



Brucellose

La brucellose bovine fait l'objet d'un plan de lutte sévère dans les pays membres de l'Union européenne vu ses conséquences économiques et son impact zoonotique. La maladie est à déclaration obligatoire et doit être notifiée auprès de l'OIE, de la Commission européenne et de l'EFSA. Pour la Belgique, des informations exhaustives sont disponibles sur le site de l'AFSCA.

En 2012, plusieurs foyers de brucellose ont été détectés dans des exploitations bovines belges. Dans ce contexte, des analyses *Brucella* ont été réalisées en faune sauvage.

Foyers de brucellose dans les élevages bovins (données AFSCA)

1999 : dernier cas de brucellose bovine à *Brucella abortus* biovar 3.

2000 : déclaration d'un foyer à *Brucella abortus* biovar 1 (origine Portugal).

2003 : la Belgique acquiert le statut indemne de brucellose bovine (Décision 2003/467/EC).

11/2010 : un cas de brucellose bovine est déclaré dans une exploitation à Haccourt, province de Liège. Ordre d'abattage, pas de foyer secondaire mais origine non déterminée.

03/2012 : déclaration d'un premier foyer de brucellose dans une exploitation de Franc-Waret, province de Namur. Notification d'un second foyer à Nuringen, province de Flandre Occidentale. Bovin provenant de l'exploitation du premier foyer (12 janvier 2012) avec culture positive sur organes.

04/2012 : confirmation de deux nouveaux foyers à Emines et Cognelée, province de Namur, dans des exploitations en contact avec le premier foyer. Cultures positives sur deux bovins.

05/2012 : foyer détecté (screening lait de tank) à Corenne, province de Namur. Abattage de l'animal et isolement de *Brucella suis* biovar 2 dans l'utérus. Ordre d'abattage de la totalité du troupeau
En mai 2012, un 5^{ème} foyer à *B. abortus* est détecté en Province de Namur.

08/2012 : résultats d'analyses favorables et « fin de l'incident brucellose »

01/2013 : un nouveau cas de brucellose a été détecté en province de Namur lors du screening hivernal. Ce foyer est lié aux foyers de 2012 (exploitation de contact du premier foyer de mars 2012).

Dans tous les cas, la totalité du troupeau a été abattue.

A l'exception du foyer de Corenne, *Brucella abortus* biovar 3 a été isolé dans tous les autres foyers bovins. Le typage moléculaire des souches isolées en 2012 montre qu'il s'agit du même profil que celui de la souche de *B. abortus* isolée en 2010 à Haccourt et que la souche belge des années 90 (analyses réalisées au LNR, CERVA, Dr. D. Fretin).

Origine des foyers

Hypothèses les plus probables :

(1) introduction d'un animal infecté en provenance d'une zone non indemne par le biais de commerces et mouvements d'animaux, de matériels génétiques et/ou biologiques.

(2) résurgence de l'infection à partir d'un bovin atteint de brucellose congénitale issu d'un foyer non entièrement dépeuplé dans les années 2000 [cet animal aurait donc plus de 10 ans].

(3) faune sauvage comme source d'infection, en particulier pour le foyer où *Brucella suis* biovar 2 a été isolé.



Etat de la question (rapport 2011)

Brucella abortus

Brucella abortus est l'espèce qui infecte habituellement le bovin, elle comprend 7 biovars (1,2,3,4,5,6,9) sur base de critères biochimiques, phénotypiques et antigéniques.

La brucellose induit des troubles principalement d'ordre reproducteur (avortements, veaux morts-nés, rétentions placentaires, mammites, infertilité, orchites). Des atteintes extra-génitales sont également décrites (hygromas et arthrites). *Brucella abortus* présente un risque zoonotique important.

***Brucella abortus* : situation chez le bovin en Europe**

La maladie est désormais sporadique en Europe occidentale, concernant particulièrement les pays du sud. Actuellement, les pays de l'UE non officiellement indemnes de brucellose sont : la Bulgarie, Chypre, l'Estonie, l'Espagne, la Grèce, la Hongrie, l'Italie, la Lituanie, la Lettonie, Malte, la Pologne, le Portugal, la Roumanie et le Royaume-Uni (Irlande du Nord).

***Brucella abortus* : situation en faune sauvage en Europe et aux États-Unis**

Seuls quelques rares cas d'infection par *Brucella abortus* ont été décrits chez les cervidés européens, à savoir le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) et le chevreuil (*Capreolus capreolus*). Une étude réalisée en Espagne (Munoz et al., 2010) a montré que la faune sauvage en Europe ne représentait pas un réservoir pour *B. abortus*. Par contre, la situation est très différente aux États-Unis où la transmission de la bactérie du bétail à la faune sauvage a permis l'établissement de nouveaux réservoirs. Deux espèces sauvages sont ainsi des hôtes de maintenance pour *B. abortus*, représentant à leur tour une source de contamination pour les animaux domestiques : le wapiti (*Cervus elaphus nelsoni*) et le bison (*Bison bison*). Dans le Parc National du Yellowstone, les séroprévalences envers *Brucella spp.* chez les bisons sont très élevées, de l'ordre de 50 %. Néanmoins les populations continuent à augmenter, la maladie ne semblant pas avoir d'impact sur la démographie de l'espèce. Des études expérimentales ont montré que les bisons peuvent effectivement transmettre *B. abortus* aux bovins domestiques, bien qu'aucun cas de transmission naturelle ne soit documenté. Concernant le wapiti, les séroprévalences sont très variables selon les méthodes de gestion des populations de gibier, allant des 2 - 3 % jusqu'à 80 % dans des zones où le nourrissage artificiel est pratiqué. L'affouragement hivernal est apparu comme le principal facteur responsable de la maintenance de la brucellose au sein des populations de wapitis dans le Parc National du Yellowstone. Dans la même région, plusieurs foyers bovins ont été déclarés au départ du wapiti. Des cas de transmission humaine lors de manipulations de carcasses d'animaux sont également décrits.

Brucella suis

L'espèce *Brucella suis* comprend 5 biovars, dont les 3 premiers infectent les suidés domestiques et sauvages. Le biovar 2 touche le porc et le sanglier en Europe. Il est peu pathogène pour l'homme ; seuls quelques cas d'infection humaine ont été décrits. Concernant les biovars 1 et 3, le premier est essentiellement présent en Amérique du Nord et du Sud, en Asie et en Océanie, tandis que le second est décrit en Chine, aux États-Unis et récemment en Europe. Ces deux biovars, contrairement au biovar 2, sont fortement pathogènes pour l'homme.

Suite à l'industrialisation de l'élevage porcin en Europe, la brucellose porcine est devenue rare et ne touche plus que les élevages en plein air. Le dernier cas de brucellose porcine en Belgique date de 1969.



***Brucella suis* : situation chez le bovin en Europe et aux États-Unis**

Brucella suis peut occasionnellement infecter l'espèce bovine. Les cas impliquant le biovar 2 sont très rarement décrits. Sur les *Brucella* isolées chez les bovins en France entre 1982 et 2000, un seul cas est rapporté (Garin-Bastuji et Delcuelle, 2001). Un cas d'infection naturelle chez un bovin par *B. suis* 2 a également été rapporté au Danemark (Andersen et al., 1995). L'infection expérimentale de génisses par *B. suis* 2 induit l'apparition d'une réponse sérologique mais sans isolement de la bactérie des tissus à l'autopsie 8 semaines après l'inoculation ; il semble donc que l'infection des bovins par *B. suis* 2 se limite spontanément (Godfroid et al., 2002).

Brucella suis biovar 1 est également isolé chez des bovins aux États-Unis. Dans de nombreux états, les porcs sauvages (feral swines) sont infectés de façon endémique par *B. suis* 1 et sont potentiellement sources de contamination pour les élevages bovins et porcins. Bien que la bactérie puisse infecter naturellement l'espèce bovine, la maladie est peu sévère et non contagieuse. *B. suis* 1 se localise dans la glande mammaire, et peut être responsable de mammite. La bactérie étant alors excrétée dans le lait, elle peut représenter un risque pour la consommation humaine. Les veaux nés de mères infectées, naturellement ou expérimentalement, naissent normaux, ne présentent aucune lésion et n'hébergent pas de *Brucella* dans leurs tissus.

***Brucella suis* : situation en faune sauvage en Europe et aux États-Unis**

- **Sanglier** : *Brucella suis* biovar 2 circule de façon endémique dans les populations de sangliers (*Sus scrofa*) dans de nombreux pays européens dont la Belgique, la France, la Suisse, l'Allemagne, l'Espagne, la Croatie, la Pologne et la Tchéquie. Contrairement au porc domestique (troubles reproducteurs et lésions extra-génitales), l'infection est généralement asymptomatique.

Lors de l'apparition de foyers de brucellose à *B. suis* 2 dans des élevages de porcs en plein air, notamment en France et en Allemagne, les sangliers sont apparus comme une source potentielle de contamination. En France, la naissance d'hybrides porcs/sangliers a confirmé l'intrusion de sangliers, attirés par les truies en chaleur.

Le biovar 3 a été récemment isolé chez des sangliers en Croatie, montrant ainsi l'émergence de biovars au potentiel zoonotique en Europe et confirmant l'importance de suivre la brucellose chez le sanglier.

- **Lièvre européen** : le lièvre (*Lepus europaeus*) est également un réservoir pour *Brucella suis* biovar 2. En Europe, la brucellose chez le lièvre a été rapportée tout d'abord en Allemagne (1941), puis dans d'autres pays. Au Danemark, le premier cas a été identifié en 1951 ; dans ce pays, le lièvre a été identifié comme source de contamination d'un cas bovin et de plusieurs foyers porcins. Le nourrissage des porcs domestiques avec des restes de lièvres tirés à la chasse était la voie de contamination la plus probable. La présence de l'infection par *Brucella* chez le lièvre a également été rapportée en France, en Suisse, en Pologne, en Hongrie et en Tchéquie. En Belgique, aucun cas de brucellose n'a été détecté jusqu'à présent sur base des autopsies des lièvres trouvés morts. Les lésions observées chez les lièvres infectés par *Brucella suis* 2 sont des nodules de taille variable, souvent purulents, localisés au niveau du tissu sous-cutané ou inter-musculaire, du foie, des poumons, des reins ou, plus fréquemment, au niveau de la rate ou du tractus reproducteur.

- **Porcs sauvages** : aux États-Unis, les porcs sauvages (« feral pigs ») constituent non seulement un réservoir pour *Brucella suis* biovar 1 mais également pour *Brucella abortus* biovar 1 et pour la souche vaccinale *B. abortus* S19 comme l'a montré une étude menée en Caroline du Sud. L'isolement de *B. abortus* S19 et biovar 1 chez ces porcs sauvages fait probablement suite à l'ingestion de cadavres de veaux morts-nés ou d'avortons.



Enquêtes Brucella réalisées en faune sauvage

(1) Analyses autour du foyer *B. abortus* de Haccourt en 2010

Analyses Brucella (dont mises en culture) réalisées au CERVA (D. Fretin) en 2010 sur des cervidés autour du foyer *B. abortus* de Haccourt. Total 9 cervidés testés (7 chevreuils et 2 cerfs prélevés (rates) en 2010) : tous négatifs pour *Brucella abortus*.

(2) Analyses autour des foyers *B. abortus* de Franc-Waret, Cognelée et Emines en 2012

Analyses Brucella (dont mises en culture) réalisées au CERVA en 2012 sur cervidés et suidés prélevés autour des foyers *B. abortus* de Franc-Waret, Cognelée et Emines.

Total : 9 cervidés (9 chevreuils prélevés (rates) en automne 2011) : tous négatifs pour *Brucella abortus*.

Total : 32 sangliers prélevés (amygdales) en automne 2011 : tous négatifs pour *Brucella abortus* mais 7 sur 32 positifs pour *Brucella suis*. Le biotypage a confirmé *B. suis* biovar 2 dans les 7 cas.

(3) Analyses autour du foyer *B. suis* biovar 2 de Corenne en 2012

La destruction des sangliers dans 10 communes avoisinant Florennes (Corenne) a été autorisée par Arrêté ministériel (en mai 2012 pour une durée de 1 mois). Au total, 18 sangliers abattus dans ce contexte (2 par commune) ont été transmis pour analyse. En outre, l'équipe ULg avait demandé à analyser des échantillons supplémentaires provenant d'animaux abattus dans un rayon de 5 km autour de la ferme en question. Les contraintes de terrain n'ont pas permis cet échantillonnage. Les organes à analyser ont été stockés en attente de prélèvements ultérieurs dans cette zone. En automne 2012, 9 prélèvements supplémentaires ont été réalisés dans cette zone. En janvier 2013, les 34 échantillons (27 amygdales et 7 organes génitaux) ont été transmis au FLI (Friedrich-Loeffler-Institut, Jena, laboratoire de référence OIE) ; 5 amygdales sur les 27 envoyées étaient positives en culture. Dans tous les cas, il s'agissait de *Brucella suis* biovar 2.

(4) Enquête épidémiologique *Brucella abortus* et *Brucella suis* en faune sauvage

B. suis en suidés : l'enquête prévue en 2012 n'a pas été réalisée.

B. abortus en cervidés : méthode et résultats sont détaillés ci-dessous.



Analyses (Cervidés) réalisées par le Réseau ULg suite à la détection de foyers de brucellose bovine

1.1. Production d'un fragment d'ADN destiné à servir de référence (contrôle positif)

1.1.1. Amplification par PCR classique d'un fragment du gène *bcspp31*

Une souche de *Brucella suis* biovar 2 est mise en culture sur gélose solide contenant le milieu BBL Brucella (Becton Dickinson). Après 48 heures, une des colonies est suspendue dans 200 µl d'eau distillée. Les bactéries sont ensuite inactivées à 100°C pendant 10 minutes. L'ADN génomique libéré servira de matrice pour amplifier un fragment de 151 paires de bases du gène *bcspp31* (*Brucella cell surface protein*) (n° d'accèsion Genbank : M20404) qui est commun à *Brucella spp.* Les amorces utilisées sont *Brucella_fwd* (5'-GCTCGGTTGCCAATATCAATGC-3') et *Brucella_rev* (5'-GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG-3') (Probert et al., 2004). Le mélange PCR (50 µl) comprend les amorces (0,2 µM), les dNTP (200 µM), la polymérase *Taq* (1,25 unités) (New England Biolabs), le tampon *Thermopol reaction* (New England Biolabs) et l'ADN génomique (1 µL). Les conditions d'amplification efficaces sont les suivantes : après une première dénaturation de 5 min à 94°C suivent 45 cycles consistant successivement en 30 s à 94°C, 30 s à 57°C et 1 min à 68°C, suivis d'une élongation terminale de 5 min à 68°C. Après électrophorèse, le gel d'agarose 2% contenant le produit de PCR est coloré au *Midori green DNA stain* (Nippon Genetics) et visualisé sous UV. La bande présomptivement intéressante est ensuite purifiée grâce au kit *Nucleospin® gel and PCR clean up* (Macherey Nagel) et séquencée (GATC Biotech).

1.1.2. Clonage du fragment *bcspp31* dans le plasmide pCR2.1

Le fragment du gène *bcspp31* obtenu est inséré dans un vecteur de clonage, le pCR2.1, par *TA cloning* suivant les recommandations du fabricant (Invitrogen). Les colonies obtenues sur milieu LB agar (Merck) additionné d'ampicilline à 100 µg/ml (Sigma-Aldrich) sont analysées par PCR en utilisant les amorces M13 (M13 fwd : GTAAAACGACGGCCAG et M13 rev : CAGGAAACAGCTATGAC) complémentaires de séquences plasmidiques situées de part et d'autre de l'insert. Le mélange PCR (50 µl) comprend les amorces (0,2 µM), les dNTP (200 µM), la polymérase *Taq* (1,25 unités) (New England Biolabs), le tampon *Thermopol reaction* (New England Biolabs) et l'ADN génomique (1 µL). Les conditions d'amplification efficaces sont les suivantes : après une première dénaturation de 5 min à 94°C suivent 30 cycles consistant successivement en 30 s à 94°C, 30 s à 55°C et 30 s à 68°C, suivis d'une élongation terminale de 5 min à 68°C. Après électrophorèse, le gel d'agarose 2% contenant le produit de PCR est coloré au *Midori green DNA stain* (Nippon Genetics) et visualisé sous UV. Les colonies PCR-positives sont cultivées dans un milieu LB liquide (Merck) additionné d'ampicilline à 100 µg/ml (Sigma-Aldrich). L'ADN plasmidique est extrait et purifié, à partir de 2 ml de ces milieux ensemencés, grâce au kit *Nucleospin® Plasmid* (Macherey Nagel) suivant les recommandations du fabricant. La concentration et la pureté de l'ADN plasmidique extrait sont analysées par spectrophotométrie grâce au Nanodrop 1000 (Thermoscientific).

1.2. Détection de la cible par PCR en temps réel

1.2.1. Réactifs & Scénario

La PCR en temps réel utilisée cible donc le gène *bcspp31* (*Brucella cell surface protein*, n° d'accèsion Genbank : M20404) ; elle amplifie un fragment long de 151 paires de bases qui est commun à *Brucella spp.* en utilisant les amorces conseillées par le Laboratoire de référence de l'OIE, soit *Brucella_fwd* (5'-



GCTCGGTTGCCAATATCAATGC-3') et Brucella_rev (5'-GGGTAAAGCGTCG CCAGAAG-3') et la sonde Brucella_probe (5'-6-FAM-AAATCTTCCACCTTGCCCTTGCCATCA-BHQ1-3') (Probert et al., 2004). Les conditions d'amplification sont les suivantes : après une première dénaturation de 10 min à 95°C suivent 45 cycles comprenant successivement 15 s à 95°C et 1 min à 57°C. Le mélange PCR (25 µl) est constitué de 12,5 µl de TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), des 2 amorces (200 nM) (Eurogentec), de la sonde (100 nM) (Eurogentec) et de la matrice contenant l'ADN (2 µl).

1.2.2. Linéarité et efficacité de la PCR en temps réel

La linéarité de la méthode a été déterminée en analysant des dilutions 1/10 du plasmide (pcR2.1) contenant l'insert *bcsP31* (cf. 1.1.2.). Quantitativement, la gamme utilisée s'étend de 10^8 à 10^2 copies de plasmide. L'efficacité de la méthode est déterminée par la formule : Efficacité (%) = $100 \times (10^{-1/\text{pente}} - 1)$. La procédure a été répétée deux fois.

1.3. Extraction de l'ADN génomique total au départ des échantillons de cervidés

Les échantillons sont issus des prélèvements réalisés en automne 2012. L'ADN total provenant de rates, d'utérus et de testicules (655 échantillons, au total) provenant de 637 cervidés (*Cervus elaphus* et *Capreolus capreolus*) est extrait grâce au kit Nucleospin® 96 Tissue (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. En résumé, 20 mg de tissus sont lysés dans une solution contenant du SDS et de la protéinase K. L'ADN est ensuite adsorbé sur une membrane de silice en ajoutant des sels chaotropiques et de l'éthanol au lysat. Les contaminants sont éliminés par lavage avec différents tampons. L'ADN génomique est finalement élué dans un tampon contenant peu d'ions et faiblement alcalin.

1.4. Résultats

1.4.1. Amplification par PCR classique du fragment du gène *bcsP31*

Le gel d'agarose de 2% (Fig. 1) montre, après électrophorèse, une bande inférieure à 200 pb, le fragment attendu étant de 151 pb. Après purification de la bande, celle-ci a été clonée dans le vecteur pCR2.1.

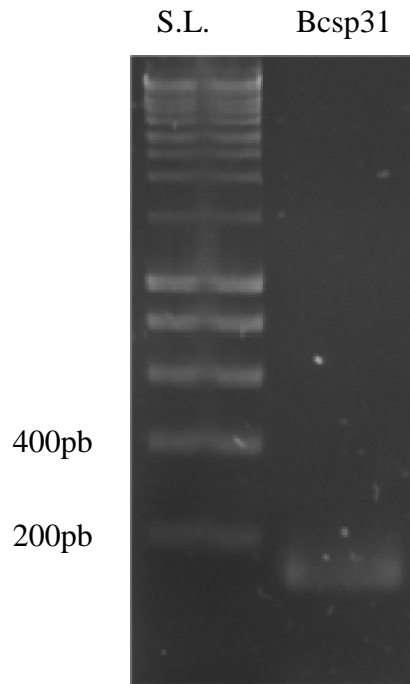


Figure 1: Gel d'agarose 2% après électrophorèse, coloration au Midori Green stain et visualisation sous UV de l'amplicon produit par la PCR *bvsp31*. S.L. : Smart Ladder, marqueur de masse moléculaire.

1.4.2. Clonage du fragment du gène *bvsp31* dans le pCR2.1

Le gel d'agarose 2% (Fig. 2) montre, après électrophorèse, une bande inférieure à 400pb, ce qui correspond à la taille de notre fragment d'intérêt (151pb) additionné des séquences se trouvant de part et d'autre sur le plasmide (202 pb). Le séquençage nous a permis de confirmer la présence du fragment de 151pb de *bvsp31* à l'intérieur de l'amplicon.

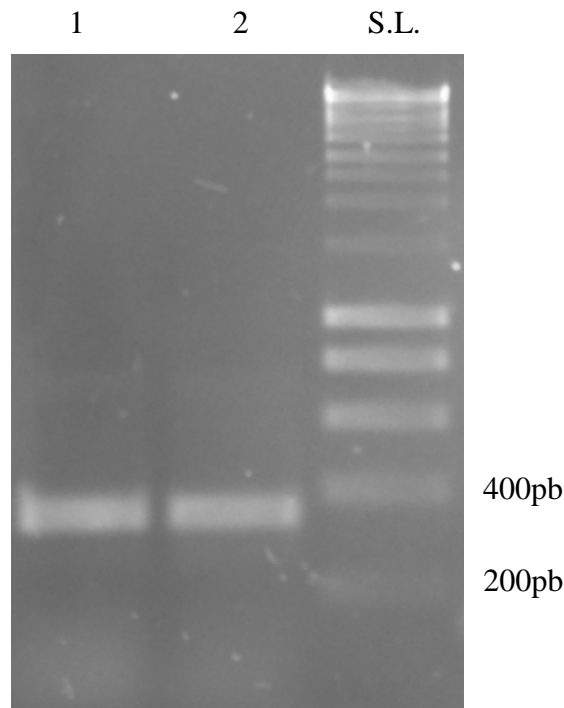


Figure 2: Gel d'agarose 2% après électrophorèse, coloration au Midori Green stain et visualistaion sous UV de la PCR M13 sur les colonies positives. S.L. : Smart Ladder, marqueur de masse moléculaire. Puits 1 et 2 : colonies positives.

1.4.3. Linéarité et efficacité de la PCR en temps réel

L'analyse de la régression linéaire montre que la PCR en temps réel *Brucella spp.* est linéaire pour une gamme allant de 10^2 à 10^8 copies de bcs31 avec un $R^2 > 0,99$. Basée sur la pente de la droite de régression linéaire, l'efficacité de la méthode est de 83% (Fig. 3).

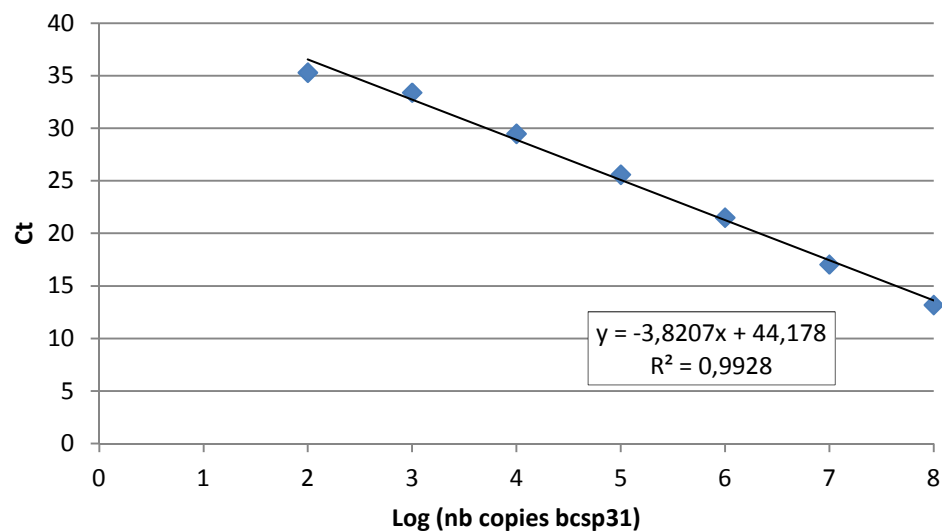


Figure 3 : Régression linéaire de la PCR en temps réel *Brucella spp.*



1.4.4. Détection de *Brucella spp.* chez les cervidés par PCR en temps réel

Au total, 655 ADNs génomiques de cervidés ont été extraits et 319 ont été testés par la PCR en temps réel pour la présence de *Brucella spp.* Jusqu'à présent, aucun échantillon de cervidé n'a permis d'amplifier le fragment cible.

1.5. Bibliographie

Probert, W.S., Schrader, K.N., Khuong, N.Y., Bystrom, S.L., Graves, M.H., 2004. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella spp.*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Journal of clinical microbiology* 42, 1290-1293.

Conclusions

Brucellose/sangliers : présence de *Brucella suis* bv 2 chez le sanglier en RW

- Enquête 2003-2007 : au cours d'une première étude réalisée sur plus de 1000 individus, nous avons démontré que la brucellose était présente de façon endémique dans les populations de sangliers en Région wallonne avec une séroprévalence apparente globale de 55 % et une bactérioprévalence de 25 % parmi les séropositifs (BMC Vet Research, 2011).

- Etudes 2011 et 2012 : *Brucella* a été isolée de 7 individus sur 32 analysés (2011) et de 5 individus sur 27 analysés (2012). Dans tous les cas, il s'agissait de *Brucella suis* biovar 2.

Les études ponctuelles réalisées en 2011 et 2012 ne reflètent pas la situation épidémiologique de l'ensemble de la région mais indiquent que *Brucella suis* est toujours présent dans les populations de sangliers. L'enquête épidémiologique prévue sera mise en œuvre en fonction des moyens financiers disponibles.

Rappelons pour conclure le risque que représentent les sangliers porteurs et excréteurs de *Brucella* pour les élevages de porcs plein air. Les risques sont liés à la transmission directe mais surtout indirecte des *Brucella*. Le Réseau de surveillance souhaiterait être informé de la localisation des élevages de porcs plein air en Région wallonne afin de pouvoir mener à terme l'étude d'analyse de risques. Dans les zones concernées, des solutions concrètes doivent être envisagées aussi bien par les éleveurs (clôtures électrifiées) que par les chasseurs (gestion des populations de sangliers). Quant à la transmission de *Brucella suis* à des bovins (cas de Corenne), il s'agit d'un événement rare et les conséquences épidémiologiques, cliniques et lésionnelles ne sont pas comparables à ce qui est décrit avec *Brucella abortus*. Les conséquences économiques pour l'éleveur sont cependant dramatiques puisque l'isolement de *Brucella* au sein d'une exploitation bovine impose les mêmes mesures, et ce, quelle que soit l'espèce de *Brucella* identifiée. Ainsi l'élevage de Corenne a dû faire face aux mêmes mesures drastiques que celles imposées dans les autres foyers.

Brucellose/cervidés : pas d'indice de présence de *Brucella spp.* en cervidés en RW

Au total 319 rates de cervidés ont été criblées par PCR en temps réel pour la présence d'une séquence cible de *Brucella spp.* Aucun échantillon ne s'est révélé positif jusqu'à présent.