

Le directeur général

**Extrait de la Note
d'appui scientifique et technique
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
du 12 octobre 2022**

**relatif aux « investigations épidémiologiques suite à la détection d'un foyer de
brucellose bovine en Haute-Savoie »**

**Le présent document est un extrait de la note du 12 octobre 2022, après
suppression des d'informations confidentielles au regard des textes législatifs.**

L'Anses a été saisie le 19 novembre 2021 par le Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire pour la réalisation de l'appui scientifique et technique relatif aux investigations épidémiologiques suite à la détection d'un foyer de brucellose bovine en Haute-Savoie.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA DEMANDE

Lors de la surveillance mensuelle de la brucellose bovine sur prélèvement de lait, un résultat ELISA positif a été détecté le 12 octobre 2021 dans un élevage laitier de 219 bovins de race Abondance en Haute Savoie. Le résultat sérologique positif a été confirmé par le Laboratoire National de Référence (LNR) le 19 octobre 2021. Par suite, des prélèvements sérologiques individuels ont conduit à détecter une vache primipare présentant des résultats sérologiques positifs (vache index). Les tests à la brucelline réalisés le 25 octobre étaient positifs chez deux vaches (dont la vache index). Une analyse bactériologique à la suite d'un contrôle sur lait individuel (prélevé le 25 octobre 2021 chez la vache index) s'est révélée positive à *Brucella* le 9 novembre 2021.

La souche bactérienne isolée par le LNR *Brucella* de l'ANSES à partir d'un prélèvement de lait (collecté le 25 octobre 2021) et par le Laboratoire départemental d'analyse (LDA) de la Savoie à partir de deux paires de ganglions (prélèvements réalisés lors de l'abattage diagnostique de

la vache index le 27 octobre 2021) correspond à *Brucella melitensis* (espèce bactérienne confirmée le 9 novembre 2021). La vache infectée était une primipare, née le 12 juillet 2019 et ayant vêlé le 14 septembre 2021.

L'élevage laitier haut-savoyard a été déclaré infecté et mis sous arrêté préfectoral de déclaration d'infection le 10 novembre 2021.

L'analyse génomique par séquençage en date du 18 novembre 2021 a confirmé le lien avec la souche isolée des bouquetins du massif du Bargy depuis plusieurs années.

L'appui scientifique et technique doit en particulier porter sur les points suivants :

- 1-Enquête épidémiologique dans l'élevage index afin de déterminer l'origine et l'étendue de la contamination
- 2-Expertise et appui technique aux services déconcentrés sur les prélèvements à conduire en abattoir ou à l'équarrissage dans le cadre des investigations.
- 3-Appuis scientifiques et techniques aux services déconcentrés et à la direction générale de l'alimentation dans les investigations dans les élevages en lien épidémiologique avec l'élevage index ;
- 4-Appui scientifique pour la mise en place d'une surveillance renforcée pour les élevages en retour d'estive de la zone Bargy.

2. ORGANISATION DES TRAVAUX

Pour répondre à ces demandes, plusieurs actions et protocoles ont été mis en place avant, pendant et l'après l'abattage du troupeau et sont décrits ci-dessous.

2.1 Enquête épidémiologique dans l'élevage index

L'enquête épidémiologique dans l'élevage index a été menée par les services de la direction départementale en charge de la protection des populations du département 74. Compte tenu de la possibilité que la vache infectée ait été contaminée en 2020 sur l'alpage du Reposoir, les mouvements de bovins ont été investigués sur une période rétrospective de 2 ans, avec l'objectif d'établir les liens amont et aval avec le troupeau sur la période. Pour chacun des bovins du troupeau, les facteurs de risque suivants, vis-à-vis de la brucellose, ont été identifiés : Commémoratif d'avortement ; Prise de colostrum issu de la vache infectée ; commémoratif de transhumance sur la zone du Reposoir en 2020 ou 2021.

2.2 Investigations dans les élevages en lien épidémiologique

Les mouvements des animaux ont été répertoriés rétrospectivement sur une période de 2 ans. L'étude des données a permis d'identifier les élevages en lien épidémiologique avec le foyer (liens amont et aval). Des investigations complémentaires ont été réalisées dans les élevages concernés (tests sérologiques, brucelline et/ou abattage diagnostique) afin d'investiguer les sources possibles d'infection lors d'introduction et d'écartier la possibilité de dissémination de la maladie dans d'autres élevages (sortie d'animaux).

2.3 Protocole de prélèvements à l'abattoir, analyses réalisées en laboratoire

Le protocole de prélèvements à l'abattoir a concerné les animaux adultes passant sur la chaîne, ainsi que les veaux euthanasiés.

2.3.1 Protocole de prélèvements à l'abattoir

Pour chaque animal abattu, la liste des prélèvements effectués est listée dans le Tableau 1. Chaque prélèvement était identifié comme suit : identification de l'animal (via numéro d'ordre d'abattage), identification du prélèvement. Les étiquettes ont été préparées à l'avance par l'abattoir. Les échantillons ont été conditionnés en sachets individuels (1 sachet par animal).

Tableau 1 : Liste des prélèvements réalisés à l'abattoir

Type animal	Prélèvements (identifiant)
Adultes, génisses et veaux de plus de 6 mois	Sang Paire de ganglions rétro-pharyngiens (RETRO) Paire de ganglions iliaques (IL) Paire de ganglions génitaux (GEN) 2 Ecouvillons génitaux (EG) Rate (RATE) Utérus (UT) ou Testicules (T)
Veaux de moins de 6 mois	Sang Ombilic 1 Ecouvillon génital (EG)

Après prélèvement, les échantillons ont été maintenus à température de 5 ± 3 °C et transférés au LDA de la Savoie pour congélation, répartition et envoi aux laboratoires départementaux agréés par UN3373.

2.3.2 Analyses de laboratoire

Pour chaque animal abattu, les prélèvements ont été congelés puis adressés à sept laboratoires vétérinaires agréés pour la bactériologie brucellose. Au vu du nombre très important d'analyses à réaliser, les prélèvements ont été congelés afin de tenir compte des délais nécessaires à l'analyse de tous ces prélèvements par les laboratoires mobilisés. Le protocole est présenté en Annexe 1.

L'ensemble des prélèvements a ensuite été transféré au LNR Brucellose pour des analyses complémentaires :

- 1- Réalisation d'un test PCR en temps réel pour tous les prélèvements (kit commercial ID Gene® Brucella spp triplex – ID.vet). Les résultats douteux et positifs obtenus par PCR TR (prélèvements (kit commercial ID Gene® Brucella spp triplex – Idvet) ont été vérifiés à l'aide d'une 2^{nde} méthode utilisant 3 cibles différentes (Bounaadja et al, 2009), afin d'augmenter la spécificité des analyses.
- 2- Analyses sérologiques des sérums par EAT, FC et ELISA indirect (kit IDEXX Bovin)

- 3- Sélection d'une liste restreinte de vaches à risque d'infection en fonction des critères suivants : i) résultats sérologiques et moléculaires obtenus par le LNR, ii) lésions observées à l'abattoir, iii) facteurs de risque précédemment identifiés (cf 2.1).
- 4- Analyses complémentaires réalisées par le LNR chez les vaches à risque d'infection, avec la réalisation d'une culture sur milieu liquide pendant trois semaines, appelée « culture enrichie », combinée avec la réalisation hebdomadaire de tests PCR temps réel. Ce protocole permet d'enrichir les cultures à partir de prélèvements afin d'augmenter la sensibilité de la bactériologie. En cas de signal positif par PCR sur la période de 3 semaines, une bactériologie conventionnelle selon la norme U47-105 a été réalisée à partir des prélèvements concernés à l'issue de la période d'enrichissement.

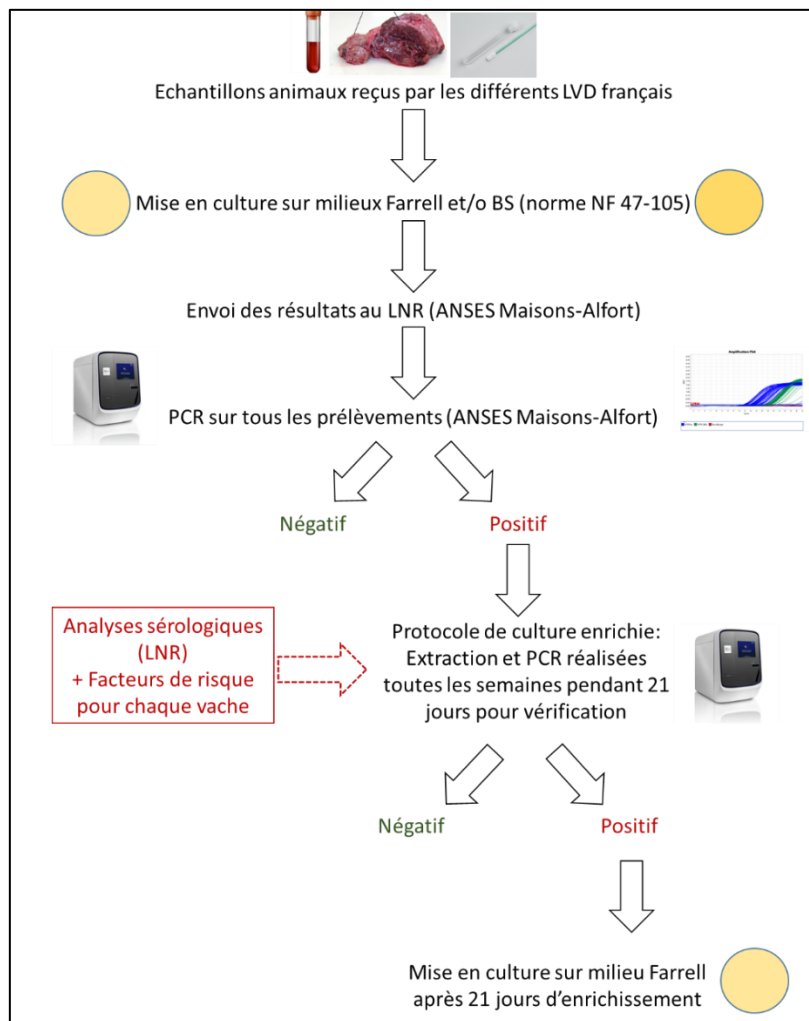


Figure 1 : Résumé des analyses de laboratoire réalisées sur les prélèvements

3. ANALYSES ET CONCLUSIONS

3.1 Enquête épidémiologique dans l'élevage index

L'enquête épidémiologique dans l'élevage index a été menée par les services de la direction départementale en charge de la protection des populations du département 74.

Sept vaches ont avorté entre le 14/12/2020 et le 30/11/2021. Parmi elles, cinq étaient des femelles primipares (nées en 2018 ou 2019) et étaient présentes sur l'alpage du Reposoir en 2020 ou 2021 (Tableau 2). Quatre d'entre elles étaient encore présentes sur l'élevage lors de la détection de l'infection en novembre 2021. Il est à noter que deux vaches nées à la même période que la vache infectée ont présenté des avortements en juin 2021 (vaches C et D). L'avortement tardif survenu le 29/10/2021 (vache E) pourrait être lié à une injection d'ocytocine réalisée le 25/10/2021 (pour faciliter un prélèvement de lait).

Tableau 2 : Liste des femelles nées dans l'élevage, ayant avorté fin 2020 et 2021

Alpage sur Reposoir		Identification animal	Date naissance	Date premier vêlage	Date avortement	Date sortie (cause)
2020	2021					
		A	30/05/2016	17/10/2018	14/12/2020	19/05/2021 (b)
		B	01/08/2016	08/01/2019	02/03/2021	19/05/2021 (b)
X		C	30/06/2019	-	06/06/2021	06/09/2021 (é)
X		D	12/07/2019	-	07/06/2021	
X		E	23/07/2018	24/01/2021	29/10/2021	
X		F	18/06/2018	-	30/11/2021	
	X	G	30/12/2019	-	30/11/2021	

Légende : (b) boucherie, (é) élevage

L'étude des groupes d'animaux présents en alpage a permis d'identifier 88 femelles ayant pâturé sur le site du Reposoir en 2020 et/ou 2021 : 40 femelles nées entre le 18/06/2018 et le 08/10/2019 ont pâturé sur le site du Reposoir en 2020 ; 35 femelles nées entre le 24/10/2018 et le 28/09/2020 ont pâturé sur le site du Reposoir en 2021 et treize femelles étaient présentes sur cet alpage les 2 années. Parmi ce groupe de femelles, seule une femelle n'était pas née sur l'exploitation.

Les femelles présentes en alpage sur le Reposoir en 2020 ou 2021 et ayant présenté des problèmes particuliers de santé (absence de vêlage, mortalité, maladie) sont listés dans le Tableau 3. Parmi elles, une vache née le 25/10/2018 a été abattue le 04/08/2021 (raison non précisée), une génisse de 3 ans (née le 24/10/2018) n'avait pas de date de vêlage (vache H ; Tableau 3). Outre les deux vaches ayant avorté en juin 2021, une vache née à la même période que la vache infectée était morte début 2021 (vache K) et une vache primipare avait eu un veau infecté de diarrhée virale bovine (infecté permanent immunotolérant) (vache L).

La liste des animaux ayant été abattus, vendus ou réformés en 2021 a été établie. Outre deux sorties rapportées début 2020 et 2021, onze animaux sont sortis de l'exploitation entre juillet et octobre 2021 pour abattage, vente ou mortalité (équarrissage). Il est à souligner un nombre relativement élevé de sorties de l'élevage avant la détection du foyer : trois mortalités rapportées en octobre 2021, un abattage, ainsi que la sortie des deux veaux de la vache infectée le 11 octobre 2021.

Avant d'être reconnu infecté, lorsque l'élevage laitier haut-savoyard était bloqué pour suspicion de brucellose bovine (arrêté préfectoral de mise sous surveillance), plusieurs femelles ont été réformées fin octobre et en novembre 2021, 2 vaches ont été abattues le 4/11/2021. Pour ces deux vaches, aucun prélèvement n'a été réalisé. Enfin, cinq veaux ont été emmenés à l'équarrissage le 16/11/2021, sans qu'aucun prélèvement n'ait été effectué.

Tableau 3 : Liste des femelles présentes en alpage sur le Reposoir en 2020 ou 2021 et ayant présenté des problèmes particuliers de santé (absence de vêlage, mortalité, maladie)

Alpage 2020	2021	Identification animal	Date naissance	Date premier vêlage	Date sortie (cause)	Commentaire
X	X	H	24/10/2018	-		Pas de vêlage
X		C	30/06/2019	06/06/2021	06/09/2021 (é)	Avortement le 06/06/2021
X	X	I	01/07/2019	-		Abattage le 04/11/2021 - réforme
X		J	01/07/2019	-		Pas de vêlage
X		K	01/07/2019	-	02/01/2021 (m)	Mort le 02/01/2021, équarrissage le 05/01/2021
X		D	12/07/2019	06/06/2021		Avortement le 07/06/2021
X	X	L	18/07/2019	23/09/2021		Veau IPI

Légende : (é) élevage, (m) mortalité

3.2 Investigations dans les élevages en lien épidémiologique

L'étude des données a permis d'identifier 70 élevages en lien épidémiologique avec le foyer (liens amont et aval) répartis sur 19 départements. Ces élevages étaient majoritairement des élevages d'engraissement de veaux (n=59), puis des élevages allaitants (n=4), laitiers (n=4) ou des négociants (n=3).

Les informations de traçabilité ont été vérifiées sur le terrain par les services des directions départementales en charge de la protection des populations des départements concernés (dates entrée et sortie de l'établissement, type de production, ainsi que les ateliers liés à ces établissements). Les mesures prescrites par l'arrêté ministériel du 22 avril 2008 et le règlement (CE) n°853/2004 ont été appliquées avec notamment la mise sous surveillance des troupeaux, suspension de qualification, limitation de mouvement.

Dans ces troupeaux, deux séries de sérologies individuelles ont été réalisées à 60 jours d'intervalle sur les animaux de plus de 12 mois pour les bovins et plus de 6 mois pour les ovins (EAT et FC pour élevages de voisinage sinon EAT et FC si EAT positif). Il a été décidé d'interdire la livraison de lait cru remis en l'état pour la consommation humaine, séquestration du lait et des produits laitiers chez le producteur et les affineurs dans l'attente des résultats du premier dépistage sérologique individuel ou destruction.

Vingt-et-un bovins encore vivants et en lien avec le foyer ont été identifiés dans les élevages sous APMS (1 à 4 bovins par élevage, 15 élevages concernés). Les mesures (tests sérologiques, brucelline et/ou abattage diagnostique) ont permis d'écarter la possibilité de dissémination de la maladie dans d'autres élevages (sortie d'animaux).

Les résultats obtenus chez les animaux abattus dans ce contexte sont présentés dans l'Annexe 2.

3.3 Résultats des prélèvements dans l'élevage index et à l'abattoir, analyses réalisées en laboratoire

3.3.1 Résultats des animaux de réforme / abattus en octobre - novembre

Tous les résultats de bactériologie et de sérologie chez les bovins abattus après la suspicion étaient négatifs (à l'exception de la vache index). Les résultats de PCR et les cultures enrichies obtenus à l'ANSES sur une partie des animaux ont confirmé *a posteriori* ces résultats. Toutes les PCR réalisées sont négatives (Tableau 4). Il a été observé que les ganglions génitaux étaient manquants chez 2 femelles abattues le 26 novembre 2021, ce qui équivaut à un défaut de sensibilité pour la bactériologie (réalisée sur 2 prélèvements pour ces animaux).

Chez la femelle index infectée (abattage du 27/10/2022), la bactérie a été isolée à partir de la culture enrichie du lait prélevé le 25/10/2022 (résultats ANSES) et de deux paires de ganglions étaient manquants chez 2 femelles abattues le 26 novembre 2021, ce qui équivaut à un défaut de sensibilité pour la bactériologie (réalisée sur 2 prélèvements pour ces animaux).

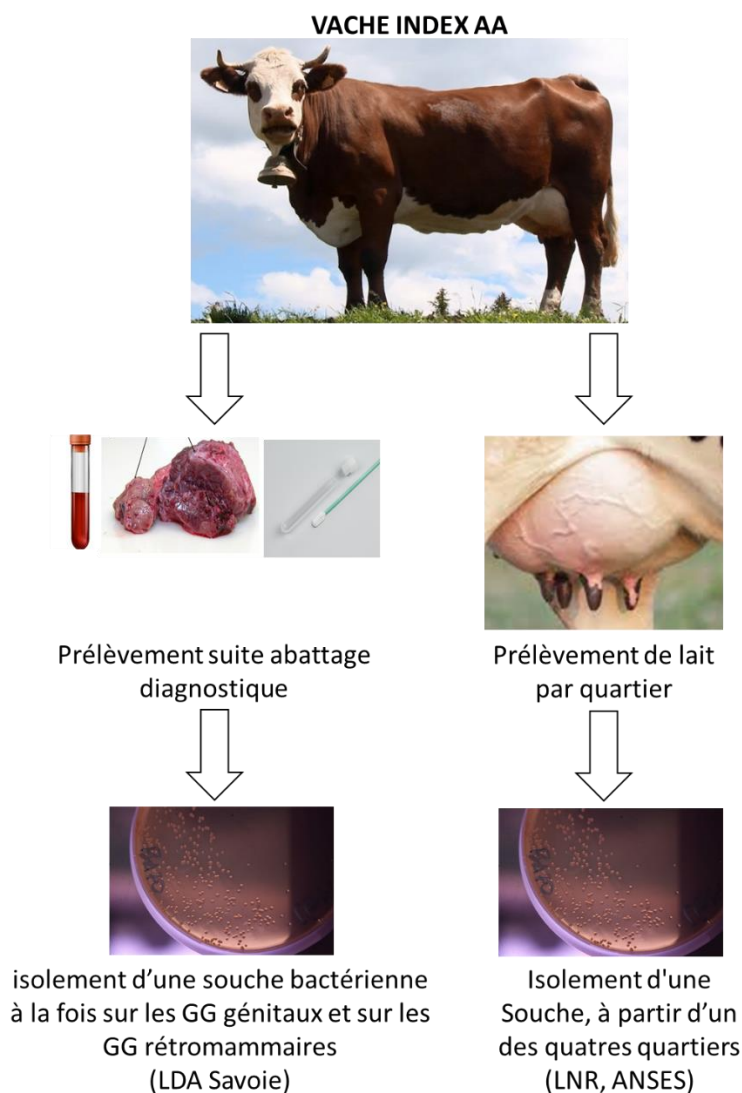


Figure 2 : Résumé des résultats d'analyses obtenus chez la vache index AA

Tableau 4 : Résultats PCR obtenus à l'ANSES chez les animaux abattus en octobre – novembre 2021

Identifiant	Organe	Résultat définitif PCR
AB	GG génitaux	Négatif
AB	GG Iliques	Négatif
AB	GG rétropharyngiens	Négatif
AC	GG génitaux	Négatif
AC	GG Iliques	Négatif
AC	GG rétropharyngiens	Négatif
AD	GG génitaux	Négatif (avec légère inhibition)
AD	GG Iliques	Négatif
AD	GG rétropharyngiens	Négatif
AE	GG génitaux	Négatif
AE	GG Iliques	Négatif
AE	GG rétropharyngiens	Négatif
AF	GG génitaux	Négatif (avec légère inhibition)
AF	GG Iliques	Négatif
AF	GG rétropharyngiens	non traité (prélèvement manquant)

3.3.2 Résultats d'analyses du LNR des bovins abattus les 5 et 6 janvier 2022

Peu de lésions ont été observées à l'abattoir, à l'exception de deux bovins ayant présenté une hypertrophie d'un ganglion iliaque lors de l'abattage. Les 1348 analyses bactériologiques réalisées par les LDA ont mobilisé sept laboratoires du 7 janvier au 1^{er} mars 2022 : tous les résultats étaient négatifs, à l'exception de 29 résultats ininterprétables (présence de contaminants mentionnée pour 1 prélèvement de ganglions rétropharyngiens, 1 rate, 1 utérus, 2 écouvillons génitaux et 24 prélèvements sanguins). Les prélèvements ont tous été transmis pour confirmation au LNR Brucellose de l'ANSES et ont été testés par PCR en temps réel. Le Tableau 5 résume les résultats obtenus par le LNR chez les bovins abattus.

Au total, 1348 prélèvements issus des bovins abattus ont été analysés pour confirmation par le LNR : 1159 prélèvements sont négatifs (dont 62 prélèvements présentant un signal non interprétable), 151 prélèvements sont ininterprétables (dont 129 en raison de la présence d'une inhibition) et 9 prélèvements sont positifs.

Les prélèvements de sang ont été difficiles à analyser, probablement en lien avec les modalités de prélèvement sur la chaîne d'abattage. Près de la moitié des prélèvements sanguins ont présenté une inhibition de l'amplification, ce qui ne permet pas d'interpréter les résultats de PCR.

Enfin, 29 prélèvements sur 1348 n'ont pas été exploités, principalement en raison d'un problème d'identification (étiquette non lisible ou identifiant non reconnu).

Tableau 5 : Résultats PCR obtenus par le LNR chez les femelles abattues en fonction du type de prélèvement

Type de prélèvement	ININTERPRETABLE		NEGATIF			POSITIF		NON	Total
	IN	ININT	N	N(LI)	N (SA)	P	PF	TRAITE	
Ecouvillon vaginal			176	2	12	3	2		195
GG génitaux / rétromammaires	5		162	6	8	1		1	183
GG Iliques	7		170	5	8	1			191
GG rétropharyngiens	7		176	3	9		2	1	198
Rate	6		176	3	7			1	193
Sang	101	22	58	3	9			16	209
Utérus / Ecouvillon utérin	3		156	1	9			10	179
Total général	129	22	1074	23	62	5	4	29	1348

Légende : IN=inhibé, ININT=ininterprétable, N=négatif, N (LI)= négatif avec légère inhibition, N (SA)= négatif avec présence d'un signal aspécifique, P= positif, PF= positif faible

Le détail des 9 résultats positifs est présenté dans le Tableau 6 : 5 prélèvements sont confirmés sur 2 PCR différentes avec des amplifications détectées sur 2 ou 3 cibles différentes, et 4 prélèvements sont positifs faibles (amplification obtenue sur 2 PCR différentes avec 1 seule cible).

Tableau 6 : Détail des résultats positifs obtenus par PCR (valeurs des CTs) par le LNR chez les femelles abattues (PCR 1= kit commercial ID Gene® Brucella spp triplex – ID.vet ; PCR 2= Bounaadja et al, 2009)

Identification animal	Prélèvement	PCR 1	PCR 2-1	PCR 2-2	PCR 2-3	Résultat	Résultat
AG	GG rétropharyngiens	37,7	39,6	37,3	ND	P (2 cibles)	Positif faible
AH	ECV vaginal	33,4	33,9	34,9	36,5	P (3 cibles)	Positif
AI	ECV vaginal	37,3	35,1	ND	36,6	P (2 cibles)	Positif
AJ	ECV vaginal	37,8	35,8	ND	ND	P (1 cible)	Positif faible
AK	GG rétropharyngiens	35,0	35,4	ND	ND	P (1 cible)	Positif faible
AL	ECV vaginal	35,4	38,2	ND	ND	P (1 cible)	Positif faible
AM	GG génitaux / rétromammaires	36,6	38,7	36,0	ND	P (2 cibles)	Positif
AN	ECV vaginal	37,9	35,5	36,4	36,6	P (3 cibles)	Positif
AO	GG iliaques	35,6	34,7	35,4	ND	P (2 cibles)	Positif

Légende : PCR-1=cible IS711 ; PCR2-1=cible IS711, PCR 2-2 = cible Bcsp31, PCR 2-3 = cible PER ; GG = ganglions ; ECV = écouvillon ; ND = non détecté ; P = Positif

Parmi ces prélèvements, le génome de *Brucella* a été détecté à partir de 5 écouvillons vaginaux (indiquant une possible excrétion intermittente par voie génitale) et 4 prélèvements de ganglions. Chaque résultat correspond à une femelle différente. Les femelles positives

étaient nées entre 2014 et 2021. Quatre femelles ont séjourné sur le site du Reposoir en 2020 (vaches AK, AL), 2021 (vache AN) ou pendant les 2 années consécutives (vache AM). Cinq femelles faisaient partie du troupeau laitier lors de la détection du foyer, dont trois ont séjourné sur le site du Reposoir en 2020. Deux vaches avaient été tarées les 26/08/2021 et 18/10/2021 respectivement (vaches AH, AJ). Enfin, il faut souligner la présence de résultats positifs chez deux génisses (vaches AN, AO). Aucun de ces animaux ne présente de réaction sérologique positive.

Chez les veaux, aucun résultat positif n'a été mis en évidence (Tableau 7).

Tableau 7 : Résultats PCR obtenus par le LNR chez les veaux euthanasiés en fonction du type de prélèvement

Type de prélèvement	Négatif	Négatif (avec légère inhibition)	Total
Ombilic	29	-	29
Ecouvillon vaginal	18	-	18
Sang	16	2	18
Total général	63	2	65

Les principaux résultats sérologiques sont présentés dans le Tableau 8. Ils indiquent la séroconversion d'une femelle, avec des résultats EAT et FC positifs (vache AQ). Une autre femelle a présenté un test EAT positif (vache AP) et un test ELISA douteux (vache L). Enfin, un groupe de femelles a présenté des résultats sérologiques négatifs, mais proches du seuil de positivité. Ces profils particuliers sont compatibles avec des femelles en cours de séroconversion compte tenu du contexte épidémiologique.

Les résultats ont été associés aux autres facteurs de risque pour la sélection des animaux présentant plusieurs facteurs de risque d'infection (voir point 3.3.3).

Tableau 8 : Liste des femelles ayant présenté au moins un test sérologique positif le jour de l'abattage ou des résultats négatifs proches du seuil de positivité (possiblement en cours de séroconversion ; tests réalisés au LNR Brucellose, ANSES)

Identification	Date de naissance	EAT	ELISA indirect	FC
AP	27/12/2017	P	103,87	16,67
AQ	08/04/2019	P	109,93	33,33
L	18/07/2019	N	117,85	0

Légende : P=positif, N=négatif, EAT= épreuve à l'antigène tamponné, ELISA= seuils >110 = douteux et >120=positif, FC=Fixation du complément (seuil de positivité=20 UI/ml)

3.3.3 Résultats complémentaires obtenus chez les vaches présentant au moins deux facteurs de risque

Un panel de 40 animaux a été sélectionné à partir des résultats précédemment présentés, afin de réaliser des analyses complémentaires (culture enrichie pendant 3 semaines). Les analyses se sont échelonnées de début juillet 2022 à fin septembre 2022 (Tableau 9). Les femelles présentant les facteurs de risque suivants ont été sélectionnées : avortement, animaux ayant été en alpage sur le site du Reposoir en 2020 ou 2021, animaux ayant reçu du colostrum de la vache infectée, résultat positif en sérologie ou biologie moléculaire.

Tableau 9 : Nombre de prélèvements analysés par la méthode de culture enrichie au LNR

Date de début de la culture enrichie	Nombre de prélèvements
05/07/2022	14
06/07/2022	14
19/07/2022	8
21/07/2022	10
01/08/2022	4
02/08/2022	8
03/08/2022	6
09/08/2022	9
10/08/2022	8
17/08/2022	10
18/08/2022	9
25/08/2022	10
26/08/2022	9
01/09/2022	20
09/09/2022	25
Total général	164

Ces analyses complémentaires n'ont pas permis d'isoler de souches bactériennes chez ces animaux, malgré les résultats positifs obtenus par PCR. Il est possible que les bactéries n'aient pas pu être revivifiées après les cycles de congélation – décongélation, ou que l'excrétion intermittente explique la difficulté d'isoler la bactérie.

4. CONCLUSIONS

Suite à la détection d'un cas index d'une vache positive, confirmé et ayant conduit à l'isolement d'une souche bactérienne de *Brucella melitensis*, une enquête épidémiologique approfondie a été menée sur l'élevage avant son abattage au titre des mesures de police sanitaire.

La bactérie *Brucella melitensis* a été isolée de deux paires de ganglions et d'un prélèvement de lait chez la vache index. Après mise sous arrêté préfectoral d'infection et abattage du troupeau, l'ensemble des animaux du troupeau a été prélevé pour détecter la présence de la bactérie par bactériologie, ou de son génome par biologie moléculaire ainsi que la présence d'anticorps dirigés contre *Brucella*. Ce travail exhaustif a représenté trois mois de travail pour le réseau des laboratoires départementaux et a mobilisé l'ensemble de l'équipe du Laboratoire National de Référence pendant six mois : les analyses réalisées à partir des animaux de l'élevage index représentent plus de 1500 bactériologies, 1500 réactions de PCR de détection et/ou de confirmation, 170 cultures enrichies, le séquençage des 3 souches isolées et plus de 660 analyses sérologiques.

Les résultats indiquent la présence de 13 bovins non négatifs :

- l'animal à l'origine des investigations (résultat sérologique positif a été confirmé par le Laboratoire National de Référence (LNR) le 19 octobre 2021 et ayant permis d'isoler la souche bactérienne et de la comparer avec des souches historiques du massif ;
- 5 animaux ont présenté un test PCR positif confirmé par 2 méthodes différentes sur deux ou trois cibles différentes, 4 autres ont présenté un résultat PCR positif faible confirmé par 2 méthodes différentes sur une seule cible. Parmi ces résultats, 5

prélèvements étaient des écouvillons vaginaux, probablement associés à une excrétion intermittente ;

- trois vaches ont présenté des réponses sérologiques non négatives (1 femelle positive en EAT et FC ; 1 femelle positive en EAT ; 1 femelle douteuse en ELISA). Compte tenu du contexte épidémiologique et des résultats sérologiques particulièrement proches des valeurs seuils, ces trois résultats sont compatibles avec ceux d'animaux infectés en début de séroconversion.

Mis à part le cas index, il n'a pas été possible d'isoler des souches bactériennes de ces différents animaux, malgré la mise en œuvre de cultures par enrichissement. Ces résultats illustrent la difficulté d'isoler cette bactérie et sont en faveur de l'utilisation combinée de la bactériologie et de la PCR, plus sensible. Dans ce cas, la confirmation des résultats sur plusieurs cibles différentes est nécessaire et a été mise en œuvre afin de limiter les défauts de spécificité.

Les résultats d'analyses ainsi obtenus indiquent une distribution limitée au sein de l'élevage (13 animaux concernés par des résultats non négatifs, dont 1 résultat positif par bactériologie et PCR, 9 résultats positifs par PCR et 3 résultats sérologiques positifs) : ils apparaissent compatibles avec un scénario d'infection brucellique secondaire des animaux par la vache index, probablement contaminée sur l'alpage en 2020 et excrétrice intermittente à partir de son premier vêlage en septembre 2021.

Il faut également noter que certains animaux réformés et abattus après la mise sous surveillance (deux vaches et cinq veaux) n'ont pas fait l'objet de prélèvements pour analyses lors de la mise sous surveillance. Il est donc impossible de se prononcer sur le statut de ces animaux vis-à-vis de l'infection par *Brucella* au moment de leur réforme ou de leur abattage : le décompte des 13 animaux non négatifs est donc une identification *a minima*. La réalisation de prélèvements chez des animaux réformés ou abattus aurait dû être mise en œuvre dès le début de la suspicion. En outre, les investigations réalisées chez les vaches ayant avorté en 2020 et 2021 avant la détection du foyer ne sont pas connues. Dans ce cas, il convient de souligner l'intérêt des démarches de diagnostic différentiel, comme le dispositif OSCAR permettant la réalisation d'analyses complémentaires en cas d'avortements.

Enfin, la présence de plusieurs élevages en lien épidémiologique avec le foyer, situés dans plusieurs départements interroge les pratiques locales d'élevage qui consistent à mettre des génisses en pension. Elles entraînent des mouvements supplémentaires de génisses dans un contexte épidémiologique défavorable (présence de bouquetins et chamois infectés dans les zones d'alpage du Bargy), dans une zone géographique où les productions de fromages au lait cru sont très répandues et accroissent de fait le nombre d'élevages qu'il est nécessaire de mettre sous surveillance en cas de suspicion.

Dr Roger Genet

LISTE DES ABBREVIATIONS

EAT : épreuve à l'antigène tamponné

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay / test immunoenzymatique

FC : fixation du complément

LDA : laboratoire départemental d'analyse

LNR : laboratoire national de référence

LVD : laboratoire vétérinaire départemental

PCR : polymérase chain réaction / réaction d'amplification en chaîne par polymérase

MOTS-CLÉS

Brucellose bovine, bouquetin des Alpes, *Brucella melitensis*

Bovine brucellosis, alpine ibex ; *Brucella melitensis*

BIBLIOGRAPHIE

Bounaadja L, Albert D, Chénais B, Hénault S, Zygmunt MS, Poliak S, Garin-Bastuji B. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcsp31 and per target genes. *Vet Microbiol.* 2009 May 28;137(1-2):156-64. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.023. Epub 2009 Jan 4. PMID: 19200666

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2022). Extrait de la note d'appui scientifique et technique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail du 12 octobre 2022 relatif aux « investigations épidémiologiques suite à la détection d'un foyer de brucellose bovine en Haute-Savoie ». (saisine 2021-SA-0203). Maisons-Alfort : Anses, 21 p.

REMERCIEMENTS

Etape	Institution	Personnes impliquées
Analyses de laboratoire Appui scientifique et technique Préparation des protocoles Prélèvements à l'abattoir Transports de matériel biologique / tri préparation des prélèvements Rédaction de la note	ANSES LNR Brucellose, Laboratoire de la Santé Animale	Marie-France Devaux (Assistante), Rébiha Mesbah, Vincent Sester (Fabrication milieux de culture) Fathia Petot-Bottin Ludivine Perrot, Maëline Ribeiro, Alexandre Dremeau (Experts Techniques), Luca Freddi, Acacia Ferreira Vicente, Guillaume Girault, Vitomir Djokic, Liliia Kharchewska Weis, Claire Ponsart (Equipe Scientifique)
Enquêtes épidémiologiques Gestion du foyer	DGAL, Bureau de la Santé et Protection Animale	Clémence Bourely, Marie-Bénédicte Peyrat
Enquêtes épidémiologiques Gestion du foyer Prélèvements à l'abattoir	DDPP 74	Hélène Allard, Chantal Baudin, Aline Depecker, Guillaume Nieuwjaer, Sébastien Riu, Marie Tesseydre
Prélèvements à l'abattoir	DRAAF	Benhabria Kamel, Rémi Stoltz,
Analyses de laboratoire	LDA01	Sophie GRANGER Florence VURBIER
Analyses de laboratoire	LDA13	Baud Hervé, Senelle Magali Guildoux Hélène
Analyses de laboratoire	LDA15 - TERANA	Émilie Dracon, Céline Poirier Johnny Poirier, David Weinberg
Analyses de laboratoire	LDA31 - EVA	Florence Bennasar, Lucille Mouyen
Analyses de laboratoire	LDA35 - LABOCEA Fougères	Julie Brouillard et Elodie Bertel-Chevalier (Secrétariat Technique) Emmanuelle Poitou, Charly Hamelin, Antoine Datin, Euloge Souroungba, Cyril Delory, Jean-Claude Pigné, Guillaume Lequeux (Service Microbiologie Vétérinaire)
Analyses de laboratoire Transports de matériel biologique / tri préparation des prélèvements	LDA73 - Laboratoire de la Savoie	Séverine Pasquier, Céline Ruat Marie-Noëlle Barthe
Analyses de laboratoire	LDA81 - Public Labos	Dv Régis Duquesnel (Expert Santé Animale), Pierre Marc (Technicien Santé Animale), Thierry Calvet (Technicien Santé Animale)

ANNEXE 1 : PROTOCOLE MIS EN ŒUVRE PAR LE RESEAU DES LABORATOIRES AGREES POUR LES PRELEVEMENTS COLLECTES DANS LE CADRE DE L'ABATTAGE DU FOYER DE BRUCELLOSE BOVINE A *B. MELITENSIS*

1-Prélèvements réalisés à l'abattoir

Pour chaque animal abattu, la liste des prélèvements est listée dans le tableau 1. Chaque prélèvement est identifié comme suit : identification de l'animal (via numéro d'ordre d'abattage), identification du prélèvement. Les étiquettes ont été préparées à l'avance par l'abattoir. Les échantillons ont été conditionnés en sachets individuels (1 sachet par animal).

Les prélèvements réalisés sont les suivants : paire de ganglions rétro-pharyngiens (RETRO), paire de ganglions génitaux ou rétro-mammaires (GEN), paire de ganglions iliaques (IL), rate (RATE), utérus (UT) ou testicules (T), 2 écouvillons génitaux (EG) et prise de sang (tube citrate et tube sec). La référence suivante a été utilisée pour les écouvillons génitaux : Copan modèle 480CE eSwab™ suite à la publication récente du LNR Brucellose (DOI: <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00728-21>), indiquant que ce modèle est le meilleur choix en cas de congélation nécessaire des écouvillons.

Après prélèvement, les échantillons ont été maintenus à température de 5 ± 3 °C et transférés au LVD73 pour congélation, répartition et envoi aux laboratoires départementaux agréés par UN3373.

Tableau 1 : Liste des prélèvements à réaliser à l'abattoir

Type animal	Prélèvements (identifiant)	Conteneur
Adultes, génisses et veaux de plus de 6 mois	Sang Paire de ganglions rétro-pharyngiens (RETRO) Paire de ganglions iliaques (IL) Paire de ganglions génitaux (GEN) 2 Ecouvillons génitaux (EG) Rate (RATE) Utérus (UT) ou Testicules (T)	Tube citrate + tube sec Falcon 50 ml Flacon carré 250 ml Flacon carré 250 ml Copan (480CE eSwab™) Flacon carré 250 ml
Veaux de moins de 6 mois	Sang Ombilic 1 Ecouvillon génital (EG)	Tube citrate + tube sec Flacon carre 250 ml Copan modèle 480CE eSwab™

2-Tri des prélèvements et envoi au laboratoire destinataire

Les prélèvements ont été congelés et stockés au LDA73, avant d'être envoyés aux laboratoires départementaux pour mise en culture.

Tableau 3 : Répartition des prélèvements de bovins en fonction des disponibilités du réseau des laboratoires agréés pour la bactériologie brucellose

Laboratoire	Nombre de bovins pouvant être analysés en 10 jours	Quantité envoi	TOTAL pour 10 j (avec CO ₂)
LDA01	5 bovins par jour, 2 jours (avec CO ₂) 5 bovins par jour, 5 jours (sans CO ₂ dépendance)	20	10
LDA13	5 échantillons par jour, 5 jours Extraction	30	25
LDA15 - TERANA	1 bovin par jour, 1 jour (avec CO ₂) 2 bovins par jour, 1 jour (sans)	10	1
LDA31	3 bovins par jour, 5 jours (avec CO ₂ dépendance) 6 bovins par jour, 5 jours	50	15
LDA35 - LABOCEA	5 à 8 bovins par jour, 5 jours (25 à 40 par semaine)	55	25
LDA73	3 bovins par jour, 5 jours (avec CO ₂ dépendance)	20	15
LDA81 - Public labos	3 animaux, 1 jour	6	3
TOTAL	Période minimale de 10 jours	191	99

2-Traitement des échantillons pour isolation et identification de la *Brucella*

La Brucellose est une zoonose. La dose infectieuse est faible et le risque de transmission par aérosol est élevé. Toutes les étapes de traitement, de culture ainsi que les étapes d'extraction avant inactivation et lyse bactérienne doivent être réalisées en zone confinée de niveau 3, sous poste de sécurité microbiologique (PSM). Les équipements et les protocoles utilisés doivent être sécurisés (centrifugeuses, etc.) et conformes à la réglementation MOT.

INTRODUCTION :

Les échantillons sont préparés et traités comme prévu dans la norme AFNOR NF U 47-105.

La recherche des bactéries du genre *Brucella*, autres que *B. ovis* et *B. canis* s'effectue par culture sur au moins un milieu solide sélectif (milieu de Farrell) incubé simultanément **en atmosphère normale et en atmosphère enrichie en CO₂**.

Une fois les ganglions réceptionnés, ils doivent être traités le plus rapidement, au maximum dans les 24 heures après réception. Sinon, ils doivent être congelés à la température inférieure ou égale à -16°C.

L'identification présomptive des bactéries du genre *Brucella* spp. est effectuée sur la base des épreuves suivantes :

- croissance sur milieu de Farrell ;
- caractère lisse ou rugueux ;
- agglutination par le sérum monospécifique anti-A ou anti-M ;
- caractères oxydase + et/ou uréase +.

REACTIFS ET MATERIELS :

Les produits suivants sont utilisés spécifiquement pour la mise en place des analyses.

Diluants ->

- PBS

Milieux de culture ->

- Milieu solide sélectif : Farrell en boîtes de Pétri, conservé jusqu'à 8 jours maximum à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$;
- Milieu solide non sélectif : Blood Agar Base n°2 + 5% de sérum de cheval (BS) en boîtes de Pétri ou en pente en tubes bouchés. Blood Agar Base n°2 (BAB2) en boîtes de Pétri ou en pente en tubes bouchés.
- Milieux prêts à l'emploi Columbia 5% sang de cheval.

Autres réactifs ->

- Solution mère de Cristal violet;
- Solution de N.N. diméthyl p.phénylène diamine (sel hémi-oxalate) pour l'épreuve à l'oxydase (SIGMA-ALDRICH ref. 409758);
- Milieu à l'urée (équivalent Christensen);
- Sérums monospécifiques anti-A, anti-M ou sérum anti-S et sérum de contrôle négatif ;
- Tampon de lyse des globules rouges :
 - 90 ml de NH_4Cl 0,16 M (8,3 g/l)
 - 10 ml de Tris base 0,17 M (pH 7,65) :
 - > 20,6 g de Tris base
 - > 900 ml d' H_2O
 - > Ajuster à pH 7,65 avec de l'HCl concentré
 - > qsp 1000 ml avec de l' H_2O (ultrapure stérile).
 - Ajuster à pH 7,2 avec HCl concentré
- Souches témoins:
 - *B. melitensis* biovar 1 (16M ATCC 23456) : témoin positif « + » pour le test à l'urée et l'oxydase et comme témoin « A- M+ » pour l'agglutination ;
 - *B. suis* biovar 2 (Thomsen, ATCC 23445) : témoin positif « + » pour l'urée.

Matériels ->

- Etuve préréglée à $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et entre 5 et 10% de CO_2 ;
- Etuve préréglée à $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en air ;
- Enceinte réfrigérée à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$;
- Enceinte réfrigérée au température inférieur ou égale à -16°C ;
- Dispositif de broyage de type péristaltique ou dispositif équivalent (Exemple IKA ULTRA-TURRAX) ou Stomacher) ;
- Loupe binoculaire avec, si possible, éclairage par transilluminations obliques ;
- Microscope avec objectif à immersion et à grossissement adéquat ;
- Bain marie thermostaté.

PREPARATION DES ECHANTILLONS :

Chaque dossier fait l'objet de l'ouverture d'une fiche de paillasse spécifique pour la traçabilité des résultats, et chaque échantillon est traité indépendamment.

De manière exceptionnelle, en raison du grand nombre de prélèvements, tous les échantillons y compris les écouvillons génitaux et le sang (tube citrate), arriveront congelés au laboratoire. Il est essentiel de les décongeler pour les traiter. Pour ces deux prélèvements, il convient donc de retirer le logo COFRAC.

Nœuds lymphatiques et/ou organes

Les nœuds lymphatiques et/ou organes doivent faire l'objet d'un broyage fin, le plus homogène possible, afin de permettre l'ensemencement et de faciliter la lyse en vue d'une extraction d'ADN. Si nécessaire, ajouter du PBS, dans une proportion de 1/2 à 1/5ème de façon à obtenir une suspension ni trop dense ni trop liquide pour l'ensemencement. Prédécouper le prélèvement au moyen de ciseaux ou d'un bistouri stérile afin d'obtenir plus rapidement une suspension homogène lors du broyage.

Écouvillons génitaux

Les écouvillons utilisés (modèle Copan modèle 480CE eSwab™) contiennent déjà 1 ml de milieu de transport. Donc, il n'est pas nécessaire d'ajouter du PBS supplémentaire pour la réhydratation de l'échantillon. Avant ensemencement des boîtes, il est nécessaire de vortexer l'écouvillon pendant 30 sec afin de bien homogénéiser la suspension.

Sang

Une fois le tube de sang décongelé, l'état de conservation de l'échantillon sera noté. Si le sang n'est pas hémolysé, il est traité préférentiellement de la façon suivante :

- Transvaser le sang dans des tubes à centrifuger coniques de type Falcon de 15 ml ;
- Centrifuger 15 min à environ 1000 g sans frein ;
- Oter le surnageant par aspiration (ne jamais retourner le tube) ;
- Ajouter environ 10 ml de tampon de lyse ;
- Agiter sur Vortex puis laisser agir 10 minutes à température ambiante ;
- Centrifuger 15 min à environ 2000 g avec frein ;
- Oter le surnageant par retournement du tube ;
- Recommencer à partir de l'étape 4 jusqu'à l'obtention d'un surnageant et d'un culot clair ;
- Suspendre le culot clair dans au moins 1 ml de PBS (volume exact dépendant du volume initial de sang et des analyses à mettre en œuvre, bactériologie et/ou PCR).

Si le sang décongelé est hémolysé et/ou si il n'est pas possible de mettre en œuvre le protocole décrit ci-dessus, procéder avec l'ensemencement direct du sang total sans traitement. Faire un/deux refoulements avec la pipette pour homogénéiser la suspension.

ENSEMENCEMENT DES GELOSES:

Nœuds lymphatiques et/ou organes

Pour la mise en culture du broyat, ensemer 4 boîtes de Farrell à raison de 100-200 µL de l'échantillon.

Écouvillons génitaux

Pour la mise en culture des écouvillons, frotter directement la tête de l'écouvillon à la surface de 4 boîtes de Farrell (après chaque boîte, réhydrater l'écouvillon dans milieu de transport). De plus, pour améliorer la sensibilité, ensemer pour le même animal 4 boîtes 100 µl de milieu de transport.

Sang

Ensemer immédiatement au moins 0,2 ml du culot ou du sang total sur 4 boîtes de BS. Congeler à - 20°C le restant de la suspension de culot, en sauvegarde pour extraction d'ADN.

CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS ET BROYATS :

Dans un tube Eppendorf de 5 ml, conserver entre 4 et 5 ml de broyat pour envoi au LNR.

De la même façon, dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, conserver 500 µl du sang et/ou de culot ainsi que du milieu de conservation d'écouvillon pour extraction de l'ADN total.

Tous les échantillons (broyat et organes) sont conservés (si la quantité initiale le permet) à une température ≤ -16°C au moins jusqu'à la fin de l'analyse. Leur destruction éventuelle ou l'envoi est décidé en accord avec le LNR, en fonction des résultats obtenus.

INCUBATION ET LECTURE DES GELOSES :

Incuber à 37± 2°C, 2 géloses Farrell et/ou BS en air et 2 géloses Farrell et/ou en CO₂ si l'espace le permet. Dans le cas contraire, l'incubation pourra se faire en air uniquement.

Les boîtes sont examinées régulièrement jusqu'au 10^{ème} jour. Toutes les colonies translucides de forme ronde ressemblant à *Brucella* (figure 1) sont repiquées sur gélose BS (ou gélose Farrell si la colonie suspecte est voisine de contaminants) et incubées en CO₂ ou en air pour leur isolation. L'absence de colonies suspectes après 10 jours de culture est considérée comme un résultat négatif.

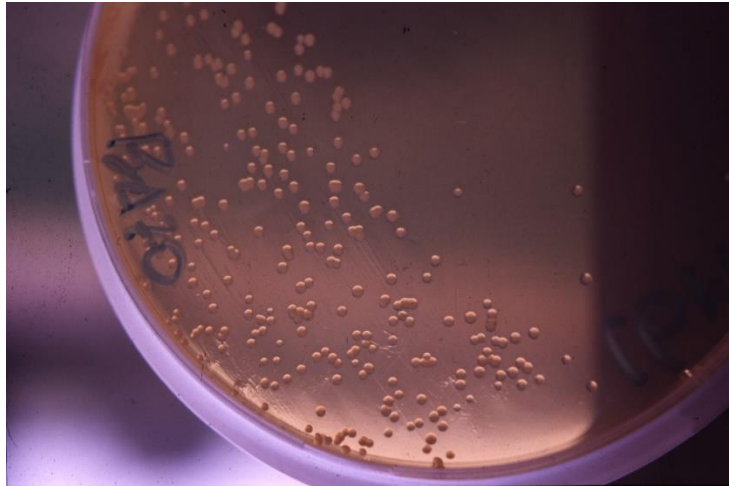


Figure 1 : Colonies de *Brucella melitensis* après 5 jours d'incubation
(source LNR Brucellose, ANSES)

IDENTIFICATION DU GENRE BRUCELLA :

Toute souche isolée devra être testée pour prouver l'appartenance au genre *Brucella* comme prévu dans la norme AFNOR NF U 47-105. L'identification présomptive des bactéries du genre *Brucella* spp. est effectuée sur la base des épreuves suivantes :

- Détermination du caractère morphologique lisse ou rugueux des colonies ;
- Agglutination sur lame par un sérum hyper-immun anti-*Brucella* ;
- Epreuve de l'oxydase ;
- Epreuve de l'uréase.

CONSERVATION ET ENVOI DES SOUCHES :

Une fois que l'appartenance au genre *Brucella* de la souche isolée est confirmée, il est impératif de l'envoyer au laboratoire de référence pour confirmation du genre *Brucella* et identification de l'espèce et du biovar.

Le transport des souches doit être fait en triple emballage réglementaire UN2814 en respectant la réglementation MOT.

ANNEXE 2 : RESULTATS DES ANALYSES DES BOVINS EN LIEN EPIDEMIOLOGIQUE AVEC LE FOYER, SUITE A LEUR ABATTAGE DIAGNOSTIQUE

Identification animal (EDE)	Bactériologie (LDA Savoie)						Sérologie (LDA Savoie)
	GG rétropharyngiens	GG iliaques	GG génitaux / mammaires	GG trachéobronchiques	ECV vaginal	Sang	EAT – ELISA – FC
1	ININT	N	N	N			N
2					ININT	N	
3					ININT	N	
4					ININT	N	
5	N	N	N				
6	N	N	N			N	
7					N		
8	N		N				
9		N	N	N		N	

Légende : GG= ganglions, ININT= Ininterprétable, N= négatif