.9 % of B.19 batches were found to be unsuitable.

The results of tests conducted at local level (provinces of Almeria, Granada, Jaen and Malaga) on batches passed by the National Centre, but this time after storage and distribution are shown in Tables 3 and 4. In this study, 20.3 % of the Rev.1 vaccine batches and 15.9 % of the B.19 batches were found to be unsuitable.

It is therefore evident that routine control tests for brucellosis vaccines following storage and local distribution are of decisive importance.

*Table 3. Results of the local routine control on 64 Rev 1 vaccine batches after its distribution and storage in the provinces of Almeria, Granada, Jaen and Malaga.*

	1988	1989	1990	1991	Total
Number of batches under control	22	12	19	11	64
Number of batches found suitable(%)	17(72,3%)	12(100%)	15(79,0%)	7(63,6%)	51(79,7%)
Number of batches unsuitable (%)	5(22,7%)	0(0,0%)	4(21,0%)	4(36,4%)	13(20,3%)
Average cell count of suitable batches( $\times 10^9$ )	1.33	1.9	1.5	1.78	1.58
Average cell count unsuitable batches ( $\times 10^9$ )	0.60	---	0.26	0.62	0.49

Samples taken by Local Veterinary Services from Distribution Centres, and tested in the National Brucellosis Reference Centre

*Table 4. Results of the local routine control on 44 B19 vaccine batches after its distribution and storage in the provinces of Almeria, Granada, Jaen and Malaga.*

	1988	1989	1990	1991	Total
Number of batches under control	9	11	13	11	44
Number of batches found suitable	9	9	9	10	37(84,1%)
Number of batches unsuitable	0(0,0%)	2(18,2%)	4(30,8%)	1(7,7%)	7(15,9%)
Average cell count of suitable batches( $\times 10^9$ )	75	90.5	67	74	76.5
Average cell count unsuitable batches ( $\times 10^9$ )	---	34	30.4	1.1	27

Samples taken by Local Veterinary Services from Distribution Centres, and tested in the National Brucellosis Reference Centre

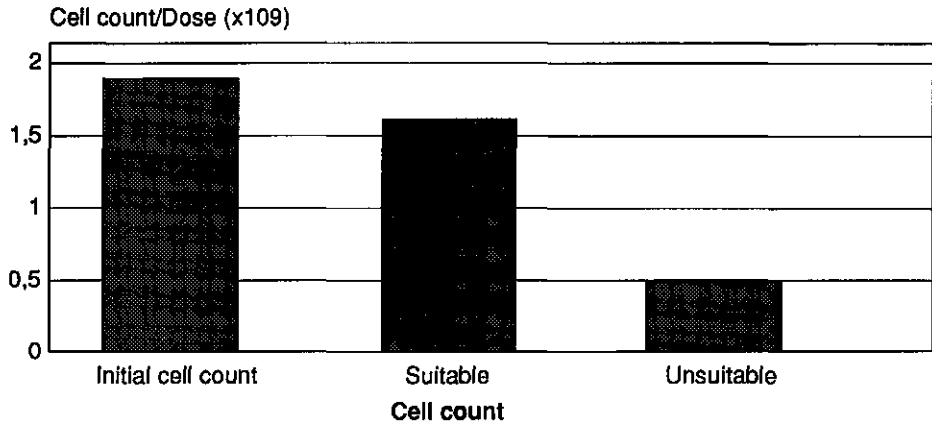


Figure 1. Batches of Rev 1 cell count variations after the storage and local distribution.

Figure 1 shows the loss in viability in Rev.1 batches between production and vaccine administration.

In Spain, under the conditions prevailing in the Mediterranean region of Eastern Andalusia, the administration of Rev.1 vaccines which had not undergone the necessary quality-control checks would have provided insufficient protection for over 30 % of the animals inoculated, and would therefore have been inadequate for preventing disease transmission.

The lesser tolerance found between the maximum ( $2 \times 10^9$ ) and minimum ( $1 \times 10^9$  bacteria/dose) count in Rev.1 in comparison with that of B.19 makes its control imperative in the final phase of vaccine distribution, to ensure vaccine effectiveness in small ruminants.

### Observation on the effectiveness of the Rev.1 vaccine

It has been well established that a large proportion of animals vaccinated are protected against infection (1), and in those animals where infection does appear it is merely transitory. Hence, the period of brucella excretion from the udder or vagina is shorter, the degree of microbial contamination of the surroundings is reduced and, consequently, disease transmission within and between herds is significantly reduced.

Using three different vaccination systems in regions with a high rate of incidence, the following results were obtained :

### Systematic vaccination of young animals: comments on mass serology findings

In the province of Granada (12000 km<sup>2</sup> and over 300000 breeding animals over a year old, in flocks of sheep and/or goats vaccination has been performed at 3-6 months of age since 1976. In 1984, 80 % of the registered young small ruminants were covered, and in 1986 practically 100 % were vaccinated. The rate of incidence in humans dropped 67 % between 1983 and 1990.

In 1984 the serological prevalence of brucellosis represented 11.2 % of the small ruminant population. During the first part of 1991, the serological prevalence for a total of 72035 animals surveyed was 2.8 % (Figure 2). A total of 52.2 % of the flocks and herds surveyed were seropositive (including animals with titres equal or greater than 1/4++: 20

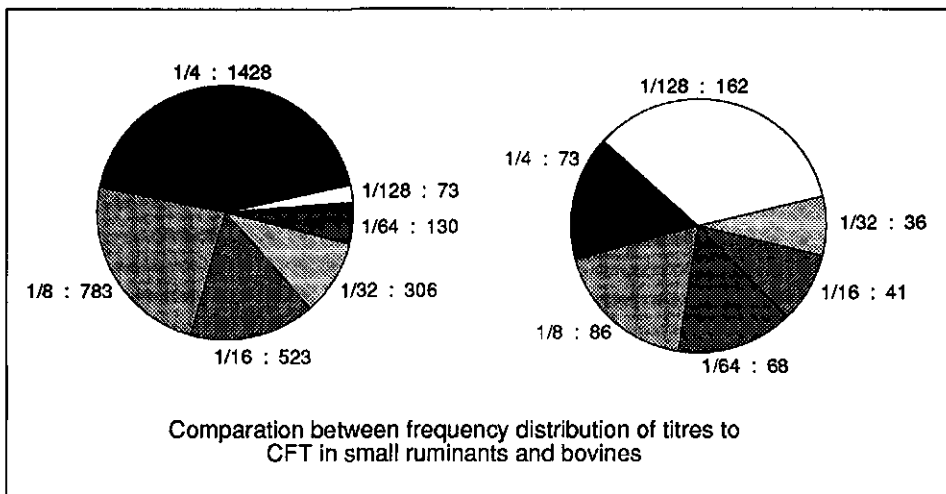


Figure 2. Frequency distribution of the titres to CFT found in ruminants.

IUCF/ml). A total of 12.5 % were considered suspect (titres of 1/4+) and the remaining (35.3 %) were seronegative. The prevalence of seropositive animals within seropositive flocks and herds was 5.4 %. The proportion seropositive flocks or herds has shown very few variations since 1984.

In light of these results, it appears to be confirmed once again that the mere vaccination of herds incidence is reduced to a minimum, subsequent vaccination only appears to accomplish a relative stabilizing effect of the situation (2) particularly in goats, in which the infection is more persistent.

If vaccine administration in young animals is interrupted in the absence of other control measures, with time the incidence of brucellosis in flocks or herds will rise to its initial levels (3). It is inevitable that in order to successfully eradicate infection, both diagnosis and slaughter must be additionally used.

### Comments on antibody titres frequency distribution

In the aforementioned animal population of 72035 sheep and goats in Granada province, the proportion of minimum antibody titre (1/4+) to the CF test was considerably greater (85 %) than the proportion of other 1/4 titres (++, +++, +++++). At the same time, the number of animals reacting to 1/4 dilutions was considerably greater than those reacting to medium or high titres. When compared with the results shown for seropositive cattle (100 % were vaccinated young with B.19 from the same province during the same time period it was found that, quantitatively, the immune response of large and small ruminants to infection and, perhaps, to the brucellosis vaccines, was entirely different (Figures 2 and 3).

On the basis of this observation, we must remember that infections brought about by *B.abortus* and *B.melitensis* induce quite different diseases :

- a. the expression of infection by *B.melitensis* in the humoral immune system is weaker, perhaps as a consequence of the greater difficulty in presenting their antigens to macrophages;

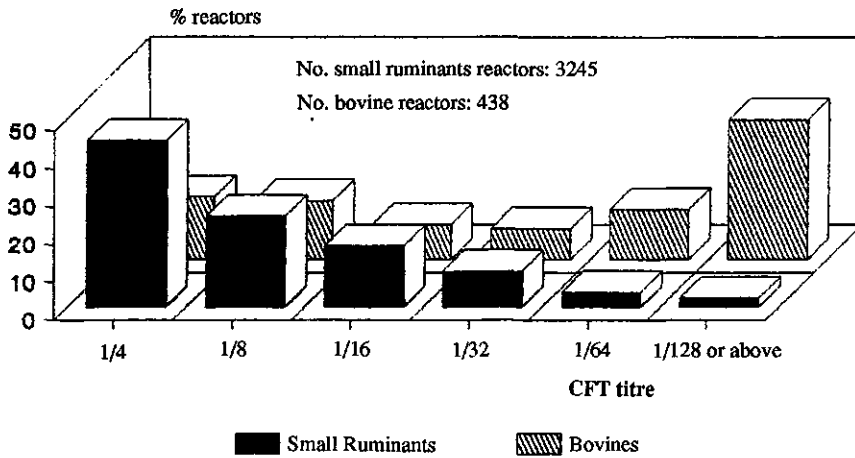


Figure 3. Comparison between frequency distribution of titres to CFT in small ruminants and bovines.

- b. this poor response in circulating antibodies suggests the possibility that the lack of sensitivity to serodiagnostic techniques for ovine and caprine brucellosis cannot be attributed only to the techniques used, but rather to the very nature of the infection;
- c. the main prevalence of low antibody titres also suggests a greater degree of confusion with regard to residual antibodies after Rev.1 vaccination. A hypothetical mathematical approach, based on negative culture results, ascribes about half of the reactors showing 1/4 titres to vaccinal origin.

#### Large-scale vaccination of the whole population with reduced doses

Large-scale administration of Rev.1 vaccine in reduced doses ( $1 \times 10^6$  bacteria/dose) to adult (2.5 sheep million) and caprine populations (600000) in the central region of Castilla-La Mancha resulted in a reduction in the prevalence of brucellosis from an initial 6.2% to 1.8% over a five-year period.

#### Combined systems of adult seropositive slaughtering and conjunctival vaccination

In countries or regions endowed with a good infrastructure of laboratories and sufficient veterinary service coverage, the vaccination of the entire population (including adult animals with reduced or conjunctival doses at the onset of the campaign) tends to be very effective, although perhaps unnecessary. On the basis of our experience, even in endemic regions with a high rate of incidence in humans, 50-90 % of animals remain unaffected by brucellosis. Under such conditions, a very rapid reduction of ovine brucellosis was achieved in the Pyrenean region of Navarre by preliminary testing of the livestock population, vaccination of young animals, slaughtering seropositive animals in flocks of high prevalence, and the subsequent conjunctival vaccination of the remaining adult animals in these flocks. The consequence was an 80 % reduction in the incidence rate in man, a drastic reduction

in the number of abortions brought on by brucellosis, and a variation in the serological prevalence from 12.8 to 1.2 % over a 3-year period, in a total population of 600000 heads (4).

In light of these results, one should wonder if the conventional scheme of eradicating bovine brucellosis based on the vaccination of young animals, serodiagnosis and slaughtering can be improved in ovines and caprines by a more generous administration of the vaccine in adult animals in flocks or herds having a high rate of incidence. We should keep in mind that the brucellosis serodiagnostic techniques are less sensitive in small ruminants infected by *B. melitensis* than in bovines infected by *B. abortus* (5), and therefore the proportion of small ruminants infected by *B. melitensis* which go undetected is greater.

The next step, namely the decision to abandon vaccination with Rev.1 when serological prevalence is low, should be made only after having tried it out first in a restricted area, but under large-scale conditions.

### Observations on the immune response to Rev.1 vaccine

It is well known that vaccination with Rev.1 can produce paradoxical results. While it may confer effective protection, it may also provokes the appearance of antibodies which cannot be distinguished from those originated by the infection, which persist only at low titres in the immense majority. In animals vaccinated between the ages of 3-6 months, the minimum waiting period for applying the serodiagnostic system is 1 year. The complement fixation test (C.F.T.) is presently the only serological technique which proves effective for diagnosing the infection by *B. melitensis* in sheep and goats vaccinated with full doses of Rev.1. (6).

Opinions do exist, nevertheless, with regard to the persistence of the immune response. In the opinion of some (7,8), in the large majority of vaccinated sheep and goats the CFT would become negative between 6 and 12 months. The results of the aforementioned large-scale serodiagnostic study of animals over 18 months old in Granada province comes close to this tendency. In the opinion of others (9,10), a very significant proportion (10-30 %) of the lambs vaccinated would maintain positive titres at CFT for an even longer period of time up to two years. It appears to be extremely difficult to reconcile these apparently contradictory positions, although it has been stated that this could be due to differences in the CFT techniques used. Another possible explanation could be that both groups of authors used variations of the Rev.1 strain with differing degrees immune responses with regard to intensity and duration.

In any event, the results obtained in a vaccination experiment carried out entirely in the field, using herds of different health status in the province of Cadiz are very enlightening (11).

All of the goats vaccinated in brucellosis-free herds became negative in the CFT within a period of only 5 months. In this case, the predictive CFT value for healthy vaccinated animals was 100 % and consequently, vaccination with Rev.1 did not interfere in the diagnosis. The brucellosis survey in Granada comes close to these results, as 229 brucellosis-free vaccinated flocks and herds were found to be seronegative. When seronegative goats within infected herds were vaccinated, however, a considerable proportion of the animals maintained 1/4 titres, and a smaller number maintained 1/8 and 1/16 titres following the 210-day period of study.

This prolonged persistence in vaccine antibodies in animals defined as seronegative at the time of vaccination has been continuously observed with the administration of Rev.1 in flocks of infected sheep and herds of infected goats, both in young animals with full doses

as well as in reduced adult doses (E. Esteban, J. Casado, F. Crespo, A. Gasca, personal communication).

### **The booster effect of Rev.1 vaccination in Infected herds (12)**

For the purposes of explaining the differences in intensity and immune response duration to Rev.1 vaccination in seronegative individuals from flocks or herds of differing health status, we must take into consideration that in the herds studied, reproduction is not planned and deliveries occur throughout the year. Artificial lactation is not generally practised, and the kids and lambs live with their mothers for at least 3 months.

Under these conditions, which are generally practised in most Mediterranean countries, the administration of Rev.1 vaccine to seronegative young and old animals in infected herds could have a secondary antigenic impact. The primary impact would have been made first by the environmental *B.melitensis* excreted by infected animals. This immune response to the vaccine is of greater intensity and longer duration. When animals are given a secondary impact with the same antigen (this time with the Rev.1 vaccine) a much faster, *more potent* and *more persistent* immune response occurs. These differences in the nature of the secondary response are readily explained by the presence of larger numbers of specific helper T cells and memory B cells in the immune system of the primed animal (13). As memory cells are long-lived, the booster effect of the Rev.1 vaccination can take place months or years after the primary antigenic impact. Hence, Rev.1 vaccination of infected flocks or herds interferes with serodiagnosis in a portion of the animals for a much longer time than when Rev.1 is inoculated in brucellosis-free flocks or herds.

It would be interesting to experimentally reproduce the above-mentioned booster effect, administering subinfective doses orally or conjunctivally over a specific period of time to unweaned kids, and later vaccinating with normal doses of Rev.1. In this way we would be reproducing the environmental conditions of the infected herds, and it is very probable that we would discover new reasons for recommending conjunctivally administered vaccination.

For goats (natural host) and for sheep (main host) many questions still exist with regard to intensity and duration of the immune response, both to the infection by *B.melitensis* as well as to vaccination with Rev.1, or a combination of both.

From the progress made in these areas of our knowledge very valuable tools could be found to improve existing disease eradication schemes.

### **References :**

1. Elberg, S.S. (1959) Immunisation against Brucella infection. VII. Immunological and epidemiological studies in Cordoba, Spain. Bull. WHO, 20,1033.
2. Garrido, F. 1985 Enfermedades endémicas del caprino en Zonas Áridas. Proceedings, I Simposium Internacional sobre la Explotación del Caprino en Zonas Áridas. Fuerteventura.
3. Garrido, F. Gomez, F., Crespo, F. 1982 Evolución de la Incidencia de brucelosis en rebaños caprinos vacunados con Rev.1. Proceedings, VII Congreso Nacional de Ovinotecnia, Murcia, 125.
4. Sainz de Murieta, C., Eguluz, J. (1991) Saneamiento brucelar ovino y caprino en Navarra. Proceedings, Congreso Nacional de Ovinotecnia (in pres).
5. Farina, R. 1985 Current serological methods in *B.melitensis* diagnosis in *B.melitensis*,



- a seminar in the EEC Programme of coordination on Research on Animal Pathology, Martinus Nijhoff, 139.
6. Alton, G.G. (1967) Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine, serological reactions in Maltese goats, *J. Comp. Pathol.*, 77, 327.
  7. Alton, G.G. 1990 *Brucella melitensis*. In "Animal brucellosis" edited by K.Nielsen and B.Duncan. CRC Press, Boston 383-409.
  8. Pedruelo, F., Ladero, J.L. (1977) Evolucion de los titulos serologicos de ovidos y capridos inoculados con la vacuna Rev.1. Proceedings, I Reunion Nacional sobre Brucelosis. Valladolid.
  9. Fensterbank, P., Pardon, P., Marly, J. (1989) Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, 50, 560-563.
  10. Blasco, J.M. (1990) Control y profilaxis en brucelosis ovina. *Ovis* No 8, 65-69.
  11. Gasca, A., Jimenez, J.M., Diaz, L. (1985) Experiencias sobre vacunacion antibrucelar. Diputacion Provincial de Cadiz.
  12. Garrido, F. (1985) Profilaxis y erradicacion de la brucelosis en Espana. Proceedings, I Congreso Internacional Sobre Brucelosis, Ciudad Rodrigo.
  13. Male, D., Champion, B., Cooke, A. (1987) *Advanced immunology*. Gower, Lippencott Medical, Philadelphia, USA.

# Manufacture of brucellosis vaccines in Turkey. Quality control and field trials

A. Çoker

*Pendik Animal Diseases Central Research Institute, Brucella Section, Istanbul, Turkey*

## Introduction

Live, attenuated, freeze-dried brucellosis vaccines currently used in Turkey are:

### *Brucella abortus* strain 19

This has been used in Turkey since 1960 for immunizing female calves aged 4-8 months against *B. abortus* infection. It is produced in liquid medium in fermenters by a continuous culture method, and annual production is one million doses.

Each dose contains  $40-120 \times 10^9$  viable cells in 4 ml for subcutaneous injection. Vaccinated animals are ear-tagged and kept apart from other animals in sheltered accommodation for 3 weeks.

A pilot project for vaccination of adult cattle commenced in the Thrace region in 1991. All unvaccinated female cattle over 8 months of age are being vaccinated with a reduced dose of strain 19 vaccine ( $3-10 \times 10^9$  viable cells in 1 ml for subcutaneous injection).

### *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine

This has been used successfully for protecting sheep and goats against *B. melitensis* infection since 1968. It was produced on solid medium in Roux flasks until 1991, when a fermenter came into use for batch production. 5-6 million doses are produced annually. Each dose contains  $2 \times 10^9$  viable cells in 1 ml for subcutaneous injection behind the scapula. So far lambs, kids, ewes and goats have received the full dose. Pregnant females are not vaccinated. During 1991 in the Thrace region, 884 000 sheep and goats (above 8 months of age) were vaccinated with  $5 \times 10^8$  viable cells in 1 ml (see Table 1). It is planned to give a booster injection after a year.

The first eradication scheme commenced in government farms. All sheep and goats, whether infected or not, received a full dose of Rev. 1 vaccine. During the second year, the lambs and kids of vaccinated females were inoculated with the same dose, and this scheme was applied for 4 years, at the end of which the farms were free from *B. melitensis* infection. The disease has now been eradicated from all government farms.

With the start of a national brucellosis control and eradication scheme in 1982, control activities intensified on a regional basis. The objective is complete vaccination of calves (at 4-8 months of age) with strain 19, and all sheep and goats, together with their offspring at 3-5 months of age, with Rev. 1 vaccine. This national scheme will continue for 26 years. So far 35 942 272 sheep and goats have been vaccinated (see Table 2).

*Table 1. Numbers of animals receiving strain 19 or Rev. 1 vaccine in the Thrace region during 1991.*

Province	strain 19	Rev. 1
Edirne	43 500	157 000
Istanbul	20 500	235 000
Kirkareli	50 000	220 000
Tekindag	12 000	67 000
Canakkale	4 200	205 000
Total	130 200	884 000

*Table 2. Number of sheep and goats vaccinated between 1982 and 1990.*

Year	number vaccinated
1982	522 000
1983	722 000
1984	8 038 000
1985	3 408 000
1986	3 728 000
1987	5 362 000
1988	4 022 000
1989	5 019 300
1990	5 161 672
Total	35 942 972

### **Vaccine testing**

Vaccines are tested according to the INRA guidelines "Techniques for the brucellosis laboratory", as follows.

1. Identification of the vaccine strain
2. Freedom from contaminating micro-organisms
3. Dissociation
4. Concentration of viable bacteria
5. Stability
6. Vacuum
7. Safety testing
8. Efficacy testing
9. Guinea-pig inoculation (for residual virulence).

The duration of immunity conferred by Rev. 1 vaccine has been studied in Turkey over 3 successive pregnancies (2, 3).

A field trial of revaccination with Rev. 1 vaccine was conducted by Unel (1971, unpublished report). The lambs of infected flocks were vaccinated when 4-6 months old

(group A). Some received a second inoculation either after 7 months (Group B) or after 12 months (Group C). The antibody response disappeared 7 months after inoculation.

The three groups vaccinated as lambs and a group of unvaccinated females (Group D) were challenged with the Turkish "Cifteler" field strain of *B. melitensis*, biotype 2. None of Groups A, B or C aborted, but 89.52% of Group D aborted. The percentages of serologically positive animals were 16.5% in Group A, none in Group B, 11.75% on Group C and 85.32% in Group D. The bacterium was recovered at slaughter as follows:

Group D (controls):	generalized	82%
	infected foci	17.7%
	milk	90.95%
	vaginal swab	93.75
Group A:	generalized	9.7%
	infected foci	12.5%
	milk	25.6%
	vaginal swab	28.5
Group B:	generalized	nil
	infected foci	nil
	milk	nil
	vaginal swab	nil
Group C:	generalized	3.12%
	infected foci	9.7%
	milk	nil
	vaginal swab	11.97

The results show that revaccination of Group B with Rev. 1 at an interval of 7 months conferred better immunity than that seen in Groups A and C.

In another study of the immunization of sheep and lambs by the aerosol method against *B. melitensis* infection (S. Unel, 1972, unpublished report), 20 pregnant ewes were each exposed for 20 minutes to an aerosol of Rev. 1 at  $20 \times 10^9$ /ml. The results of challenge infection showed that protection was equivalent to that conferred by subcutaneous inoculation.

## References

1. Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R.d. & Verger, J. M., 1988. Techniques for the brucellosis laboratory.
2. Unel, S.; Erdem, R.; Williams, C. F.; Stableforth, A. W. (1969) *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine. Duration of immunity experiments, first pregnancy challenge. *Pendik Vet. Kontr. Arst. Enst. Dergisi* C:2, S:2
3. Unel, S. (1970) *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine. Duration of immunity experiments, third pregnancy challenge (unpublished report).

## **Session 5**

**Recent progress in understanding the immune response:  
immunity and diagnosis**

# Identification des antigènes protecteurs et mécanismes de la protection

G. Dubray<sup>1</sup>, J.N. Limer<sup>2</sup>, M.S. Zygmunt<sup>1</sup>, A. Cloeckaert<sup>2</sup>, I. Jacques<sup>1</sup>.

1. Unité de Pathologie Infectieuse et d'Immunologie, INRA Centre de recherches de Tours, 37380 Nouzilly, France.

2. Centre d'Etude de la Brucellose, Unité d'immunologie et de Microbiologie, Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, 61, rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgique.

## Introduction

Dans la lutte contre la brucellose, les plans de prophylaxie font appel à des mesures sanitaires (dépistage des infectés par la sérologie et parfois l'allergie et abattage des animaux infectés) et des mesures médicales de vaccination (vaccins vivants atténués). Ces mesures ont des limites importantes qui ralentissent l'éradication ; celles concernant les vaccins sont :

- l'induction d'anticorps agglutinant ou fixant le complément, qui empêche la distinction entre animaux infectés et vaccinés. Ces anticorps sont dirigés principalement contre l'immunogène majeur de la surface des *Brucella* en phase lisse (S) : le lipopolysaccharide S ou LPS-S. De plus le LPS-S d'autres bactéries est responsable de réactions croisées (Bundle et al., 1987). Celles-ci deviennent un problème en fin d'éradication dans des troupeaux de zone sans brucellose .
- la variation de la qualité de la souche vaccinale.
- la protection variable d'un vaccin à l'autre et, surtout, d'un lot à l'autre. En fait il y a peu ou pas de contrôle de l'efficacité de chaque lot mis sur le marché.

Seule l'identification des antigènes protecteurs et des mécanismes de protection permettrait de surmonter ces limites et de définir un vaccin idéal : délivrance d'une dose, aucune restriction d'âge, protection pendant la durée de vie économique de l'animal ; ne produisant pas de lésion locale ; n'induisant pas d'anticorps ni de cellules T sensibilisées détectables par les épreuves sérologiques standards actuelles (épreuve d'agglutination sur lame à l'antigène tamponné coloré au Rose Bengale, fixation du complément) ; ne pas créer d'état d'infection vaccinal persistant ; facile à produire et à contrôler et peu coûteux. Ces conditions impliquent une stratégie globale de la recherche 1- des antigènes protecteurs et des mécanismes de la protection et 2- des antigènes de diagnostic différents des antigènes protecteurs (J. Limer et al, ce séminaire).

## Antigènes protecteurs (AgP)

La recherche d'antigènes protecteurs sur l'animal a commencé dès 1944 par l'injection d'une fraction de *Brucella* (antigène glucido-lipidique) à des bovins (Lisbonne, Roman). Cependant l'identification des AgP et des mécanismes immunitaires de la protection implique de nombreuses expériences difficilement réalisables directement sur les animaux cibles. Aussi, les chercheurs se sont posés le problème de la mesure de la protection dans deux

modèles d'animaux de laboratoire (cobaye et souris) et de la transposition à l'animal cible.

### Identification des AgP avec épreuve de protection sur animal de laboratoire

Le choix d'un modèle expérimental de laboratoire pour estimer la protection due à un vaccin est très délicat, car la protection mesurée doit être corrélée à celle qui existe lorsque l'hôte naturel vacciné est protégé.

Le modèle cobaye a été longtemps le modèle de référence pour tester l'efficacité des vaccins vivants par la mesure de la protection avec une réponse de tout ou rien : absence d'infection ou animal infecté (World Health Organization, 1986). Ce modèle comparant des pourcentages d'infection ne se prête pas à une mesure quantitative précise de la protection et nécessite un grand nombre d'animaux pour comparer des pourcentages proches.

Le modèle souris a été aussi très utilisé sans parfois étudier correctement tous les paramètres: cinétique d'infection, voie, courbe dose-réponse du vaccin, statistiques..... Un modèle quantitatif de mesure de la protection sur souris a été développé: les meilleurs vaccins utilisés sur les bovins, ovins et caprins se sont également révélés les meilleurs dans ce modèle (Plommet et Bosseray, 1977, Bosseray et Plommet, 1983, Bosseray et al, 1984; Plommet et Bosseray, 1984). Ce résultat ne fait pas trop craindre l'extrapolation souris/bovins, ovins et caprins.

Deux stratégies ont été utilisées pour identifier les AgP : protection active en injectant des fractions plus ou moins purifiées et protection passive par transfert d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux et de cellules (B, T). Dans la plupart des cas, la protection est mesurée globalement sans chercher en général à connaître les mécanismes immunitaires impliqués. Le terme protection est employé ici dans le sens d'une diminution significative du nombre de *Brucella* dans un organe cible (la rate, en général) d'un groupe vacciné par rapport à un groupe contrôle : les groupes sont éprouvés par une souche virulente de *Brucella*.

Malgré les réserves concernant les modèles, il a été montré que les antigènes protecteurs sont localisés dans la paroi de la cellule de *Brucella* puis dans des fractions solubles et insolubles de cette paroi (voir la revue détaillée de Roux, 1972)

#### *Protection active*

Les fractions solubles de la paroi qui se sont montées protectrices contiennent principalement le LPS-S ainsi que probablement une quantité variable des protéines de la membrane externe (PME) des *Brucella* bien qu'elles ne soient bien connues que depuis peu (revue de Winter, 1987, Cloeckart et al, 1990).

Les fractions insolubles sont les résidus:

1. de paroi extraites par le phénol (fraction Rh2, Rasooly et al, 1966)
2. de cellules extraites par le phénol (fraction PI, Roux et al, 1967) dont un extrait de *B. abortus* B19 est proposé comme vaccin en médecine humaine (Bentejac et al, 1984, Desmettre et al, 1984).
3. de parois extraites par le dodécylsulfate de sodium (fraction SDS-I, Dubray et al, 1974, Winter et Rowe, 1988) (voir la revue de Dubray, 1987 concernant les propriétés de ces trois fractions).

De ces trois fractions, la fraction SDS-I a été la mieux caractérisée physicochimiquement et immunologiquement. Cette fraction renferme une quantité importante de peptidoglycane (30 %) et de protéines (50 %). Celles-ci sont libérées seulement après hydrolyse du

peptidoglycane par le lysozyme. L'analyse de la fraction par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (EGPA-SDS) montre : 2 bandes majeures de PME : 25-27K, 36-38K; des bandes mineures de PME : 31K, 43K, 68-70K et du lipopolysaccharide de haut (LPS-S) et de bas poids moléculaire (LPS-R). Ces molécules sont les protéines majeures de la membrane externe (Dubray et Charriaut, 1983, Cloeckaert *et al*, 1990). Les difficultés de purification (molécules de la fraction solubles seulement dans les solutions de SDS) et la purification insuffisante des fractions et notamment la présence de LPS-S ne nous a pas permis d'attribuer sans ambiguïté l'activité protectrice par immunisation active de fractions "purifiées" aux protéines de la fraction ou au LPS-S (Dubray et Bézard, 1980).

La protéine de masse moléculaire 31kDa dont la localisation cellulaire est incertaine, a une activité protectrice dans le modèle Lemming (Tabatabaï *et al*, 1989). Cependant, sa purification à partir d'une souche S entraîne une contamination par du LPS-S ce qui ne permet pas d'assurer qu'elle est entièrement responsable de la protection. Son expression après clonage a été obtenue dans la bactérie porteuse *Salmonella typhimurium*. Cette dernière injectée par voie orale, ne permet d'induire qu'une réponse en anticorps (Stabel *et al* 1990). L'activité protectrice n'a pas été testée.

Devant les problèmes de purification, une autre approche a été tentée par injection du polysaccharide couplé à une PME majeure (porine de 36 k, Winter *et al*, 1988) ou couplé à un porteur macromoléculaire (Jacques et Dubray, Vaccine, sous presse). L'utilisation d'un vaccin semi-synthétique obtenu par couplage du PS purifié sur la porine de souche R confère une bonne protection, comme les complexes porine-LPS-S (Winter *et al*, 1988). Dans cette même étude, le complexe porine-LPS-R ne protège pas. Le polysaccharide du LPS-S ou PS-S purifié par chromatographie liquide haute performance (Zygmunt et Dubray, 1987) a été couplé à l'albumine du sérum de boeuf pour étudier la réponse immunitaire humorale chez la souris. Une bonne réponse en anticorps a été obtenue et ce conjugué est capable de protéger la souris contre une infection à *B. melitensis* (Jacques et Dubray, Vaccine, sous presse). Cependant, la protection à long terme est moins bonne que celle obtenue par le vaccin tué et adjuvé *B. melitensis* H38. Ceci est en faveur de la participation d'autres antigènes dans la protection comme par exemple les PME.

### ***Protection passive avec des Anticorps polyclonaux***

Des sérums immuns dont les spécificités n'ont pas été établies (contenant probablement une majorité d'anticorps polyclonaux anti LPS-S) injectés avant l'épreuve sont capables de diminuer notablement la quantité de *Brucella* dans la rate (Sulitzeanu, 1965, Bascoul *et al*, 1978, Pardon, 1977, Plommet *et al*, 1986, Winter *et al*, 1989). L'analyse récente de sérums polyclonaux de souris par la technique d'immunoempreinte a montré la présence d'anticorps anti-PME (Limet, communication personnelle). Des sérums anti-fraction SDS-I absorbés par du LPS-S et transférés à des souris naïves possèdent encore une activité protectrice ce qui suggère un rôle des anticorps polyclonaux anti-PME dans la protection (Limet et Plommet, communication personnelle).

### ***Protection passive avec des Anticorps monoclonaux anti-LPS-S et anti-PME***

Sur la chaîne polysaccharidique du LPS-S, deux antigènes A (*abortus*) et M (*melitensis*), avaient été mis en évidence par Wilson et Miles, 1932. En fait, avec des sérums monospécifiques de lapin de spécificité A et M, les différents biovars des espèces *melitensis*, *abortus* et *suis* ont été classés selon la quantité de A et M présent à la surface en sérovars : A (A>M), ou



M (M>A) enfin A, M (Alton *et al.*, 1988). La production d'Anticorps monoclonaux (Acms) qui ont été caractérisés par fixation sur du LPS-S de type A>M ou M>A a permis d'obtenir des Acms de spécificité A et M. L'effet protecteur des Acms anti-LPS-S est un fait bien établi (Montaraz *et al.*, 1986, Limet *et al.*, 1987, Philips *et al.*, 1989). Les Acms dirigés contre l'épitope A ou M confèrent à la souris une bonne protection contre une souche homologue A>M ou M>A et une moins bonne protection lorsque l'épitope A ou M est mineur (Limet *et al.*, 1989). Les PME de *Brucella*, notamment les mineures, ne sont connues que depuis peu (Cloekaert *et al.*, 1990). Trois Acms sur 26 Acms anti-PME sont protecteurs. Ils sont dirigés contre les PME 16.5, 25-27, 36-38 k. Un seul Ac, l'anti-25-27k, est notablement protecteur (Cloekaert *et al.*, 1991). D'autres auteurs n'ont pas obtenus de protection avec des Acms anti-36k d'isotype IgM (Montaraz *et al.*, 1986).

En conclusion : dans le modèle souris, la protection à médiation humorale est surtout due aux anticorps anti LPS-S. Les anticorps anti-PME semblent jouer un rôle mineur. Ceci n'exclut pas qu'ils puissent avoir une action plus importante s'ils sont associés à des anticorps anti-LPS-S. De plus, ces conclusions sont tirées d'expériences de transfert d'Acms et la prudence s'impose car une seule spécificité correspondant à un épitope est testé alors que des anticorps polyclonaux spécifiques de plusieurs épitopes pourraient être plus actifs.

#### ***Protection passive par des cellules T.***

L'identification des antigènes protecteurs du vaccin *B. abortus* B19 (B19) et de la fraction SDS-I impliqués dans la protection à médiation cellulaire n'a pas encore abouti.

#### **Antigènes protecteurs et animaux cibles**

Très peu de bovins ont été injectés et éprouvés par des fractions de composition moléculaire connue (Lisbonne et Roman, 1944 ; Paterson et Pirie, 1948 ; Sterne *et al.*, 1970), les rares cas signalés contenaient soit peu d'animaux ou pas de lot témoin et donc des résultats peu exploitables.

A partir de fractions de composition connue (PME, fraction SDS-I) injectées à des bovins, une réponse immunitaire humorale ou cellulaire est mise en évidence mais les animaux n'ont pas été éprouvés (Winter *et al.*, 1983 ; Baldwin *et al.*, 1984 ; Winter et Rowe, 1988 ; Smith III *et al.*, 1990 ; Dubray, résultats personnels). Après vaccination de bovins par B19, la réponse cellulaire a été mise en évidence par différentes fractions de composition moléculaire plus ou moins connue (voir revues de Nicoletti et Winter, 1990 et de Smith III, 1990). En conséquence, il n'est pas possible de tirer des conclusions sur les antigènes impliqués dans la protection car réponse immunitaire ne veut pas dire obligatoirement protection.

#### **Mécanismes immunitaires de la protection**

Les mécanismes immunitaires de protection ont été étudiés par de nombreux auteurs avec des modèles cobaye et souris (voir les revues de Roux, 1972 ; Plommet, 1987 ; Plommet *et al.*, 1987). Les études ont essentiellement porté sur l'identification des composants humoraux et cellulaires impliqués dans la protection. Les connaissances sur les mécanismes de l'induction et de la régulation restent marginales. Il a souvent été écrit et considéré comme

un dogme que l'immunité à médiation cellulaire est le mécanisme de défense majeur en brucellose à cause de la multiplication intracellulaire des *Brucella* (Mackanness, 1964; Mc Cullough, 1970). De plus, d'autres données sur les animaux cibles vont également dans ce sens: existence d'une hypersensibilité de type retardé associée à l'infection comme en tuberculose (voir la revue de Nicoletti et Winter, 1990); - les bovins et ovins, caprins vaccinés par respectivement B19 et Rev 1, à la dose usuelle ou à plus faible dose par voie conjonctivale, sont protégés tout en étant négatifs aux épreuves de la sérologie classique (Plommet et al, 1987). Cependant, le vaccin à base de cellules tuées de *B. melitensis* H38, mélangées à un adjuvant huileux sont capables de bien protéger les bovins ovins et caprins avec une persistance longue de la sérologie classique positive (Plommet et al, 1987). De plus, le vaccin *B. abortus* 45/20 (phase rugueuse: R) semble capable de protéger bien que le caractère R de la souche et la protection soient problématiques (Plommet, 1990).

Ces résultats pourtant contradictoires ont amené à postuler que le LPS-S n'était pas nécessaire à la protection des vaches, brebis et chèvres (Sutherland, 1980; Plommet et al 1987). Il est vrai que le macrophage activé semble être le maillon important dans la protection (Holland et Pickett, 1958 ; Halliburton et Hinsdill, 1972 ; Mackanness, 1964; Cheers et Pagram, 1979).

### **Les composants spécifiques de la protection déduits d'expériences sur animal de laboratoire.**

Les résultats discutés ici concernent principalement le modèle souris qui a été très largement utilisé pour étudier la réponse humorale et cellulaire au cours d'une infection et d'une vaccination.

#### ***Composants spécifiques de l'immunité de type humoral.***

Des sérums immuns injectés avant une épreuve virulente peuvent modifier l'évolution de la maladie chez la souris (Sulitzeanu, 1965, Bascoul et al, 1978; Madraso et Cheers, 1978; Pardon, 1977). Le transfert passif de sérums immuns dirigés contre la fraction LPS-S isolée de *B. melitensis* et la fraction SDS-I isolée de *B. abortus*, et transférés avant l'épreuve virulente est capable d'arrêter la souche d'épreuve *B. abortus* soit dans le plus proche ganglion lymphatique de la voie d'inoculation, soit dans le foie avec l'injection intraveineuse de l'épreuve (Plommet et Plommet, 1983). L'immunité transférée au moyen de sérum anti-fraction SDS-I isolée de *B. abortus* montre un effet précoce similaire avec celui observé avec les sérums anti-LPS-S de *Brucella* et de *Yersinia enterocolitica* O9. Il s'en distingue par l'existence d'un effet protecteur de plus longue durée qui pourrait être attribué aux anticorps polyclonaux anti-PME présents dans le sérum anti-SDS-I (Plommet et Plommet, 1983).

Une autre approche de l'étude de la réponse humorale s'est développée récemment avec la production d'Acms (voir paragraphe identification des AgP). Des Acms anti-LPS-S quelque soit leur isotype se sont révélés aussi efficaces pour empêcher la colonisation initiale de la rate que le sérum immun anti-fraction SDS-I et plus que le sérum anti-LPS de *B. melitensis*. Ces résultats suggèrent que les mécanismes immunitaires mis en jeu pendant les premières phases de l'infection après vaccination dépendent surtout des épitopes de l'antigène majeur LPS-S portés par la souche d'épreuve. Cette immunité de type humoral s'ajoute à la défense non spécifique (complément, opsonisation...).

## Composants spécifiques de l'immunité à médiation cellulaire

Les polynucléaires et les macrophages sont souvent cités comme intervenant principalement dans la destruction des *Brucella*. Les *Brucella* peuvent survivre dans les deux types de cellules (voir la revue de Nicoletti et Winter, 1990). Le macrophage est activé par une immunisation mais son activité est non spécifique (Mackanness, 1964), cependant la participation possible d'anticorps est suggérée par cet auteur. Le transfert à des souris naïves de lymphocytes T d'animaux immunisés confère une protection; les lymphocytes immuns ont été montrés appartenir soit 1- à des cellules T non identifiées en sous-population (Plommet et al, 1986; Araya et al, 1989; Araya et Winter, 1990); 2 des T CD8<sup>+</sup> (cellules T cytotoxiques, Pavlov et al., 1982; Cheers, 1984); 3- des T CD4<sup>+</sup> (cellules T "helper" ou T<sub>H</sub>) et T CD8<sup>+</sup> (Araya et al, 1989). Il est peu vraisemblable, en tenant compte des données actuelles de l'immunologie, que ces cellules agissent directement sur la bactérie mais plutôt par l'exacerbation des mécanismes de défense par l'intermédiaires de cytokines (Mosmann et Moore, 1991).

Les immunités transférées par sérums immuns et cellules immunes sont additives dans le système vaccination B19 et souris BALB/c (Araya et al, 1989), peu ou pas additives dans le système DBA/2, (sérum immun obtenu par inoculation à la souris de *B. abortus* 544) et cellules spléniques sensibilisées à la fraction SDS-I (Plommet et al, 1986). Cette contradiction pourrait s'expliquer par la différence de réponse immunitaire entre vaccin vivant et fraction adjuvée

Dans le système BALB/c, vaccination B19, la cinétique de transfert d'antisérums montre qu'ils protègent à partir de 3 semaines après l'infection alors que pour les cellules T sensibilisées il faut attendre la 4<sup>ème</sup> semaine pour transférer une protection (Araya et al, 1989). Ces auteurs ont montré par transfert de cellules T purifiées que la protection due à une vaccination par B19 impliquait des lymphocytes CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>) et CD8<sup>+</sup> (T cytotoxiques) confirmation pour ces derniers des résultats de Pavlov et al (1982). Chez la souris DBA/2J, le transfert de cellules spléniques sensibilisées à la fraction SDS-I, montre que la protection est significative à 3 semaines pour atteindre un plateau à 4 semaines après vaccination des donneuses ayant fourni les cellules à transférer (Plommet et Plommet, 1987).

## Constituants de la protection déduits d'expériences sur les animaux cibles

### Constituants humoraux

Les résultats obtenus avec les vaccins vivants atténués et tués amènent souvent à tirer des conclusions parfois contradictoires :

1. la réponse sérologique est essentiellement dirigée contre le LPS-S (Diaz et Levieux, 1972). Cette affirmation doit être maintenant nuancée car l'étude cinétique de la réponse immunitaire avec la technique d'immunoempreinte montre nettement qu'il y a une réponse anticorps contre les protéines de *Brucella* (Limet et al. ce séminaire; Zygmunt et al., 1990);
2. les anticorps anti-LPS-S ne semblent pas nécessaires à la protection car les bovins, ovins et caprins vaccinés respectivement par le vaccin B19 et Rev 1 ont des titres en anticorps en dessous des limites inférieures de détection des épreuves sérologiques classiques (Sutherland, 1980, Plommet et al, 1987). Cependant, le pouvoir protecteur des anticorps peut être dû soit à leur présence en forte concentration (cas de la vaccination avec H38) ou à l'effet mémoire par production rapide d'anticorps avides (Zanetti et al, 1987) ce qui

pourrait être le cas de la vaccination par B19.  
Le système complément pourrait inactiver les *Brucella* dans la phase extracellulaire de l'infection (McCullough, 1970, Corbeil et al, 1988).

### Constituants cellulaires

La réponse cellulaire (test d'hypersensibilité de type retardé, test de transformation lymphoblastique) a été mise en évidence avec de nombreuses fractions (revues de Nicoletti et Winter, 1990 et de, Smith III, 1990) et se développe rapidement (Limet et al, ce séminaire). Les synthèses sur ce sujet sont faites à partir de résultats de différents auteurs avec des fractions plus ou moins bien définies (Smith III, 1990). Jusqu'à présent il n'y a pas eu de relation évidente entre les épreuves *in vitro* et la protection. L'activation des cellules T bovines par l'antigène présenté par les monocytes a été récemment étudié (Splitter et Everlith, 1989).

Le LPS-S en présence d'interferon- $\gamma$  est capable de réduire la prolifération des cellules T qui n'est pas restaurée par l'addition d'interleukine-1. Le rôle des interactions cellulaires via les cytokines émerge comme un point clé des études à mener pour comprendre les mécanismes immunitaires (Smith III, 1990; Mosman et Moore, 1991).

### Mécanismes de la protection et antigènes protecteurs

En fonction de la porte d'entrée des *Brucella* (voie nasale, voie orale, blessure), les mécanismes immunitaires peuvent différer. Avant la réponse immunitaire, des mécanismes de résistance naturelle impliquent le franchissement des barrières cutanée et muqueuses avec des réactions classées sous le terme d'immunité non spécifique (Olitzki, 1970 ; Templeton et al, 1988) parmi lesquelles le pouvoir neutralisant du sérum bovin normal (complément, anticorps naturels...). En effet, une étude récente montre que le sérum normal de vache est capable d'inactiver les cellules lisses de *B. abortus* et surtout les cellules rugueuses (Corbeil et al, 1988).

Avant la réponse anticorps, l'inactivation des brucella due au sérum normal (activation de la voie classique du complément) n'interfère pas avec les anticorps comme cela a été montré pendant la réponse immunitaire : les isotypes IgG1 et IgG2 bloquent l'inactivation alors que les IgM et les IgA ne le font pas (Corbeil et al, 1988). Ceci montre que la phase bactériémique précoce peut être limitée par une inactivation non spécifique par le complément mais semblerait tributaire de l'état sanitaire des bovins (Corbeil et al, 1988). En outre, puisque les *Brucella* sont considérées comme des parasites intracellulaires facultatifs capables de survivre et de se multiplier dans les cellules phagocytaires de l'hôte la résistance naturelle sera conditionnée par l'activité de ces cellules phagocytaires. Il existe un contrôle génétique de l'hôte de cette immunité cellulaire qui semble liée à un petit nombre de gènes de résistance (Skamene E. 1983; Templeton et al., 1988).

Les macrophages (dérivant du sang et de la mamelle) de vaches naturellement résistantes aux *Brucella* sont capables de contrôler plus efficacement la multiplication intracellulaire de *B. abortus* (Price et al., 1990). L'identification dans l'espèce bovine d'un gène équivalent au gène *Ity/Bcg/Lsh*, montré chez la souris, devrait permettre la sélection ou l'augmentation de la résistance d'animaux naturellement résistants aux bactéries intracellulaires.

En fin, des cellules de type "Natural Killer" (NK) pourraient également jouer un rôle (non-spécifique) contre les infections bactériennes en produisant des cytokines capables d'activer les cellules effectrices responsables de la résistance non spécifique (Trinchieri,

1989, voir la discussion de Araya et al., 1989).

Ces éléments non spécifiques et particulièrement le macrophages vont servir de moteur à l'induction d'une réponse immunitaire spécifique. Au cours d'une série d'interactions moléculaires entre la bactérie, les composés humoraux et cellulaires, il va y avoir finalement la production d'anticorps et de cellules effectrices. Le but de la protection vaccinale étant d'empêcher la survie et la multiplication intracellulaire des *Brucella*.

### *Mécanismes inducteurs de la réponse immunitaire*

#### *Oponisation*

L'induction de la réponse immunitaire primaire dont une partie vraisemblablement est protectrice implique la coopération d'anticorps et de cellules. Plusieurs étapes sont généralement décrites et nécessaires à l'induction de la réponse immunitaire: oponisation non spécifique, inactivation, destruction, présentation des antigènes, réponse anticorps et cellulaire....

#### *Inactivation*

L'ingestion d'une bactérie oponisée génère une augmentation rapide du métabolisme oxydatif qui se traduit par la formation de radicaux d'oxygène et l'activation du système enzymatique myéloperoxydase, capables de tuer la bactérie. Les *Brucella* sont capables de relarguer dans le milieu le 5'-guanosine mono-phosphate et l'adénine qui sont responsable de l'inhibition de l'activité bactéricide du système myéloperoxydase et de la dégranulation des PMN de bovins (Canning et al, 1986) d'ou l'augmentation de leur persistance intracellulaire. Les macrophages de la mamelle de vaches naturellement résistantes aux *Brucella* montrent un métabolisme oxydatif supérieur à ceux provenant de vaches non résistantes (Harmon et al, 1989).

#### *Destruction: fusion lysosome-phagosome, lyse des bactéries*

Des expériences *in vitro* avec des macrophages péritonéaux de souris font état de l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome mais en fait, le phénomène n'est pas de tout ou rien (Oberti et al, 1981, Fenchick et al, 1985).

Le LPS-S ne semble pas impliqué dans l'inhibition de la fusion (Fenchick et al. 1985). Cependant, les souches S sont souvent plus résistantes à l'effet bactéricide des PMN (Kreutzer et al, 1979). Ceci pourrait être relié à un effet d'empêchement stérique dû aux longues chaînes du LPS-S.

#### *Présentation des antigènes*

La mise en évidence de cellules T de type T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> capables de transférer la protection chez la souris (Araya et al, 1989) implique deux types de présentation des antigènes: par des molécules de classe I et des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. De plus, la protection des souris de lignée DBA/2 et CBA par le vaccin B19 et par la fraction SDS-I s'exprime avec des différences: DBA/2 exprime une meilleure protection avec la vaccin fraction et CBA exprime mieux une protection avec le vaccin vivant atténué (Plommet et Plommet, 1987). Ce résultat pourrait être lié à la présentation des antigènes avec des molécules de classe I ou II.

En effet, le traitement des antigènes dans les cellules présentatrices d'antigènes se fait soit par une voie endogène avec molécule de classe I ou exogène avec molécules de classe II (Kaufman, 1988, Braciale et Braciale, 1991).

## Mécanismes effecteurs spécifiques de la réponse immunitaire

Au cours d'un deuxième contact avec les *Brucella*, l'opsonisation spécifique est principalement due aux anticorps dirigés contre l'antigène majeur LPS-S. Les bactéries circulantes opsonisées peuvent être arrêtées soit par le foie et détruites efficacement (Plommet, 1987) ou les ganglions lymphatiques drainants (blocage ganglionnaire) (Pardon, 1977; Plommet et Plommet, 1983). La fixation du complément sur les complexes immuns induit également l'opsonisation de *Brucella* par les PMN de vaches (Canning et al., 1988). Les *Brucella* opsonisées par un antisérum frais ou inactivé par la chaleur sont capables de stimuler la production d' $O_2$  du polynucléaire neutrophile (PMN) du sang (Canning et al., 1988) ou des macrophages de la mamelle de vache (Harmon et Adams, 1987). Le rôle d'opsonines spécifiques semble difficilement possible aux anticorps anti-PME si les bactéries ont une surface bien recouverte par du LPS-S car dans ce cas, les Acms se fixent peu (Cloekaert et al., 1990). Cependant, le possible rôle de lymphocytes cytotoxiques (voir paragraphe suivant) sur les macrophages pourrait libérer des bactéries plus ou moins décapées à leur surface ce qui permettrait aux anticorps polyclonaux de se fixer et de réaliser l'opsonisation pour une deuxième phagocytose.

La destruction des *Brucella* a lieu principalement dans les macrophages immuns (Holland et Pickett, 1958; Halliburton et Hinsdill, 1972; Mackaness, 1964). Cependant, d'autres cellules peuvent intervenir comme les lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup> (Cheers, 1984; Araya et al., 1989). Elles pourraient être capables de détruire les cellules cibles ayant des antigènes de *Brucella* à leur surface (Kaufmann, 1988). Il s'ensuivrait une libération d'antigènes de *Brucella* (LPS-S, PME, ou constituants de la brucelline) induisant soit une issue bénéfique par restimulation de la réponse immunitaire ou maléfique par réactivation de l'infection (Plommet et Plommet, 1988).

Les mécanismes immunitaires effecteurs semblent impliquer, chez la souris, les deux sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. De plus, l'activité cytotoxique liée à des clones T CD4<sup>+</sup> a été décrite contre *Bordetella pertussis* et *Plasmodium bergi* (voir la discussion dans Peppoloni et al., 1991). La sous population CD4<sup>+</sup> est maintenant divisée en T<sub>H</sub> 1 ET T<sub>H</sub> 2 sur la base de différences dans la sécrétion de cytokines (Mosmann et Coffman, 1987) et des fonctions d'aide à la réponse anticorps (T<sub>H</sub>1) ou d'hypersensibilité de type retardé active contre les bactéries intracellulaires (Mosmann et Moore, 1991). Le rôle des cytokines dans l'expression des fonctions effectrices des T CD4<sup>+</sup> semble très importante (Mosmann et Moore, 1991). Parmi celles-ci, l'interferon- $\gamma$  est capable d'augmenter l'activité métabolique oxydative des PMN résultant en une capacité accrue de tuer les *Brucella abortus* virulentes (Canning et Roth, 1989).

La lyse des cellules contenant des antigènes de *Brucella* pourrait également avoir lieu par l'intermédiaire de lymphocyte T et d'anticorps comme cela a été montré pour les *Salmonella* et *Shigella* (Tagliabue et al., 1984; Kaufmann, 1988).

## Conclusions

L'identification complète des antigènes protecteurs avance grâce à la disponibilité de nombreux réactifs tels que les anticorps monoclonaux et de gènes des PME ou autres protéines. Cependant, il faudra vraisemblablement poursuivre cette identification d'abord chez la souris puis sur une espèce cible à l'aide de deux modes de vaccination: B19 et fractions. Les mécanismes immunitaires du fait de l'interaction de nombreux protagonistes cellulaires et moléculaires (cytokines) ont plus de mal à émerger.

L'utilisation de souris immunodéficiente de type SCID et la reconstitution totale ou partielle du système immunitaire par des cellules totales d'animaux cible ou de clones T devrait devenir un appoint non négligeable dans la compréhension des mécanismes immunitaires (Holaday *et al*, 1991). Il semble que la résistance vaccinale et non spécifique de l'hôte contre les bactéries à parasitisme intracellulaire puisse se faire par deux voies principales résumées comme suit:

1. activation des macrophages par les cellules T<sub>H</sub> via les interleukines
2. lyse de la cellule hôte infectée par des mécanismes spécifiques et non spécifiques avec dissémination des bactéries et de ses extraits plus ou moins solubilisés pouvant restimuler le système immunitaire.

La régulation concernant toute la réponse immunitaire spécifique et non spécifique est actuellement difficile à entrevoir vu par exemple le nombre de sous-populations de cellules T<sub>H</sub> qui sont décrites avec des sécrétions variables et transitoires de cytokines (Mosmann et Moore, 1991), la possibilité pour les macrophages, les cellules B, les cellules dendritiques de présenter l'antigène (Metlay *et al*, 1989).

Une approche globale de l'induction de la réponse et de l'expression des fonctions effectrices des cellules et des anticorps est encore très spéculative notamment chez les bovins (Smith III, 1990)

## Références

- Araya L. N., Elzer P. H., Rowe G. E., Enright F. M. and Winter A. J., 1989. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/C mice infected with *Brucella abortus*. *J. Immunol.*, 143: 3330-3337.
- Araya L. N., and Winter A. J., 1990. Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cells or serum. *Infect. Immun.*, 58: 254-256.
- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. and Verger J.M., 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
- Baldwin C. L., Antczak D. F. and Winter A. J., 1984. Evaluation of lymphocyte blastogenesis for diagnosis of bovine brucellosis. *Dev. Biol. Stand.*, 56: 357-370.
- Bascoul S., Cannat A., Huguet M.F. and Serre A., 1978. Studies on the immune protection to murine experimental brucellosis conferred by *Brucella* fractions. I. Positive role of immune serum. *Immunol.*, 35: 213-221.
- Bentejac M.C., Biron G., Bertrand A. and Bascoul S., 1984. Vaccination contre la brucellose humaine. Bilan sur une période de 2 ans. *Dev. Biol. Stand.*, 56: 531-535.
- Bosseray N. and Plommet M., 1983. A laboratory reference vaccine to titrate immunogenic activity of anti-*Brucella* vaccines in mice. *Ann. Rech. Vét.*, 14: 163-168.
- Bosseray N., Plommet A.M. and Plommet M., 1984. Theoretical, practical and statistical basis for a general control method of activity for anti-*Brucella* vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, 56: 257-270.
- Braciale T. J. and Braciale V. L., 1991. Antigen presentation : Structural themes and functional variations. *Immunol. Today*, 12: 124-129.
- Bundle D.R., Cherwonogrodsky J.W., Caroff M. and Perry M.B., 1987. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 138: 92-98.
- Canning P. C., Roth J. A. and Deyoe B. L., 1986. Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria.

- J. Infect. Dis., 154: 464-470.
- Canning P. C., Deyoe B. L. and Roth J. A., 1988. Opsonin-dependant stimulation of bovine neutrophile oxidative metabolism by *Brucella abortus*. Am. J. Vet. Res., 49: 16-163.
- Canning P. C. and Roth J. A., 1989. Effects of *in vitro* and *in vivo* administration of recombinant bovine interferon-g on bovine neutrophile response to *Brucella abortus*. Vet. Immunol. Immunopath., 20: 119-133..
- Cheers C., 1984. Pathogenesis and cellular immunity in experimental murine brucellosis. Dev. Biol. Stand., 56: 237-246.
- Cheers C. and Pagram F., 1979. Macrophage activation during experimental murine brucellosis: a basis for chronic infection. Infect. Immun., 23: 197-205.
- Cloekaert A., De Wergifosse Ph., Dubray G. and Limet J. N., 1990. Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies : immunogold labeling for electron microscopy and enzyme linked-immunosorbent assay. Infect. Immun., 58: 3980-3987.
- Cloekaert A., Bosseray N., Limet J.N., Jacques I., Bowden R., Dubray G. and Plommet M., 1991. Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer membrane protein antigens of *Brucella*. J. Medical Microbiol., 34: 175-180.
- Corbeil, L. B., Blau K., Inzana, T. J. Nielsen K. H., Jacobson R. H., Corbeil R. R. and Winter A. J., 1988. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. Infect Immun., 56: 3251-3261.
- Desmettre Ph., Joubert L., Valette L. and Roux J., 1984. Vaccin de la brucellose humaine obtenu à partir de la souche phéno-insoluble de *Brucella abortus* souche B 19. Dev. Biol. Stand., 56: 579-586.
- Diaz R. and Levieux D., 1972. Rôle respectif en sérologie de la brucellose bovine des antigènes et des immunoglobulines G1 et G2 dans les tests d'agglutination, de Coombs et au Rose Bengale ainsi que dans le phénomène de zone. C. R. Acad. Sci. (Paris) (série D), 274: 1593-1596.
- Dubray G., 1987. Protective antigens in brucellosis. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 138: 84-87.
- Dubray G., Bosseray N. et Plommet M. 1974. Propriétés vaccinales de fractions de *Brucella*. C.R. Acad. Sc. Paris, 279: 1805-1808.
- Dubray G. and Bézard G., 1980. Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis. Ann. Rech. Vét., 11: 367-373.
- Dubray G. and Charriaut C., 1983. Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. Ann. Rech. Vét., 14: 311-318.
- Frenchick P. J., Markham R. J. and Cohrane A. H., 1985. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*. Am. J. Vet. Res., 46: 332-335.
- Halliburton B.L. and Hinsdill R.D., 1972. Recall of acquired cellular resistance in mice by antigens from killed *Brucella*. Infect. Immun., 5: 42-47.
- Harmon B. G. and Adams L. G., 1987 Assessment of bovine mammary gland macrophage oxidative burst activity in a chemiluminescence assay. Am. J. Vet. Res. 48: 119-125.
- Harmon B. G., Adams L. G., Templeton J. W. and Smith R., 1989. Macrophage function in mammary glands of *Brucella abortus*- infected cows and that resisted infection after inoculation of *Brucella abortus*. Am. J. Vet. Res. 50: 459-465.
- Holaday B. J., Sadick M. D., Wang Z. Reiner S. L. Heinzl F. P., Parslow T. G. and Locksley R. M., 1991. Reconstitution of *Leishmania* immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1 and Th2-like cell lines. J. immunol., 147: 1653-1658.



- Holland J.J. and Pickett M.J., 1958. A cellular basis of immunity in experimental *Brucella* infection. *J. Exp. Med.*, 108: 343-360.
- Kaufmann S. H. E., 1988. CD 8+ lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol. Today*, 9: 168-174.
- Kreutzer D. L., Dreyfus L. A. and Robertson D. C., 1979. Interaction of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, 23: 737-742.
- Limet J.N., Plommet A.M., Dubray G. and Plommet M., 1987. Immunity conferred upon mice by anti-LPS monoclonal antibodies in murine brucellosis. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.*, 138: 417-424.
- Limet J.N., Bosseray N., Garin-Bastuji B., Dubray G. and Plommet M., 1989. Humoral immunity in mice mediated by monoclonal antibodies against the A and M antigens of *Brucella*. *J. Med. Microbiol.*, 30: 37-43.
- Lisbonne et Roman G., 1944. Vaccination des bovins contre l'infection brucellique par l'inoculation d'un germe avirulent et d'un antigène glucido-lipidique. *Bull. Acad. Médecine*, 128: 1-4.
- Mackaness G.B., 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J. Exp. Med.*, 120: 105-120.
- Madraso E.D. and Cheers C., 1978. Polyadenylic acid-polyuridilic (poly A:U) and experimental murine brucellosis. -II. Macrophages as target cells of poly A:U in experimental brucellosis. *Immunol.*, 35: 77-84.
- McCullough N.B., 1970. Microbiol and host factors in the pathogenesis of brucellosis. In "Infections agents and host reactions", Mudd S. and Saunders W.B. Co (ed), Philadelphia, 324-345.
- Metlay J. P., Pure E., and Steinman R. M., 1989. Control of the immune response at the level of antigen-presenting cells : a comparison of the function of dendritic cells and B lymphocytes. *Ad. Immunol.*, 47: 45-116.
- Montaraz J.A., Winter A.J., Hunter D.M., Sowa B.A., Wu A.M. and Adams L.G., 1986. Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 51: 961-963.
- Mosmann T. R. and Coffman R. L., 1987. Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunol. Today*, 8: 223-227
- Mosmann T. R. and Moore K. W., 1991. The role of IL-10 in cross-regulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol. Today*, 12: A49-A53.
- Nicoletti P. and Winter A. J., 1990. The immune response to *B. abortus* : the cell-mediated response to infection. In "Animal brucellosis", Nielsen K. and Duncan J.R. (Eds), CRC Press, Boca Raton, 283-299.
- Oberti J. Caravano R. et Roux J., 1981. Essai de détermination quantitative de la fusion phago-lysosomiale au cours de l'infection de macrophages murins par *Brucella suis*. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 132D: 201-206.
- Olitzki A., 1970. Immunological methods in brucellosis research. Part II : *In vivo* procedures. Chapter I. Host and parasite factors determining the course of infection. Non-specific resistance., S. Karger, Basel, 1-67.
- Pardon P., 1977. Resistance against a subcutaneous *Brucella* challenge of mice immunized with living or dead *Brucella* or by transfer of immune serum. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.*, 128 C: 1025-1037.
- Paterson J. S. and Pirie N. W., 1948. Attempted active immunisation of cattle against *Br. abortus* infection with an antigenic fraction. *J. Comp. Path.*, 58: 227-231.

- Pavlov H., Hogarth M., McKenzie I.F.C. and Cheers C., 1982. *In vivo* and *in vitro* effects of monoclonal antibody to Ly antigens on immunity to infection. *Cell. Immunol.*, 71: 127-138.
- Peppoloni S., Nencioni L., Di Tomaso A., Tagliabue A., Parronchi P., Romagnani S., Rappuoli R. and De Magistris M. T., 1991 Lymphokine secretion and cytotoxic activity of human CD4+ T-cell clones against *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 59: 3768-3773.
- Phillips M., Deyoe B.L. and Canning P.C., 1989. Protection of mice against *Brucella abortus* infection by inoculation with monoclonal antibodies recognizing *Brucella O*-antigen. *Am. J. Vet. Res.*, 50: 2158-2161.
- Plommet M., 1984. Progrès récents en immunisation contre l'infection à *Brucella abortus*. Immunisation chez les bovins. *Preventive Vet. Medicine*, 2: 205-214.
- Plommet M., 1987. Brucellosis and immunity: humoral and cellular components in mice. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 138: 105-110.
- Plommet M., 1990. Killed vaccines in cattle: current situation and prospects. In "Advances in brucellosis research", Adams, L. G. (Ed), Texas A and M University Press, College Station, 215-227.
- Plommet M. and Bosserey N., 1977. Le contrôle des vaccins antibrucelliques par dénombrement des *Brucella* dans la rate de souris, vaccinées ou non, inoculées par voie intrapéritonéale. *J. Biol. Stand.*, 5: 261-274.
- Plommet M. and Plommet A.M., 1983. Immune serum-mediated effects on brucellosis evolution in mice. *Infect. Immun.*, 41: 97-105.
- Plommet M., Hue I. and Plommet A.M., 1986. L'immunité anti-*Brucella* transférée par sérum immun et l'immunité transférée par les lymphocytes spléniques ne s'additionnent pas. *Ann. Rech. Vét.*, 17: 169-175.
- Plommet M. and Plommet A.M., 1987. Anti-*Brucella* cell-mediated immunity in mice vaccinated with a cell-wall fraction. *Ann. Rech. Vét.*, 18: 429-437.
- Plommet M., Serre A. and Fensterbank R., 1987. Vaccines, vaccination in brucellosis. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 138: 117-121.
- Plommet M. and Plommet A.M., 1988. reactivation of a residual *Brucella abortus* B19 vaccine infection by a virulent challenge or by injection of brucellin or of *Brucella* lipopolysaccharide. *Ann. Rech. Vét.*, 19: 245-251.
- Price R. E., Templeton J. W., Smith R. and Adams L. G., 1990. Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control *in vivo* intracellular survival of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, 58: 979-886.
- Rasooly G., Boros D. L. and Gerichter M. D., 1968. Immunization against *Brucella* with killed vaccine III. Experiments in mice. *Israel J. Med. Sc.*, 4: 246-251.
- Roux J., 1972. Les vaccinations dans les brucelloses humaines et animales. *Bull. Inst. Pasteur*, 70: 145-202.
- Roux J., Asselineau J., Serre A. and Lacave C., 1967. Propriétés immunologiques d'un extrait phénol-insoluble de *Brucella melitensis* [fraction P.I.]. *Ann. Inst. Pasteur*, 113: 411-423.
- Skamene E., 1983. Genetic regulation of host resistance to bacterial infection. *Rev. Infect. Dis.*, 5: S823-S832.
- Splitter G. A. and Everlith K. M., 1989. *Brucella abortus* regulates bovine macrophage-T cell interaction by major histocompatibility complex class II and interleukin-1 expression. *Infect. Immun.*, 57: 1151-1157.
- Smith III R., Adams L. G., Ficht T. A. Sowa B. A. and Wu A. M., 1990. Immunogenicity of

- subcellular fractions of *Brucella abortus*: measurement by *in vitro* lymphocyte proliferative responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 25: 83-97.
- Smith III R., 1990. T lymphocyte-mediated mechanisms of acquired protective immunity in cattle. In "Advances in brucellosis research", Adams, L. G. (Ed), Texas A and M University Press, College Station, 164-190.
- Sulitzeanu D., 1965. Mechanism of immunity against *Brucella*. *Nature*, 205: 1086-1088.
- Sutherland S.S., 1980. Immunology of bovine brucellosis. *Vet. Bull.*, 50: 359-368.
- Stabel T. J., Mayfield J. E., Tabatabaï L. B. and Wannemuehler M. J., 1990. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* containing a recombinant plasmid which codes for production of a 31-kilodalton protein of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, 58: 2048-2055.
- Sterne M., Trim G. and Broughton E. S., 1971. Immunization of laboratory animals and cattle with non-agglutinogenic extracts of *Brucella abortus* strain 45/20. *J. Med. Microbiol.*, 4: 185-194.
- Tabatabaï L. B., Deyoe B. L. and Patterson J. M., 1989. Immunogenicity of *Brucella abortus* salt extractable proteins. *Vet. Microbiol.*, 20: 49-58.
- Tagliabue A., Boraschi D., Villa L., Keren D. F., Lowell G. H., Rappuoli R. and Nencioni L., 1984. IgA-dependent cell-mediated activity against enteropathogenic bacteria: distribution, specificity, and characterization of the effector cells. *J. Immunol.*, 133: 988-992.
- Templeton, J. W., Smith III R. and Adams G. L., 1988. Natural resistance in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 192: 1306-1314.
- Trinchieri G., 1989. Biology of Natural killer cells. *Ad. Immunol.*, 47: 187-376.
- Wilson G.S. and Miles A.A., 1932. The serological differentiation of smooth strains of the *Brucella* group. *Br. J. Exp. Pathol.*, 13: 1-13.
- Winter A.J., 1987. Outer membrane proteins of *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 138: 87-89.
- Winter A.J., Verstrete D.R., Hall C.E., Jacobson, R.H., Castlema W. and Meredith M.P. and McLaughlin, C.A., 1983. Immune response to porin in cattle immunized with whole cell, outer membrane protein antigens of *Brucella abortus* combined with trehalose dimycolate and muramyl dipeptide adjuvants. *Infect. Immun.*, 42: 1159-1167.
- Winter A.J. and Rowe G.E., 1988. Comparative immune responses to native cell envelope antigens and hot sodium dodecyl sulfate insoluble fraction (PG) of *Brucella abortus* in cattle and mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 18: 149-163.
- Winter A.J. Rowe G.E., Duncan J.R., Eis M.J., Widom J., Ganem B. and Morein B., 1988. Effectiveness of natural and synthetic complexes of porin and O polysaccharide as vaccines against *Brucella abortus* in mice. *Infect. Immun.*, 56: 2808-2817.
- Winter A.J., Duncan J. R. Santisteban C. G. Douglas J. T. and Adams L. G., 1989. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus* infection in mice. *Infect. Immun.* 57: 3438-3444.
- World Health Organization, 1986. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, Sixth report. W.H.O. Tech. Rep. Ser. n°740, Geneva.
- Zanetti M., Sercarz E. and Salk J., 1987. The immunology of new generation vaccines. *Immunol. Today*, 8: 18-25.
- Zygmunt M.S. and Dubray G., 1987. Preparation by ultrafiltration and control by high-performance liquid chromatography of the native hapten of *Brucella abortus* for use in radial immunodiffusion diagnostic test. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 1860-1863.

Zygmunt M.S., Martin J. C. and Dubray G., 1990. Analysis of immune response : comparison of immunoblots after isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using cytoplasmic extract from *Brucella* .Fems Microbiol. Let., 70: 263-268.

# Identification et clonage des antigènes de diagnostic de la brucellose: perspectives d'application

J.N. Limet<sup>1</sup>, T. K-O Vo<sup>1</sup>, C. Saegerman<sup>1</sup>, L. De Waele<sup>1</sup>, A. Tibor<sup>1</sup>, A. Cloeckaert<sup>1</sup>, P. de Wergifosse<sup>1</sup>, J-M. Trunde<sup>2</sup>, M. Zygmunt<sup>2</sup>, J-J. Letesson<sup>1</sup> and G. Dubray<sup>2</sup>.

1. Centre d'Etude de la Brucellose, Unité d'Immunologie et de Microbiologie, Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, 61, rue de Bruxelles 5000 Namur, Belgique.

2. Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, INRA, Centre de Recherches de Tours, 37380 Nouzilly, France.

## Introduction

Une revue concernant les antigènes de *Brucella* a récemment été écrite par Cherwonogrodzky, Dubray, Moreno et Mayer (1990). Le propos de cet article sera dès lors d'évoquer les avantages et les inconvénients des méthodes immunologiques de diagnostic existantes et de présenter une voie d'approche qui vise le développement de nouveaux tests de diagnostic en utilisant des outils tels que les anticorps monoclonaux et le clonage de gènes.

Dans les laboratoires de dépistage, le diagnostic de la brucellose repose préférentiellement sur des examens sérologiques et sur l'isolement du germe à partir de fluides ou d'organes contaminés. Pour les troupeaux laitiers, un dépistage supplémentaire par ring test est effectué systématiquement au mieux, une à deux fois par mois.

Une étude de Fensterbank (1977) indique toutefois qu'une partie des animaux infectés peut présenter une sérologie négative (Agglutinations et fixation du complément) et développer une réaction d'hypersensibilité retardée suite à une injection intradermique de brucelline (IDR). L'efficacité de la technique immunoenzymatique ELISA par rapport à l'IDR n'est pas encore documentée dans la littérature.

Avant de traiter de l'identification et du clonage des antigènes de diagnostic, nous donnerons quelques résultats d'une étude comparative de la technique ELISA et de l'IDR par rapport aux tests classiques (TC) d'agglutinations et de fixation du complément. En effet, l'ELISA et l'IDR seront probablement la base des tests de diagnostic de demain.

Comme l'indique la revue de Cherwonogrodzky et coll., le lipopolysaccharide (LPS) apparaît comme l'antigène dominant de *Brucella* avec la réserve que la réponse humorale contre les antigènes protéiques a été étudiée par des techniques peu sensibles telles que l'immunodiffusion radiale et l'immunoélectrophorèse. Par contre la structure du LPS de *Brucella* a été étudiée en détail (Caroff et coll. 1984) et a permis de mieux comprendre les réactions croisées observées avec des germes tels que *Escherichia coli* O:157, *Salmonella urbana* et principalement *Yersinia enterocolitica* O:9 (Bundle et coll. 1984).

Les TC (agglutinations en tube et sur lame, fixation du complément) détectent les anticorps IgM ainsi que l'une ou l'autre sous-classe d'IgG spécifiques du LPS. Dès lors, ces méthodes qui se sont révélées bien utiles dans la lutte contre la brucellose, manquent de spécificité et la limite inférieure de détection (LID) est assez élevée.

La spécificité et la sensibilité des tests classiques sont limitées par le fait que les

anticorps IgM sont plus ou moins bien détectés dans les différentes épreuves sérologiques et que les anticorps IgM sont généralement moins spécifiques. En effet des infections par des germes tels que *Escherichia coli* 0:157 et 0:116, *Salmonelle urbana*, *Vibrio cholerae* ... peuvent induire des anticorps IgM qui agglutinent les *Brucella* (pour une revue, voir Corbel 1985). Ceci est dû au fait que la structure du lipopolysaccharide (LPS) de ces bactéries est très proche de celle du LPS de *Brucella*. Ces réactions non spécifiques limitées aux anticorps IgM sont éliminées par traitement du sérum par le dithiothreitol (DTT). La réaction croisée est cependant beaucoup plus importante avec *Yersinia enterocolitica* 0:9 dont la structure antigénique du LPS serait identique à celle du LPS de certains biovars de *B. abortus* (Caroff et coll. 1984). Des infections par ce germe induisent non seulement des anticorps IgM mais aussi IgG, de spécificité identique à ceux induits par l'infection par *Brucella*.

L'importance de ces réactions sérologiques faussement positives induites par les germes qui présentent une parenté antigénique avec *Brucella* est d'autant plus grande que la prévalence de la brucellose diminue. Dans certains cas, les titres d'anticorps atteignent des valeurs clairement positives au regard de la législation, ce qui pose de graves problèmes d'ordre commercial et sanitaire. Chez les bovins, le problème est passé presque inaperçu au cours de ces dernières années, surtout dans les régions où l'éradication était encore en cours. Mais cette année, dans les régions de Belgique indemnes ou devenues indemnes, des sérologies positives et ne correspondant pas aux données épidémiologiques et bactériologiques ont été observées dans environ 2 % des cheptels.

De plus, les résultats des TC sont influencés par la vaccination à l'aide des vaccins vivants atténués et tués avec adjuvant. En ce qui concerne la vaccination à l'aide des vaccins vivants B19 et Rev1, plusieurs approches ont été utilisées avec succès, pour réduire l'influence de la vaccination : diminution de la dose vaccinale, voie conjonctivale (Fensterbank et Plommet, 1979).

Une autre approche développée récemment par le laboratoire de Dépistage des Maladies du Bétail d'Erpent en collaboration avec le Centre d'Etude de la Brucellose est basée sur une répartition différente des anticorps produits après vaccination ou infection entre les classes d'immunoglobulines.

Cette approche complémentaire de la vaccination à dose réduite permet de faire une distinction claire entre animaux vaccinés uniquement et vaccinés puis infectés. En bref, les sérums sont titrés selon le protocole classique d'agglutination et après traitement du sérum par le DTT qui réduit les anticorps IgM.

Du facteur rhumatoïde (FR) qui favorise l'agglutination des anticorps IgG est ajouté à la suspension d'antigène pour ce test. La différenciation est basée sur le rapport des titres observés dans ces deux tests. Lorsque le titre du deuxième test (DTT + FR) est supérieur ou égal à 50 et supérieur au test classique, l'animal peut être considéré comme infecté. Quand le titre du deuxième test est nettement inférieur à celui du test classique, l'animal peut être considéré comme vacciné uniquement.

Quelques antigènes ont été décrits comme permettant d'améliorer la différenciation entre animaux vaccinés et infectés, tels que le poly B (Diaz et coll. 1979) et l'antigène A2 (Schurig et coll. 1981 et Stemshorn et Nielsen 1981.). Ces antigènes étaient toutefois utilisés à l'aide de techniques de LID élevée, telle que l'immunodiffusion radiale. Le poly B n'est en fait que du poly-glucose contaminé par du polysaccharide S et le pouvoir discriminatoire de l'immunodiffusion radiale au poly B dépend probablement plus des conditions expérimentales et du type d'immunoglobulines produites suite à la vaccination et à l'infection que de la spécificité de l'antigène.

## Apport du test ELISA et de l'IDR avec le brucellergène par rapport à l'agglutination en microplaque, au rose bengal et à la fixation du complément

Fensterbank et ses collaborateurs ont montré que dans un foyer, environ 15 à 25 % des bovins infectés présentaient uniquement une IDR positive, 50 % étaient détectés par les deux méthodes et les 25 à 15 % restants uniquement par les TC. Nous avons étendu cette étude en réalisant simultanément l'IDR, les TC et l'ELISA sur le sérum.

### Sensibilité et précocité de la détection

Dans la suite de cet article, les termes sensibilité et spécificité correspondent à la sensibilité et la spécificité immunologique des méthodes, c'est-à-dire respectivement, le pourcentage d'animaux positifs dans le test pour une population d'animaux infectés et le pourcentage d'animaux négatifs pour une population indemne de brucellose.

Le test ELISA développé au laboratoire utilise du LPS purifié comme antigène de sensibilisation des cupules et l'anticorps monoclonal 1C8 (spécifique de l'IgG1 bovine) couplé à la peroxydase comme conjugué. Le seuil de positivité correspond à 2 unités CEE définies à partir d'un sérum d'infection chronique titrant 1200 unités CEE à la fixation du complément.

L'IDR a été réalisée à l'enclure par injection de 100 ml de Brucellergène, soit 140 mgr de protéines, estimées par la méthode de Lowry, avec un étalon constitué par de la sérum albumine bovine. La lecture a été réalisée après 48 ou 72 heures et nous avons tenu compte de l'épaississement, de l'induration et de la rougeur de la peau au site d'injection. Sur les animaux indemnes, aucune réaction nette n'a été observée. Seule une très faible réaction limitée au site d'injection a été observée chez certains animaux, mais celle-ci est probablement attribuable à un traumatisme plutôt qu'à une réaction de type allergique.

Les tests ont été réalisés sur des animaux provenant de foyers de brucellose et dans une station d'engraissement de femelles issues de foyers et présentant une sérologie classique négative à leur entrée dans le centre d'engraissement. Le tableau 1 résume les résultats obtenus sur les animaux de la station d'engraissement des bêtes issues de foyers après 6 mois de suivi. Le suivi mensuel ultérieur de ces animaux nous a permis de préciser le devenir d'une partie de ces animaux (Tableau 1).

Tableau 1. Centre d'engraissement

T.C.	Elisa	IDR	N	%
+	+	+	34	8,9
+	+	-	9	2,4
+	-	+	0	0
+	-	-	0	0
-	+	+	34	8,9
-	-	+	16	4,2
-	+	-	63	16,5
-	-	-	225	59,1
Totaux			381	100

Tableau 2.

T.C.	Elisa	IDR	N	%
+	+	+	13	15,3
+	+	-	1	1,2
+	-	+	0	0
+	-	-	0	0
-	+	+	3	3,5
-	-	+	1	1,2
-	+	-	15	17,6
-	-	-	52	61,2
Totaux			85	100

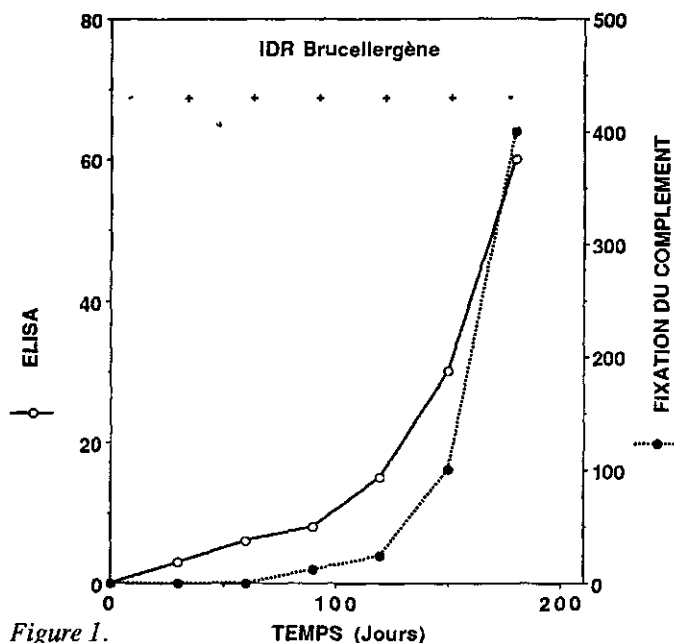


Figure 1.

Ces résultats confirment la sensibilité supérieure de l'ELISA. Dans 28,7% des cas, l'ELISA est positif alors que les TC sont négatifs. Soixante dix neuf pourcents des animaux sérologiquement positifs (TC et ELISA) sont également IDR positifs. L'IDR est négative chez 20 % des animaux dont la sérologie classique et l'ELISA sont positifs. Trente cinq pourcents des animaux uniquement détectés par l'ELISA présentent également une IDR positive. L'IDR est positive dans 19 % des cas, alors que les TC et l'ELISA sont négatifs. Pour 25 animaux suivis sur une période suffisamment longue, le premier test positif a été l'IDR dans 3 cas, l'ELISA dans 16 cas et simultanément l'ELISA et l'IDR dans 6 cas.

Le Tableau 2 illustre les résultats obtenus dans un foyer, 1 mois après une épuration



partielle (Tableau 2). On observe les mêmes types de catégories avec des pourcentages différents ; seul un animal présente une IDR positive avec un ELISA négatif lors de ce bilan. Sur l'ensemble des examens réalisés dans cette ferme, seulement 3 animaux ont été détectés plus précocement par l'IDR.

Le profil type de positivisation des tests, observé à quelques exceptions près, est schématisé dans la figure suivante (Figure 1).

Les valeurs limites de l'ELISA sont données à titre indicatif et ne représentent pas une moyenne des valeurs observées. Les résultats préliminaires indiquent qu'environ un tiers des animaux qui lors d'un premier test ne réagissaient pas à l'IDR, mais dont le sérum contenait des anticorps décelables en ELISA (taux compris entre 2 et 8 unités CEE) et non dans les tests classiques, voient leur sérologie classique et l'IDR se positiviser par la suite. Il faut noter que ce suivi a été réalisé sur des vaches et génisses non gestantes.

### Avantages et limites de l'ELISA

L'ELISA s'avère une technique non seulement très sensible mais aussi très spécifique, spécialement lorsqu'elle est appliquée aux laits de mélange. Pour des échantillons de sérums de bovins indemnes, la spécificité peut atteindre 100 % dans certains troupeaux. Toutefois, cette année, la spécificité évaluée sur une population confondue de 936 sérums provenant d'animaux indemnes n'est que de 95,4 %. Si l'on relève le seuil de positivité de 2 à 7,5 unités, la spécificité est de 99,35 %. Si l'on applique ce seuil de positivité aux sérums des animaux de la station d'engraissement, environ 50 % des animaux IDR positifs deviennent ELISA négatifs. La sensibilité reste toutefois supérieure à celle des tests classiques.

Au cours de cette année, nous avons également observé un plus grand nombre de réactions faussement positives qui, dans certains cas, atteignaient des valeurs de 60 unités, dans des fermes où le contexte épidémiologique et les résultats de la bactériologie indiquaient qu'il ne s'agissait pas de brucellose. Des souches de *Yersinia enterocolitica* 0:9 ont été isolées chez certains de ces animaux présentant une sérologie faussement positive, ainsi que sur d'autres animaux de la même ferme (B. Limbourg et P. Thiange, Centre de Dépistage des Maladies Animales, J. Dufey, Inspection Vétérinaire, communications personnelles).

### Avantages et limites de l'IDR

Dans les cheptels où des réactions sérologiques positives qui ne correspondaient pas aux données épidémiologiques et bactériologiques ont été observées, l'IDR s'est toujours révélée négative.

Une réaction positive à l'IDR a l'avantage de montrer aux propriétaires des animaux les traces de la maladie sur l'animal même, ce qui est beaucoup plus convaincant que les résultats de tests sérologiques, surtout lorsque l'on connaît les problèmes que les réactions croisées suscitent.

Elle peut pallier une lacune dans l'identification des animaux, puisque les animaux à éliminer peuvent être marqués de façon indélébile lors de la lecture de l'IDR.

L'IDR s'avère être une technique assez sensible, parfois plus précoce que les tests classiques. Malheureusement, la réaction avec le brucellergène n'est pas très intense et demande une grande attention pour la lecture. De plus, le brucellergène n'induit pas de réaction cutanée chez tous les animaux en début d'infection et chez certains animaux infectés

lorsque la sérologie devient fortement positive (Z. Bercovich et observation personnelle).

Il serait toutefois possible d'utiliser d'autres antigènes qui induiraient une réaction chez ces animaux (Z. Bercovich, communication personnelle). L'utilisation des molécules les plus actives uniquement, dépourvues de toutes traces de LPS devrait permettre d'obtenir un allergène plus actif.

### **Les limites des antigènes utilisés pour l'IDR**

Une des difficultés majeures rencontrées lors du développement de tests de diagnostic basés sur un ou des antigènes protéiques, est la mise au point d'un protocole d'extraction et de purification qui permette l'obtention de lots d'antigènes de qualité reproductible. Les difficultés peuvent être liées aux méthodes de culture, d'extraction et de purification, mais aussi à des variations dans les souches utilisées, ou à des particularités jusqu'à présent encore inconnues. Le contrôle des souches bactériennes et des préparations antigéniques est facilité par la disponibilité d'anticorps monoclonaux spécifiques des LPS S et R et de certaines protéines.

La plus grande difficulté est certainement la standardisation d'un allergène. Pour le contrôle d'antigènes utilisés dans un test ELISA, on dispose de collection de sérums déjà éprouvés avec les antigènes des lots précédents. Par contre, il n'existe pas encore de test in vitro d'un allergène. Le contrôle d'un allergène demande dès lors toujours le passage par un test sur animal infecté, le cobaye, car le test sur l'animal cible est trop coûteux.

### **Approche proposée**

Afin d'apporter une solution à ces diverses faiblesses du diagnostic de la brucellose, nous nous proposons de développer un nouveau test ELISA et un nouveau test cutané qui utiliseraient des antigènes protéiques de *Brucella*, non inclus dans un nouveau vaccin du type fraction SDS-I (voir Identification et mécanisme de protection des antigènes protecteurs de *Brucella*, G. Dubray, ce séminaire). Ces tests seraient dès lors plus spécifiques et non influencés par la vaccination. Etant donné les difficultés rencontrées dans la purification des protéines de *Brucella* à l'aide des techniques classiques, nous avons décidé de produire des anticorps monoclonaux contre les antigènes intéressants, de cloner les gènes correspondants et de produire ces antigènes par les techniques du génie génétique.

## **Etude de la réponse immunitaire suite à l'infection**

### **Réponse humorale**

Jusqu'à ce jour, l'antigène majeur mis en évidence lors d'une réponse humorale est le lipopolyoside qui induit des anticorps décelables dans les tests d'agglutinations, de fixation du complément et l'ELISA qui utilise le LPS comme antigène. Plusieurs antigènes protéiques ont été mis en évidence par immunoélectrophorèse (pour revue voir Cherwonogrodzky et coll. 1990). Seul l'antigène A2 (Stemshorn, B. and Nielsen, K., 1981, Schurig et coll. 1981) a été étudié plus en détail. Aucun antigène n'a toutefois été purifié, produit en quantité suffisante pour développer et évaluer un test ELISA.

La technique d'immunoempreinte (Western blotting) s'est révélée très utile dans l'étude de la réponse humorale suite à une infection virale ou bactérienne. Brièvement, les composants des extraits protéiques sont soit dénaturés par chauffage dans le SDS et séparés

en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), ou séparés en fonction de leur point isoélectrique par focalisation isoélectrique (FIE), puis transférés sur une membrane de nitrocellulose par électrophorèse transversale. Cette dernière est ensuite incubée avec les sérums des animaux à analyser. La fixation spécifique d'anticorps est révélée à l'aide d'un deuxième anticorps couplé à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline.

Cette technique a été appliquée à des sérums de chèvres infectées en utilisant un extrait cytoplasmique de *B. melitensis* (Zygmunt et coll. 1990). Une coloration des protéines après FIE révèle dans cet extrait environ 25 bandes de protéines entre 4,3 et 6 unités de pH. Après SDS-PAGE, environ 20 protéines sont révélées par une coloration à l'argent. Sur les immunoblots préparés par SDS-PAGE, les anticorps présent dans les sérums révèlent de 1 à 4 bandes de protéines. Une bande correspondant à une masse moléculaire apparente de 39 kDa est reconnue par 12 sérums sur 17, un doublet dans les régions des 50 kDa est révélé par 10 sérums. Deux sérums reconnaissent des bandes supplémentaires de masses moléculaires égales à 20, 30, 35 50 et 65 kDa. Après focalisation isoélectrique, les antigènes majeurs sont révélés dans une zone correspondant à une gamme de pH comprise entre 4,8 et 5. Un plus grand nombre de bandes est observé après FIE. Une vingtaine de sérums de

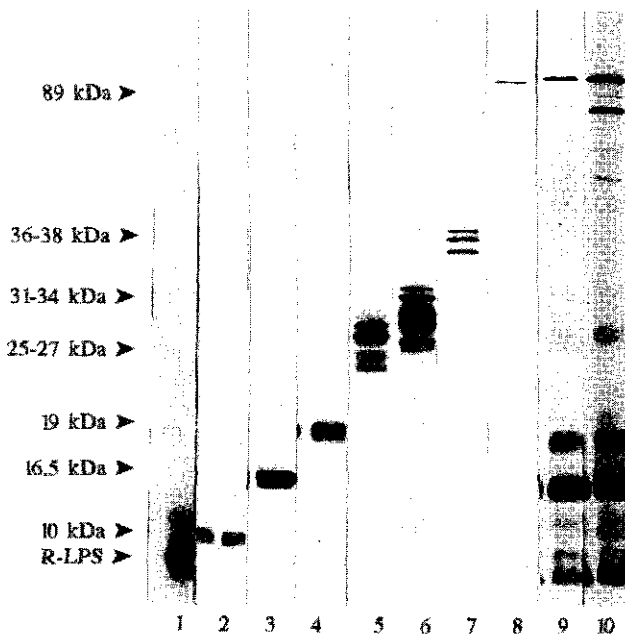


Figure 2 . Immuno-empreintes de PME de *B. melitensis* B115 (R)

Les 10 pistes ont été chargées avec des extraits de *B. melitensis* B115 produits par sonication. Les différentes bandelettes de nitrocellulose ont été incubées avec des anticorps monoclonaux spécifiques du LPS R (1), de la PME 10, de la PME 16 (3), de la PME 19 (4), de la PME 25-27 (5), de la PME 31-34 (6), de la PME 36-38 (7), de la PME 89 (8) ou du sérum de souris infectées par *B. melitensis* B115 (9) ou *B. abortus* 45/20 (10).

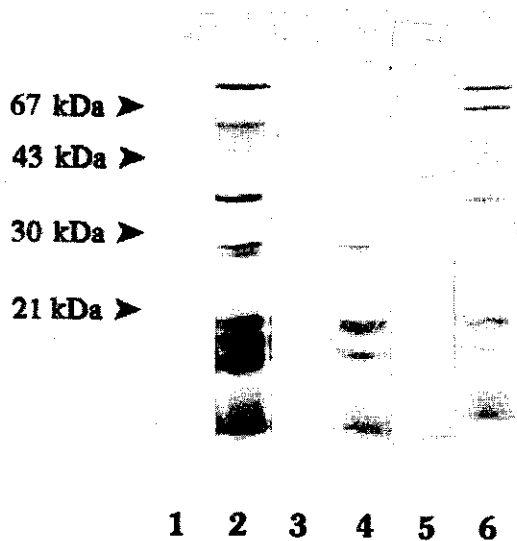


Figure 3 . Immuno-empreintes réalisées à l'aide de sérum de bovins indemnes de brucellose ou infectés. Les bandelettes de nitrocellulose préparées comme à la figure 1 ont été incubées avec le sérum d'un taureau prélevé avant l'infection expérimentale (1) et du sérum du même animal prélevé 6 mois après l'infection (2), avec le sérum d'un animal d'un foyer mais négatif en sérologie LPS (3) et de sérums de 3 animaux infectés du même foyer et contenant des anticorps spécifiques du LPS (4, 5 et 6).

bovins provenant d'un foyer de brucellose ont été analysés par immunoempreintes sur des extraits de bactéries rugueuses, obtenus par sonication et séparés par SDS-PAGE. Les résultats de cette étude indiquent que la production d'anticorps spécifiques des protéines est très variable d'un animal à l'autre, tant en ce qui concerne le nombre que la nature des protéines reconnues (Figure 2). L'identification précise d'une protéine parmi le grand nombre de protéines qui constituent un extrait brut obtenu par sonication n'est pas toujours aisée, c'est pourquoi nous avons produit une série d'anticorps monoclonaux (AcM) en fusionnant les cellules spléniques de souris infectées par la souche R de *B. abortus* 45/20... La spécificité des anticorps reconnaissant en ELISA les bactéries entières ou un extrait brut, a été déterminée par immuno-empreintes. Cinquante deux pourcent des anticorps ne reconnaissaient ni le LPS S, ni le LPS R et se fixaient à la surface des bactéries R et reconnaissaient des protéines de la membrane externe (PME). Ces résultats ont été confirmés par microscopie électronique à l'aide des AcM révélés par un second anticorps marqué à l'or colloïdal. La masse moléculaire de ces protéines étaient de 10, 16, 19, 25-27, 31-34, 36-38, 73 et 89 KDa, nous les appellerons PME 10, PME 16... (Figure 3). Les AcM réagissent également avec des préparations de parois. Ils ne se fixent pratiquement pas sur les bactéries lisses, exceptés les anticorps spécifiques des PME 25-27 et 36-38 sur *B. abortus* et 31-34 sur *B. melitensis* (Clockaert et coll., 1990).

Tableau 3. Immuno-empreintes de sérums de bovins infectés.

Identification de l'animal	Elisa LPS (unités)	Masse Moléculaire des protéines reconnues						36-38 kDa	40-60 kDa	89 kDa
		<10 kDa	10 kDa	16.5 kDa	19 kDa	25-27				
3	-	+/-	-	-	-	+/-	-	+	-	
15	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
20	-	++	-	+	-	+	-	+	-	
1	11,4	+	-	-	-	+/-	-	+	-	
2	>60	+++	+	+++	+++	+++	+/-	+	++	
4	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	8,5	-	-	-	-	-	-	+	-	
6	>60	+	-	-	-	-	-	-	-	
7	>60	-	++	+	++	+	-	++	-	
8	49,1	-	-	-	-	-	-	-	++	
9	>60	-	++	++	++	+	-	+	-	
10	>60	-	+	-	+	-	-	+	+	
11	>60	-	+/-	-	-	-	-	-	-	
12	>60	-	+	+	+++	+/-	-	+/-	+++	
13	>60	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	nd	+	-	+/-	+/-	-	-	+	+	
16	4,6	-	-	-	-	-	+/-	+	++	
17	>60	+	+	+	+	+	+/-	++	+	
18	>60	+/-	+	+	+	+	-	+	-	
19	>60	+++	++	+/-	+++	++	++	++	+++	
Nombre d'animaux dont le sérum révèle une ou plusieurs protéines	17	7	8	7	8	8	1	14	8	

Quelques anticorps réagissaient également avec une protéine cytoplasmique que nous appellerons protéine C1 (PC1).

L'utilisation conjointe des anticorps monoclonaux et des sérums de bovins infectés en immuno-empreintes a permis de montrer que les PME 10, 16, 19 et 89 étaient des antigènes potentiels pour le développement d'un test de diagnostic sérologique (Tableau 3). Toutefois, la réponse des bovins infectés est très hétérogène (Figure 2). Dès lors, plusieurs protéines devront être utilisées conjointement pour le développement d'un nouveau test ELISA.

Les résultats des immuno-empreintes ont été confirmés par le développement de tests ELISA de compétition pour les PME 10, 16 et 19. Les tests de compétition développés à l'aide de deux AcM spécifiques de la PME 89 se sont avérés non spécifiques de l'infection brucellique, alors que ces AcM ne se fixaient pas sur des extraits de protéines de *E. coli* 0:157 ou de *Y. enterocolitica* 0:9. La PME 89 a été purifiée par SDS-PAGE préparative et un test ELISA indirect a pu être développé en incubant les sérums de bovins avec des extraits de *E. coli* 0:157 préalablement au test.

Il existe donc des épitopes spécifiques sur la PME 89, mais la proximité d'épitopes partagés avec d'autres bactéries telles que *E. coli* 0:157 engendre l'inhibition de la fixation de l'anticorps spécifique par l'encombrement stérique que les anticorps non spécifiques induisent en se fixant sur la protéine à proximité du déterminant spécifique. Les résultats des tests ELISA sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Elisa sur sérums de bovins infectés.

Identification de l'animal	Elisa LPS (unités)	Tests classiques	Elisa de compétition (% d'inhibition)			Elisa indirect (DO) 89 OMP purifiée *1	Nombre de protéines reconnues par chaque animal
			OMP 10	OMP 16,5	OMP 19		
3	-	-	-	-	-	0,093	0
15	-	nd	-	-	-	0,044	0
20	-	nd	-	-	-	0,066	0
1	11,4	nd	-	-	-	0,187	0
2	>60	++++	56,5	38,4	45,1	0,978	4
4	2,9	nd	-	-	-	0,209	0
5	8,5	+/-	-	-	-	0,455	1
6	>60	nd	-	-	-	0,393	1
7	>60	++++	15,5	84,0	10,0	0,983	4
8	49,1	+	-	-	-	1,576	1
9	>60	+++	51,6	27,5	13,8	1,7	4
10	>60	++	53,5	-	-	0,684	2
11	>60	+	10,7	-	-	0,536	2
12	>60	nd	-	-	-	1,082	1
13	>60	nd	-	-	-	0,37	1
14	nd	++	-	14,5	32,2	nd	2
16	4,6	nd	-	-	-	0,129	0
17	>60	++	-	10,8	13,0	0,872	3
18	>60	nd	-	-	-	0,494	1
19	>60	+++	86,7	80,6	65,5	1,603	4
Nombre de tests positifs	17/20 *2	6/20	6/20	6/20	13/19	14/20	

\*1: Moyenne + 3 déviations standard pour des sérums d'animaux indemnes = 0,278

\*2: Nombre d'animaux dont le sérum contient des anticorps spécifiques du LPS décelés soit par Elisa, les tests classiques ou les deux.

### Utilisation de la PC1 en IDR

La PC1 de la brucelline a été purifiée par SDS-PAGE préparative (J.M. Trunde). L'injection intradermique de cette protéine au cobaye, sensibilisé par infection avec la souche vaccinale *B. melitensis* Rev 1, induit une réaction cutanée presque équivalente à celle observée avec la brucelline. Une plus grande quantité a été purifiée, à environ 98 % par chromatographie échangeuse d'anions. Cette préparation a ensuite été testée parallèlement au brucellergène de Rhône Mérieux sur 22 vaches et génisses provenant de foyers de brucellose. Les résultats du tableau 5 indiquent que l'IDR avec la fraction contenant la PC1 (100 mg/100 ml) détecte tous les animaux décelés par le brucellergène (140 mg/100 ml). Bien que légèrement plus faible chez certains animaux, la réaction était toutefois nettement visible et décelable à la palpation.

### Identification de protéines utilisables en IDR

Actuellement, nous fractionnons le brucellergène par chromatographie échangeuse d'ions, filtration moléculaire, interaction hydrophobe et SDS-PAGE. Nous avons également mis au point un test de transformation lymphoblastique sur des cellules bovines à l'aide d'antigènes transférés sur membrane de nitrocellulose après SDS-PAGE. Ce test nous

Tableau 5.

Comparaison PC1 et Brucellergene en IDR

Intensité de la réaction Brucellergene		Nombre d'animaux
	PC1	
+	+	1
++	++	3
++	+	3
+++	++	2
+	-	0
-	-	13

permettra de sélectionner les antigènes qui induisent une production importante d'interféron  $\gamma$ . Les antigènes intéressants seront ensuite testés en IDR sur cobayes sensibilisés par infection et, si la réponse est positive, sur bovins infectés.

### Clonage des antigènes de *Brucella*

Les gènes codants pour plusieurs protéines de *Brucella* ont été clonés, notamment la PME de 36 kDa (Ficht et coll. 1989), ainsi qu'une protéine de 31 kDa qui serait un antigène protecteur potentiel (Mayfield 1988). L'antigénicité de cette protéine est bien conservée dans la plupart des espèces de *Brucella* testées (Bricker et coll. 1988). Une superoxyde dismutase dépendante du Cu et du Zn a également été clonée et est bien conservée dans les différentes espèces de *Brucella* à l'exclusion de *B. neotomae* et de *B. suis* biovar 2 (Bricker et coll. 1990). L'utilité de ces protéines pour le développement de nouveaux tests de diagnostic n'a pas encore été évaluée.

Une banque d'ADN de *Brucella* a été construite dans le phage  $\lambda$ gt11. La librairie a été criblée à l'aide d'un mélange d'anticorps monoclonaux. Des phages codants pour l'expression des différentes PME et de la PC1 ont été obtenus. Les séquences des gènes des PME 16, 19, 25-27, 36-38 et 39 ont été déterminées, le gène de la PME 36-38 amplifié par PCR et sous-cloné dans le plasmide pTZ. Son expression est très toxique pour *E. coli*. Seul les deux tiers du gène de la PME 89 ont été clonés dans  $\lambda$ gt11, mais le gène entier pourra être obtenu à partir d'un recombinant établi dans le phage  $\lambda$ EMBL3.

### Conclusions et perspectives

L'ELISA utilisant le LPS comme antigène s'avère, dans nos mains, une méthode d'une grande sensibilité, utile principalement pour le suivi des troupeaux laitiers par l'analyse des laits de refroidisseurs. Ce test s'avère également très utile pour le suivi des animaux provenant de foyers ou d'exploitations voisines de foyers pour dépister les animaux infectés le plus rapidement possible. L>IDR est également, dans ce cas, une méthode complémentaire très précieuse.

Si les réactions non spécifiques dues à des réactions croisées restent aussi fréquentes que cette année, ce type d'ELISA risque d'être une technique trop peu spécifique pour la

surveillance sérologique des troupeaux indemnes. Relever le seuil de positivité augmenterait la spécificité, mais enlèverait en partie l'avantage de la technique, sa meilleure sensibilité.

Dès lors, il semble indispensable de se tourner vers l'identification, la caractérisation et la production d'antigènes protéiques spécifiques de *Brucella* utilisables à la fois pour le diagnostic sérologique et dans un test cutané. Si l'on peut extrapoler les résultats obtenus sur les bovins aux petits ruminants, et si l'on parvient à développer un allergène qui révèle les cas d'infection chronique à sérologie élevée, l'IDR serait probablement le test idéal chez la chèvre et le mouton, principalement pour les troupeaux en transhumance.

Le clonage des gènes de *Brucella* s'avère assez aisé. L'expression sera probablement plus ardue étant donnée la toxicité de certaines PME pour *E. coli* mais cette difficulté devrait pouvoir être contournée en n'exprimant qu'une partie de la protéine dans un vecteur d'expression adéquat. Pour certaines protéines, comme la PME 89, il sera indispensable d'identifier les épitopes spécifiques des *Brucella* et de n'utiliser que ces derniers.

La partie la plus laborieuse du travail sera sans doute l'identification des antigènes à utiliser pour l'IDR. Toutefois, les résultats obtenus avec la PC1 indiquent qu'il ne sera probablement pas nécessaire d'associer un très grand nombre de molécules pour le développement de ce test. De plus, certaines PME déjà clonées pourraient s'avérer utiles à cet égard.

## Remerciements

Ces travaux ont été financés par plusieurs aides de l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture, ainsi que de la Communauté Economique Européenne dans le cadre des programmes BAP et ECLAIR. Nous remercions également la Région Wallonne qui nous a donné accès aux animaux de son centre d'engraissement.

## Références

- Blasco, J.M., Diaz, R., Moriyon, I. and Salvo, M.D. 1984; Evaluation of a radial immunodiffusion test for diagnosing brucellosis in sheep and its possible value for differentiating infected from *Brucella melitensis* Rev.1 vaccinated sheep. *Develop. Biol. Standard*, 56, 507-511.
- Bricker, B.J., Tabatabai, L.B., Judge, B.A., Deyoe, B.L. and Mayfield J.E. 1988. Conservation of Antigenicity in a 31-kDa brucella protein. *Vet. Microbiol.* 18, 313-325.
- Bricker, B.J., Tabatabai, L.B., Judge, B.A., Deyoe, B.L. and Mayfield J.E. 1990. Cloning, Expression, and Occurrence of the Brucella Cu-Zn Superoxide Dismutase. *Infection and Immunity* 58, 2935-2939.
- Bunle, D.R., Gidney, M.A.J., Perry, M.B., Duncan, J.R., and Cherwonogrodzky, J.W., 1984. Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9, O antigens by monoclonal antibodies, *Infect. Immun.* 46, 389.
- Caroff, M., D.R.B. Bundle, and M.B. Perry, Cherwonogrodzky, J.W., and Duncan, J.R., 1984. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 11198-3. *Infect. Immun.* 46, 384-389.
- Caroff, M., D.R.B. Bundle, and M.B. Perry. 1984. Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9. *Eur. J. Biochem.* 139 : 195-200.
- Cherwonogrodzky, J.W., Dubray, G. Moreno, E. and Mayer H. 1990. Antigens of *Brucella*



- in Animal Brucellosis, Klaus Nielsen and J. Robert Duncan Editors, CRC Press.
- Cloekaert, A. De Wergifosse, P., G. Dubray and J.N. Limet. Identification of Seven Surface-Exposed Outer Membrane Proteins by Use of Monoclonal Antibodies and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Infection and Immunity*, 1990, 3980-3987.
- Corbel, M.J., 1985. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions, *Vet. Bull.*, 55, 927.
- Diaz, R. Garatea, P., Jones, L.M., Moryon, I. 1979, Radial immunodiffusion test with *Brucella* polysaccharide B for differentiating infected from vaccinated cattle. *J. Clin Microbiol.* 1979, 10 : 37-41.
- Fensterbank, R., Diagnostic allergique de la brucellose bovine .2. Utilisation du test allergique dans les troupeaux infectés. 1977 *Ann. Rech. Vet.* 8 (2), 195-201
- Fensterbank et Plommet, 1979. Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. IV Comparison between two methods of vaccination. *Ann. Rech. Vét.* 10 (1), 131-139.
- Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A. and Adams, L.G. , 1988. A 36-KDa *Brucella abortus* Cell Envelope Protein Is Encoded by Repeated Sequences Closely Linked in the genomic DNA. *Infection and Immunity*, 56, 2036-2046.
- Kerkhofs, P., Botton, Y., Thiange, P., Dekeyser, P. and Limet, J.N., 1990. Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. *Veterinary Microbiology*, 24, 73-80.
- Mayfield, J.E., Bricker, B.J., Godfrey, H., Crosby, M.R., Knight, D.J., Halling, S.M., Balinsky, D., and Tabatabai, L.B., 1988. The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene*, 63, 1-9.
- Schurig, G.G., Pringle, A.T. and Breese, S.S., Localization of *Brucella* antigens that elicit a humoral immune response in *Brucella abortus* infected cattle, *Infect. Immun.*, 34, 1000-1007, 1981
- Stemshorn, B. and Nielsen, K., 1981. The bovine immune response to *Brucella abortus* IV. Studies with a double immunodiffusion test for antibody against antigen A2, *Can. J. Comp. Med.*, 45, 147-153.
- Tabatabai, L.B., Deyoe B.L. and Patterson J.M. 1989. Immunogenicity of *Brucella abortus* Salt-extractable Proteins. *Veterinary Microbiology*, 20, 49-58.
- Zygmunt, M.S., Martin, J.C. and Dubray G., 1990. Analysis of immune response : comparison of immunoblots after isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using cytoplasmic protein extract from *Brucella*. *FEMS Microbiology Letters* 70, 263-268.

# Industrial production of vaccines for brucellosis

F. Milward

Rhône Mérieux, Laboratoire IFFA, 254, rue Marcel Mérieux 69342 LYON CEDEX 07, France

## Abstract

The goal of an industrial production of vaccines is not only to make available to the user a product that meets a number of predetermined standards but also to insure that this level of quality is obtained batch after batch and remains stable for the prescribed period of stability.

This goal is reached through a thorough control of all production and control parameters: seed lots, fermentation equipment and media, freeze drying or adjuvanting, quality controls. Methods to protect personnel and environment against accidental contamination must be in place.

Illustration of these steps and quality insurance methods will be presented.

## Industrial production of vaccines for brucellosis

The purpose of any industrial process for the production of vaccines is to carry out, in a large scale, methods and techniques that may often be well tested but generally suitable only for laboratory scale fermentation.

The purpose of this presentation is to illustrate some of the major parameters that must be taken into account to turn out, reliably, batches of vaccines of consistent quality, meeting prescribed standards and produced under conditions that protect the product, the personnel involved and the environment.

The basic bacteriological techniques as well as the standards that brucellosis vaccines for sheep and goats must meet, have been described in detail elsewhere (1, 2, 3).

We will limit our illustration to the major vaccine used for the control of brucellosis in sheep or goats : a live freeze dried vaccine (*B. melitensis* strain Rev 1), non streptomycin dependent revertent, dose 1-2x10<sup>9</sup> live bacteria/dose (4). However the principles described are applicable to the production of any modern vaccine.

## Vaccine production

Bacterial vaccine production is schematized in Figure 1.

### Strains : Initial seed, Master seed and seed lots

The vaccine strains used are well known strains.

The characteristics have been extensively described (Table 1) (3).

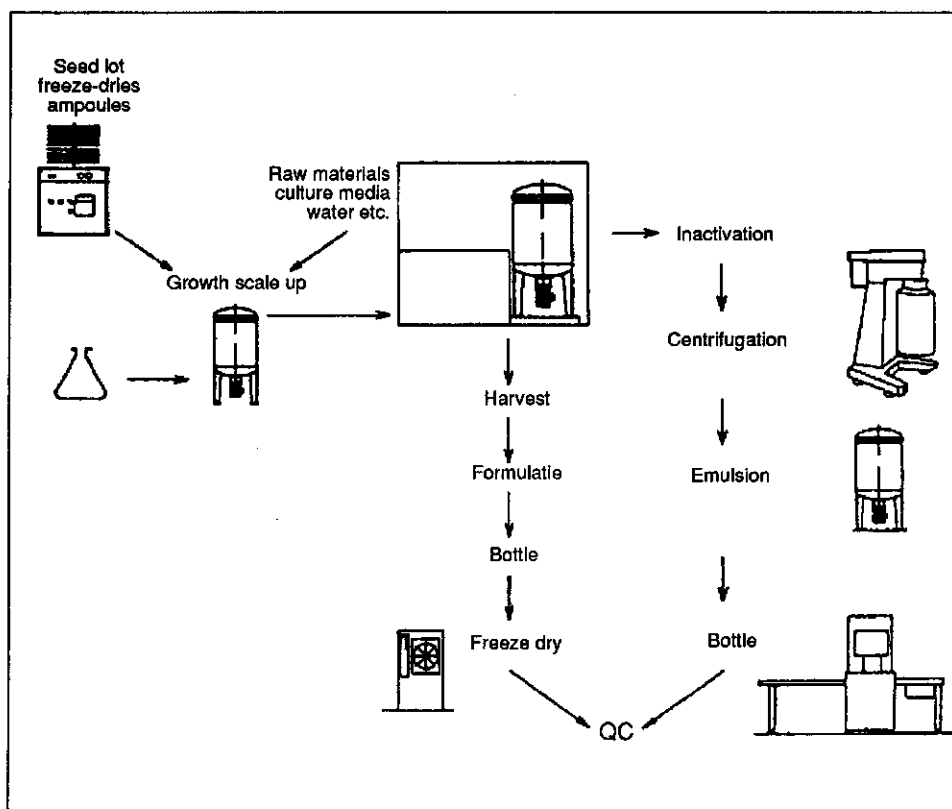


Figure 1. Schematic of a bacterial vaccine production.

Table 1. Differential identification of the major strains of *Brucella* sp. used in vaccine production.

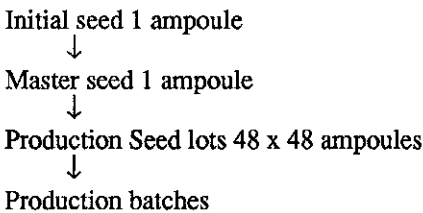
	<i>B. abortus</i>				<i>B. melitensis</i>			<i>B. suis</i>
	19	99	544	45/20	H.	38	Rev 1	
Colonial aspect	S	S	S	R	S	S	(±1mm)	S
H <sub>2</sub> S production	+	+	+	+	-	-	-	+
Urease (Christensen)	+	+	-	+	+	+	+	+(1H)
Penicilline (5 UI)	-	+	+	±	-	-	-	-
Streptomycine (2,5µg)	-	-	-	+	-	-	+	-
Erythritol	-	+	+	+	+	+	+	+
Thionine 1/50 000	-	-	-	-	+	-	-	+
Fuchsine 1/50 000	+	+	+	+	+	-	-	-

Production of vaccines must start from initial seed obtained from the international reference center (2).

The responsibility of the producing laboratory is then to prepare and maintain production seed lots in such a way that the characteristics of the initial seed are completely preserved. By performing 2 passages from the initial strain, enough seed lots can be produced with identical characteristics for a large number of vaccine batches (Table 2).

The methods used to maintain the strains and preserve both their viability and their characteristics will depend on equipment and facilities available. Many techniques have been described (5). We have found freeze drying to be the easiest and safest. Strains are preserved in glass ampoules frozen and dried in a centrifuge type freeze drier and stored at + 5°C (5).

*Table 2. Description of a seed lot system enabling the production of a large number of seed lots with minimal passaging.*



### **Bacterial fermentation**

The choice of equipment for bacterial fermentation will depend on amounts to be produced and local conditions.

Production on solid media is time proven. This method is however labor intensive and will usually be limited to small batches. Large amounts of vaccine can be turned out from fermentors, thus minimizing the number of batches and the number of controls. Fewer personnel may be used and containment of the bacteria better controlled. This method will however require a larger initial investment and specialized technicians especially for maintenance.

Whatever the method, particular attention must be given to the choice of raw materials. Peptones must be of high quality. Unavoidable batch to batch variation of these can be overcome by stocking sufficient amount of one batch for a large number of vaccine lots. Quality control methods should be well standardized and include vaccine trial runs and sterility for bacteria, fungi and mycoplasma (6). Heat sterilization of animal origin ingredients will avoid controls for viral contaminants.

Although the probability of transmitting bovine spongiforme encephalitis (BSE) by vaccination has not been assessed, some countries are now requiring that peptones originate from BSE free countries. Scale up passages may be done in a number of ways: solid media, liquid media or a combination. Although highest yield is sought, the method chosen must maintain the properties of the vaccine strain. In-process controls will especially emphasize

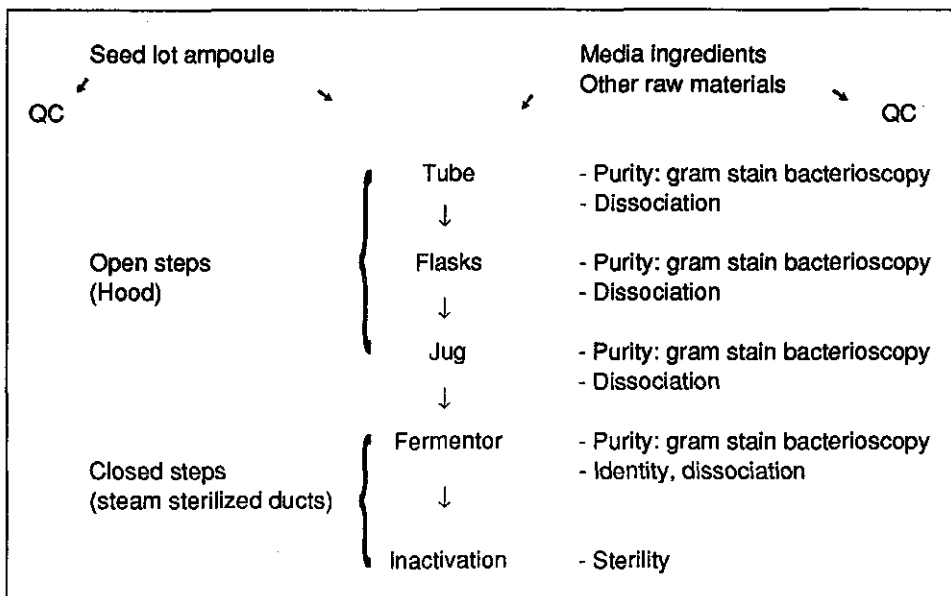


Figure 2. Schematic of the scale up passages of a bacterial vaccine strain and quality control.

purity (absence of bacterial contamination) and dissociation (smooth to rough). A complete identity test will be carried out in the final fermentor culture prior to freeze drying (Rev 1) (Figure 2). It should be noted that most of the control methods used (excepting direct microscopic observation) will furnish results after the culture has been passaged, freeze dried or inactivated, thus making the cost of a non-satisfactory test and the subsequent destruction of the serial more costly. This emphasizes the need for a quality assurance program that will prevent defects.

### Vaccine formulation

Formulation of the vaccine will take the active ingredient (live or inactivated bacterial suspension) and turn out a finished vaccine in its final "ready to use" format. Live vaccines such as REV 1 can be presented in a liquid or freeze dried form. Freeze drying will maintain viability for much longer periods of time (18 months versus 2-4 weeks) (3). A detailed description to the technology of freeze drying is beyond the scope of this presentation. However the following parameters must be taken into account when optimizing a process: quality of the initial bacterial suspension, nature and quality of the substrat, the freezing and drying cycles, the atmosphere used to seal the container.

Determination of residual moisture is an important quality control parameter that should be monitored.

Water content should be between 2 and 3 % to insure the best stabilization of viability (Figure 3) (7). Freeze dried vaccines should be stored in the cold ( $+ 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) or may be frozen ( $- 20^{\circ}\text{C}$ ).

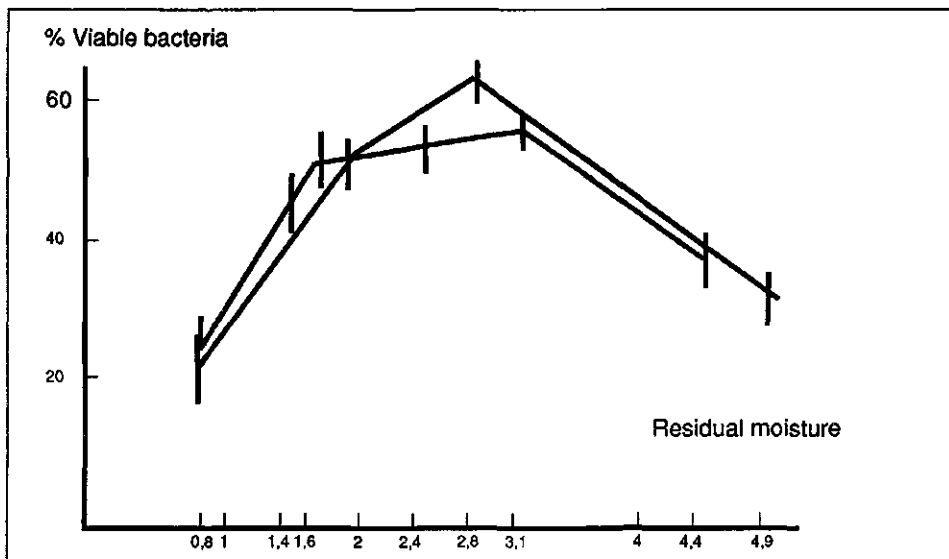


Figure 3. Stability of freeze dried strain 19 vaccines with different levels of residual moisture.

## Quality control

The standards applied to brucellosis vaccines have been well documented (2, 3). In all cases, control methods should conform to international and local authority requirements. Stringent standards are necessary to insure that the vaccines being used in long term control programs are of consistent quality. This area will be developed by other speakers in this session (D. Garin-Bastuji).

Quality control methods can be broken down into the broad categories :

- physicochemical controls : aspect, residual moisture, emulsion parameters, pH, amount in final container,
- biological controls in vivo : purity, identity, dissociation and viability,
- biological controls in vitro : these include controls for activity and safety : Rev 1 vaccine is tested in laboratory animals for reactivity and immunogenicity as described (3). The duration of the tests for reactivity and immunogenicity may be incompatible with the rhythm of production. In such a case the tests may be applied to each seed lot and each forts batch of vaccine from a new seed lot. Particular care must be taken to insure that bacteria in the subsequent batches have maintained their cultural properties.

## Security measures

Brucellosis is a disease affecting humans through consumption of animal products or professional contact with infected animals or the organism in a laboratory.

In the course of a control program, every precaution should be taken so that the

laboratory producing the vaccine does not become a health hazard for its workers or environment.

Various parameters should be taken into account when designing a facility for production of vaccines for brucellosis (Figure 4).

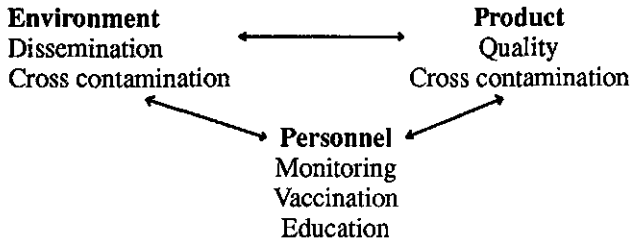


Figure 4. The factors involved in containment of brucella during the industrial production of vaccines.

### The product

When possible, the choice of strains with reduced virulence must be preferred. This is not an option for REV 1 and H 38. However production of antigens may use *B. abortus* 19 or 99. Cross contamination of the product can be avoided by good manufacturing procedures: handling one strain at a time in a given laboratory, all open transfers performed under class II laminar flow hoods, prefer transfers through steam sterilized ducts.

### The environment

Production laboratories must be under negative pressure. Liquid waste should be inactivated (heat or chemical inactivation). Air is expelled through high efficiency filters. Ideally solid waste should leave the laboratory through a double door autoclave. If unavailable bags should be clearly marked for disposal and carry a biohazard warning. Adequate procedures should exist in writing to describe the complete disposal procedure (autoclaving or incineration).

### The personnel

Technicians involved in the production of vaccines for brucellosis are at a high risk of acquiring an infection as well as causing a dissemination of the agent. All technicians are regularly tested for hypersensitivity and if negative, are vaccinated (phenol insoluble fraction of *B. abortus* strain 19). A person with a generalized allergic reaction to brucella antigen will be kept away from the production or control laboratories. Special care must be taken when handling infected animals. Finally, but most importantly personnel must be well trained and reminded of the requirements for handling a class III pathogen.

### Conclusion

Although all or most of the basic methods for the production and control of vaccines for brucellosis in sheep and goat have been published, their production at a large scale requires

additional expertise. At all levels, many factors must be taken into account to insure that the quality of the production output is constant. The use of such products is an element of primary importance in the implementation of a control program.

## References

1. Alton G.G., Jones L.M. and Pietz D.E. Brucellosis. Laboratory techniques. 2nd edition, WHO, Geneva, 1977
2. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 6th Report, Technical Report Series 740, WHO, Geneva, 1986
3. WHO Expert Committee on Biological Standardization 28th Report, Technical Report Series 610, WHO, Geneva, 1977
4. Elberg S.S. and Faunce K. J. Bacteriol 1957, 73, 211
5. Kirsop B.E. and Snell J.J.S. Maintenance of Microorganisms, 1st edition, Academic Press, London, 1984
6. Code of Federal Regulations, 9 CFR 113
7. Precausta P., Benet G., Languet B. and Milward F. Microorganismes et fabrication des vaccins. In Conservation des Microorganismes, SFM, L.



# Diagnosis of *Brucella melitensis* infection in small ruminants

J.M. Blasco

Departamento de Production Animal, SIA/DGA. 50080 Zaragoza, Spain.

## Introduction

As in many other infectious diseases of animals, symptoms of *Brucella* infections are not pathognomonic, so diagnosis cannot rely on clinical criteria. Direct diagnosis based on demonstrating brucellas by bacteriological techniques in a given animal is the only reliable demonstration of infection. As direct diagnosis is unsuitable for use on a large scale, indirect diagnosis of brucellosis, based on serological or cellular (allergic) immune responses is generally used.

## Direct diagnosis

Although *B. abortus* has been responsible of abortions in sheep (20) and *B. suis* could theoretically affect small ruminants, the main pathogen excluding (*B. ovis*) of brucellosis in sheep and goats is *B. melitensis*. A presumptive diagnosis can be made by microscopic examination of smears from vaginal swabs, placenta or aborted fetuses. The smears are stained by the modified Stamp technique or other procedures (4).

An experienced person can make an accurate diagnosis, but morphologically related microorganisms such *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci* or *Coxiella burnetti* can mislead diagnosis. For these reasons, the isolation of *B. melitensis* on culture media is the most reliable for an accurate diagnosis. The swab, taken directly from the vagina of aborted animals, is the best sample for isolating *B. melitensis*. Vaginal excretion of the bacteria is important, and it persists for up two months after parturition or abortion (5,7). Spleen, lung, liver and stomach contents are the most reliable samples to isolate *B. melitensis* from aborted fetuses. Milk is also a good sample to isolate *B. melitensis*, particularly from goats (3,5).

The isolation can be made post mortem from spleen and lymph nodes (iliac, mammary and crural). *B. melitensis* does not require serum or CO<sub>2</sub> for growth, and it can be isolated in ordinary media such as blood agar and trypticase soy agar under aerobic conditions at 37°C. However, the use of these media for inoculating highly contaminated samples cannot be recommended, and *Brucella*-selective media are better. Farrell's selective medium, developed for isolating *B. abortus* from contaminated sources (14), is probably the most widely used also for isolating *B. melitensis*, but its sensitivity for this purpose is doubtful. In fact, some antibiotics of this medium, such as bacitracin, are inhibitory for some *B. melitensis* isolates (C. Marin, unpublished). Therefore, further research is required on the development of selective media for isolating *B. melitensis*. Once isolated, *B. melitensis* can be identified by colony morphology, Gram staining, agglutination with specific antiserum, and oxidase and urease reactions. To distinguish it from smooth species of *Brucella* and for

Table 1. Comparative results of serological tests for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and goats.

Test	N° of sera	Sensitivity <sup>a</sup>	Specificity <sup>b</sup>	Reference
RB	115 sheep <sup>1</sup>	96.5	ND	(24)
SA		86		
CF		94.8		
RB	2,550 goats <sup>2</sup>	6	ND	(12)
SA		15		
RB	241 sheep <sup>2</sup>	26.1	ND	(22)
SA		19.5		
CIE		22.8		
RB	206 goats <sup>2</sup>	35.4	ND	(26)
SA		18.4		
CF		25.2		
DGD		20.8		
RB	182 sheep <sup>3</sup>	58.2	100 <sup>4</sup>	(25)
CF		58.8	100	
SA		50	100	
CIE		61.5	100	
RB	36 sheep <sup>1</sup>	100	100 <sup>4</sup>	(6)
CF		100	100	
DGD		91.6	100	
RID		100	>90	
RB	77 sheep <sup>1</sup>	100	100 <sup>4</sup>	(18)
CF		100	100	
ELISA		100	100	
SA		98.7	100	
RIV		93.5	100	
RID		96.1	100	

ND = Not done.

<sup>a</sup> Determined as: positive results/total sera tested x 100

<sup>b</sup> Determined as: negative results/total *Brucella*-free sera tested x 100

RB: Rose begal; CF: Complement fixation; SA: Standard agglutination; CIE: Counterimmunoelectrophoresis; DGD: Double Enzyme-linked immunosorbent assay.

<sup>1</sup> Animals in which *B. melitensis* was bacteriologically isolated.

<sup>2</sup> Animals belonging to flocks suspected from *B. melitensis* infection.

<sup>3</sup> Animals experimentally exposed to *B. melitensis*.

<sup>4</sup> Results obtained with sera from *Brucella*-free animals.

classifying in biovars, phage-typing and agglutination with monospecific A and M antisera are required (4).

### **Serological diagnosis**

In Mediterranean countries, small ruminants are kept under extensive systems, and brucellosis is prevalent at high rates. In these conditions, *Brucella melitensis* infection cannot be eradicated by testing and slaughter alone, and a vaccination program is necessary to stop the spread of disease. The Rev.1 strain appears as the best vaccine available (1,11), but when injected subcutaneously it induces long lasting serological responses that represent a serious drawback during subsequent serological screening. It is necessary to find differences between the serological responses due to infection and those due to vaccination to avoid overkilling animals in eradication programs. As no differences have been found between diagnostic antigens, from field strains of *B. melitensis* and the Rev.1 strain, there is great difficulty in finding a serological test able to distinguish infected from vaccinated animals. This problem complicates the combined use of vaccination and test-and-slaughter policies for eradicating brucellosis. A serological test for the diagnosis of *B. melitensis* should have high sensitivity and specificity, should differentiate infected from Rev.1-vaccinated animals, and should be easy to perform and interpret. Obviously, this ideal test has yet to be found.

The conventional serological tests used in bovine brucellosis have been applied to sheep and goats with variable success, depending on the authors (2,13). Unfortunately, studies on this subject are scarce (particularly in goats) and there are discrepancies in the results. The most widely used serological tests for diagnosing *B. melitensis* in small ruminants have been the rose bengal (RB), standard agglutination (SA) and complement fixation (CF) tests.

#### **Rose bengal test**

This test is widely used as screening test for the diagnosis of brucellosis in small ruminants. In general, most of authors agree on its good sensitivity and specificity (5,13) (Table 1). Concentration of the antigen could be of importance in both sensitivity and specificity (24). In our opinion, at least in sheep, it is an excellent screening test having sensitivity and specificity values close to 100% (Table 1) when adequate control sera are used (6,18,24,25). The information available on its diagnostic value in goats is scarce and, in our opinion, needs further investigation using adequate control sera. Another problem that deserves investigation is the *Brucella* species and biovars that should be used in the production of RB antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection. The standard RB antigens are usually made with the dominant A strains (4) and infections with *B. melitensis* biovar 1 could be misdiagnosed (4,5). However, in our experience, the RB with dominant A antigen gives positive results when testing sera from sheep infected with *B. melitensis* biovar 1 (18).

The main inconvenience of the RB test is that standard subcutaneous vaccination with Rev.1 ( $10^9$  microorganisms) induces long lasting positive serological responses (15,18) (Table 2).

#### **Standard agglutination**

This is still largely used in small ruminants (5,13). It may be performed as a tube or microplate test, with 5% NaCl in buffers to avoid prozone (23). It was problems of

Table 2. Percentage of reactors in RB, CB, SA, RIV, RID or ELISA tests after subcutaneous and conjunctival vaccination with Rev 1 in three months old rams (18).

	Route of vaccination			
	SUBCUTANEOUS		CONJUNCTIVAL	
	4 weeks after vaccination	17 weeks after vaccination	4 weeks after vaccination	17 weeks after vaccination
RB	100	100	72.7	9.1
CF	100	100	63.6	0
SA	100	100	72.7	36.3
RIV	100	90.9	18.2	0
RID	100	18.2	0	0
ELISA	100	45.4	0 <sup>a</sup>	0

For abbreviations see Table 1. RID = radial immuno diffusion.

<sup>a</sup> Considering Optical Density values of 1.0 as the lowest positive limit (see Figure 1).

sensitivity and specificity that have been well documented (5,13). In comparative assays with other tests (Table 1), the SA gives, in general, the lowest sensitivity. Moreover, the lack of specificity is very important when testing sera from Rev.1 vaccinated animals (Table 2) (5,13,18). For these reasons, the SA cannot be recommended for the serological diagnosis of brucellosis in small ruminants.

Information on the diagnostic value of other agglutination tests such Coombs' or 2-mercaptoethanol is scarce (5,13). The sensitivity of the Rivanol agglutination test with sheep serum is somewhat lower than that of the RB and CF tests (Table 1) and moreover lacks specificity when testing serum from Rev.1 vaccinated sheep (18).

### Complement fixation

This is probably the most widely used test for the serological diagnosis of brucellosis in small ruminants. As in cattle, despite its complexity and variation in techniques used in different countries, there is practically total agreement that this test is the most effective for serological diagnosis. In fact, in comparative assays (Table 1), the CF test has an excellent sensitivity and specificity. However, the CF test has inconveniences such as complexity, variability of reagents, prozones, anticomplementary activity of sera, difficulty to perform with highly hemolyzed sera, and subjectivity for interpretation of low titres. On the other hand, as CF detects IgG1 and IgM isotypes, and the smooth lipopolysaccharide (S-LPS) is the antigen involved in the reaction (8), it is not possible to distinguish between infected and standard Rev.1 vaccinated animals (6,18). However, when the animals are conjunctivally vaccinated, the antibodies reacting in the CF test disappear as soon as 4 months after vaccination (15,16,18,21) (Table 2). Conjunctival vaccination with Rev.1 affords a similar degree of immunity in small ruminants against *B. melitensis* (15,16) and *B. ovis* (21) as that induced by subcutaneous vaccination. Because of its simplicity and the low serological response evoked (see below), conjunctival vaccination appears to be the best method for

prophylaxis of *Brucella* infections of sheep and goats in countries with combined programs of control.

### Other serological tests

#### Radial immunodiffusion (RID)

Here the native hapten polysaccharide (9,10) is incorporated in agarose gel, and the sera are placed in wells cut into the gel. A positive reaction consists of a precipitation ring around the well. Although there is controversy about the exact nature of the antigen employed in the RID test, and on the explanation of why infected cattle are positive and those vaccinated with strain 19 are not, the RID has been evaluated with success for the differentiation of infected from vaccinated cattle (9,19). In sheep the RID is similar in sensitivity to RB and CF tests (Table 1), but it does not distinguish between infected and subcutaneously vaccinated animals (6,18) (Table 2). However, the conjunctival use of Rev.1 improves the specificity of this test (18) (Table 2). The main advantage of the RID test over the CF test is its simplicity and economy. Further research is needed on the diagnostic value of the RID test in extensive campaigns in the field. There is little information on the use of RID in goats.

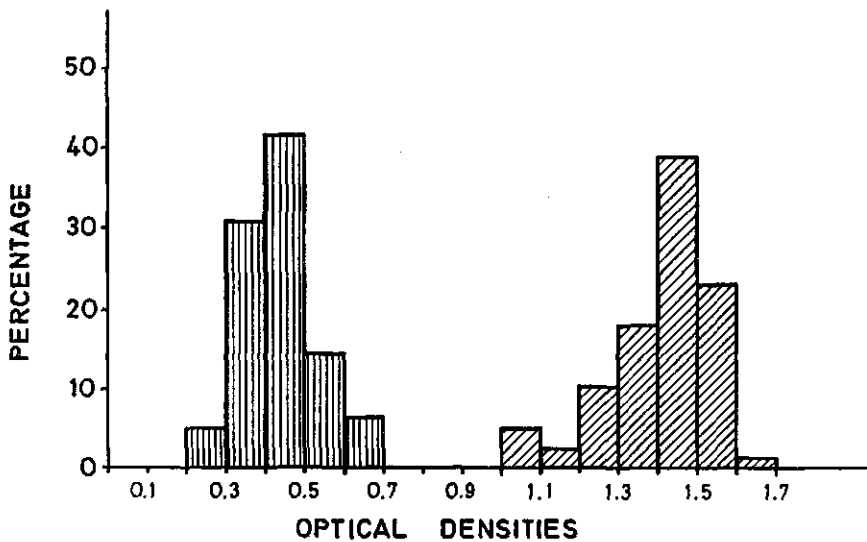


Figure 1. Distribution of the ELISA Optical Density (OD) values of the 77 sera from *B. melitensis*-infected (▨;  $\bar{X}_{OD} = 1.421 \pm 0.01$ ) and *Brucella*-free (▤;  $\bar{X}_{OD} = 0.432 \pm 0.01$ ) animals. The same values for subcutaneously vaccinated animals were  $\bar{X}_{OD} = 1.388 \pm 0.02$  (4th) and  $\bar{X}_{OD} = 1.017 \pm 0.06$  (17th). For conjunctivally vaccinated animals the values were  $\bar{X}_{OD} = 0.641 \pm 0.05$  (4th week) and  $\bar{X}_{OD} = 0.406 \pm 0.05$  (17th week).

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

There is abundant information on the sensitivity and specificity of ELISA for the serological diagnosis of brucellosis due to *B. abortus* or *B. ovis*. However, no information has been published on its value for the diagnosis of *B. melitensis* in small ruminants. In comparative assays with other tests (Table 1) (18), ELISA with crude S-LPS as antigen shows excellent sensitivity and specificity (Figure 1) for the diagnosis of infection in sheep.

Its specificity in standard vaccinated animals is low but, as commented before in the other tests, the conjunctival administration of Rev.1 improves specificity (Table 2). No information is available on its diagnostic value in goats. Additional work should be carried out to evaluate the ELISA in more extensive trials in sheep and goats with adequate control sera.

### Allergic diagnosis

The delayed-type hypersensitivity reaction produced in infected animals after inoculation of *Brucella* cytoplasmic proteins has been used as diagnostic test in *B. melitensis* infection of small ruminants (5,17). This test has a good specificity (lack of false positives) when testing uninfected flocks, but discrepancies with serological results are frequent in *B. melitensis*-infected flocks (17). In fact, only half the animals belonging to infected flocks show a correlation between allergic and serological results (17). Another inconvenience of the allergic diagnosis is that Rev.1 induces a prolonged allergic state (2 years or more) in many vaccinated animals (5,17). On the other hand, as cytoplasmic antigens are common to all *Brucella* species, cross-reactions with *B. ovis* are to be expected when testing sheep. In conclusion, allergic diagnosis can be recommended for routine screening to distinguish non-infected flocks and as a supplement to serological procedures (17). In our opinion, additional research should be carried out by histological, bacteriological and serological examinations to clarify the discrepancies between allergy and serology.

### Acknowledgements

The research in our Laboratory is financed in part by CICYT, CONAI and MAPA from Spain.

### References

1. Alton, G.G. & Elberg, S.S. (1967) *Vet. Bull.* 37, 793.
2. Alton, G.G. et al. (1984) in "les maladies de la chèvre", INRA (Les colloques de l'INRA, no 28), p 69.
3. Alton, G.G. (1985) in "Brucella melitensis" edited by Verger & Plommet. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands, p 215.
4. Alton, G.G. et al. (1988) *Techniques for the brucellosis laboratory*. INRA, 147 rue de l'Université, 75007 Paris.
5. Alton, G.G. (1990) in "Animal brucellosis" edited by Nielsen & Duncan. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p 383.
6. Blasco, J.M. et al. (1985) in "Brucella melitensis" edited by Verger & Plommet. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands, p 147.
7. Blasco, J.M. et al. (1990) *Brucellosis ovina*. Monografía One, 8, 25.
8. Diaz, R. et al. (1968) *J. Bacteriol.* 96, 893.

9. Diaz, R. et al. (1979) *J. Clin. Microbiol.* 10, 37.
10. Diaz, R. et al. (1981) *Ann. Rech. Vet.* 12, 35.
11. Elberg, S.S. (1981) *Vet. Bull.* 51, 67.
12. Falade S. (1978) *Res. Vet. Sci.* 24, 376.
13. Farina, R. (1985) in "Brucella melitensis" edited by Verger & Pommet. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands, p 139.
14. Farrell, I.D. (1974) *Res. Vet. Sci.* 16, 280.
15. Fensterbank, R. et al. (1982) *Ann. Rech. Vet.* 13, 295.
16. Fensterbank, R. et al. (1985) *Ann. Rech. Vet.* 16, 351.
17. Fensterbank, R. (1985) in "Brucella melitensis" edited by Verger & Plommet. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, p 167.
18. Jimenez de Bagues, M.P. et al. (1991) *Vet. Microbiol.* (in press).
19. Jones, L.M. et al. (1980) *J. Clin. Microbiol.* 12, 753.
20. Luchsinger, D.W. et Anderson, R.K. (1979) *Am. J. Vet. Res.* 40, 1307.
21. Marin, C.M. et al. (1990) *Res. Vet. Sci.* 48, 209.
22. Muhammed, S. (1980) *Vet. Microbiol.* 5, 223.
23. Renoux, G. et al. (1971) *Ann. Rech. Vet.* 2, 263.
24. Trap, D. et Gaumont, A. (1976) *Develop. Biol. Standard.* 31, 136.
25. Trap, D. et Gaumont, A. (1982) *Ann. Rech. Vet.* 13, 33.
26. Wagela, S. et al. (1980) *Res. Vet. Sci.* 28, 168.

## **Session 6**

### **General conclusions**



# Seminar report

## Introduction

The "Prevention of brucellosis in Mediterranean countries" seminar organized by CIHEAM under the auspices of EC, WHO, FAO, OIE, the Maltese Ministry of Agriculture and the Maltese Foundation for International Studies was held at Valletta, Malta on 28-30 October 1991.

The purpose of the seminar was to compare experience gained by the animal health services, public health services and research workers in the countries concerned in the control of this disease, and to consider applications which technical innovations offer, or might offer for making disease control more effective.

Six sessions were devoted to:

1. The current epidemiological situation of human and animal brucellosis in Mediterranean countries.
2. Human brucellosis, its diagnosis and treatment.
3. Prevention of brucellosis in animals: results achieved or anticipated; the role of veterinary services.
4. Recent progress in the knowledge of *Brucella*: microbiology and vaccines.
5. Recent progress in understanding the immune response: immunity and diagnosis.
6. General conclusions.

## The epidemiological situation

Just 90 years after its discovery, brucellosis due to *Brucella melitensis* still affects numerous flocks of sheep and goats, sometimes cattle and, as a consequence, human beings in every Mediterranean country.

Throughout the Mediterranean Basin, small ruminants outnumber cattle. Their numbers, in the nine countries which submitted reports (Algeria, Spain, France, Greece, Italy, Malta, Morocco, Tunisia and Turkey) total over 157 million, against about 50 million cattle. About half of this population is kept outside the Mediterranean regions of Spain, France and Italy.

The prevalence of bovine brucellosis has diminished during the past ten years from 9% to less than 1% in Spain, from 3% to 0.09% in France, from 1.22% to 0.7% in Greece. In Malta it has fallen from 2% in 1987 to 0.28% in 1990 among dairy herds.

In the case of ovine and caprine brucellosis, eradication from the most advanced countries is a short-term or medium-term objective (5-10 years).

In other countries, particularly those of the Maghreb and in Turkey, the still incomplete estimates of the frequency of the disease in human beings and animals reveals a difficult situation in certain zones. In every country the prevalence of human brucellosis reflects that of the disease in animals. The number of cases reported is far from revealing the actual clinical situation in most of the countries. Reports are often confined to cases among occupations at risk, even when brucellosis has been made notifiable and included in the list of diseases under State control. In general, prevalence falls with the number of flocks and with progress in hygiene. However, improvements in diagnosis and better recording of human cases has given rise to a considerable increase in prevalence in certain countries.

Cooperation between public health and agricultural services needs to be strengthened

at all levels, particularly at local level, so that information flows in both directions, and actions are coordinated.

## **Human brucellosis**

Although the isolation of *Brucella* in culture still provides confirmatory diagnosis, research and development of new methods of immunological diagnosis can supply a precise diagnosis. Thanks to correctly executed studies in various countries, the treatment of human brucellosis by combinations of antibiotics is well established. It has a satisfactory outcome in most cases. There are still infections which have proceeded to a chronic stage, and states of sensitization which create problems, but new investigative procedures may overcome them soon.

## **Prevention of brucellosis in animals**

### **Principles**

Brucellosis in sheep and goats creates public health problems and it is more difficult to control than bovine brucellosis, as the seminar papers reveal. No major country has yet gained sufficient practical experience, leading to eradication, to provide precise rules for a universal procedure. Basically there are two methods: vaccination with strain Rev. 1 and the slaughter of infected flocks. Choice of the most appropriate method depends on the epidemiological situation of each zone and the surveillance facilities available. It has to be borne in mind that procedures which have been effective in cattle-breeding countries are not directly transferable to Mediterranean zones because of different types of husbandry in these regions and biological differences between ovine and bovine brucellosis. Each procedure carries constraints and special requirements which have to be evaluated carefully when planning a strategy which will extend over many years, or at least ten years, and has to be conducted in a precise order. It is vital for owners of livestock to be consulted through their organizations in drawing up rules and in implementing them in the field.

The success of preventive operations depends on rigorous application of certain principles. Concerning vaccination, the principles are (1) vaccine of high quality and (2) widespread vaccine cover. In the opinion of research workers, only correctly performed vaccination can lead to eradication or virtual eradication within about ten years. Prophylaxis by slaughter (test and slaughter policy) is suitable for zones of low prevalence, and it can lead to eradication in quite a short period if applied rigorously. Use of both procedures simultaneously requires well-organized vaccination and testing, in order to avoid the slaughter of animals which have become serologically positive through vaccination. Vaccination by the conjunctival route overcomes this major disadvantage.

Concerning diagnosis in sheep and goats, there is still some uncertainty about the value of the tests, alone or combined. The detection of infected animals is improved by using well-defined antigens, whether for serological or skin tests, and the latest tests of high sensitivity and high specificity.

### **Comments on prophylaxis**

The prophylaxis of brucellosis in animals is the objective of programmes conducted under State guidance in every country represented at this seminar.

These programmes embrace:

- all herds of cattle and small ruminants in European Community countries and Malta,
- selected premises (often few) in the other countries.

They have been set up between 1968 and 1978 up in EC countries (Spain, France, Greece, Italy) for eradicating bovine brucellosis.

Prophylaxis is now obligatory and generalized. In the same countries, the control of brucellosis in small ruminants became obligatory throughout the territory in 1991.

In Malta the latest plan for eradicating bovine brucellosis and brucellosis of small ruminants dates from 1987.

In Turkey, a programme for controlling brucellosis in small ruminants was established on a regional basis in 1982.

Prophylactic plans were introduced in Algeria in 1985 and in Morocco in 1989.

Tunisia has a programme of vaccine prophylaxis for dairy calves. A plan for large-scale and generalized vaccination of small ruminants with Rev. 1 vaccine, extending over several years, has just started.

Prophylactic procedures differ according to the species of animal and the degree of advancement of the programmes.

Prophylaxis of bovine brucellosis has been confined to testing and slaughter since 1984 in France, 1977 in Greece and 1977 in Malta.

This is coupled with vaccination in Spain, while only vaccination is used in Turkey.

A testing and slaughter policy for brucellosis of small ruminants is practised only in northern France and in Malta.

It is combined with vaccination in southern France, Spain, Greece and Italy, and vaccination alone is practised in Turkey and Tunisia.

### **Constraints of prophylaxis**

The constraints of prophylaxis of brucellosis in animals are associated with the husbandry system, collaboration by farmers, cooperation between veterinary and public health services, and financial provisions.

*Husbandry systems* differ with species, country, and regions of a country. However, they can be classified into two groups for cattle and two groups for small ruminants.

For cattle:

- a. Housing without contact with small ruminants is practised widely in the western Mediterranean (Spain, France, northern Italy) and in Malta.
- b. Housing or extensive husbandry, in close contact with small ruminants, dominates in other countries.

For small ruminants:

- a. It is rare to encounter sedentary husbandry in Mediterranean countries.
- b. Transhumance is practised practically throughout the Mediterranean basin; it favours the spread of brucellosis, and makes control very difficult.

*Collaboration by farmers*, vital for assessing the epidemiological situation and applying the appropriate measures, is determined by economic factors, particularly in Mediterranean countries of the EC and in Malta.

In places where brucella infection is latent, which is general under extensive husbandry, and when there are no incentives, the farmers display no interest in the disease.

*Collaboration between veterinary and public health authorities* can result in the detection of latent, unrecognized foci of animal brucellosis through diagnosis of human

cases, but such collaboration is rare unless the disease occurs in endemic form.

*Financial provisions* for effective control of brucellosis are difficult to obtain in certain countries, particularly in the absence of information on the socio-economic cost of the disease.

### **Microbiology of *Brucella* and vaccines**

Analysis of the genome, histological structure and biochemical properties of *Brucella*, and phylogenetic relationships with closely-related bacteria, has shown that the various strains are derived from a single homogeneous species originating from primitive bacteria, which has become adapted to life within eukaryote cells, and thence to preferential hosts. Genetic analysis has not yet identified the genes and factors of virulence and adaptation to the host, but this advance might not be far away.

It follows that the production and testing of live, attenuated vaccines is still governed by empirical choices, particularly in measuring residual virulence and immunogenicity for laboratory animals.

This means that great care has to be taken at each stage of manufacture in order to produce a vaccine which conforms to the criteria of successful vaccination.

### **The immune response: immunity and diagnosis**

There is active research into identification of the structures and molecules responsible for immune mechanisms. Many antigenic fractions have been fully identified, leading to refinement of diagnostic procedures, and offering the hope of new vaccines produced by biotechnology, free from the disadvantages of current vaccines.

### **Conclusions**

Various conclusions arising from this seminar warrant special attention.

1. Despite the progress which has taken place during the past decade in many countries which have the necessary infrastructure and suitable husbandry systems, brucellosis among sheep and goats will remain for many years to come a major public health risk in Mediterranean countries. The epidemiological situation receives some attention, but the means required for implementing effective control programmes are not well appreciated yet by the responsible authorities.
2. Those means which are currently available are no doubt not perfects. Nevertheless, if used wisely and with determination, they permit the implementation of effective control measures, specially adapted to the conditions prevailing in each country or region.
3. Among these means, vaccination with Rev. 1 live vaccine is strongly recommended. Provided that correctly manufactured and tested batches are used, and the vaccination schemes are appropriate to local conditions, vaccination by itself can lead to complete or virtual eradication in the long term.
4. Surveillance of movement of animals and flocks may still prove to be very difficult. Thorough analysis of production and trading systems should assist the control of such routes of disease spread.
5. Progress in research, particularly analysis of virulence mechanisms and the immune response, may lead to the adoption of simpler and more effective control measures.

# Rapport de synthèse

## Introduction

Le Séminaire sur "la lutte contre la brucellose dans les pays méditerranéens" organisé par le C.I.H.E.A.M., sous les auspices de : C.E.E., O.M.S., F.A.O., O.I.E., MIN.AG. (Malte) et F.I.S. (Malte) s'est tenu à la Valette (Malte), du 28 au 30 Octobre 1991.

L'objectif du séminaire était de confronter les expériences acquises par les services de la santé animale et humaine et par les chercheurs des pays concernés dans la lutte contre cette maladie et de considérer les perspectives que les progrès des connaissances et des techniques offrent, ou vont offrir, pour rendre cette lutte plus efficace.

Six sessions ont été consacrées à :

1. La situation épidémiologique actuelle de la brucellose humaine et animale dans les pays méditerranéens.
2. La brucellose humaine : le point sur le diagnostic et le traitement.
3. La prévention de la brucellose animale : les résultats atteints et attendus; le rôle des services vétérinaires.
4. Les progrès récents dans la connaissance des *Brucella* : microbiologie et vaccins.
5. Les progrès récents dans la connaissance de la réponse immunitaire : immunité et diagnostic.
6. Conclusions générales.

## Situation épidémiologique

Bientôt 90 ans après sa découverte, la brucellose due à *Brucella melitensis* affecte encore dans tous les pays méditerranéens de nombreux troupeaux ovin et caprin et quelquefois bovin, et par voie de conséquence, l'homme.

Les petits ruminants sont, dans l'ensemble du Bassin Méditerranéen, beaucoup plus nombreux que les bovins. Leur nombre, dans les neufs pays<sup>1</sup> qui ont fait l'objet de rapports (Algérie, Espagne, France, Grèce, Italie, Malte, Maroc, Tunisie, Turquie), est supérieur à 157 millions, contre environ 50 millions de bovins, dont la moitié environ est stationnée en dehors des régions méditerranéennes d'Espagne, de France et d'Italie.

La prévalence de la brucellose bovine a diminué, au cours des dix dernières années, de 9 % à moins de 1 % en Espagne, de 3 % à 0,09 % en France, de 1,22 % à 0,70 % en Grèce. A Malte, elle est tombée de 2 % en 1987 à 0,28 % en 1990, dans les troupeaux laitiers.

Pour la brucellose ovine-caprine, l'éradication dans les pays les plus avancés est un objectif en vue à court ou moyen terme (5 - 10 ans).

Dans d'autres pays, en particulier ceux du Maghreb, et en Turquie, les estimations, encore incomplètes, de la fréquence de la maladie, tant chez l'homme que l'animal, font prévoir une situation difficile dans certaines zones.

La prévalence de la brucellose humaine est, dans tous les pays, le reflet de celle des brucelloses animales. Le nombre des cas déclarés est, cependant, loin de traduire la réalité des cas cliniques, dans la plupart des pays. Les déclarations sont, en effet, le plus souvent limitées aux cas observés dans les catégories professionnelles à risque, lorsque la brucellose est à déclaration obligatoire et inscrite au tableau des maladies prises en charge par l'Etat. La prévalence régresse en général en parallèle avec celle des troupeaux et avec les progrès de l'hygiène. Cependant, les progrès du diagnostic et de la prise en compte des cas chez

l'homme font apparaître, dans certains pays, un accroissement notable de la prévalence.

La coopération entre les services de santé publique et de l'agriculture doit être renforcée à tous les niveaux, en particulier au niveau local, de manière à ce que les informations circulent dans les deux sens, et que les actions soient coordonnées.

## La brucellose humaine

Bien que l'isolement des *Brucella* par culture reste le diagnostic de certitude, l'étude et le développement de nouvelles méthodes de diagnostic immunologique permettent le plus souvent de porter un diagnostic précis. Grâce à des études correctement planifiées conduites dans différents pays, les traitements de la brucellose humaine par des associations d'antibiotiques sont maintenant bien codifiés. Ils permettent d'intervenir avec succès dans la majorité des cas. Il reste que les infections évoluant à un stade chronique et les états de sensibilisation soulèvent encore des difficultés, que de nouveaux moyens d'investigation devraient résoudre à brève échéance.

## Prévention de la brucellose animale

### Principes

La brucellose ovine et caprine pose des problèmes de santé publique et de contrôle beaucoup plus difficiles que la brucellose bovine, comme l'ont souligné tous les exposés.

Aucun grand pays ne dispose à ce jour d'une expérience pratique suffisante, allant jusqu'à l'éradication, pour donner des règles précises sur la conduite à tenir dans toutes les circonstances. Il existe fondamentalement deux méthodes, *la vaccination par la souche Rev. 1*, et *l'abattage des troupeaux infectés*. Le choix de la méthode la plus appropriée dépend de la situation épidémiologique de chaque zone et des moyens de surveillance existants. On doit en particulier tenir compte du fait que les mesures qui ont été efficaces dans les pays d'élevage bovin ne sont pas directement transposables dans les zones méditerranéennes, à la fois en raison des structures de l'élevage dans ces régions et des différences biologiques entre les brucelloses ovine et bovine. Chaque méthode implique des contraintes et des exigences propres, qu'il faut apprécier avec soin avant de mettre en oeuvre la stratégie, qui doit se dérouler pendant plusieurs années, au moins dix ans, selon un ordre précis. Il est indispensable pour cela que les éleveurs soient associés à travers leurs organisations à l'élaboration des mesures réglementaires et à leur mise en oeuvre sur le terrain.

Le succès des opérations de *prévention* exige l'application rigoureuse de certains principes.

*Concernant la vaccination*, ce sont (1) la qualité du vaccin, production, contrôle, administration (2) la généralisation de la couverture vaccinale. De l'avis des chercheurs concernés, la vaccination seule correctement appliquée doit conduire en un délai d'environ dix ans à l'éradication ou la quasi-éradication de la maladie. La prophylaxie par abattage (test and slaughter) s'adresse aux zones de faible prévalence, et peut, à condition d'être conduite avec rigueur, aboutir à l'éradication dans un délai assez bref. La mise en oeuvre des deux méthodes simultanément exige une organisation articulant vaccination et diagnostic de sorte à éviter l'abattage d'animaux séropositifs suite à la vaccination. La vaccination par la voie conjonctivale évite cet inconvénient majeur.

*Concernant le diagnostic* sur ovins et caprins, il reste un certain nombre d'incertitudes sur la valeur et la complémentarité des tests. Des recherches sur l'utilisation d'antigènes

mieux définis, tant pour la sérologie que pour les tests cutanés, ainsi que des méthodes nouvelles plus sensibles et plus spécifiques, ont déjà et pourront encore améliorer la détection des animaux infectés.

### **Point sur les prophylaxies**

*La prophylaxie des Brucelloses animales* fait l'objet de programmes conduits sous l'égide de l'Etat dans tous les pays représentés au séminaire.

Ces programmes visent :

- la totalité des troupeaux de bovins et de petits ruminants dans les pays membres de la C.E.E. et à Malte;
- une fraction, le plus souvent faible, des élevages, dans les autres pays.

Ils ont été mis en place dans les pays de la C.E.E. (Espagne, France, Grèce, Italie), avec pour objectif l'éradication de la brucellose bovine, entre 1968 et 1978. La prophylaxie y est maintenant obligatoire et généralisée. Dans ces mêmes pays, la lutte contre la brucellose des petits ruminants est également obligatoire sur tout le territoire depuis 1991.

A Malte, le dernier plan d'éradication de la brucellose bovine et de la brucellose des petits ruminants date de 1987.

En Turquie, un programme de lutte contre la brucellose des petits ruminants a été établi sur une base régionale en 1982.

Les plans de prophylaxie, mis en place en Algérie et au Maroc, datent respectivement de 1985 et 1989.

En Tunisie, un programme de prophylaxie médicale reposant sur la vaccination des jeunes femelles laitières a été mis en oeuvre contre la brucellose bovine. Un plan pluriannuel de vaccination des petits ruminants, massive et généralisée, avec le vaccin Rev. 1 est à sa première phase d'exécution.

Les méthodes de prophylaxie sont différentes selon les espèces animales et l'état d'avancement des programmes.

La prophylaxie de la brucellose bovine est exclusivement sanitaire, fondée sur le dépistage, l'abattage et le contrôle, en France depuis 1984, en Grèce depuis 1977, à Malte depuis 1977.

Elle est médico-sanitaire en Espagne et médicale en Turquie.

La prophylaxie de la brucellose des petits ruminants n'est exclusivement sanitaire que dans le nord de la France et à Malte. Elle est médico-sanitaire dans le sud de la France, en Espagne, en Grèce et en Italie; elle est médicale en Turquie et en Tunisie.

### **Contraintes de la prophylaxie**

*Les contraintes de la prophylaxie des brucelloses animales* sont liées au système d'élevage, à la collaboration des éleveurs, à la coopération entre services vétérinaires et services de santé publique et aux moyens financiers.

*Les systèmes d'élevage* sont différents selon les espèces, les pays et, à l'intérieur des pays, selon les régions.

On peut cependant classer ces systèmes en deux grands groupes pour les bovins et deux groupes également pour les petits ruminants.

Pour les bovins :

- a. la stabulation sans contact avec les petits ruminants est généralement pratiquée dans les pays de la Méditerranée occidentale (Espagne, France, Italie du Nord) et à Malte;

b. la stabulation ou l'élevage extensif, en contact étroit avec les petits ruminants, est le système dominant dans les autres pays.

Pour les petits ruminants :

a. l'élevage en troupeaux sédentaires ne se rencontre qu'exceptionnellement, dans des régions qui n'ont pas les caractéristiques du milieu méditerranéen.

b. l'élevage transhumant pratiqué dans la quasi-totalité du Bassin Méditerranéen favorise la diffusion de la brucellose et en rend la prophylaxie très difficile.

*La collaboration des éleveurs*, indispensable pour la connaissance de la situation épidémiologique et l'application des mesures appropriées, est conditionnée par l'intérêt économique qu'ils peuvent y trouver, comme c'est fréquemment le cas dans les pays méditerranéens membres de la C.E.E. et à Malte.

Là où l'infection brucellique est latente, ce qui est généralement le cas pour les petits ruminants dans les pays d'élevage extensif où n'ont pas été mises en place des mesures incitatives, les bergers ne portent aucun intérêt à la maladie.

*La coopération entre vétérinaires et médecins*, qui permet, en particulier la révélation des foyers latents, méconnus, de brucellose animale, à partir du diagnostic des cas de brucellose humaine, n'existe le plus souvent qu'à l'occasion de l'apparition de foyers épidémiques.

*Les moyens financiers* nécessaires pour le contrôle effectif de l'infection brucellique sont difficiles à obtenir dans certains pays, du fait notamment de l'absence de données permettant de chiffrer le coût socio-économique de la maladie.

## **Microbiologique des brucella - vaccins**

L'analyse du génome, des structures histologiques et biochimiques des *Brucella* et de leurs relations phylogéniques avec les bactéries voisines ont montré que les différentes souches ne constituent qu'une seule espèce homogène, dérivant à l'origine de protéobactéries ancestrales par adaptation à un état d'association avec les cellules eucaryotes, puis à des hôtes préférentiels.

L'analyse génétique n'a pas encore permis l'identification des gènes et facteurs de virulence et d'adaptation à l'hôte, ce qui est l'objectif qui devrait être atteint à brève échéance.

De ce fait, la production et le contrôle des vaccins vivants atténués repose encore sur des moyens largement empiriques, en particulier la mesure de la virulence résiduelle et de l'immunogénicité sur l'animal de laboratoire. Ceci implique une grande rigueur à chacune des étapes de la fabrication pour assurer que la qualité finale du vaccin soit conforme aux normes requises pour le succès de la vaccination.

## **Response immunitaire: immunité et diagnostic**

L'identification des structures et molécules impliquées dans les mécanismes immunitaires se poursuit activement. Plusieurs fractions sont maintenant bien identifiées, ce qui permet d'affiner les moyens de diagnostic et d'envisager, à terme, la mise au point de nouveaux vaccins issus de la biotechnologie, débarrassés des inconvénients des vaccins actuels.

## **Conclusions**

A l'issue du séminaire, plusieurs conclusions méritent une attention particulière :



1. En dépit des progrès enregistrés ces dix dernières années dans plusieurs pays disposant des infrastructures nécessaires et de systèmes d'élevage relativement favorables, la brucellose ovine-caprine restera encore pour de longues années un problème de santé publique majeur dans nos pays méditerranéens. La situation épidémiologique, mieux connue, apparaît comme d'autant plus préoccupante que les moyens pour mettre en oeuvre des programmes efficaces sont encore très mal appréciés par les autorités responsables.
2. Ces moyens tels qu'ils sont actuellement disponibles sont sans doute imparfaits. Néanmoins, à condition d'être utilisés avec discernement et détermination, ils permettent la mise en place de programmes de lutte efficaces, adaptés à la situation propre à chaque pays ou région.
3. Parmi ces moyens, la vaccination avec la souche vivante Rev.1 est fortement recommandée. A condition d'employer des lots correctement fabriqués et contrôlés, et d'utiliser des schémas de vaccination adaptés à la situation locale, la vaccination seule peut conduire à terme à l'éradication, ou à une situation proche.
4. La surveillance des déplacements des animaux et troupeaux reste très souvent un problème très difficile. Une analyse attentive des systèmes de production et de commercialisation doit aider à maîtriser ces voies de transmission de la maladie.
5. Les progrès de la recherche, en particulier l'analyse des mécanismes de la virulence et de la réponse immunitaire, apporteront à brève ou moyenne échéance de nouveaux moyens d'actions plus simples et plus efficaces.