

UNIVERSITÉ DE LA SCIENCE AGRONOMIQUE  
ET MÉDECINE VÉTÉRINAIRE DE BUCAREST



FACULTE DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE



# LES CONSÉQUENCES DE L'INFECTION AVEC LA *BRUCELLA MELITENSIS* ET L'IMMUNISATION CONJONCTIONNELLE PAR REV1 SOUCHE SUR LA SÉCURITÉ DU LAIT DE BREBIS ET DE CHÈVRE

Directeur de theme,

Prof. univ. dr. DANEȘ DOINA

Candidat au doctorat: SHMEGLIA (AWWAD) ELENA

Domaine: MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

## RÉSUMÉ

### MOTS-CLÉS:

Bactériose, zoonoses, epidemiologie, brucellose, petits ruminants, moutons, chèvres,  
diagnostic de laboratoire, biologie moléculaire, phylogénie

Thèse en « médecine vétérinaire » intitulé « Conséquences de l'infection par *Brucella melitensis* et de la vaccination oculaire par la souche Rev1, sur la sécurité du lait de brebis et de chèvre » a été réalisée à l'Université des Sciences Agricoles et de Médecine Vétérinaire, Bucarest, Département des maladies infectieuses et médecine préventive de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Bucarest, sous la direction de Mme. Prof. Univ. Dr Doina DANEȘ. Le premier objectif de l'étude était de caractériser la situation épidémiologique et le risque qu'il représentent la brucellose en Palestine, après une période de 15 ans de contrôle de l'exécution du projet de vaccination contre la brucellose animale, en utilisant la vaccination en tant que premier outil. Le deuxième objectif de cette thèse est de caractériser, phénotypiques et génotypiques, les souches sauvages de *B. melitensis* isolées en Palestine, par les techniques conventionnelles et les techniques moléculaires modernes. La thèse est divisée en deux parties: la première partie est consacrée à l'étude des connaissances dans le domaine, et la seconde est consacrée à la recherche personnelle. Ces sections sont organisées en trois chapitres, le premier chapitre présentant des informations de la littérature sur le sujet de la thèse, qui sont utilisées pour interpréter et comparer les résultats de leurs propres recherches. Les chapitres II et III montrent les résultats de la recherche personnelle.

Chapitre I « ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE » résume l'information scientifique de base sur les aspects suivants: caractéristiques générales et la morphologie des bactéries du genre *Brucella*, principaux déterminants antigéniques, pathogénicité et la caractérisation moléculaire des bactéries du genre *Brucella* et la caractérisation de *Brucella melitensis* souche Rev 1. Un chapitre est consacré à l'aspect zoonotique de la brucellose, il a été décrit chez les animaux et chez l'homme. En outre, ce chapitre présente certains renseignements bibliographiques sur le diagnostic de laboratoire des infections à *Brucella*, en partant du prélèvement d'échantillons biologiques jusqu'aux méthodes de laboratoire actuellement utilisées.

Le II-ème CHAPITRE présente les résultats des études personnelles sur les « FACTEUR DE RISQUE ASSOCIÉE À LA PRÉVALENCE DE *BRUCELLA MELITENSIS* DANS LE LAIT DE BREBIS ET DE CHÈVRE ET LA SITUATION ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA BRUCELLOSE EN CISJORDANIE, PALESTINE » en deux sous-chapitres. Le premier sous-chapitre « PRÉSENTATION DE LA PALESTINE ET DU MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE » est une brève description de la Palestine historique, la partie de la Palestine qui est la Cisjordanie, du gouvernement palestinien, du ministère de l'Agriculture - vision et défis,

l'interférence avec Israël dans l'agriculture et celui de bétail, les particularités sociales des Bedouins qui s'avère un élément important en relation avec le bétail, les principales races de moutons et de chèvres en Palestine, la Palestine traditionnelle laitière choisi (lait frais de brebis et de chèvre, brânza blanc (jibnah Baida, brânza Naplouse) , la production de fromage labneh (yaourt), yaourt produits séchés (jameed, laban kisheq). A la fin de ce chapitre présente les services vétérinaires palestiniens.

Le deuxième sub - chapitre, intitulé « BRUCELLOSE EN PALESTINE ET FACTEURS DE RISQUE » présente des études portant sur quatre principaux facteurs de risque, qui se manifeste en ce qui concerne la brucellose en Palestine. Le premier facteur de risque est étudiée « ÉVALUATION DE LA SITUATION EPIDEMIOLOGIQUE ET LE POINT SUR LE CONTRÔLE DE LA BRUCELLOSE DE 1974 A 2014 EN CISJODRANIE »: a ce but ont été consultés documents officiels publiés par le ministère de l'Agriculture et ont été présenté des documents et des méthodes qui ont été utilisées pour contrôler la brucellose en Palestine au cours 1974 - 1998 et ensuite à la mise en oeuvre du Programme Palestinien de la lutte contre la brucellose (PBCP) en 1998. Les progrès consécutive a la mise en oeuvre de PBCP ont été quantifiée par des objectifs de performance, tels que: l'enregistrement des agriculteurs, la vaccination des animaux, la surveillance des animaux vaccinés au cours de la campagne de vaccination, la surveillance épidémiologique et le suivi du programme de lutte contre la brucellose, le renforcement des capacités des services vétérinaires, le développement des capacités de laboratoires pour le diagnostic de la brucellose, la surveillance épidémiologique concernant l'infection due a *Brucella abortus* chez les vaches laitières, la sensibilisation des publics cibles et a mesure l'impact des actions entreprises par l'étude KAP. Les enquêtes de ce chapitre évalue l'impact PBCP sur la situation épidémiologique de la brucellose après 15 ans de mise en oeuvre du projet, la prévalence de la brucellose chez les animaux et les humains, l'impact PBCP sur d'autres aspects de la vie et, enfin, les problèmes critiques qui affectent le résultat du programme de contrôle et conclusions. Le deuxième facteur de risque étudié est la fréquence de l'infection par *Brucella* par – “LA PREVALENCE DES ANTICORPS ANTI-BRUCELLA PARMIS LES AUTRES AVORTEMENT CHEZ LES PETITS RUMINANTS EN CISJORDANIE – ENQUETE SEROLOGIQUE”, en utilisant des matériaux et des méthodes (échantillonnage, la performance de la méthode ELISA, analyse statistique) spécifiques. L'avortement brucellique s'est avéré être la troisième cause des avortement répandue chez les

petits ruminants. Les “CONNAISSANCES, ATTITUDES ET PRATIQUES (KAP) RELATIVES A LA BRUCELLOSE DONT ELLE DETIENT LES PROPRIETAIRES D’ANIMAUX (OVIN ET CAPRINS) EN CISJORDANIE “ est le troisième facteur de risque étudié, en utilisant des matériaux et des méthodes appropriées (zone d'étude, l'identification population cible, compte tenu ethnique, la conception du questionnaire, le traitement et l'analyse statistique de leurs réponses). Le résultat de cette étude KAP - Connaissances, Attitudes et Pratiques, ont été évaluées par référence aux données fournies par le ministère palestinien de la Santé en 1999 et des activités de sensibilisation du public menées par le programme de lutte contre la brucellose 1999-2010. Le quatrième facteur de risque évalué furent les techniques de diagnostic disponibles et leur performance, présentés dans les « MEILLEURS OUTILS DE DIAGNOSTIQUE DANS LE PROGRAMME DE CONTROLE DES FOYERS DE BRUCELLOSE”, sujet traité dans deux chapitres. Le premier chapitre, « Validation de la RT-qPCR pour la détection du génome de *Brucella* dans le lait des brebis et de chèvre » montre le principe de RT-qPCR et les exigences qui doivent être remplies pour valider les techniques de sensibilité et de la spécificité de la RT-qPCR, la limite de détection et la quantification, linéarité y ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination, le coefficient de corrélation, l'écart type et le coefficient de variation, et le calcul de l'efficacité et la reproductibilité du nombre de copies du génome. Il a été décrit comment traiter les échantillons (contrôle de traction, l'isolement de souches de référence, l'extraction DNAlui, la détermination de la concentration du vaccin *Brucella melitensis* Rev 1, l'amplification du son RT-qPCR) et la validation de RT-qPCR (spécificité et la limite de sensibilité détection (LOD) et le niveau de préparation de la courbe, la répétabilité, la reproductibilité et l'efficacité de l'essai, la robustesse et finalement l'électrophorèse. La conclusion de cette étude est que la RT-qPCR « in-house » est une method pas cher, précis, pour la détection précoce des agents infectieux et utiles pour la mise en oeuvre rapide des mesures visant à prévenir l'apparition et la propagation de la maladie et d'éviter l'infection humaine. Le deuxième chapitre de l'enquête sur le facteur de risque quatre, «la détection du génome *Brucella* par RT-qPCR dans des échantillons de lait chez les petits ruminants, outil importante pour la gestion des foyers » montre comment le protocole développé « in house » a été utilisé lors de l'épidémie de brucellose présente, les matériaux et les méthodes, les critères et l'échantillonnage inclusivement des échantillons de lait. Ils sont discutés les résultats des tests sérologiques et les résultats de l'isolement bactérien et la performance de la

RT-qPCR sur des échantillons de lait. La conclusion de ce chapitre est l'introduction de l'utilisation de tests rapides, comme la RT-qPCR, précis et sensibles qui a prouvé ses qualités et fournit un outil fiable pour une utilisation par les autorités afin de mettre en œuvre des mesures préventives pour lutter contre les épidémies et pour prévenir la propagation de la maladie à la population humaine et aux animaux.

Dans le III-ième chapitre est présenté « LA PRÉVALENCE DES GÈNES DE PATHOGÉNICITÉ ASSOCIÉE À LA VIRULENCE CODANT POUR LA PAROI CELLULAIRE AUX SOUCHES SAUVAGES DE *BRUCELLA MELITENSIS* ISOLÉES DE CISJORDANIE » objet auquel a été répondu par quatre études. La première étude a porté sur « la base moléculaire des gènes de virulence de souches de *B. melitensis* isolées en Cisjordanie Palestine ». Cette étude présente les matériaux et les méthodes (culture et culture d'échantillons, l'analyse par PCR et l'identification des gènes de virulence par PCR), et présente les résultats et les conclusions à l'effet que, malgré l'introduction de la vaccination du troupeau en 1999 en Palestine, la présence des déterminants génétiques de pathogénicité associés aux parois cellulaires montre un taux très élevé (95-100%) aux souches sauvages isolées de la Cisjordanie. La deuxième étude réalise l'« analyse du polymorphisme génétique et de l'homogénéité des gènes d'enveloppe *lpsB*, *dacE* et *amiC* aux souches de *Brucella melitensis* sauvages isolées en Cisjordanie Palestine ». Sont présentés des matériaux et des méthodes (culture et culture d'échantillons, conception des amorces et l'analyse de la PCR, le séquençage et l'analyse BLAST du gène *lpsB*, à moins que l'homologie de contacts et l'analyse phylogénétique), les résultats (analyse bactériologique, le séquençage des gènes et l'analyse par BLAST) et les conclusions. Selon cette étude, les souches *B. melitensis* qui ont été isolées de Cisjordanie appartiennent au biovar 1, ce qui confirme les résultats de l'identification par des méthodes bactériologiques basées sur le phénotype ou la morphologie et les propriétés biochimiques.

Le troisième étude a porté sur « L'APPROCHE ÉPIDÉMIOLOGIE BRUCELLOSE EN PALESTINE UTILISANT L'ANALYSE DE PROFIL PHYLOGÉNÉTIQUE ». Sont des matériaux et des procédés présentés (échantillonnage et l'isolement des amorces de conception bactériennes et l'identification de la PCR, la conception d'amorces et de séquençage du protocole d'amplification des produits d'amplification, l'alignement et l'analyse phylogénétique), le résultat de l'alignement de séquence et les résultats d'arbres phylogénétiques et, enfin, les conclusions ce qui montre que, bien que l'isolement *B. melitensis* des 18 souches ont un ancêtre commun, ils ne

sont pas de différence entre les variations. Les séquences étudiées avaient un degré élevé d'homologie, mais un degré plus forte d'homologie de la variation génétique, ont montré les échantillons des mêmes villages, menant à l'emplacement de la même branche de l'arbre phylogénétique. Cette étude montre que la relation étroite entre la variation de séquence dépend de la distance entre les régions d'origine des échantillons. Ils ont été identifiés parmi les souches de terrain, quelqu'un qui ont montré un certain degré d'homologie, supérieur à *B. melitensis* souche Rev 1 vaccin, ce qui suggère une éventuelle infection causée par la souche du vaccin. Bien que le degré de variation des souches sauvages de *Brucella melitensis* a été réduite, la virulence conservée et pathogénicité pour l'homme, la capacité abortifère sont gardées. Cartographie phylogénétique a révélé que les souches palestiniennes sont génétiquement liées à ceux qui ont été isolés d'autres pays de la Méditerranée, comme l'Espagne, Israël, Chypre et la Turquie et celles qui sont isolées dans certains pays asiatiques comme l'Inde, la Malaisie, Indonésie. Cette découverte indique isolements ancestrales d'origine évolutive commune. Dans la 4<sup>ème</sup> étude recherché a mesurer « La prévalence de *Brucella melitensis* REV1 et sa discrimination par rapport aux souches isolées du lait de brebis et de chèvre, en analysant le polymorphisme de restriction du gène OMP2 ». Sont présentées les matériaux et les méthodes : récolte d'échantillons, l'isolement de la souche de *B. melitensis* Rev 1 et des souches sauvages, l'analyse par PCR, la digestion de l'ADN par l'enzyme Pst I et les produits de digestion en migration électrophorétique. Les résultats ont montré que les fragments d'ADN obtenus à partir de la souche de *B. melitensis* Rev 1 et deux isolés sauvages provenant de troupeaux dans la région de Hébron et Ramallah ont un profil similaire à la digestion PstI et après digestion ont donné trois bandes: un fragment 282 pb intact omp2a gène amplifié, dépourvu du site de restriction PstI, et deux petits fragments de 238 pb et de 44 dérivés du fragment amplifié a été digéré omp2b. En revanche, les isolats sauvages *B. melitensis* produisent deux fragments plus petits: un fragment de 238 pb et 44 pb.

Le chapitre IV de la thèse porte sur des « NOUVELLES TENDANCES DANS LE DIAGNOSTIC DE LA BRUCÉLOSE DANS LE LABORATOIRE CENTRAL » et regroupe toutes les techniques de diagnostic qui ont été utilisées pour la recherche présentée dans la thèse et présente la conception globale du diagnostic de la brucellose dans le laboratoire vétérinaire palestinien, le mode de prélèvement, la collecte et le traitement des échantillons, l'examen sérologique d'échantillons de sérum, le test de fixation du complément (FC), dosage immunitaire

enzymatique indirect (ELISA), l'isolement et l'identification des brucelles, le diagnostic moléculaire de la brucellose – extraction d'ADN et identification par PCR, en utilisant une ou plusieurs paires d'amorces, la détection en temps réel par PCR du polymorphismes génétiques du gène omp2 par PCR-RFLP, le séquençage du produit d'amplification, l'alignement et l'analyse phylogénétique, qui ont conduit à la conclusion que les autorités disposent de l'ensemble des méthodes nécessaire au diagnostic pour la lutte contre la brucellose. Le présent travail fini par 19 conclusions avec 12 recommandations et indiquant les références.