

*Ce rapport exprime les vues collectives d'un groupe international d'experts et ne représente pas nécessairement les décisions ou la politique officiellement adoptées par l'Organisation Mondiale de la Santé.*

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

SÉRIE DE RAPPORTS TECHNIQUES

N° 67

# COMITÉ MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE

## Deuxième rapport

	Pages
Introduction . . . . .	4
1. Voie de transmission de la maladie des animaux à l'homme . . . . .	5
2. La brucellose chez l'homme . . . . .	6
3. La brucellose chez les animaux . . . . .	10
4. Standardisation et interprétation de l'épreuve de séro-agglutination . . . . .	17
5. Isolement des <i>Brucella</i> . . . . .	18
6. Identification des espèces de <i>Brucella</i> . . . . .	22
7. Centres FAO/OMS de la brucellose et recherches futures . . . . .	27
Annexe 1. Epreuve d'agglutination du petit-lait . . . . .	29
Annexe 2. Epreuve des antigènes colorés appliquée au lait de chèvre . . . . .	30
Annexe 3. Dissociation des <i>Brucella</i> . . . . .	32
Annexe 4. Le travail des centres FAO/OMS de la brucellose . . . . .	33

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

PALAIS DES NATIONS

GENÈVE

Mai 1953

## COMITÉ MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE

### Deuxième session

Florence, 13-18 octobre 1952

#### Membres :

- Professeur G. P. Alivisatos, Directeur de l'Institut et Musée d'Hygiène de l'Université d'Athènes, Grèce
- D<sup>r</sup> H. C. Bendixen, Collège royal de Médecine vétérinaire et d'Agriculture, Copenhague, Danemark
- D<sup>r</sup> M. Ruiz Castañeda, Institut de Recherches médicales, Hôpital général, Mexico, D.F., Mexique
- Sir Weldon Dalrymple-Champneys, Bt., Deputy Chief Medical Officer, Ministry of Health, Londres, Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord (*Président*)
- D<sup>r</sup> S. B. Golem, Institut central d'Hygiène « Refik Saydam », Ankara, Turquie
- D<sup>r</sup> N. B. McCullough, Chief, Laboratory of Clinical Investigation, National Microbiological Institute, National Institutes of Health (US Public Health Service), Bethesda, Md., Etats-Unis d'Amérique
- D<sup>r</sup> C. A. Manthei, Animal Disease Station, US Bureau of Animal Industry, Beltsville, Md., Etats-Unis d'Amérique
- D<sup>r</sup> G. Mazzetti, Directeur de l'Institut d'Hygiène et de Microbiologie de l'Université de Florence, Italie (*Vice-Président*)
- D<sup>r</sup> G. Renoux, Chef de Laboratoire, Institut Pasteur, Tunis, Tunisie
- D<sup>r</sup> W. W. Spink, Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, Minn., Etats-Unis d'Amérique
- D<sup>r</sup> A. W. Stableforth, Director, Ministry of Agriculture and Fisheries Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, Surrey, Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord (*Rapporteur*)

#### Secrétariat :

- Sir Thomas Dalling, Conseiller vétérinaire principal, Sous-Division de la Production animale, Division de l'Agriculture, FAO
- Mr. E. C. Hulse, Vétérinaire, Division des Services des Maladies transmissibles, OMS
- D<sup>r</sup> M. M. Kaplan, Vétérinaire en Chef, Division des Services des Maladies transmissibles, OMS (*Co-Secrétaire*)
- D<sup>r</sup> K. V. L. Kesteven, Chef de la Sous-Division de la Production animale, Division de l'Agriculture, FAO (*Co-Secrétaire*)

Le rapport sur la deuxième session de ce comité a paru primitivement sous forme de document polycopié (WHO/Bruc/93), en date du 17 novembre 1952.

## COMITÉ MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELLOSE

### Deuxième rapport <sup>1</sup>

En novembre 1950, le Groupe mixte FAO/OMS d'experts de la Brucellose s'est réuni à Washington, D.C. Le rapport sur cette session a traité des questions fondamentales que posent le diagnostic et la prophylaxie de la brucellose chez l'homme et chez les animaux.<sup>2</sup>

Au cours des deux dernières années, des progrès appréciables ont été réalisés dans l'étude de la brucellose et c'est afin d'examiner les nouvelles connaissances acquises que le Comité mixte FAO/OMS d'experts de la Brucellose s'est réuni à l'Institut d'Hygiène de l'Université de Florence (Italie), du 13 au 18 octobre 1952.

Au cours de cette deuxième session, le comité a discuté en détail de questions concernant l'isolement et la détermination des types de *Brucella* ; il a également repris l'examen du rapport de la première session pour modifier, le cas échéant, certaines des recommandations qui y étaient contenues et pour le compléter sur d'autres points importants, compte tenu des faits nouvellement acquis. Il est donc essentiel que le lecteur se réfère au rapport sur la première session.<sup>2</sup> Les indications qui restent valables n'ont pas été rappelées dans le présent rapport si ce n'est pour la clarté de l'exposé ou pour donner à ces indications l'importance qu'elles méritent.

---

<sup>1</sup> Le Conseil Exécutif de l'OMS, lors de sa onzième session, a adopté la résolution suivante :

Le Conseil Exécutif

1. PREND ACTE du deuxième rapport du Comité mixte FAO/OMS d'experts de la Brucellose ;
2. REMERCIE les membres du comité du travail qu'ils ont accompli ; et
3. AUTORISE la publication du rapport.

(Résolution EB11.R12, *Actes off. Org. mond. Santé*, 46, 4)

<sup>2</sup> *Org. mond. Santé : Sér. Rapp. techn.* 1951, 37 (publié aussi comme *Etude agricole de la FAO*, N° 14)

## INTRODUCTION

Au cours des deux dernières années, des progrès remarquables ont été enregistrés dans plusieurs pays — notamment au Danemark, aux États-Unis d'Amérique, en Finlande, au Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord et en Suède — dans la lutte contre la brucellose animale. Toutefois, le problème reste très important du point de vue sanitaire, aussi bien qu'économique. Des enquêtes locales conduites par les autorités nationales et par l'intermédiaire du réseau des centres FAO/OMS de la brucellose<sup>3</sup> ont révélé la présence et parfois la fréquence élevée de la maladie dans des régions pour lesquelles on manquait jusqu'ici de renseignements précis (c'est le cas notamment pour diverses parties de l'Afrique, de l'Asie occidentale et de l'Asie du Sud-Est). Un autre fait inquiétant a été la découverte de cas de brucellose porcine en Europe centrale, région dans laquelle la maladie n'avait pas été signalée pendant de nombreuses années.

La prophylaxie de la brucellose humaine repose sur la lutte contre la maladie chez l'animal et sur sa suppression. Il y a, dans les régions atteintes, une corrélation entre le développement des mesures contre la brucellose bovine, accompagnées du traitement convenable du lait de vache et des produits laitiers par la chaleur, et la diminution de la brucellose humaine causée par *Brucella abortus*. Malheureusement toutefois, l'infection des moutons et des chèvres par *Br. melitensis* et sa transmission aux êtres humains continuent à poser un problème majeur. Bien que les résultats expérimentaux laissent entrevoir un progrès dans la prophylaxie de la brucellose ovine et caprine, la situation générale ne pourra guère s'améliorer, tant que les fermiers et les administrations sanitaires ne prendront pas de dispositions effectives pour entreprendre des programmes de lutte chez les animaux considérés. Un point important qui a souvent été méconnu au sujet de la brucellose ovine et caprine est la perte économique sérieuse provoquée par la maladie du fait des avortements, de la stérilité des animaux et de la diminution de la production laitière, notamment dans les pays le moins aptes à supporter une telle perte. Le comité préconise donc que les autorités agricoles, vétérinaires et sanitaires prennent, avec l'aide si possible de la FAO et de l'OMS, toutes mesures utiles pour enrayer la brucellose ovine et caprine (voir également section 3.3, page 15).

<sup>3</sup> Voir Annexe 4, page 33.

Le comité appelle l'attention sur la fréquence croissante des infections croisées à partir de l'une quelconque des trois espèces de *Brucella* chez les divers animaux domestiques. Ce problème mérite d'être examiné à fond, notamment en ce qui concerne la transmission de *Br. melitensis* à l'homme par les bovins ou les porcins infectés et la propagation de la maladie entre les animaux eux-mêmes. Sous ce rapport, les programmes de vaccination du bétail risquent de se trouver entravés, car aucune raison ne permet de croire que les vaccins actuellement employés protègent les bovins contre l'infection par *Br. melitensis*.

Le comité souligne qu'il importerait que les gouvernements fassent de la brucellose humaine et animale une maladie soumise à déclaration obligatoire et que les informations enregistrées soient échangées par l'intermédiaire de la FAO, de l'OIE (Office International des Epizooties) et de l'OMS.

### 1. VOIES DE TRANSMISSION DE LA MALADIE DES ANIMAUX A L'HOMME [1] \*

Cette question a été examinée dans le premier rapport. On ne la reprendra ici que sur quelques points, afin de préciser certains faits.

On peut prévenir la transmission de la brucellose par les aliments, en particulier par la viande, le lait et les produits laitiers, en les soumettant à un chauffage suffisant. Partout où la mesure s'impose, un texte législatif devrait prescrire la pasteurisation du lait et des produits laitiers. Dans de nombreux pays, on consomme des fromages fraîchement préparés à partir de lait cru et cette coutume est à l'origine de l'infection dans les populations humaines considérées. On a reconnu que les fromages fermentés conservés sont exempts de *Brucella*, mais on dispose de peu de renseignements précis sur le temps de fermentation nécessaire pour en assurer l'innocuité. Sous ce rapport, on a pu faire valoir qu'une période de trois mois est suffisante pour les fromages fortement fermentés, mais il convient de ne pas généraliser trop vite, en raison de la grande diversité des méthodes employées pour préparer ces produits suivant les pays. Le comité recommande donc que, dans des pays déterminés, on procède, par inoculation aux cobayes, à des contrôles de différents fromages, de beurre et d'autres produits laitiers préparés localement à partir de lait non pasteurisé et que les résultats de ces examens servent de base à l'établissement d'une législation sur les produits en question.

---

\* Les chiffres indiqués entre crochets après les titres de sections se rapportent aux sections correspondantes du rapport sur la première session (*Org. mond. Santé : Sér. Rapp. techn.* 1951, 37).

Des observations qui précèdent, il ne faut nullement conclure que le contact avec des animaux ou des matières infectés ne demeure pas, dans de nombreuses régions, le mode d'infection le plus important.

## 2. LA BRUCELLOSE CHEZ L'HOMME [2]

### 2.1 Critères cliniques [2.1]

Les manifestations cliniques de la brucellose humaine sont parfaitement décrites dans la littérature spécialisée, mais le comité fait observer que les deux formes de la maladie les plus répandues sont les suivantes :

- 1) une fièvre aiguë d'une durée limitée, suivie d'une guérison apparente ;
- 2) une maladie prolongée marquée par des périodes d'exacerbation.

Toutefois, l'invasion peut être insidieuse, tout en donnant lieu à une maladie prolongée. L'infection par *Brucella* peut persister longtemps dans l'organisme sans provoquer de manifestations cliniques. Chez les malades présentant des symptômes non spécifiques et mal définis, le diagnostic de brucellose doit obligatoirement reposer sur les critères ci-dessous indiqués. Le comité a de nouveau souligné qu'il n'y a pas de critère, à l'exception de la culture du germe, qui permette de conclure avec certitude à l'existence de l'infection par *Brucella*.

### 2.2 Critères de diagnostic [2.2]

#### 2.2.1 Culture [2.2.1]

C'est à partir du sang et de la moelle osseuse que les *Brucella* peuvent être le plus facilement isolés. S'ils n'aboutissent pas, les essais de culture doivent être renouvelés, et il y aura lieu d'examiner d'autres sources possibles de germes, telles que les ganglions lymphatiques, le liquide céphalo-rachidien, les urines ou les abcès éventuels. Des *Brucella* ont parfois été isolés des crachats, du placenta, du lait maternel, des sécrétions vaginales, du liquide séminal, etc. (voir section 5, page 18).

#### 2.2.2 Agglutination [2.2.2]

Le comité croit devoir reproduire ci-après, en raison de l'importance qu'il présente, l'exposé qui figure dans son premier rapport :

« Le sérodiagnostic, quand il est exécuté avec un antigène convenable et une technique satisfaisante, donne presque toujours des résultats positifs significatifs en présence d'une infection active. En cas de taux peu élevés ou de réactions négatives, il convient de

répéter les épreuves avant d'écarter le diagnostic de brucellose. Dans les cas suspects d'infection à *Brucella*, un taux élevé ou croissant d'agglutination constitue une présomption d'infection. Si les taux élevés indiquent une forte probabilité d'infection, il ne faut pas exclure la possibilité d'infection dans les cas où le titre est faible ou indiscernable. »

Il convient de noter qu'une réaction d'agglutination positive qui pourrait être interprétée comme indiquant la présence de *Brucella* peut être provoquée par le choléra, la tularémie ou la vaccination contre l'une ou l'autre de ces maladies. Ceci est particulièrement important dans les régions où se rencontre le choléra ou pour les sujets vaccinés contre cette maladie. Les agglutinines du choléra peuvent être différenciées de celles de la brucellose par l'épreuve d'absorption des agglutinines. Dans le cas de la tularémie, la différence de taux et les formes cliniques de la maladie suffisent à orienter le diagnostic.

Il conviendrait d'appeler l'attention sur l'existence, dans quelques régions endémiques, d'un grand nombre de personnes qui ne présentent pas de symptômes mais qui accusent un faible taux d'agglutinines de *Brucella*. En conséquence, chez des malades présentant des symptômes mal définis de la maladie et de faibles taux d'agglutinines, il conviendra d'être circonspect avant de mettre en cause une infection par *Brucella*. Le comité estime que dans tous les cas une extrême prudence devra présider à l'interprétation des taux inférieurs au dixième de celui que l'on obtient si on emploie les mêmes méthodes et les mêmes antigènes avec l'Étalon international de sérum anti-*Brucella abortus*.<sup>4</sup>

Quand on administre largement des antibiotiques à des malades fébriles, le diagnostic par hémoculture positive est moins fréquemment possible et on doit alors faire plus confiance aux résultats des épreuves d'agglutination.

#### 2.2.3 *Epreuve de fixation du complément et épreuve opsonocytophagique* [2.2.3 et 2.2.4]

Le comité estime que la réaction de fixation du complément n'a pas de valeur pratique à l'heure actuelle et que l'épreuve opsonocytophagique, quelles que soient ses variantes, ne se prête pas au diagnostic.

#### 2.2.4 *Réaction intradermique* [2.2.5]

Une épreuve intradermique positive dénote un état allergique spécifique du sujet et devrait être considérée comme dénuée de toute autre signification

---

<sup>4</sup> Ce sérum-étalon peut être fourni aux gouvernements et à d'autres laboratoires officiels sur demande adressée au Ministry of Agriculture and Fisheries Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, Angleterre. Des instructions concernant son emploi seront adressées avec le sérum. (Voir aussi la note 7, page 18.)

diagnostique, quels que soient la technique ou l'antigène employé ; la positivité ne prouve certainement pas la présence d'une infection active. L'épreuve est surtout utile à des fins épidémiologiques.

#### 2.2.5 *Autres épreuves de laboratoire* [2.2.6]

Une formule leucocytaire normale ou une leucopénie, avec ou sans lymphocytose relative, chez un févreux devrait faire penser à une infection par *Brucella* et amener à procéder à des épreuves complémentaires de diagnostic.

### 2.3 Thérapeutique [2.3]

Depuis la publication du premier rapport, la connaissance pratique de certains traitements s'est largement enrichie. Toutefois, le comité pense qu'il convient de répéter quelques conseils thérapeutiques donnés à l'époque, en les modifiant quand il y a lieu. Les recommandations suivantes sont applicables en général à l'infection humaine, quelle que soit la variété de *Brucella* qui l'a provoquée.

#### 2.3.1 *Traitement général* [2.3.1]

Une thérapeutique d'appoint comprenant le repos au lit et un régime alimentaire adéquat est indispensable pendant les manifestations aiguës de la maladie.

En raison de la nature des brucelloses qui rétrocedent d'elles-mêmes, l'efficacité de toute thérapeutique devrait être jugée d'après les critères suivants :

- a) amélioration clinique immédiate et continue de l'état du malade ;
- b) disparition des *Brucella* du courant sanguin et des tissus ;
- c) réduction de l'incidence des complications ;
- d) réduction de la fréquence des rechutes dont la majorité surviennent dans les six mois.

#### 2.3.2 *Antibiotiques et chimiothérapie*

2.3.2.1 *Antibiotiques* [2.3.2-2.3.7]. Bien qu'ils marquent un grand progrès dans le traitement de l'infection par *Brucella*, les antibiotiques actuellement connus ne permettent pas de résoudre complètement le problème.

En effet, des rechutes sont observées après l'emploi de l'un ou l'autre des antibiotiques pris séparément ou administrés en association. Si une rechute survient, on peut reprendre le traitement précédemment employé.

L'emploi de la pénicilline dans le traitement des infections par *Brucella* ne se justifie pas. La streptomycine et la dihydrostreptomycine employées seules ne sont pas efficaces. Quand elles sont employées seules ou associées à d'autres antibiotiques ou à des sulfamides, elles sont susceptibles de déterminer des effets toxiques. Le plus important d'entre eux est l'atteinte de la 8<sup>e</sup> paire de nerfs. L'auréomycine est efficace quand elle est employée seule dans le traitement de l'infection active par *Brucella*. Pour les adultes, la posologie suggérée est 2 g par jour pendant 14-21 jours. L'oxytétracycline,<sup>5</sup> quand elle est employée seule est comparable, à tous égards, à l'auréomycine. Le chloramphénicol s'est montré efficace dans le traitement de la brucellose, mais il convient d'être prudent, en raison de l'anémie aplastique qui peut suivre parfois son emploi ; pour cette raison, il convient de lui préférer l'auréomycine ou l'oxytétracycline.

2.3.2.2 *Sulfamides et autres agents chimiothérapeutiques* [2.3.8-2.3.9]. Les composés sulfamidés administrés isolément n'ont qu'une valeur très limitée dans le traitement des infections par *Brucella*. Aucun autre agent chimiothérapeutique ne s'est pour l'instant montré efficace dans le traitement de la maladie.

2.3.2.3 *Traitement combiné*. L'administration simultanée de streptomycine ou de dihydrostreptomycine et de sulfadiazine est efficace. La posologie suggérée pour les adultes est la suivante : 1-2 g par jour de streptomycine ou de dihydrostreptomycine et 4-6 g de sulfamide pendant 14-21 jours. L'association de la streptomycine ou de la dihydrostreptomycine et de l'auréomycine ou de l'oxytétracycline est supérieure au traitement précédent. La posologie quotidienne recommandée est la suivante : 1-2 g de streptomycine ou de dihydrostreptomycine associée à 2 g d'auréomycine ou d'oxytétracycline pendant 21 jours. L'adjonction d'un sulfamide aux deux antibiotiques, comme dans le traitement précédent a donné de bons résultats. Certains s'en tiennent à la dose d'antibiotique indiquée, tandis que d'autres préfèrent la réduire quelque peu.

2.3.2.4 *Vitamine B*. Au cours d'un traitement comportant l'administration par voie buccale d'antibiotiques ou de sulfamides, il est recommandé de donner des doses suffisantes de complexe vitaminique B pour éviter les manifestations d'avitaminose.

---

<sup>5</sup> Oxytétracycline est la dénomination commune internationale pour « Terramycine » (voir *Chron. Org. mond. Santé*, 1953, 7, 42).

### 2.3.3 *Antigènes* [2.3.10]

L'accord ne s'est pas encore établi sur la place qui revient à la vaccinothérapie antibrucellique dans le traitement de cette maladie. Le comité reconnaît que, du fait que les antibiotiques sont difficiles à se procurer dans certains pays, d'autres méthodes de traitement y sont employées, notamment la thérapeutique par les antigènes. Une forme courante de cette thérapeutique est l'administration parentérale de divers types d'antigènes brucelliques qui peuvent provoquer des réactions générales. Quelques cliniciens font état de résultats favorables obtenus par ce traitement, notamment dans les formes chroniques de la maladie, accompagnées de complications. Les renseignements disponibles sont toutefois insuffisants pour justifier la recommandation d'un antigène déterminé.

Il conviendrait de noter que l'administration intraveineuse d'antigènes n'est pas exempte de risques tels que des réactions générales graves suivies de collapsus.

La vaccinothérapie prolongée n'est jamais justifiée chez les malades présentant des symptômes multiples et mal définis, pour lesquels le diagnostic n'est pas prouvé.

## 3. LA BRUCELLOSE CHEZ LES ANIMAUX [3]

La plupart des questions qui se posent à cet égard ont été traitées en détail dans le premier rapport. Toutefois, le comité a estimé souhaitable de souligner, au sujet de la prophylaxie que, si l'assainissement et l'hygiène ont une grande importance, la prophylaxie repose essentiellement sur le dépistage et l'élimination ou l'isolement effectif de l'animal infecté.

### 3.1 Méthodes de diagnostic [3.2]

Il s'est confirmé que les différentes épreuves de diagnostic n'ont qu'une valeur relative, comme il est indiqué dans le premier rapport. Il convient, dans le présent rapport, de rappeler le principe de la réaction d'agglutination du petit-lait et celui des diverses épreuves réalisées sur le lait avec des antigènes colorés.

### 3.1.1 *Epreuves de détection des agglutinines dans le lait par les antigènes colorés*<sup>6</sup>

Ces épreuves sont des réactions d'agglutination qui se fondent sur la présence d'agglutinines de *Brucella* dans le lait provenant d'animaux infectés. Les antigènes employés sont colorés de façon à permettre l'observation de l'agglutination en présence de lait ou de crème.

Les antigènes préparés dans les différents pays sont habituellement étalonnés par rapport à des antigènes pré-existants; on emploie à cet effet un échantillon de lait positif ou plusieurs échantillons de titres différents. Il y a cependant lieu de penser que l'étalonnage peut être effectué au moyen de réactions d'agglutination avec un sérum étalon. Il est donc recommandé de faire des essais à cet égard avec l'Étalon international de sérum anti-*Brucella abortus*.

3.1.1.1 « *Milk Ring Test* » ou *épreuve de l'anneau sur le lait* (3.2.3 et *Annexe 3*). Dans le premier rapport, cette épreuve a été désignée sous le nom d'« ABR » (Abortus Bang Ringprobe) et cette dénomination est encore employée dans de nombreux pays. Toutefois, comme cette épreuve est applicable au lait d'animaux infectés par n'importe quelle espèce de *Brucella* et qu'elle est spécialement utilisée pour le lait, le comité estime qu'il serait préférable de la dénommer, à l'avenir, « *Milk Ring Test* » ou *épreuve de l'anneau sur le lait*.

Les antigènes utilisés peuvent être colorés avec divers réactifs. Les deux colorants les plus employés, à l'heure actuelle, sont l'hématoxyline et le chlorure de triphényl tétrazolium. On a introduit récemment un autre colorant, le chlorure de diphenyl tétrazolium. L'antigène coloré à l'hématoxyline a l'avantage de donner, en fin de réaction, un anneau de couleur bleu foncé et de nombreux chercheurs considèrent qu'il est plus facile à interpréter que les colorations données par les antigènes traités par d'autres colorants. Il présente cependant les inconvénients suivants: il est plus long à préparer, il est moins stable que les colorants vitaux et l'on éprouve des difficultés pour obtenir un antigène ayant la sensibilité désirable. Les antigènes colorés au tétrazolium ont l'avantage d'être faciles à préparer. En outre, les colorants vitaux sont bien fixés, une fois que les cellules ont pris la coloration. Cependant, l'anneau rouge clair produit par l'antigène coloré au triphényl tétrazolium est considéré par quelques chercheurs comme moins facile à interpréter que le bleu de l'anneau d'hématoxyline. L'antigène ou diphenyl tétrazolium est aussi aisément préparé que l'antigène au triphényl et il a l'avantage de donner un anneau de couleur pourpre.

<sup>6</sup> Des précisions sur ces épreuves peuvent être obtenues sur demande adressée aux co-secrétaires du Comité mixte FAO/OMS d'experts de la Brucellose, Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture, Viale delle Terme di Caracalla, Rome, Italie, ou Organisation Mondiale de la Santé, Palais des Nations, Genève, Suisse.

Les renseignements recueillis depuis le précédent rapport ont confirmé le grand intérêt pratique de l'épreuve de l'anneau sur le lait en tant qu'épreuve de présomption ou de dépistage général pour déceler les troupeaux infectés. Elle est également utile comme auxiliaire de la réaction de séro-agglutination pour dépister l'infection dans des troupeaux préalablement reconnus indemnes et dans des régions légèrement infectées (moins de 10 % de troupeaux positifs). Pour certifier qu'un troupeau est indemne de brucellose, il ne faut pas se fier à des résultats négatifs obtenus avec l'épreuve de l'anneau, mais confirmer ces constatations en pratiquant une séro-agglutination sur chaque animal. Toutefois, s'il s'agit d'une nouvelle attestation de non-infection, on peut s'en rapporter aux résultats d'épreuves de l'anneau répétées. La combinaison de cette épreuve avec la réaction de séro-agglutination permet de vérifier à bien meilleur compte et beaucoup plus rapidement si la maladie a disparu ; dans quelques régions, elle a en fait rendu possible l'exécution de programmes qui, autrement, n'auraient pu être réalisés par suite du manque de personnel.

3.1.1.2 « *Milk Plate Test.* » Les antigènes servant à l'épreuve de l'anneau peuvent être employés pour cette épreuve sur lame et dans ce cas les antigènes les plus foncés, c'est-à-dire en particulier l'antigène coloré à l'hématoxyline, sont plus faciles à interpréter. Toutefois, il serait souhaitable de disposer d'un antigène encore plus sensible. Cette technique a l'avantage de permettre de réaliser directement l'épreuve sur la crème, le lait aigre, le lait homogénéisé, le lait écrémé et le lait de bêtes atteintes de mastites.

3.1.1.3 *Epreuve du tube capillaire.* L'épreuve du tube capillaire donne les meilleurs résultats quand elle est effectuée avec l'antigène coloré à l'hématoxyline. Ces résultats sont comparables à ceux du « *Milk Plate Test* », mais la lecture en est généralement plus difficile.

### 3.1.2 *Test d'agglutination du petit-lait*

Le test d'agglutination du petit-lait est une méthode pratique de diagnostic pour dépister l'infection par *Br. abortus* virulent, en particulier dans le pis des animaux suspects. Il est également utile pour différencier les animaux vaccinés de ceux qui sont infectés mais dont le sérum présente des titres d'agglutination douteux ou faiblement positifs. Un fort pourcentage d'échantillons de petit-lait provenant d'animaux non infectés vaccinés avec la souche 19 ne présentent pas d'agglutination à une dilution inférieure à la dilution minimum permettant de poser un diagnostic, tandis qu'un fort pourcentage d'échantillons de petit-lait provenant d'animaux infectés accusent des titres supérieurs au titre minimum de diagnostic. L'épreuve est moins sûre quand elle est appliquée précocement ou tardivement pendant la lactation.

Une description de la technique de l'épreuve d'agglutination du petit-lait est donnée à l'Annexe 1 (voir page 29).

### 3.2 Brucellose bovine [3.5]

Il y aurait un grand intérêt à entreprendre des enquêtes sur la fréquence et l'importance économique de la brucellose bovine dans des pays qui n'ont pas encore fait l'objet d'études de ce genre. Dans certains cas, ce travail pourrait être exécuté sous le patronage de la FAO et de l'OMS et le comité recommande que l'on procède ainsi chaque fois que cela sera possible. La fréquence de l'infection chez les bovins pourrait être mesurée d'après les résultats de réactions de séro-agglutination ou d'épreuves de l'anneau, ou encore au moyen des deux méthodes employées simultanément, dans des régions représentatives du pays considéré.

Tout plan de prophylaxie et de suppression radicale de la maladie dans un pays quelconque repose sur un programme éducatif s'étendant à tous les groupes de la collectivité et exige notamment la formation de vétérinaires et de techniciens, aussi bien pour l'emploi des méthodes de laboratoire que pour les travaux sur le terrain. Le mode de formation dépend évidemment des moyens dont on dispose. Quand il existe des organisations d'éleveurs, on peut faire largement appel à leur concours et travailler en étroite collaboration avec les pouvoirs publics, centraux et régionaux. Il faut, dans tous les cas, insister sur le gain économique que représente l'élimination de la brucellose tant humaine qu'animale.

Ce à quoi il faut tendre en dernière analyse, c'est de supprimer radicalement la brucellose bovine sur tout le territoire d'un pays. Toutefois, le programme à adopter dépend des conditions qui règnent dans ce pays. Les services vétérinaires et la législation sur la prophylaxie des zoonoses varient d'un pays à l'autre : dans certains d'entre eux, ces services et cette législation sont pratiquement inexistantes, dans d'autres ils sont excellents.

Par conséquent, tout en maintenant son point de vue sur les méthodes de prophylaxie et de lutte exposées dans son premier rapport, le comité estime qu'il faut souligner la double nécessité d'un programme éducatif destiné à atteindre tous les secteurs de la population nationale et d'un service vétérinaire satisfaisant dans les pays qui en sont dépourvus. Lorsque les mesures ainsi recommandées auront exercé tous leurs effets, le moment sera venu d'aborder le programme de lutte proprement dit.

#### 3.2.1 Vaccination des bovins [3.3]

3.2.1.1 *Vaccin de la souche 19* [3.4]. Le comité estime que, du point de vue de l'innocuité, du degré de protection conféré et de la facilité de

préparation et d'emploi, le vaccin préparé à partir de la souche 19 conserve toujours sa supériorité sur les vaccins utilisés contre la brucellose.

a) Vaccination des animaux gravides. Chez les animaux non gravides vaccinés de la façon habituelle, la souche 19 n'a pas été isolée du lait ou des sécrétions génitales. Chez les animaux gravides, en revanche, bien que l'utérus ou le pis de l'animal ne soit pas infecté de façon permanente, la souche 19 peut être excrétée pendant une période pouvant atteindre une semaine après la parturition. Normalement, la vaccination des adultes gravides n'est donc pas recommandée.

b) Durée de la protection. Nous disposons désormais de renseignements indiquant que les animaux vaccinés jeunes et dont l'immunité n'a pas été accrue par exposition ultérieure aux *Brucella* sont encore résistants jusqu'à leur cinquième vêlage. On a toutefois lieu de penser que le vieillissement de l'animal peut intervenir pour une part dans cette résistance prolongée. De l'avis du comité, on semble fondé à conclure que la revaccination après le premier vêlage ou les vêlages ultérieurs n'est pas nécessaire. Les travaux se poursuivent sur l'utilité possible de la revaccination des jeunes animaux.

c) Vaccination des taureaux. Les taureaux sont sérieusement exposés quand ils entrent en contact avec des troupeaux fortement infectés. Le sérum des taureaux vaccinés présente souvent des taux d'agglutinines persistants et la vaccination ne peut donc pas leur être appliquée quand on l'associe à l'épreuve de séro-agglutination pratiquée pour éliminer les animaux atteints. Mais rien ne semble s'opposer à ce que les taureaux soient vaccinés dans les troupeaux ou dans les pays où la vaccination est la seule méthode de lutte employée. Chez les taureaux, comme chez les vaches, la vaccination pourrait être limitée aux jeunes animaux âgés de 6 à 8 mois.

d) Vaccins secs. De nouvelles expériences ont confirmé que les vaccins secs se conservent mieux et se révèlent efficaces dans la pratique courante. Il n'est pas encore possible de se prononcer sur la durée de leur activité mais, tandis qu'elle semble n'être pas inférieure à un an si la préparation est conservée au réfrigérateur, elle peut être beaucoup plus courte quand le vaccin est exposé, de façon continue ou par intermittences, à de hautes températures ambiantes.

e) Voies d'administration des vaccins et doses à employer. Habituellement, la vaccination est effectuée par voie sous-cutanée. On a montré cependant que des doses réduites, administrées par voie intradermique, intracaudale ou sous-cutanée, semblent conférer une protection suffisante lors de gravidités ultérieures. Toutefois, la dose minimum (c'est-à-dire la quantité de souche 19 vivante) nécessaire pour provoquer une bonne immunité par voie sous-cutanée, intradermique ou autre, n'est pas encore

connue. Il faut donc, à l'heure actuelle, s'en tenir à la dose recommandée de 5 ml (approximativement 60 milliards de germes vivants) injectée par voie sous-cutanée. Il conviendrait de réunir de plus amples renseignements sur ces questions.

Le comité souligne que le vaccin doit renfermer, au moment même de l'injection, la quantité totale de germes vivants de la souche 19 et que ceux-ci doivent se présenter non dissociés.

3.2.1.2 *Autres vaccins.* Dans le premier rapport, il n'a pas été fait mention du vaccin « M ». Les données publiées sur l'efficacité de ce vaccin dans la prophylaxie de la brucellose bovine sont d'ailleurs encore insuffisantes pour permettre de porter un jugement définitif. Il semble toutefois que les résultats obtenus ne permettent pas de conclure à la supériorité du vaccin « M » sur le vaccin préparé à partir de la souche 19. Des essais de portée restreinte se poursuivent au sujet de vaccins tués à l'éther, associés à des adjuvants et il est trop tôt pour se prononcer. Le comité désire souligner une fois de plus le danger que présente l'emploi de vaccins vivants de haute virulence ou de virulence inconnue, qui risquent de propager l'infection et de retarder notablement les progrès de la lutte antibrucellique.

### 3.3 Brucellose des caprins et des ovins [3.6]

Il a été démontré de façon frappante, au cours des dernières années, dans certaines parties de la France et de la Yougoslavie, que la suppression quasi radicale de la brucellose caprine et ovine est possible et réalisable dans des régions fortement infectées, si l'on pratique des séroréactions et que l'on élimine les animaux positifs. Il y a lieu de remarquer que l'infection humaine dans ces régions s'en est trouvée proportionnellement réduite. Le comité préconise donc l'organisation de campagnes analogues sur d'autres territoires fortement infectés.

#### 3.3.1 *Méthodes de diagnostic* [3.6.4]

Se basant sur les faits actuellement connus et en attendant que les expérimentations en cours soient terminées, le comité recommande que le test de séro-agglutination soit interprété par rapport à l'ensemble du troupeau considéré. Si, dans un troupeau donné, un animal présente un titre sérique égal ou supérieur au dixième du titre obtenu si l'on emploie la même méthode et le même antigène avec l'Etalon international de sérum anti-*Brucella abortus*, l'animal doit être considéré comme infecté et il doit en être de même de tous les autres animaux du troupeau, quel que soit leur titre.

L'isolement de *Brucella* à partir d'un animal du troupeau constitue évidemment une preuve indéniable d'infection. La constatation de titres peu élevés dans un troupeau devrait être considérée comme éminemment suspecte.

Il conviendrait de noter toutefois que des animaux dont l'infection est prouvée par l'isolement de *Brucella* peuvent se montrer négatifs lors d'une séroration isolée. Par conséquent, en cas d'infection avérée dans un troupeau, il est nécessaire de renouveler les épreuves à des intervalles périodiques de trois à six mois, jusqu'à ce que l'infection soit éliminée.

L'application au lait de chèvre de l'épreuve à l'antigène coloré pour dépister la brucellose semble autoriser de grands espoirs et constitue une arme épidémiologique d'usage facile et pratique dans la prophylaxie de cette maladie. Il est encore trop tôt pour déterminer la portée exacte de l'épreuve à l'antigène coloré, mais on espère pouvoir y parvenir assez prochainement. Toutefois, les essais ont été suffisamment poussés pour qu'il soit possible de présenter des recommandations provisoires sur le mode d'exécution de ce test : ces recommandations figurent à l'Annexe 2, page 30. Il va sans dire que cette technique est appelée à subir des modifications, compte tenu des résultats expérimentaux que l'on espère obtenir à bref délai. Le comité recommande fortement de poursuivre les recherches sur ce point.

Quand on l'applique au lait de brebis, l'épreuve à l'antigène coloré ne peut pas encore être recommandée avec une égale confiance. Les essais préliminaires effectués sur le lait de brebis ont, en effet, révélé certaines discordances entre les résultats. Le comité recommande donc de surseoir à l'emploi de cette épreuve, tant que ne seront pas connus les résultats de nouveaux travaux entrepris dans ce domaine.

### 3.3.2 Vaccination [3.6.3]

A l'heure actuelle, aucun vaccin ne peut être recommandé pour les caprins ou les ovins. Le comité a étudié les résultats encourageants obtenus avec quelques vaccins expérimentés sur des animaux de laboratoire. Les objections élevées contre l'emploi, chez les bovins, de vaccins vivants de virulence inconnue sont également valables pour les caprins et les ovins.

On envisage d'entreprendre une vaste expérience de vaccination sur des moutons et des chèvres et le comité recommande que la FAO et l'OMS apportent tout leur appui à l'exécution de cette campagne. On ne saurait guère escompter de résultats avant deux ans au moins. Même si ces résultats sont favorables, il faudra encore plusieurs années avant que la vaccination puisse entrer dans la pratique courante. Le comité exhorte donc les pouvoirs publics des divers pays à recourir entre temps aux méthodes recommandées

d'épreuve et à l'isolement ou, de préférence, l'élimination des animaux malades, en accompagnant cette action de mesures sanitaires de nature à diminuer l'acuité du grave problème que pose la brucellose chez les ovins et les caprins.

### 3.4 Brucellose des porcins [3.7]

La brucellose des porcins provoquée par *Br. suis* est une maladie qui présente une grande importance économique et qui est également responsable d'infections chez l'homme. Bien que *Br. suis* soit le type de *Brucella* le plus communément rencontré chez le porc, la présence de *Br. abortus* et *Br. melitensis* se constate également et les porcs ainsi infectés peuvent être à l'origine de l'infection tant de l'homme que des autres animaux domestiques.

La maladie du porc due à l'infection par *Br. suis* peut revêtir une forme aiguë. Dans quelques troupeaux toutefois, notamment ceux d'importance réduite, la maladie peut disparaître ou perdre de sa gravité par suite de la guérison de quelques animaux infectés et parce que la plupart des animaux sont normalement abattus, étant donné le but de l'élevage. En revanche, surtout dans les grands troupeaux reproducteurs, l'infection est susceptible de persister et peut évoluer comme maladie chronique pour réapparaître sous une forme aiguë à la génération suivante.

Les questions de diagnostic, de vaccination et de thérapeutique ont été étudiées dans le premier rapport. Comme on l'a exposé dans ce document, la réaction de séro-agglutination doit être appliquée au troupeau tout entier [Annexe 5]. Dans le cas où un animal quelconque présente un titre égal ou supérieur au dixième du titre obtenu si l'on emploie la même méthode et le même antigène avec l'Étalon international de sérum anti-*Brucella abortus*, il convient de considérer l'ensemble du troupeau comme foyer d'infection.

## 4. STANDARDISATION ET INTERPRÉTATION DE L'ÉPREUVE DE SÉRO-AGGLUTINATION [4]

Le comité a entériné les recommandations formulées lors de la première session.

Il a pris acte que, depuis la publication du premier rapport, le Comité d'experts de l'OMS pour la Standardisation biologique avait décidé d'établir un Étalon international de sérum anti-*Brucella abortus*, dont la teneur en

agglutinines serait semblable à celle du sérum étalon de l'OIE.<sup>7</sup> Le comité estime nécessaire de préciser que cet étalon international n'est pas destiné à être utilisé dans la pratique courante comme sérum positif courant de référence, mais qu'il devrait être employé exclusivement pour uniformiser l'épreuve dans chaque pays, une fois par an.<sup>8</sup> L'étalonnage courant des antigènes devrait être réalisé au moyen d'un sérum étalon local ou national [4(2)]. Des recommandations ont été formulées plus haut pour l'interprétation des épreuves d'agglutination chez l'homme, les caprins et les porcins : elles complètent celles qui concernent les bovins, parues dans le premier rapport [4(3)].

Le comité a souligné à nouveau combien il importait qu'en publiant des résultats fondés sur des épreuves de séro-agglutination, les chercheurs indiquent la sensibilité de la méthode employée [4(8)], car l'indication de la dilution à laquelle on obtient une agglutination de 50 %, lorsqu'on procède à l'épreuve sur l'Etalon international de sérum anti-*Brucella abortus* avec un antigène et par une méthode donnée, permet aux chercheurs des autres pays de connaître immédiatement la sensibilité de la méthode employée et, par suite, la signification réelle de tout titre diagnostique ou autre mentionné [Annexe 6].

Un sérum peut parfois donner lieu à un phénomène de prozone, dans lequel l'antigène n'est pas agglutiné aux faibles dilutions de sérum. Ce phénomène est d'ailleurs rare et toute erreur d'interprétation peut être évitée si l'on a recours à un nombre suffisant de dilutions.

L'impossibilité d'obtenir l'agglutination peut être due à la présence « d'anticorps bloquants ». Quoi qu'il en soit, il semblerait, d'après les observations publiées, que le plus souvent l'agglutination est inhibée dans les faibles dilutions seulement et que ce phénomène présente rarement une importance pratique pour la détection de la brucellose active. Il sera nécessaire de poursuivre les recherches pour élucider cette question.

## 5. ISOLEMENT DES BRUCELLA

### 5.1 Culture bactériologique [5]

De bonnes techniques pour le prélèvement et la préparation des échantillons, l'ensemencement des milieux et l'inoculation aux animaux de laboratoire sont des conditions nécessaires de l'isolement des *Brucella*. Toutes les opérations doivent être réalisées aseptiquement.

<sup>7</sup> L'Etalon international de sérum anti-*Brucella abortus* a été adopté à la sixième session du Comité d'experts de l'OMS pour la Standardisation biologique (voir *Org. mond. Santé : Sér. Rapp. techn.* 1953, 68).

<sup>8</sup> Voir note <sup>4</sup>, page 7.

La meilleure méthode d'isolement des *Brucella* est l'ensemencement direct sur des milieux solides appropriés. On recommande l'emploi de milieux solides pour le premier isolement, car c'est dans ces milieux que les caractères des microorganismes ont le plus de chances de se conserver, ce qui en facilite l'étude ultérieure. Il est toutefois reconnu que les milieux liquides sont plus pratiques pour l'isolement à partir du sang et des autres humeurs, à cause du petit nombre de *Brucella* qui s'y trouvent habituellement. Il est alors essentiel de repiquer précocement sur milieux solides, pour détecter une culture parce que les *Brucella* se dissocient quand on les cultive longtemps en milieux liquides (voir Annexe 3, page 32).

L'emploi fréquent et souvent inconsidéré des antibiotiques dès les premiers signes d'une maladie a eu pour effet d'introduire des facteurs qui compliquent l'isolement des *Brucella* chez l'homme : ces microorganismes poussent parfois moins rapidement quand ils proviennent de sujets récemment traités ou en cours de traitement par les antibiotiques.

Bien que dans la plupart des cas le développement des colonies s'obtient dans les 7-14 jours, les cultures négatives doivent être conservées pendant au moins 35 jours avant d'être éliminées comme telles. Il est arrivé exceptionnellement que des *Brucella* n'aient pas pu être décelées avant la 7<sup>e</sup> semaine. Dans la recherche de *Br. abortus*, il convient également de veiller au besoin de ce microorganisme en CO<sub>2</sub>.

#### 5.1.1 Milieux

Le choix des milieux dépendra fréquemment aussi bien de leur prix de revient et de la facilité avec laquelle on pourra se les procurer que de leur convenance. Si les milieux « Albimi »<sup>9</sup> et « Trypticase-soy »<sup>9</sup> sont largement utilisés et sont préférés par de nombreux chercheurs pour isoler les *Brucella*, on peut recourir, dans les régions où il n'est pas possible de se les procurer, à d'autres milieux moins onéreux et plus aisément disponibles, soit sous forme liquide, soit après addition de gélose. Il est bien connu que les milieux à l'infusion de foie, à l'infusion de veau,<sup>10</sup> à l'infusion de bœuf,<sup>10</sup> et à l'infusion de pommes de terre<sup>10</sup> peuvent tous être utilisés comme milieux de culture primaire des *Brucella*. Le milieu au Tryptose a été largement employé, mais des faits récents montrent que certains lots ne conviennent pas à la culture des *Brucella*. Les milieux liquides préférés pour l'isolement des *Brucella* d'origine humaine sont la « Trypticase-soy » et l'« Albimi » (à défaut, on peut utiliser les milieux indiqués plus haut).

<sup>9</sup> Les co-secrétaires du comité, Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture, Viale delle Terme di Caracalla, Rome, Italie, ou Organisation Mondiale de la Santé, Palais des Nations, Genève, Suisse, fourniront, sur demande, toute précision à cet égard.

<sup>10</sup> Quand ces milieux sont utilisés sous forme solide, il conviendrait d'ajouter environ 10 % de sérum (*Brucella* négatif).

Abstraction faite du type de milieu employé, chaque lot préparé devrait être préalablement essayé pour déterminer s'il se prête à la culture de *Brucella*. Les contaminants qui poussent rapidement ou déterminent des modifications importantes du pH du milieu ont pour effet d'empêcher habituellement la pousse des *Brucella*. Le pH optimum du milieu après stérilisation est 6,8.

### 5.1.2 Méthodes

Ces milieux, additionnés de 1 à 2 % de citrate de sodium, sont répartis par quantités de 75 ml dans des flacons qui sont bouchés au coton et stérilisés à l'autoclave. On introduit aseptiquement 5 à 10 ml de sang ou d'un autre liquide organique et on porte à 37°C dans un bocal fermé dont l'atmosphère contient 10 % de CO<sub>2</sub>. A partir du 4<sup>e</sup> jour, et par la suite à intervalles réguliers, on procède à des repiquages sur un milieu gélosé solide, en y déposant, à la pipette, 0,2 ml de la culture en bouillon. Si on le désire, on peut à ce stade procéder à des repiquages en deux exemplaires, l'un en aérobiose, l'autre sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. Le flacon renfermant la culture initiale sera conservé à 37°C pendant 35 jours avant d'être éliminé, à moins que des *Brucella* y aient été décelées avant l'expiration de ce délai. Il existe d'autres méthodes acceptables, qui sont les suivantes :

a) Technique de Castañeda : On emploie les mêmes milieux, mais on étale une couche de gélose sur une paroi du flacon de culture avant d'y introduire le bouillon stérile. Le repiquage en milieu solide n'est alors plus nécessaire. Il suffit, en lieu et place, de faire basculer de temps en temps le flacon pour permettre au bouillon d'atteindre la surface libre de la gélose. On peut déceler les colonies de *Brucella* qui se développent sur cette surface. L'avantage essentiel de cette méthode est qu'il n'est plus nécessaire d'ouvrir le flacon avant que les colonies de *Brucella* n'apparaissent sur la gélose, ce qui élimine le risque de contamination à l'occasion des repiquages et réduit également le risque de contagion pour les techniciens. Si on ne voyait pas apparaître de colonies de *Brucella*, il y aurait lieu de faire un repiquage en milieu solide avant d'éliminer la culture comme négative.

b) Tandis qu'on préfère, pour toutes les autres méthodes, boucher les fioles au coton, qui permet une oxygénation convenable, il est possible d'employer une capsule de caoutchouc. Dans ce cas, on introduit directement la quantité requise de CO<sub>2</sub> en perçant la capsule avec une aiguille. Une faible proportion de souches de *Brucella* ne cultivent pas dans ces conditions, à cause de l'insuffisance d'oxygène.

Quand on fait des hémocultures à partir de prélèvements provenant de grands animaux, les mêmes milieux et les mêmes techniques sont

également satisfaisants. Toutefois, on emploie en général de plus grandes quantités de sang, spécialement pour les bovins, et le volume du milieu de culture doit être proportionnellement ajusté.

La meilleure méthode d'isolement des *Brucella* des tissus solides, consiste en l'ensemencement direct sur des milieux gélosés solides mentionnés ci-dessus. L'échantillon est légèrement passé à la flamme puis sectionné et la tranche fraîchement coupée est scarifiée avant d'être frottée sur le milieu gélosé. Les cultures sont mises à l'étuve dans une atmosphère contenant 10 % de CO<sub>2</sub>. Les *Brucella* poussant lentement, toutes les cultures doivent être conservées et examinées pendant 5-7 jours avant d'être éliminées.

## 5.2 Autres méthodes

### 5.2.1 Inoculation à l'animal

Bien que les nouvelles techniques de culture donnent de meilleurs résultats, l'emploi du cobaye continue à être utile pour déceler la présence de *Brucella*. L'inoculation au cobaye offre un intérêt particulier quand les échantillons proviennent de sources fortement contaminées ; on recommande d'utiliser une solution de pénicilline (500 unités par millilitre) mélangée à l'inoculum pour empêcher le développement de certains contaminants ; les injections doivent être faites par voie sous-cutanée. L'animal est sacrifié quatre à six semaines après l'inoculation, son sang est prélevé en vue d'une épreuve de séro-agglutination, ses lésions macroscopiques sont notées et sa rate est mise en culture.

### 5.2.2 Inoculation à l'œuf

Les *Brucella* poussent rapidement sur l'embryon de poulet. Des œufs embryonnés, âgés de 4-7 jours, sont inoculés dans le sac vitellin. Le vitellus et le foie de l'embryon sont cultivés trois jours après l'inoculation. On obtient une forte prolifération de *Brucella* même quand le nombre de bactéries introduites est très peu élevé. Les *Brucella* isolées par cette méthode sont généralement dissociées, mais cela n'a pas une grande importance si l'on n'envisage pas l'étude détaillée de la souche. Bien que l'embryon de poulet ait été utilisé avec succès pour isoler les *Brucella* du sang, des caillots sanguins et du liquide céphalo-rachidien, cette méthode doit être surtout réservée aux laboratoires centraux qui examinent de nombreux prélèvements et aux laboratoires de recherches.

## 6. IDENTIFICATION DES ESPÈCES DE BRUCELLA

### 6.1 Souches types

Comme suite aux recommandations faites lors de la première session, des souches types ont fait l'objet d'échanges entre divers laboratoires et les rapports correspondants ont été examinés par le comité.

Il a été décidé que les souches suivantes : *Br. abortus* 544 (Weybridge), *Br. melitensis* 16 M (Beltsville) et *Br. suis* 1330 (Minneapolis), seraient désignées comme souches types. Il a été convenu en outre que le centre de Weybridge serait invité à préparer un lot suffisant d'échantillons desséchés de chaque souche type et à les distribuer aux autres centres de recherches sur la brucellose, ainsi qu'aux laboratoires qui en feraient la demande. On a souligné l'importance qu'il y a à maintenir ces souches à l'état « smooth » et à s'assurer que les cultures desséchées soient telles qu'elles donnent naissance, quand on les cultive correctement, surtout à des colonies « smooth ».

### 6.2 Différenciation : méthodes recommandées

Le comité a examiné également les rapports d'un certain nombre de centres sur les méthodes d'identification. Certains de ces rapports étaient accompagnés de protocoles d'identification d'un grand nombre de souches isolées en différents points du monde et provenant de diverses espèces animales. On a noté que la plupart des souches, quand elles avaient été récemment isolées, avaient tous les caractères biochimiques et sérologiques de l'une ou l'autre des espèces reconnues de *Brucella*. Les rapports ont signalé un certain nombre de souches présentant d'autres combinaisons de caractères : c'est ainsi que certaines, qui avaient tous les caractères biochimiques de *Br. abortus*, ont présenté sérologiquement ceux de *Br. melitensis* (il s'agit de souches d'abord décrites par les chercheurs de Montpellier et observées depuis lors en Grande-Bretagne, aux Indes et en Israël), tandis que d'autres, qui avaient les caractères biochimiques de *Br. melitensis*, ont présenté les caractères sérologiques de *Br. abortus* (souches rencontrées en Italie, en Tunisie et dans le sud de la France). Cette différenciation a essentiellement reposé sur des réactions sérologiques effectuées avec des sérums monospécifiques.

Il existe également des souches dont les caractères ne diffèrent que légèrement des variétés reconnues : certaines qui, par ailleurs, se rattachent au type *Br. melitensis*, produisent des quantités considérables d'H<sub>2</sub>S pendant plusieurs jours ; d'autre part, 60 % de près de 600 souches de

*Br. abortus* isolées en France auraient poussé en culture primaire, sans adjonction de CO<sub>2</sub>.

Le comité souligne que les souches dissociées peuvent donner des résultats aberrants et qu'en conséquence, il y a lieu d'étudier avec soin les caractères des colonies de toutes les souches aberrantes.

Le comité a jugé souhaitable que les méthodes biochimiques soient employées par tous les centres et les méthodes sérologiques partout où on le peut. Les laboratoires qui n'utilisent pas de méthodes sérologiques devraient envoyer un petit nombre de souches caractéristiques à un centre de la brucellose où ces méthodes sont utilisées. Il est recommandé aux centres de la brucellose d'échanger entre eux les souches aberrantes de toute sorte.

Le comité a comparé les méthodes utilisées dans plusieurs laboratoires pour effectuer les diverses épreuves de différenciation et une des méthodes appliquées pour chaque épreuve est exposée en détail ci-après. Il est recommandé que ces méthodes spécialement choisies soient utilisées par tous les laboratoires, de façon à rendre les résultats facilement comparables, mais tout laboratoire qui préférerait une autre technique connue ou qui en découvrirait une nouvelle devrait l'utiliser comme méthode complémentaire, procéder à des échanges de renseignements et de souches avec d'autres laboratoires et adresser, le moment venu, une communication à tous les centres de la brucellose.

On confirmera qu'une culture qui vient d'être isolée est bien une *Brucella*, en procédant aux épreuves suivantes : l'examen de l'aspect des colonies, une épreuve de mobilité, la coloration par le Gram et l'agglutination dans un sérum anti-*Brucella* connu. Un bacille immobile Gram négatif, dont les colonies ont l'aspect typique de *Brucella* et qui donne une agglutination à un titre convenable avec un sérum anti-*Brucella* connu sans que ce phénomène se produise avec un sérum normal, appartient probablement au groupe des *Brucella*.

Il conviendrait de déterminer, pour toutes les souches, l'espèce de *Brucella* en cause. Malheureusement, toutes les épreuves actuellement utilisées pour différencier les espèces de *Brucella* sont exclusivement quantitatives et non qualitatives. Aucune d'elles n'est absolument sûre en soi. Il y a donc lieu de recourir à toutes les épreuves connues pour déterminer l'espèce à laquelle une souche peut appartenir. Les épreuves utilisées pour la différenciation des espèces sont les suivantes :

#### 6.2.1 Besoin en CO<sub>2</sub>

Le fait que *Br. abortus* récemment isolé exige un complément de CO<sub>2</sub> fournit le moyen d'identification le plus constant et le plus digne de foi ; toutefois, après repiquage, il se peut que le germe n'ait plus besoin d'un

complément  $\text{CO}_2$ . Il importe donc d'utiliser cette épreuve soit lors de l'isolement initial, soit le plus tôt possible après. Dans ce dernier cas, on se sert d'une culture de 48 heures. La culture est mise en suspension dans du bouillon ou de l'eau salée à 0,85 % et on en repique une anse sur un milieu gélosé ; la nouvelle culture est mise à l'étuve dans une atmosphère dans laquelle l'air a été remplacé dans la proportion de 10 % par du gaz carbonique. En outre, un témoin ensemencé de la même manière est mis à l'étuve dans une atmosphère normale et une souche de *Br. abortus* dont on connaît les besoins en  $\text{CO}_2$  est employée aux fins de comparaison. (Il ne faut pas oublier qu'il est impossible d'obtenir cette concentration de  $\text{CO}_2$  en utilisant une bougie brûlant dans un récipient fermé. Bien que cette méthode puisse produire une quantité suffisante de  $\text{CO}_2$  pour permettre le développement de nombreuses souches de *Br. abortus*, d'autres ne cultiveraient pas dans une telle atmosphère.)

#### 6.2.2 Production d'hydrogène sulfuré

La production ou l'absence de production d'hydrogène sulfuré dépend de la quantité et du type des composés soufrés contenus dans le milieu. Par conséquent, il importe d'utiliser un milieu et une méthode standards. La gélose au foie et la gélose à la pomme de terre sont considérées comme les meilleurs milieux à employer à cet effet. L'épreuve doit être réalisée sur milieu gélosé incliné en tubes. On prend des cultures de 48 heures et on ensemence largement la surface inclinée au moyen d'une anse de platine. On prépare du papier à l'acétate de plomb en trempant un morceau de papier filtre absorbant dans une solution d'acétate de plomb neutre à 10 %. Le papier filtre est ensuite desséché et coupé en bandes. Une bande de papier à l'acétate de plomb est introduite dans l'orifice de chaque tube et maintenue en place par le bouchon de coton (le papier n'est pas humidifié). Les cultures sont portées à l'étuve à  $37^\circ\text{C}$  et sont examinées quotidiennement pour contrôler le noircissement du réactif. Si l'on constate un noircissement quelconque, la bande de papier est remplacée quotidiennement par une nouvelle bande. En général, *Br. melitensis* ne détermine pas le noircissement, si ce n'est sous forme de très légères traces tout au plus ; *Br. abortus* provoque un noircissement modéré pendant deux jours ou plus ; *Br. suis* produit un noircissement pendant quatre ou cinq jours, à l'exception de la variété danoise qui ne produit pas d' $\text{H}_2\text{S}$ .

#### 6.2.3 Inhibition par des colorants

Une épreuve des plus utiles est la détermination de l'aptitude des *Brucella* à cultiver en présence de certains colorants, les plus pratiques étant la fuchsine basique et la thionine. Différents milieux peuvent être employés, à savoir la gélose au foie, la gélose « Albimi », la gélose

« Trypticase-soy », la gélose dextrosée au sérum ou la gélose à la pomme de terre. Il est toutefois essentiel de déterminer la concentration de colorant convenant au milieu particulier utilisé. Quand on utilise les lots de colorants fournis par l'OMS (fuch sine basique, certificat N° NF58 ; thionine, certificat N° NT16) et une seule concentration de ces colorants, les dilutions finales qui seront vraisemblablement satisfaisantes sont les suivantes : pour les milieux « Trypticase-soy » ou « Albimi », une dilution finale de 1/80.000 de l'un ou l'autre des colorants ; pour la gélose au foie, une dilution de 1/50.000 ; pour la gélose à la pomme de terre, une dilution de 1/25.000. Les souches présentent des variations considérables quant à leur aptitude à cultiver en présence de ces colorants. Dans les cas où le type de la culture n'est pas déterminé de façon satisfaisante par l'emploi des concentrations suggérées ci-dessus, il y a lieu de renouveler l'épreuve avec une culture récente provenant d'un milieu exempt de colorant, en utilisant deux ou trois dilutions du colorant pour établir celle sur laquelle le germe cultive le mieux. Il conviendrait de toujours pratiquer des contre-épreuves avec des cultures déjà identifiées en même temps que l'on procède à l'épreuve sur la culture inconnue. Tandis que les solutions mères des colorants (1 % dans de l'eau distillée) sont relativement stables et peuvent être conservées longtemps, les dilutions utilisées dans la préparation des milieux doivent être renouvelées pour chaque expérience et être ajoutées aux milieux après stérilisation de ceux-ci. Il convient d'employer des milieux récemment préparés. La surface ne doit pas être trop humide (porter à l'étuve à 37°C pendant 2-3 heures).

Quand on utilise des lots de colorants autres que ceux mentionnés ci-dessus, les concentrations à essayer doivent être calculées d'après la teneur en colorant du lot considéré.

L'épreuve est faite en boîtes de Pétri divisées en segments. On utilise des cultures de 48 heures qui ont poussé sur milieu solide ne renfermant pas de colorant ; le contenu d'une anse de platine de 2 mm est mis en suspension dans 0,1 ml d'eau salée à 0,85 % et une anse de cette suspension estensemencée en stries à la surface de la gélose. Les boîtes sont mises à l'étuve à 37°C pendant 72 heures ou plus. Les cultures exigeant du CO<sub>2</sub> doivent être mises à l'étuve dans une atmosphère contenant 10 % de CO<sub>2</sub>. Toutes les autres espèces doivent être cultivées en atmosphère normale.

*Br. abortus* poussera uniquement sur le milieu à la fuch sine ; *Br. suis* seulement sur celui à la thionine tandis que *Br. melitensis* cultive sur les deux milieux.

#### 6.2.4 Production d'uréase

Bien que son intérêt soit limité, une détermination semi-quantitative de la production d'uréase par les cultures de *Brucella* n'est pas sans valeur pour la différenciation des espèces. La méthode recommandée est celle de Bauer.

Le substrat est constitué par 5 % d'urée dissoute dans  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  M/8 ajusté à pH 4 (en employant HCl à 10 %) et renfermant 0,0015 % de rouge phénol comme indicateur. On part d'une culture de 48 heures sur milieu solide, dont on suspend un anse (de 2 mm) dans 1 ml de substrat réparti dans des tubes d'essai. Les tubes sont portés à 37°C (au bain-marie) et les lectures faites après 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, puis toutes les heures jusqu'à ce qu'on obtienne une réaction positive (rose ou rouge). En général, *Br. suis* donne une réaction positive immédiate ou qui survient dans les 15-30 minutes ; la plupart des souches de *Br. abortus* demandent 2 heures ou plus. Avec *Br. melitensis*, quelques souches réagissent comme *Br. suis* et d'autres comme *Br. abortus* et c'est pourquoi l'épreuve a une valeur limitée ; elle est surtout utile pour différencier *Br. abortus* de *Br. suis*, mais même dans ce cas, elle donne souvent des résultats équivoques. Elle peut, cependant, n'être pas sans intérêt lorsque ses résultats servent à corroborer ceux obtenus avec les autres épreuves.

#### 6.2.5 Préparation de sérums monospécifiques

Quand on dispose de sérums satisfaisants, les sérums monospécifiques sont une aide de valeur pour déterminer les *Brucella*. Cependant, il n'est pas facile de préparer de tels sérums et nombreux sont les chercheurs qui n'ont jamais obtenu de bons résultats. Il n'est malheureusement pas possible de donner de règle pratique de nature à garantir l'obtention d'un sérum satisfaisant. A la préparation de chaque lot, c'est une méthode par tâtonnements qu'il faudra suivre.

Les cultures employées pour la préparation des sérums, comme pour l'absorption, doivent être en phase « smooth ». Une infection active est déterminée, chez le lapin, par injection, dans la veine marginale de l'oreille, d'environ 100 millions de bacilles provenant d'une culture de 48 heures. Avant l'injection, il faut procéder à une réaction d'agglutination sur chacun des lapins pour écarter l'éventualité d'une infection préalable par les *Brucella*. On fait, à intervalles de quelques jours, des tests sérologiques sur ces animaux et dès que le titre atteint 1/640 (ou plus), les lapins sont saignés à la carotide. On obtient d'habitude un titre suffisant en moins d'une semaine, après une seule injection, mais on peut, en cas de besoin, procéder à une seconde injection. Le sérum est séparé du caillot et on lui ajoute 0,5 % de phénol. On prélève de petites parties aliquotes de chaque sérum et on fait absorber par le germe hétérologue en recourant à des cultures de 48 heures. La culture est mise en suspension dans l'eau salée à 0,85 % et les bacilles sont recueillis par centrifugation. On ajoute des quantités connues de cellules bactériennes lavées et sédimentées aux fractions aliquotes de sérum, on met en suspension, et le mélange est porté à l'étuve à 37°C pendant 2 heures.

Les cellules absorbantes sont séparées par centrifugation et les sérums sont éprouvés quant à leur capacité d'agglutiner aussi bien *Br. abortus* que *Br. melitensis*. Si l'on n'obtient pas une différenciation satisfaisante (c'est-à-dire une différence de 4 tubes dans une double série), le processus d'absorption est renouvelé une ou plusieurs fois. D'après les résultats de ces essais, la quantité requise de cellules absorbantes et le nombre d'absorptions nécessaires sont déterminés, après quoi on applique ce procédé à l'ensemble du lot de chaque sérum.

On utilise dans cette épreuve *Br. melitensis* et *Br. abortus*. Il y a lieu de souligner une fois de plus la nécessité d'utiliser des cultures « smooth », car, si on emploie des cultures partiellement dissociées, il n'est pas possible d'obtenir de sérums satisfaisants. L'emploi de sérums mal préparés ne peut qu'engendrer la confusion. Après préparation, il convient d'éprouver les sérums sur un certain nombre de cultures parfaitement « smooth » des trois espèces et, à moins qu'ils ne se comportent comme il est prévu, il faut les éliminer.

## 7. CENTRES FAO/OMS DE LA BRUCELLOSE ET RECHERCHES FUTURES

Le comité a noté avec satisfaction que ces centres, dont les travaux ont été coordonnés par la FAO et l'OMS, ont fait œuvre utile au cours des deux années écoulées (voir Annexe 4, page 33). Ils ont contribué de façon importante aux recherches, à l'unification des méthodes utilisées en laboratoire et dans la pratique, ainsi qu'à la lutte contre la brucellose dans leurs régions respectives. Le comité recommande donc fortement que la FAO et l'OMS continuent à leur apporter leur appui.

Le présent rapport contient plusieurs recommandations concernant les recherches futures sur d'importants problèmes relatifs à la brucellose qui attendent encore une solution. Une liste de problèmes essentiels est reproduite ci-après ; il faut espérer que les centres FAO/OMS de la brucellose et les autres laboratoires de brucellose entreprendront l'étude de ces questions et communiqueront leurs résultats à la FAO et à l'OMS.

1) Vaccin pour ovins et caprins. Il y aurait grand intérêt à mettre au point un vaccin efficace utilisable chez ces animaux (section 3.3).

2) Epreuves aux antigènes colorés sur le lait. Il est souhaitable de pousser les recherches sur l'utilisation de ces épreuves dans la prophylaxie de la brucellose bovine. L'application de l'épreuve de l'anneau au lait de brebis et de chèvre constituerait un moyen très utile de dépistage et prophylaxie de la brucellose ovine et caprine (section 3.1.1).

3) Thérapeutique humaine. Dans ce domaine, il importe également de pousser les recherches (section 2.3).

4) Présence de *Brucella* dans les produits laitiers. La persistance de *Brucella* dans les produits laitiers préparés avec du lait non pasteurisé devrait faire l'objet de recherches, compte tenu des procédés locaux de fabrication (section 1).

5) Isolement, identification et différenciation des *Brucella*. Il est souhaitable de perfectionner les méthodes utilisées et d'élucider les problèmes actuels (section 6).

6) Vaccins pour bovins (section 3.2.1).

7) Brucellose des porcins. Il importe d'améliorer les méthodes de diagnostic. Il conviendrait de faire des enquêtes sur la fréquence de cette maladie (section 3.4).

## Annexe 1

## ÉPREUVE D'AGGLUTINATION DU PETIT-LAIT

L'épreuve d'agglutination du petit-lait peut être effectuée soit en tube, soit sur lame. Les dilutions employées pour le petit-lait sont les mêmes que celles utilisées pour le sérum sanguin. Le mélange petit-lait-antigène est porté à l'étuve à 37°C pendant 48 heures, puis on lit les réactions.

La sécrétion mammaire ne doit pas être employée pour cette épreuve au cours des premières et des dernières phases de la lactation, à cause du pourcentage élevé de fausses réactions positives qui surviennent à ces époques. Le petit-lait est obtenu par addition, à 6,0 ml de lait, de quelques gouttes de solution de lab-ferment du commerce. Le mélange de lait et de lab-ferment est porté à l'étuve à 37°C pendant 12 heures. Cette méthode aboutit à séparer les constituants solides du lait de la fraction liquide et des corps gras. Le petit-lait peut être clarifié par centrifugation ou addition de tétrachlorure de carbone ou de chloroforme.

L'épreuve d'agglutination du petit-lait présente un grand intérêt pour identifier les bovins présentant une infection par *Brucella* localisée dans le pis ; elle semble devoir permettre de distinguer, parmi les bovins dont le sérum présente des titres d'agglutination, ceux chez qui ces titres sont provoqués par la souche 19 de ceux chez qui ils sont dus à des souches virulentes de *Br. abortus*.

Après avoir examiné 107 bovins, Traum & Maderious<sup>1</sup> ont rapporté que 85 de ces animaux présentant des titres d'agglutinine de 1/25 ou plus dans le petit-lait d'un ou de plusieurs pis ont également excrété des *Brucella* virulentes dans le lait. En outre, des *Brucella* ont été isolées à partir du lait de 92,8 % de bovins dont le petit-lait présentait un titre de 1/100, tandis que le germe a été isolé du lait de 4 bovins seulement sur 235 pour lesquels on n'avait pas mis en évidence d'agglutinine dans la dilution de petit-lait à 1/25. La totalité de ces bovins avaient été vaccinés, soit jeunes, soit adultes. Toutes les épreuves d'agglutination sur le petit-lait n'ont été pratiquées que trois mois après la vaccination.

Blake et Manthei<sup>2</sup> ont rapporté les résultats d'une épreuve d'agglutination du petit-lait effectuée sur 978 échantillons de lait provenant de

<sup>1</sup> Traum, J. & Maderious, W. E. (1947) *Amer. J. vet. Res.* 8, 244

<sup>2</sup> Blake, G. E. & Manthei, C. A. (1952) *Proceedings book : American Veterinary Medical Association. Eighty-ninth meeting, Atlantic City. 1952, Chicago, Ill., p. 98.*

66 bovins au cours d'une période de 18 mois. Ils disposaient de renseignements complets sur les antécédents de ces animaux. Les épreuves d'agglutination du petit-lait furent négatives pour 100 % des échantillons de lait provenant de bovins non exposés et non infectés, et négatives pour 98,7 % des échantillons provenant de bovins exposés, non infectés. Le titre de petit-lait n'a pas dépassé 1/50 pour le restant des échantillons de lait (1,3 %) provenant de ce second groupe.

1,1 % seulement des échantillons de lait provenant de bovins vaccinés jeunes a accusé un titre d'agglutinines de 1/25 ou plus, dans le petit-lait, tandis que la proportion a été de 10,3 % lorsque les échantillons de lait provenaient de bovins vaccinés adultes. Cette proportion de 10,3 % a été déterminée d'après les résultats obtenus sur 2 des 17 vaches qui composaient ce groupe. On n'a pas recueilli de *Brucella* dans le lait des bovins vaccinés. Dans le groupe des animaux infectés qui excrétaient des germes de *Brucella* dans le lait, 79,5 % des échantillons présentaient dans le petit-lait des titres d'agglutinines de 1/100 ou plus et 15,3 %, des titres de 1/25 ou 1/50. Quant aux 5,2 % restants, qui présentaient des titres négatifs dans le petit-lait, ils provenaient de 5 seulement des 18 bovins infectés, et aucun de ces animaux ne s'est révélé constamment négatif à l'épreuve du petit-lait.

---

## Annexe 2

### ÉPREUVE DES ANTIGÈNES COLORÉS APPLIQUÉE AU LAIT DE CHÈVRE

A l'heure actuelle, il convient d'employer cette épreuve seulement pour l'ensemble d'un troupeau, c'est-à-dire qu'il faut procéder sur un mélange de lait provenant de plusieurs animaux plutôt que sur le lait de chèvres isolées. Au cours des essais préliminaires, l'épreuve a paru suffisamment sensible pour permettre de déceler un lait positif mélangé à 9 échantillons de lait négatif. La positivité d'une épreuve indique l'infection du troupeau et confirme les soupçons que font naître des titres peu élevés d'agglutination du sérum sanguin (voir section 3.3, page 15).

D'après les résultats obtenus jusqu'ici sur des animaux pris individuellement, l'épreuve semble donner environ 20 % de réactions faussement positives par rapport à des séro-réactions parallèles (en d'autres termes 20 % environ des résultats sont négatifs à l'épreuve de séro-agglutination et positifs avec le « milk test »). Pour des animaux reconnus infectés (titres élevés obtenus avec l'épreuve de séro-agglutination), les résultats du « milk test » sont concordants dans 94-97 % des cas environ.

Deux antigènes colorés ont été essayés, l'un à l'hématoxyline et l'autre au chlorure de triphényl tétrazolium. Ce dernier semble donner des réactions légèrement plus nettes et il est un peu plus sensible.

En ce qui concerne l'application de l'épreuve au lait de brebis, les données expérimentales actuelles, encore insuffisantes, ne permettent pas de se prononcer catégoriquement; il ressort toutefois d'observations préliminaires que cette épreuve ou des modifications qui pourront être mises au point seront peut-être utiles ultérieurement.

### Exécution de l'épreuve

On recueille le lait des chèvres aussi aseptiquement que possible dans des tubes stériles. Le lait est mélangé avec soin immédiatement avant l'exécution de l'épreuve, puis prélevé à la pipette et introduit dans des tubes à raison de 2 ml par tube. Deux gouttes de l'antigène coloré sont ajoutées à chaque échantillon; le tube est vigoureusement agité et placé dans une étuve ou au bain-marie à 37°C. On procède à la lecture des résultats après 6 à 12 heures d'incubation. (Remarque: Ceci représente une différence importante par rapport à l'épreuve similaire employée pour le lait de vache.) L'interprétation des résultats doit tenir compte de trois facteurs: *a*) la clarification de la colonne de lait, *b*) la présence (ou l'absence) d'anneau, et *c*) l'agglutination de l'antigène dans la partie inférieure du tube. Comme l'indique le tableau reproduit ci-après, les phénomènes *b*) ou *c*) ne se produisent pas nécessairement quand l'épreuve est positive. L'agglutination dans la partie inférieure du tube a un aspect semblable à celle que l'on observe dans l'épreuve d'hémo-agglutination couramment employée en virologie, c'est-à-dire que l'antigène est uniformément dispersé dans une mince couche agglutinée qui épouse la forme incurvée du fond du tube. Une sédimentation partielle d'antigène non agglutiné apparaît sous forme d'un bouton solide occupant seulement le centre du fond du tube.

Le tableau I indique la notation et l'interprétation des résultats.

**TABLEAU I. NOTATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

Notation des résultats	Aspect du contenu du tube		Agglutination
	Clarification	Anneau	
++++ } positifs	complète	++++, +++	peut faire défaut
+++ }	presque complète	++, +, -	+++ , ++
++ } douteux	nette	-	+
+ } négatifs	légère	-	-
-	nulle	-	-

## Annexe 3

## DISSOCIATION DES BRUCELLA

Toutes les cultures de *Brucella* ont une tendance à se dissocier, qui se manifeste par des modifications de la morphologie du germe et de ses colonies, avec modifications corrélatives dans le pouvoir pathogène, l'agglutinabilité, le pouvoir antigénique, le degré d'inhibition par les colorants, etc. Par conséquent, il est extrêmement important d'utiliser les cultures « smooth » pour la préparation des antigènes, de même que pour la détermination des souches. Malheureusement, il n'existe pas de méthode simple permettant de conserver les *Brucella* à la phase 'S'. On ne peut y parvenir que par une surveillance constante et minutieuse des cultures et par le repiquage fréquent de colonies 'S' soigneusement prélevées. Tous les spécialistes de *Brucella*, notamment les préparateurs d'antigène, doivent s'exercer à discerner les cultures 'S' afin d'éviter des erreurs coûteuses, capables de créer des confusions.

Le meilleur moyen de détecter les différentes phases des *Brucella* consiste à examiner la forme des colonies au moyen d'un microscope binoculaire à large champ, utilisant la lumière réfléchiée transmise sous un angle incident de 45°. Les épreuves à la chaleur et à l'acriflavine ne permettent pas de différencier les formes 'S' de toutes les autres. Il faut être très exercé et très expérimenté pour reconnaître à coup sûr la phase 'S' et la différencier des diverses variantes, en particulier des formes « S - intermédiaires », intermédiaires et mucoïdes. Etant donné toutefois l'importance du problème et la réelle nécessité d'employer les cultures 'S' dans presque toutes les phases des travaux sur les *Brucella*, il importe absolument que dans les centres FAO/OMS de la brucellose, dans les laboratoires qui préparent des antigènes pour les épreuves d'agglutination ou du vaccin à partir de la souche 19, et dans tous les laboratoires qui entreprennent des recherches sur la brucellose, les techniciens parviennent à acquérir la maîtrise voulue. La tendance à la dissociation étant moindre dans les milieux solides que dans les milieux liquides, on doit, autant que possible, employer les premiers (il convient d'éviter l'humidification par l'eau de condensation). Les cultures doivent être incubées pendant 4 jours au maximum et, de préférence, pendant moins longtemps, puis conservées au réfrigérateur ; le séjour à la température du laboratoire leur est préjudiciable.

**Annexe 4****LE TRAVAIL DES CENTRES FAO/OMS DE LA BRUCELLOSE**

En 1950 et 1951, un réseau de 12 centres FAO/OMS de la brucellose a été constitué pour faire progresser les travaux d'ordre international dans le domaine de la brucellose. On espère qu'un nouveau centre sera établi prochainement au « Indian Veterinary Research Institute », Mukteswar-Kuman, U.P.

Indépendamment de leurs attributions propres, ces centres ont pour fonction de procéder à des travaux d'intérêt local et international concernant la brucellose. Ils sont utilisés : *a)* pour la préparation et l'épreuve des antigènes, des vaccins et d'autres produits biologiques ; *b)* comme centres de diagnostic ; *c)* pour encourager les études sur la fréquence de la brucellose chez l'homme et les animaux ; *d)* pour favoriser l'exécution de programmes de lutte contre la brucellose animale ; *e)* pour effectuer des recherches sur des problèmes spéciaux, et *f)* comme centres d'enseignement et d'information pour leur propre pays et les pays voisins.

Des études documentaires sur la brucellose, préparée par l'OMS et la FAO, sont adressées périodiquement aux centres. Ainsi, grâce aux échanges de renseignements et de correspondance entre les membres du Groupe mixte FAO/OMS d'experts de la Brucellose et entre les centres, les derniers résultats de la recherche sont communiqués, dans le monde entier, aux principaux spécialistes de la brucellose.

Des résultats très encourageants ont déjà été obtenus grâce aux diverses activités de ces centres. La quasi-suppression de l'infection par *Br. melitensis* dans le nord-ouest de la Yougoslavie, où la brucellose posait précédemment un sérieux problème, en fournit un exemple remarquable. L'adoption de techniques uniformes de laboratoire, spécialement pour le diagnostic de la maladie, a marqué un progrès de grande importance ; elle a permis de comparer les résultats obtenus en quelque lieu que ce soit. On s'occupe actuellement d'étendre cette normalisation à la préparation des vaccins et d'autres produits biologiques. Quand un centre a rencontré des difficultés ou constaté des résultats divergents, il lui a été possible de recourir à l'aide d'un second centre, aux fins de contrôle. Ainsi, les centres qui s'attachent à l'étude d'un problème particulier prêtent assistance à d'autres centres incapables de résoudre une question précise.

Les résultats des travaux sur la brucellose, obtenus grâce à la coopération de ces centres et d'autres laboratoires de recherches, ont été publiés de temps en temps dans des documents diffusés par l'OMS et la FAO. On peut se procurer ces documents sur demande adressée à ces organisations. L'activité de ces centres, non compris leurs travaux courants de diagnostic, est indiquée ci-après :

*Argentine*

Division de la Brucellose et de la Tuberculose  
Département des Zoonoses  
Ministère de l'Agriculture et de l'Elevage  
Buenos-Aires

Chef : D<sup>r</sup> B. L. Moran

Enquêtes locales sur la fréquence de la brucellose caprine en relation avec des enquêtes épidémiologiques intéressant l'homme ; emploi de l'épreuve de l'anneau pour dépister les brucelloses bovine et caprine ; étude du vaccin M (Huddleson) dans la prophylaxie de la brucellose caprine ; campagnes d'éducation populaire ; études sur l'épreuve d'agglutination en rapport avec l'emploi de techniques standardisées, sur l'action du vaccin préparé à partir de la souche 19 et sur les relations de l'infection avec la fièvre aphteuse.

*Australie*

Commonwealth Serum Laboratories  
Parkville N. 2  
Victoria

Directeur : D<sup>r</sup> F. G. Morgan

Préparation de vaccin de la souche 19 ; standardisation de produits biologiques et problèmes connexes ; recherches sur l'immunité et le diagnostic chez l'homme.

*Danemark*

Laboratoire de Sérothérapie vétérinaire de l'Etat  
Bülowsvej 24  
Copenhague

Chef du Service de la Brucellose : D<sup>r</sup> A. Thomsen

Mise au point des antigènes colorés au chlorure de tétrazolium pour l'épreuve de l'anneau ; préparation de vaccin de la souche 19 ; études en

vue de la standardisation des antigènes servant à l'épreuve de séro-agglutination; formation de travailleurs étrangers se consacrant à la brucellose.

*France*

Centre de Recherches sur la Fièvre ondulante  
Institut Bouisson-Bertrand  
Montpellier (Hérault)

Directeur : Professeur L. Carrère

En collaboration avec la

Clinique des Maladies infectieuses  
Clinique Pasteur  
Montpellier (Hérault)

Professeur M. Janbon

Etudes sur les anticorps bloquants dans l'épreuve de séro-agglutination ; différenciation des types de *Brucella* ; essais de vaccination des brebis ; diagnostic sur la brebis et la chèvre par les épreuves intradermiques et l'épreuve de l'anneau sur le lait ; études diagnostiques et thérapeutiques sur l'homme ; formation de travailleurs étrangers se consacrant à la brucellose.

*Grèce*

Institut de Microbiologie vétérinaire  
Botanikos  
Athènes

Directeur : D<sup>r</sup> C. Melanides

En collaboration avec

l'Institut et Musée d'Hygiène de l'Université d'Athènes  
Ambelokipi 6  
Athènes

Directeur : Professeur G. P. Alivisatos

Etudes épidémiologiques sur la fréquence de la brucellose chez l'homme et les animaux dans diverses régions du pays ; adaptation et emploi de l'épreuve de l'anneau au lait de brebis et de chèvre ; études comparatives sur les antigènes utilisés pour la réaction de séro-agglutination et l'épreuve de l'anneau ; préparation de vaccin de la souche 19.

*Italie*

Centre pour l'Etude de la Brucellose  
Institut d'Hygiène  
Université de Florence  
Viale G.B. Morgagni 48  
Florence

Directeur : Professeur G. Mazzetti

En collaboration avec

l'Ecole de Médecine vétérinaire de  
l'Université de Pise

Virulence, toxicité et pouvoir antigénique des souches de *Brucella* ; études diagnostiques sur la brebis et notamment étude de l'épreuve de l'anneau et des anticorps bloquant les agglutinines ; enquêtes locales sur la fréquence de la brucellose chez l'homme et les animaux ; persistance des *Brucella* dans les fromages ; diagnostic et thérapeutique chez l'homme.

*Mexique*

Institut de Recherches médicales  
Hôpital général  
Mexico, D.F.

Directeur : D<sup>r</sup> M. Ruiz Castañeda

Antigènes pour les épreuves intradermiques en vue de déterminer l'allergie chez l'homme ; « spot test » (réaction d'agglutination) pour diagnostic rapide ; titres en agglutinines dans la brucellose active ; études sur la thérapeutique humaine.

*Turquie*

Institut vétérinaire de l'Etat  
Etlik, Ankara

Chef du Service de la Brucellose : D<sup>r</sup> R. Durusan

En collaboration avec

Institut central d'Hygiène « Refik Saydam »  
Ankara

Secrétaire général : D<sup>r</sup> S. Bilal Golem

Enquêtes locales sur la fréquence des brucelloses ovine, caprine et bovine ; préparation de vaccin de la souche 19 ; préparation d'antigènes

destinés à l'épreuve intradermique ; réactions d'agglutination et vaccinothérapie chez l'homme ; études sur les réactions d'agglutination croisée chez les sujets vaccinés contre le choléra.

*Union Sud-Africaine*

Laboratoire vétérinaire d'Onderstepoort  
Onderstepoort

Préparation d'antigènes et de vaccin de la souche 19 ; étude de l'épreuve de l'anneau sur le lait ; centre de diagnostic.

*Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord*

Ministry of Agriculture and Fisheries  
Veterinary Laboratory  
New Haw  
Weybridge  
Surrey, Angleterre

Directeur : D<sup>r</sup> A. W. Stableforth

Préparation de Sérum Etalon international et de sérums spécifiques monovalents pour la détermination des types ; antigène standardisé et épreuve de séro-agglutination ; préparation de la souche 19 ; études sur la détermination des espèces de *Brucella* ; épreuve de l'anneau sur les animaux vaccinés ; formation de travailleurs étrangers se consacrant à la brucellose.

*Etats-Unis d'Amérique*

Department of Medicine  
University of Minnesota  
Minneapolis, Minn.

Directeur du Laboratoire de la Brucellose : D<sup>r</sup> W. W. Spink

En collaboration avec

School of Veterinary Medicine  
University of Minnesota  
St. Paul, Minn.

D<sup>r</sup> M. Roepke

Etudes thérapeutiques sur l'homme ; études sur la biologie des *Brucella* ; études sur la réaction intradermique, sur l'épreuve de l'anneau et sur les antigènes utilisés pour l'épreuve de séro-agglutination ; détermination des

espèces de *Brucella* ; études immunologiques sur les sérums bovins ; application de l'épreuve de l'anneau pour l'éradication de la brucellose bovine.

*Yougoslavie*

Centre de la Brucellose  
Laboratoire d'Hygiène de l'Etat  
Rijeka

Chef du Service de la Brucellose : D<sup>r</sup> V. Rukavina

Etudes comparatives de l'épreuve de l'anneau sur le lait de brebis par rapport à la réaction de séro-agglutination et à la réaction intradermique ; enquêtes locales sur la fréquence de la brucellose chez l'homme, les bovins et les porcins ; campagnes d'éradication de la brucellose ovine ; études thérapeutiques sur l'homme.