

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



**FACULTÉ DE MÉDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTO- STOMATOLOGIE**

Année Universitaire 2010 – 2011

Thèse N° \_\_\_\_\_/P

**SEROPREVALENCE DE LA BRUCELLOSE HUMAINE DANS  
LA ZONE PERI-URBAINE DE LA REGION DE MOPTI.**

**THESE**

*PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE \_23\_ / \_04\_ / 2011*

*DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO- STOMATOLOGIE*

*PAR MAMA DITE DIALLA SIDIBÉ*

*POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLÔME D'ÉTAT).*

**JURY**

***Président : Pr Flabou BOUGOUDOGO***

***Membres : Dr Samba SANGARE***

***Mr Seydou DIARRA***

***Co- directeur : Dr Boubou TAMBOURA***

***Directeur : Pr Souleymane DIALLO.***

# ***DEDICACES***

## **DEDICACES**

**Au nom d'ALLAH** le tout Puissant, le Miséricordieux, louange et gloire à Toi qui m'a permis de mener à bien ce travail et voir ce grand jour, car nous n'avons de savoir ni de pouvoir que ce Tu nous as appris et donné.

**Au Prophète MOHAMED** ; salut et paix sur lui.

**A mon père : feu Fousseyni SIDIBE,**

Grâce à toi j'ai appris le sens de la dignité, de l'honneur, le respect et de la probité.

Jamais je ne saurais te rendre un hommage à la hauteur de tes efforts consentis. Merci père pour tout ce que tu as fait pour nous. Je prie nuit et jour pour que ALLAH t'accorde sa paix éternelle.

**A ma mère : feue Djénèbou Coulibaly,**

Patiente, tolérante, optimiste. Ce travail est le couronnement de ta souffrance. Tu m'a toujours dis que chaque chose a son temps. J'aurais tant voulu que tu sois là aujourd'hui, mais LE TOUT PUISSANT en a voulu autrement.

Dors en paix chère mère.

**A ma tante : Namissa Coulibaly**

Tu as été l'initiatrice, la maîtresse d'œuvre de ce chemin parcouru. Ton amour, son soutien, tes rigueurs pour l'éducation, tes sacrifices et peines consentis ont fait de moi ce dont je suis.

Puisse le Miséricordieux te garder aussi longtemps que possible à nos côtés. Tout l'honneur est à toi.

**A tante Diamy :**

Chère tante, ce travail est le fruit de ton soutien, reçois en ce lieu ma profonde gratitude.

**A mon oncle: Lamine Diarra**

Les mots me manquent pour exprimer tout ce que je ressens cher oncle. Tu as été comme un père pour nous. Tes qualités humaines font de toi une personne exemplaire.

Je te prie de recevoir toute ma reconnaissance.

**A tous mes oncles et tantes:** Boubacar Sidibé, Abdoulaye Sidibé, Adama Coulibaly, Ali Coulibaly, Mariam Coulibaly et tous les autres,

Sans vos conseils, vos encouragements, vos sacrifices et vos prières ce travail n'aurait pas vu le jour. Recevez ma profonde gratitude.

**A mes grands-parents :**

Ce travail est le résultat de votre bénédiction et prière.

**A mes frères :**

Ousmane, Bany, Tièkoro, Moriba,

Que la fraternité reste toujours un lien sacré pour nous. Merci pour votre soutien moral.

**A tous mes cousins et cousines :**

Votre amour et encouragement ne m'ont jamais fait défaut.

Vous avez toujours été présents à mes côtés. Puisseons-nous demeurer unis pour le restant de notre existence.

**A mon époux : Dr TELLY Nouhoum**

Tu m'as toujours stimulé dans la poursuite du succès. Les mots me manquent

pour t'exprimer tout ce que j'ai au fond du cœur. Je ne peux que te dire merci pour tes efforts et encouragements pour ce travail qui est d'ailleurs à ton honneur.

**A toute la famille TELLY,**

Votre compréhension et votre soutien ne m'a jamais fait défaut.

Soyez-en remercier.

A tout ce de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

# ***HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY***

**A notre Maître et président du jury: Pr FLABOU BOUGOUDOGO**

- **Maître de Conférences Agrégé en Bactériologie et Virologie à la FMPOS,**
- **Directeur Général de l'Institut National de Recherche en Santé Publique.**
- **Chevalier de l'Ordre du Mérite de la Santé**

Nous sommes heureux de l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Permettez Monsieur le Président de souligner vos qualités de rigueur scientifique, votre disponibilité, votre dévouement pour le travail bien fait.

Permettez nous de vous exprimer ici notre profonde gratitude.

**A notre maître et membre du Jury :**

**Docteur Samba Adama SANGARE**

- **Pharmacien chercheur au laboratoire de bactériologie CVD - Mali (Centre pour le Développement des Vaccins - Mali) du CHU Gabriel Touré ;**
- **Assistant en bactériologie et virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d’Odonto-Stomatologie (FMPOS).**

Honorable Maître, votre appui a été d’un grand apport dans l’élaboration de ce document ;

Votre simplicité, votre rigueur, votre disponibilité, et votre esprit communicatif font de vous un Maître admiré de tous ;

Nous apprécions à sa juste valeur, l’intérêt avec lequel vous avez accepté de juger cette thèse.

Soyez rassuré, cher Maître de notre profond attachement aux valeurs qui vous sont chères tel que le travail bien fait et le courage.

Veillez trouver ici notre profond respect et nos sincères remerciements.

**A notre Maître et membre du jury: Mr Seydou DIARRA**

- **Spécialiste en bactériologie**

- **Chef du Département de Bactériologie de l'Institut National de Recherche en Santé Publique.**

Cher maître c'est un signe d'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger à ce jury de thèse.

Vos qualités d'homme de science très méthodique, votre dévouement, votre courage et votre sens élevé du travail bien fait font de vous un homme très sollicité.

Vos remarques, vos suggestions et vos critiques contribueront à l'amélioration de ce travail.

Soyez rassurer cher maître de notre sincère reconnaissance.

**A NOTRE MAÎTRE ET CO- DIRECTEUR DE THÈSE**  
**Dr Boubou TAMBOURA,**

- **Pharmacien biologiste, Chef du Laboratoire de Microbiologie du CVD/Mali**

Cher Maître, tout au long de notre travail, nous avons admiré vos qualités humaines. Votre simplicité, votre humilité, votre disponibilité constante, votre dynamisme et votre rigueur scientifique font de vous un maître digne

d'admiration.

Nous sommes très honorés pour votre confiance, en nous proposant ce travail.

Nous voudrions vous réitérer cher maître, l'expression de notre profonde gratitude et notre indéfectible disponibilité.

**A NOTRE MAÎTRE ET DIRECTEUR DE THÈSE**

**Professeur Souleymane Diallo ;**

**Pharmacien biologiste, Colonel des Forces Armées du Mali.  
Chef du département médico-technique du CHU Gabriel TOURÉ ;  
Maître de conférences en bactériologie et virologie à la Faculté de  
Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS).  
Directeur de l'Institut Charles MERIEUX.**

Cher Maître, nous ne cesserons jamais de vous remercier pour la confiance que vous nous avez placée en encadrant ce travail. Les mots nous manquent pour exprimer combien cela fut un plaisir de travailler avec vous.

Homme de principe votre simplicité, votre rigueur, votre disponibilité et votre rigueur scientifique font de vous un maître exemplaire

Veillez agréer cher Maître l'expression de notre grande admiration et de notre profonde reconnaissance.

# **Plan**

**INTRODUCTION**

**OBJECTIFS**

**GENERALITES**

**METHODOLOGIE**

**RESULTATS**

**COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS**

**CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**RESUME**

**Annexes**

## Sommaire :

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
<b>1. OBJECTIFS.....</b>	<b>14</b>
1.1. Objectif général.....	14
1.2. Objectifs spécifiques.....	14
<b>2. GENERALITES.....</b>	<b>16</b>
Historique.....	16
2.1. Définition et taxonomie.....	16
2.2 Epidémiologie.....	17
2.3. Etude bactériologique.....	18
2.3.1 Caractères bactériologiques.....	18
2.3.2 Transmission.....	20
2.4. Caractères cultureux.....	21
2.4.1 Conditions de croissance.....	21
2.4.2 Exemple de milieu de croissance : Gélose brucella.....	22
2.5. Caractères biochimiques.....	25
2.6. Structure antigénique.....	26
2.7. Physiopathologie et Immunité.....	26
2.8. Manifestations cliniques.....	27
2.8.1 Incubation.....	28

2.8.2 forme aigue.....	28
2.8.3 Phase secondaire.....	29
2.8.4 Phase secondaire focalisée.....	29
2.8.5 Brucellose chronique.....	29
2.9. Diagnostic Biologique.....	30
2.9.1 Prélèvement.....	30
2.9.2 Examen direct.....	30
2.9.3 Examen indirect.....	31
2.9.4 Action des colorants.....	32
2.9.5 I D R à la Mélitine.....	32
2.10. Traitement.....	33
2.11. Mesures prophylactiques.....	35
<b>3. METHODOLOGIE :.....</b>	<b>37</b>
3.1. Cadre de l'étude.....	37
3.2. Période d'étude.....	39
3.3. Type d'étude.....	39
3.4. Population d'étude.....	39
3.5. Critères d'inclusion.....	39
3.6. Critères de non inclusion.....	40
3.7. Collecte des données.....	40

3.8. Procédure de laboratoire.....	41
3.8.1 Echantillonnage.....	41
3.8.2 Protocole et méthode du test au Rose Bengale.....	43
3.8.3 Protocole et méthode du test ELISA : BRUCELLACAPT.....	44
3.8.4 Méthode de la biologie moléculaire.....	46
3.9. Les variables étudiés.....	53
3.10. Gestion des données.....	54
3.11. Aspects éthiques.....	54
<b>4. RESULTATS.....</b>	<b>56</b>
4.1. Présentation des données sociodémographiques.....	56
4.2. Présentation des résultats analytiques.....	62
<b>5. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>71</b>
<b>6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>79</b>
<b>8. RESUME.....</b>	<b>83</b>
<b>9. ANNEXES.....</b>	<b>87</b>

## **Sigles et Abréviations :**

**CO<sup>2</sup>:** Dioxyde de carbone

**VS :** Vitesse de Sédimentation

**IgM:** Immunoglobuline M

**IgG:** Immunoglobuline G

**IgA:** Immunoglobuline A

**EAT:** Epreuve de l'antigène tamponné

**CNAM:** Centre National d'Appui à la Lutte contre la Maladie

**CVD:** Center for Vaccin Development (Centre pour le développement des Vaccins).

**CScm:** Centre de Santé communautaire

**UV:** Ultra Violet

**ADN:** Acide Desoxyribonucléique

**PCR:** Polymerase by chain reaction

**TAE:** Tris-acetate-EDTA

**RB:** Rose Bengal

**CS Réf :** centre de santé de référence

**mL :** millilitre

**µL :** microlitres

**mM :** milli Molaire

## Liste des figures :

<u>Figure 1</u> : David BRUCE.....	10
<u>Figures 2 et 3</u> : A gauche, un fœtus de bœuf infecté par <i>B abortus</i> et à droite un mouton mort d'une infection à <i>B melitensis</i> .....	20
<u>Figure4</u> : Aspect des colonies de <i>Brucella</i> sur une gélose chocolat.....	22
<u>Figure5</u> : test d'oxydase positif d'une colonie de <i>Brucella</i> .....	25
<u>Figure6</u> : Urée positive à <i>Brucella</i> après 24h d'incubation.....	25
<u>Figure7</u> : les principaux foyers Brucelliques de l'homme.....	27
<u>Figure8</u> : coloration de Gram à partir d'un hémogramme positive à <i>Brucella</i> ...	30
<u>Figure9</u> : Antibiogramme d'une culture de <i>B melitensis</i> .....	33
<u>Figure10</u> : test au Rose Bengale positif à gauche (présence agglutination) et négatif à droite.....	44
<u>Figure 11</u> : un exemple de photo de gel que nous avons fait après l'amplification.....	53

## Liste des graphiques et tableaux

### Graphiques

<u>graphique 1</u> : Répartition des participants par tranche d'âge.....	56
<u>graphique2</u> : Répartition des participants selon le sexe.....	57
<u>Graphique 3</u> : Répartition de la population selon la consommation du lait ou produits laitiers.....	61

### Tableaux :

<u>Tableau I</u> : Hôtes préférentiels selon l'espèce.....	19
<u>Tableau II</u> : Différents volumes pour le mélange mixte.....	50
<u>Tableau III</u> : Programmation du thermocycleur.....	51
<u>Tableau IV</u> : Répartition de la population selon le sexe .....	56
<u>Tableau V</u> : Répartition de la population selon le lieu de résidence.....	58
<u>Tableau VI</u> : Répartition de la population selon la profession.....	59
<u>Tableau VII</u> : Signes cliniques fréquemment évoquées par les volontaires.....	60
<u>Tableau VIII</u> : Répartition de la population selon les résultats du test rose Bengale. ....	62
<u>Tableau IX</u> : Répartition des cas positifs au Rose Bengale en fonction du sexe.....	63
<u>Tableau X</u> : Répartition des cas positifs au Rose Bengale par tranche d'âge... ..	64
<u>Tableau XI</u> : Répartition des cas positifs au Rose Bengale par profession.....	65
<u>TableauXII</u> : Répartition des cas positifs au Rose Bengale selon la consommation du	

lait et des produits laitiers.....66

Tableau XIII: Résultat du test d'immunocapture Brucellacapt sur les cas positifs au Rose Bengale.....67

Tableau XIV: Résultat de la PCR sur les cas positifs du Rose Bengale.....68

Tableau XV: Répartition des cas positifs à la PCR selon l'espèce.....69

# ***INTRODUCTION***

## **INTRODUCTION:**

La brucellose, également appelée fièvre de Malte, fièvre Sudéroalgique ou fièvre ondulante est une anthroponose due à des coccobacilles du genre *Brucella*.

Malgré les diverses mesures de lutte prises dans de nombreux pays, la brucellose humaine et animale ne semble pas régresser dans le monde, mais au contraire elles tendent à prendre de l'importance surtout dans les pays en voie de développement. Les pays qui paraissaient indemnes ou presque, se révèlent infectés lorsqu'on procède à un dépistage systématique de la maladie. D'autres qui ont jugulé la maladie aux prix d'efforts sanitaires et économiques importants doivent poursuivre ces efforts s'ils veulent empêcher le retour de l'infection. Cette situation est doublement préoccupante, puisque la brucellose est à la fois une maladie humaine sévère qui retentit sur la santé publique et une maladie animale dont les conséquences économiques sont loin d'être négligeables [1,2].

Si la brucellose humaine n'est pas mortelle depuis l'invention des antibiotiques, elle demeure une maladie grave, longue et pénible (avortements répétés, infertilités, épididymites, maux de tête, fatigue extrême et poussée de fièvre) [3].

Au Mali, plusieurs chercheurs ont déjà travaillé sur cette maladie. En 1982, Tasei et collaborateurs ont obtenu une prévalence de 24,4% dans la région sahélienne du Gourma, montrant la nécessité d'un programme national de lutte contre la brucellose [4]. En 1994, Tounkara et collaborateurs ont obtenu une prévalence de 45% chez les bovins dans la région de Ségou, augmentant ainsi le risque de la transmission de la maladie à l'homme [5].

Des études plus récentes en 2004 sur la brucellose humaine et bovine dans la région de Ségou ont donné une prévalence de 1,24% chez les professionnels de l'élevage et 10,25% chez les bovins [6].

Il est difficile de connaître exactement l'importance de la brucellose humaine dans nos pays. Nombreux sont les pays où la brucellose humaine est mal connue des médecins et donc non diagnostiquée. Les formes inapparentes de la maladie sont fréquentes, il arrive également souvent que la brucellose aigüe soit confondue avec une autre infection et qu'un traitement par un antibiotique donné en aveugle, estompe les signes de la maladie. Ceci explique qu'on observe de plus en plus de brucelloses chroniques évoluant chez les sujets pour lesquels on n'avait pas la notion de brucellose aigüe antérieure.

La brucellose a une répartition mondiale avec une prédominance dans le bassin méditerranéen, l'Asie de l'ouest, le Moyen-Orient, l'Amérique du sud, l'Amérique centrale et l'Afrique noire [7].

En plus du problème de santé, la brucellose pose aussi des problèmes d'ordre socio-économique. A cet effet, l'incapacité prolongée de travailler pendant la durée de la maladie et la perte de salaire pendant ce temps sont d'une grande importance mais aussi les coûts pour le traitement médical (hôpital, médicaments) constituent de lourds fardeaux [8].

Le lait et les produits laitiers constituent un facteur de risque de transmission de la brucellose. Au Mali, une étude a révélé en 2002 (Bonfoh et col.) que les anticorps anti-*Brucella* étaient présents dans 30% des échantillons de lait de vache. Le lait constitue un aliment important et il est consommé régulièrement par la plus part de la population [9]. Les conditions de transport et de stockage de ces produits ne sont pas toujours les meilleures [11, 12].

De tout ce qui précède, émergent des doutes médicaux sur la consommation de lait et des produits laitiers au Mali. Dans ces circonstances, ce ne sont pas seulement les diarrhées causées par les toxines qui sont d'une grande importance mais aussi les infections bactériennes fébriles comme les zoonoses classiques dont la brucellose entre autres.

Tout ceci nous amène à nous poser un certain nombre de questions à propos de cette infection : cette zoonose existe-t-elle au Mali ? Si oui, quelle est la prévalence de la maladie humaine dans une zone d'élevage comme Mopti ? Quelle (s) est (sont) les espèces de *Brucella* prédominantes?

# ***OBJECTIFS***

## **1. OBJECTIFS:**

### **1.1. Objectif général:**

- Déterminer la prévalence de la brucellose humaine dans la zone péri-urbaine de la ville de Mopti.

### **1.2. Objectifs spécifiques:**

- Déterminer la séroprévalence de la brucellose humaine dans la population péri-urbaine de la ville de Mopti.
- Déterminer les différentes espèces de *Brucella* isolées dans la zone périurbaine de Mopti par la biologie moléculaire : PCR (Polymerase by Chain Reaction).

# ***GENERALITES***

## 2. GENERALITES

### HISTORIQUE:

La brucellose a été décrite pour la première fois en 1861 sur l'île de Malte par un médecin Anglais nommé Marston. En 1887, David Bruce isola la bactérie responsable de la maladie dans la rate d'un soldat, le germe eut le nom de *Micrococcus melitensis*. En 1897, la présence d'anticorps agglutinants dans le sérum des malades fut démontrée par Wright. En 1905, Zamitt en voulant étudier la maladie sur le modèle animal de la chèvre découvrit qu'elles étaient toutes positives au test de Wright et que la brucellose était donc une anthroponose [13].



**Figure 1 : David BRUCE**

### 2.1. Définition et taxonomie:

#### 2.1.1 Définition:

La brucellose, est une anthroponose (maladie commune à l'homme et aux animaux) due à des coccobacilles du genre *Brucella* [14, 15].

### 2.1.2 Taxonomie:

Cette bactérie appartient à :

- Embranchement des *alphas Proteobacteria* (sous groupe a2)
- Ordre des *Rhizobiaceae*
- Famille des *Brucellaceae*
- Genre *Brucella*

### 2.2. Epidémiologie :

Le réservoir est essentiellement animal. Considérée comme maladie professionnelle chez les éleveurs, les vétérinaires, le personnel d'abattoir et de laboratoire, les bouchers et les bergers, la brucellose humaine est une maladie à déclaration obligatoire par l'OMS, mais son diagnostic n'est pas systématique dans les formations sanitaires ce qui peut augmenter le risque de transmission dans la population générale. L'OMS estime l'incidence mondiale de la maladie à 500 000 cas/an.

La brucellose humaine existe en fonction de la brucellose animale. En effet, la contamination interhumaine est exceptionnelle parce que l'homme malade n'excrète que très rarement des *Brucella*. L'épidémiologie de la brucellose humaine est centrée d'une part sur les contaminations par contact avec des animaux infectés ou des objets contaminés, d'autre part sur la contamination orale notamment le lait et les produits laitiers infectés [16].

La répartition des principales espèces de *Brucella* et de leurs biotypes n'est pas strictement liée à des aires géographiques bien définies. Dans la plupart des régions du monde, ces trois espèces sont retrouvées (*abortus*, *melitensis*, *suis*). Toutefois quelques traits dominants peuvent être dégagés.

C'est ainsi que *B. abortus* domine nettement en Afrique (excepté l'Afrique du Nord), bien que *B. melitensis* soit également présent. En Europe, c'est *B. abortus* également qui domine, excepté dans les pays méditerranéens, et l'Europe centrale qui est marquée par la présence de *B. suis* [17,18].

L'élevage est un maillon important dans l'économie malienne, la surveillance des zoonoses est une priorité et surtout pour celles qui sont transmissibles à l'homme, qui engendrent des problèmes de santé publique. En matière de zoonose même de faibles prévalences engendrent une infection du troupeau et les risques sont les mêmes pour la population humaine [5].

### **2.3. Etude bactériologique :**

#### **2.3.1. Caractères bactériologiques**

##### **2.3.1.1 Morphologie :**

Très petit coccobacille à Gram négatif de 0.5 à 0.7  $\mu\text{m}$  de diamètre et 0.6 à 1.5 $\mu\text{m}$  de longueur [20].

##### **2.3.1.2 Espèces pathogènes pour l'homme :**

Plusieurs espèces de *Brucella* existent mais ceux qui sont pathogènes pour l'homme sont : *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*.

Il existe plusieurs sous types pour chaque espèce.

##### **2.3.1.3 Ecologie :**

- Bactérie immobile, non encapsulée, non sporulée et aérobic stricte.
- L'homme est un hôte occasionnel, bactérie intracellulaire facultative. Elle est responsable d'une maladie essentiellement animale (zoonose) avec l'existence d'hôtes animaux préférentiels ou de prédilection.

**Tableau 1** : Hôtes préférentiels selon l'espèce.

espèce	hôtes préférentiels
melitensis	chèvres, moutons
abortus	bovins
suis	Porcs, lièvres
canis	chiens

#### 2.3.1.4 Survie:

La bactérie est sensible à la chaleur et à l'action des rayons ultra violets mais elle peut résister au milieu extérieur.

- Dans les milieux secs, non organiques (locaux, matériels), la bactérie peut vivre 32 jours.
- Dans les milieux organiques humides (fromages, lait cru, végétaux souillés), elle peut vivre jusqu'à 120 jours voire plus.
- Dans les milieux organiques secs (souillures sèches dans une étable par exemple), elle peut vivre 135 jours.
- Enfin dans le sang conservé à +4°C, 180 jours.

### 2.3.2 Transmission:



*Figures 2 et 3* : A gauche, un fœtus de bœuf infecté par *B abortus* et à droite un mouton mort d'une infection à *B melitensis*.

#### 2.3.2.1 Transmission direct :

C'est la transmission par voie sanguine (pénétration du germe par voie cutanée ou muqueuse favorisée par des blessures ou des excoriations) avec des animaux malades, par leurs carcasses ou mieux, les produits d'avortement (placenta, sécrétions vaginales) ou encore par contact accidentel au laboratoire avec des prélèvements (hémocultures).

#### 2.3.2.2 Contamination par voie orale:

Non négligeable, elle est due à l'ingestion d'aliments souillés par le germe:

- Viande : Les viandes de boucherie peuvent contenir des *Brucella* (viande mûre cuite ou viande crue).

- Lait et dérivés : Les laits de vache, brebis, chèvre, chamelle etc sont les principaux produits alimentaires vecteurs de brucelloses (lait cru, fromages frais...).
- Légumes : Les légumes frais peuvent être contaminés lorsque le terrain sur lequel ils ont été cultivés a été enrichi par des fumiers provenant d'étables ou de bergeries infectées.

### **2.3.2.3 Contamination par voie respiratoire:**

Inhalation de poussière de litière, d'aérosol contaminé dans un laboratoire, un abattoir ou encore dans une étable vide à cause de la transhumance.

## **2.4. Caractères Culturels:**

### **2.4.1 Conditions de croissance :**

La culture des *Brucella* nécessite, au moins au sortir de l'organisme, l'utilisation de milieux enrichis par du sérum ou du sang de mouton.

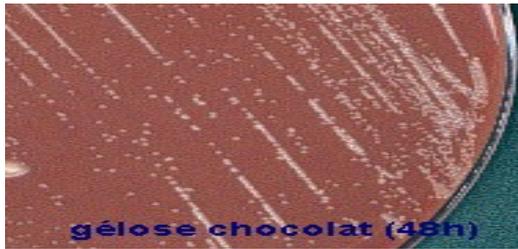
Les conditions physiques optimales pour leur croissance :

- pH= 6,8
- Temperature optimale de 35°C
- Croissance favorisée par CO<sup>2</sup> 5 à 10% (*Brucella abortus*).

La qualité des bouillons d'hémoculture est aujourd'hui largement suffisante pour permettre leur culture dans des délais plus raisonnables.

Une agitation de ces bouillons pour favoriser l'aérobiose est toutefois utile.

Les *Brucella* nécessitent des milieux de culture adéquats, enrichis en thiamine, niacine et biotine



[<http://www.microbe-edu.org/professionnel/brucellavf.html>]

**Figure 4:** Aspect des colonies de *Brucella* sur une gélose chocolat après 48h.

De nos jours, les milieux commerciaux conviennent mieux à leur culture.

Exemple: la Gélose *Brucella*

#### **2.4.2 Milieu spécifique: Gélose *brucella* [21]**

La gélose *Brucella* est recommandée pour la culture et l'isolement des *Brucella*. Additionner du sang de mouton ou de cheval à 5%, elle convient pour la culture des germes aérobies et anaérobies présentant des exigences nutritionnelles particulières. Le milieu peut également être utilisé comme base nutritive pour l'isolement sélectif des *Campylobacter*.

#### **Principes:**

- La force nutritive du milieu est due à sa richesse en peptone, extrait de levure et glucose.
- L'extrait de levure est une source de complexe vitaminique B.
- Le glucose intervient comme source d'énergie.
- Pour obtenir un milieu sélectif vis-à-vis de la *Brucella* il est utile d'ajouter des suppléments appropriés.

#### **Préparation :**

Mettre en suspension 43,1g de milieu de base déshydratée (B K 077) dans un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Refroidir en le maintenant à 44- 47°C. Ajouter les suppléments d'enrichissement (vitamines) ainsi que les suppléments sélectifs souhaités.

Agiter parfaitement de façon à bien homogénéiser l'ensemble.

Couler en boîtes de pétri stérile.

Laisser solidifier sur une surface froide.

Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert, ainsi on peutensemencer l'inoculum et l'incuber en atmosphère enrichie en dioxyde de carbone pendant 24-72 heures à 37°C pour la culture des *Brucella*.

***Formule –type du milieu :***

Pour 1 litre de milieu de base, on a:

Tryptone.....	10, 0g
Peptone pepsique de base de viande.....	10, 0g
Extrait auto lytique de levure.....	2,0g
Chlorure de sodium.....	5,0g
Glucose.....	1,0g
Bisulfite de sodium.....	0,1g
Agar-agar bactériologique.....	15,0g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C:  $7 \pm 0,2$

***Contrôle de qualité:***

- Milieu déshydraté : Poudre crémeuse, fluide et homogène.
- Milieu préparé: Gélose ambre claire.
- Réponse culturale typique après 48 heures d'incubation à 37 °C

### 3.5. Caractères Biochimiques : [22]

Les *Brucella* sont

- Catalase (+)
- Oxydase (+)



Figure5 : test d'oxydase positif d'une colonie de *Brucella*

- Uréase (+)



Figure6: Urée positive à *Brucella* après 24h d'incubation.

- Nitrates (+)
- Citrate (+)
- Indole (+)
- VP (+)

L'utilisation des sucres est lente et n'est pas décelée sur les milieux usuels car l'acidification est masquée par la production d'ammoniaque.

## 2.6. Structures Antigéniques :

Les *Brucella* possèdent des antigènes de structure lipopolysaccharidique appelés A et M inégalement répartis selon les espèces :

- L'antigène A, domine chez *Brucella abortus*
- L'antigène M, domine chez *Brucella melitensis*
- L'antigène M et l'antigène A, sont égaux chez *Brucella suis*.

Les anticorps *anti-brucella* donnent des réactions croisées avec :

*Yersinia enterocolitica* O : 9.

*Vibrio cholerae*

Plus rarement *Escherichia coli* O : 157

Certaines *Salmonella* [26]

## 2.7. Physiopathologie et Immunité:

Les *Brucella* pénètrent dans l'organisme par voie cutanée, digestive et respiratoire et gagnent par voie lymphatique le premier relais ganglionnaire.

Elles s'y multiplient et disséminent dans tout l'organisme par voie sanguine et lymphatique [2,23]. Elles sont phagocytées par les macrophages et y sont détruites en libérant antigène et endotoxine mais peuvent aussi s'y multiplier rapidement : les *Brucella* sont des bactéries à développement intracellulaire facultatif.

L'immunité à médiation cellulaire est essentielle dans la défense de l'organisme contre l'infection brucellique. Des lymphocytes T renforcent l'activité bactéricide des macrophages qui détruisent les bactéries au sein d'un granulome spécifique [2-13]. Dans certains cas, les *Brucella* résistent et persistent à l'intérieur des

*Séroprévalence de la brucellose humaine dans la zone peri-urbaine de la région de Mopti.*

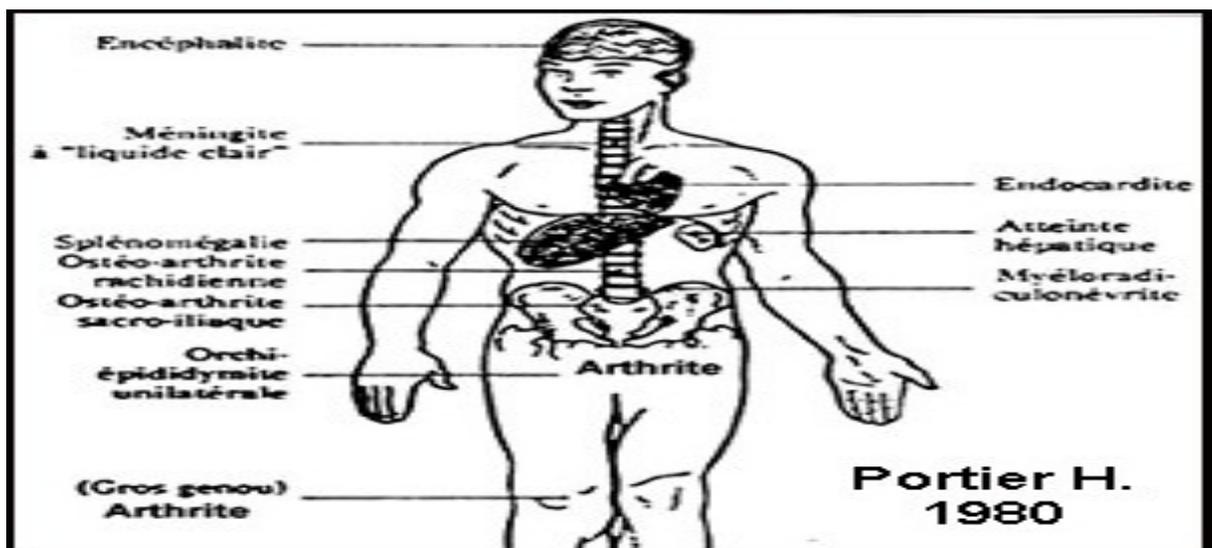
macrophages avec risque de réactivation entretenant un état d'hypersensibilité retardé responsable de la brucellose chronique.

La production d'anticorps est effective et permet le diagnostic de la maladie.

Leur cinétique de production ne diffère pas de celle qu'on observe dans la plupart des infections bactériennes.

## 2.8. Manifestations Cliniques:

La brucellose est une maladie d'expression très polymorphe (maladie aux cents visages) de longue durée et évoluant par poussées successives [24].



[<http://www.microbe-edu.org/professionnel/brucellavf.html>]

*Figure7* : les principaux foyers Brucelliques de l'homme

### **2.8.1 Incubation:**

La période d'incubation est variable. Elle correspond à la multiplication du germe dans le premier ganglion lymphatique rencontré. Cette période peut varier de 1 à 4 semaines.

La brucellose peut rester silencieuse ou entraîner de nombreuses atteintes viscérales. Les signes cliniques sont assez variables mais évoluent habituellement vers trois phases [25].

### **2.8.2 Brucellose aigue:**

Fièvre ondulante sudéro-algique (39-40°C), le début est insidieux et comporte une fièvre d'installation progressive associée à des douleurs musculaires et articulaires, des courbatures, une asthénie et des sueurs abondantes nocturnes. A l'examen clinique, on peut observer une hépatomégalie modérée, une splénomégalie, une adénopathie superficielle ainsi que des râles bronchiques. La fièvre est transitoire, disparaît en quelques jours mais réapparaît de nouveau ; ces ondulations survenant 3 à 4 fois.

### **Examen biologique:**

A l'examen biologique, on observe une leuco neutropénie, la Vitesse de Sédimentation (VS) est normale ou subnormale. Le sérodiagnostic de Wright peut être fait après 12 à 15 jours du début des symptômes.

L'hémoculture doit être pratiquée avant tout traitement.

### **2.8.3 Phase secondaire:**

Atteinte articulaire et/ou génitale.

A ce stade, il peut exister des formes discrètes qui passent inaperçues et des formes pseudo typhoïdiques avec une fièvre en plateau. Les formes graves peuvent donner des endocardites, des atteintes rénales, hépatiques, pulmonaires, poly viscérales malignes.

**2.8.4 Brucellose secondaire focalisée:** A ce stade, on peut observer :

- Des atteintes ostéo-articulaires (spondylarthrites discrètes, arthrite de hanche)
- Des atteintes neuro-méningées : méningites à LCR clair, méningo-encéphalites méningo-myélo-radiculites.

Examen biologique :

Culture du prélèvement local (articulaire, vertébral, LCR...)

Examen sérologique (Rose Bengale ou Epreuve de l'Antigène Tamponnée EAT, séro-agglutination de WRIGHT, fixation du complément, ou ELISA)

### **2.8.5 Brucellose chronique:**

Elle peut faire suite aux formes précédentes ou être en apparence inaugurale. Elle comporte :

- Des manifestations générales faites de troubles subjectifs dans lesquels dominant l'asthénie physique, psychique, sexuelle associés à des sueurs et des algies diffuses.
- Des manifestations focales correspondant à des foyers quiescents ou peu évolutifs neuro-méningés, articulaires ou viscéraux [6, 7].

## 2.9. Diagnostic Biologique:

### A. Les différents prélèvements :

#### A.1 Les prélèvements habituels :

- Sang pour hémoculture : L'hémoculture est surtout positive pendant la phase aiguë (exceptionnellement pendant la phase chronique de la maladie) [20].

#### A.2 Les autres prélèvements:

- Ganglions lymphatiques
- Moelle osseuse
- LCR
- Liquide de ponction articulaire
- Pus de foyers suppurés (d'arthrites ou d'ostéites)

### B. Examen direct:

#### B.1 Microscopie:

L'examen direct du prélèvement (hémoculture) au microscope montre des coccobacilles à Gram négatif.



[<http://www.microbe-edu.org/professionnel/brucellavf.html>]

Figure 8 : coloration de Gram à partir d'une hémoculture positive à *Brucella*.

## **B.2 Culture:**

On observe des colonies lisses, translucides. (Voir partie caractères cultureux)

La mise en culture des autres prélèvements se fait sur des milieux à base de peptones additionnées de 5 à 10% de sang de mouton.

## **C. Examen indirect:**

### **C.1 Sérodiagnostic de Wright:**

**Principe:** C'est une réaction d'agglutination d'une suspension de *Brucella* à partir d'une dilution successive du sérum à étudier.

Il met en évidence les IgM et IgG lors des brucelloses aiguës.

La réaction se positive précocement, 10 à 15 jours après le début de la maladie et se négative en 6 à 12 mois.

Des "faux positifs" sont possibles (réaction croisée avec *Yersinia enterocolitica*, *vibrio cholerae* ...).

La possibilité de faux négatifs justifie la recherche systématique d'anticorps bloquants apparaissant chez certains malades, surtout en phase chronique; ce sont des IgA ou IgG occupant les sites antigéniques sans provoquer d'agglutination.

On ajoute au tube réactionnel une goutte de témoin positif : si l'agglutination ne se produit pas, c'est parce qu'elle est empêchée par les anticorps bloquants fixés sur les *Brucella*.

### **C.2 Epreuve de l'antigène tamponné (EAT) ou réaction au Rose Bengale:**

C'est une réaction d'agglutination sur lame utilisant une suspension en milieu acide et tamponné de *brucella* inactivée et colorée par le Rose de Bengale.

Elle met en évidence les IgG et se positive plus rapidement aux 4<sup>e</sup>-5<sup>e</sup> jours persistant plusieurs mois.

Elle est très sensible.

Interprétation similaire mais la cinétique des anticorps est plus longue que celle du sérodiagnostic de Wright.

### **C.3 Immunofluorescence indirect:**

Elle se positive plus tardivement que le sérodiagnostic de Wright.

L'antigène est une suspension inactivée de *Brucella*.

Cette méthode est très utile dans le suivi des brucelloses chroniques sous traitement.

### **D. Action des colorants:**

- La thionine, inhibe la croissance de *Brucella abortus*.
- La fuchsine, inhibe la croissance de *Brucella suis*.
- *Brucella melitensis*, n'est inhibée par aucun des colorants.

### **E. IDR à la mélitine:**

#### **1. Technique:**

Injecter 0,1 mL d'un filtrat de culture de *Brucella melitensis* en IDR à la face antérieure de l'avant bras.

**2. Lecture:** La lecture se fait après 24h à 48h.

En cas de réaction positive, on observe une réaction érythémateuse et un œdème local.

### 3. Interprétation des résultats:

L'IDR est positive au cours des atteintes chroniques (c'est parfois le seul signe objectif de l'infection).

### 4. Observation importante:

Toujours faire un témoin négatif en injectant sur l'autre avant-bras du bouillon ayant servi à préparer la mélitine.

### 2.10- Traitement:

Le but du traitement est d'éradiquer la maladie.

#### Antibiogramme:

Les *Brucella* sont sensibles in vitro à de nombreux antibiotiques mais on aura à l'esprit qu'il s'agit de parasites intracellulaires facultatifs.



[<http://www.microbe-edu.org/professionnel/brucellavf.html>]

Figure 9 : Antibiogramme d'une culture de *Brucella*.

In vivo, l'antibiothérapie est active dans les formes aiguë et subaiguë ou focalisée après un temps de traitement suffisamment long pour les associations suivantes: Tétracycline +

Streptomycine, Doxycycline + **Rifampicine** et, à un moindre degré, Triméthoprime-Sulfaméthoxazole.

**Posologie:**

- Les Tétracyclines semi synthétiques (Doxycycline et Minocyclines 200 mg /j en une prise) sont régulièrement efficaces.
- La Rifampicine a une action moindre, 10 à 20 % des souches sont résistantes. La dose quotidienne est de 15mg /kg/j.
- L'association Triméthoprime/Sulfaméthoxazole possède des indications du fait de sa bonne pénétration tissulaire.

Les doses respectives sont de 320 et 1600 mg/j.

Parmi les Fluoroquinolones, la Ciprofloxacine et l'Ofloxacine sont les meilleures et sont régulièrement actives.

**Indications:** [15]

- **Brucellose aiguë** : en cas de brucellose aiguë sans focalisation osseuse ou viscérale, hépato splénite exceptée, l'association Doxycycline/Rifampicine pendant 45jours est préconisée du fait d'une bonne efficacité et d'une toxicité faible. La Doxycycline seule est possible.

Un autre protocole obligatoire chez l'enfant de moins de 8 ans utilise l'association Triméthoprime-Sulfaméthoxazole (TMP/SMZ) + Rifampicine.

En cas de focalisation inaugurale ou subaiguë, surtout s'il s'agit d'une localisation osseuse, le traitement est prolongé jusqu'à 3 ou 6 mois.

Dans le cas de focalisation neuro-méningée, l'association TMP /SMZ + Rifampicine est de mise d'abord par voie intraveineuse.

Une endocardite est traitée par les trois antibiotiques pendant 9 à 12 semaines. La surveillance rejoint celle des effets secondaires des 2 antibiotiques: Photosensibilisation pour les Cyclines, fonction hépatique pour la Rifampicine.

### **2.11. Mesures Prophylactiques:**

La brucellose est une maladie à déclaration obligatoire. Dans certaines conditions, elle devient une maladie professionnelle. La prévention de la brucellose humaine repose sur la surveillance sérologique des animaux d'élevage et l'abattage des séropositifs. Chez le sujet contact, le port de gants et l'hygiène au cours des manipulations sont de mise.

Hygiène individuelle vis-à-vis des crudités est aussi à souligner [2].

#### **Vaccination: [29]**

La vaccination animale est interdite car elle risque de fausser les investigations de diagnostics fondées sur le sérodiagnostic qui décélèrerait les anticorps vaccinaux.

Le vaccin anti-brucellien à usage humain n'est plus fabriqué depuis 1992.

# ***METHODOLOGIE***

### **3. METHODOLOGIE**

#### **3.1. Cadre de l'étude :**

- **Mali :**

Le Mali est un pays continental, sahélo saharien, situé en Afrique de l'Ouest avec une superficie de 1 241 238 Km<sup>2</sup>. Le pays est désertique à 50%, sahélien à 25% et savanicole à 25%. Il fait frontière avec 7 pays : l'Algérie au Nord, le Niger à l'Est, le Burkina Faso, la Côte d'Ivoire et la Guinée Conakry au Sud, le Sénégal et la Mauritanie à l'Ouest. L'altitude moyenne est de 500 m. Le pays est arrosé par deux grands fleuves : le Niger 1700 km et le Sénégal 800 km (25).

Le système de santé est basé sur des structures publiques, privées et communautaires.

Nous avons mené notre enquête dans la zone péri-urbaine de Mopti.

#### **Mopti :**

Mopti, encore appelé la Venise du Mali est un cadre convenable à cette étude parce que Mopti est une zone d'élevage par excellence.

Nos échantillons ont été traités dans le laboratoire du Centre de Santé de Référence (CS Réf) de Mopti, le service de laboratoire d'Analyses Biomédicales du Centre National d'Appui à la Lutte contre la Maladie (CNAM) et dans le laboratoire du Center for Vaccin Development (CVD).

- **CNAM: Centre National d'Appui à la Lutte contre la Maladie.**

La création du Centre National d'Appui à la Lutte contre la Maladie (CNAM) par l'ordonnance Numéro 036 PRM du 15 août 2001 ratifiée par la Loi numéro 02-009 du 4 Mars 2002 répond à un certain nombre de besoins

- **Elaboration et mise en place de stratégies, d'outils de dépistage, de**

prévention des épidémies et de contrôle des maladies transmissibles ;

- La mise en place d'un pôle d'excellence de surveillance, de formation sur les maladies de la peau ;
- Le développement de la recherche vaccinale nationale (essai de laboratoire et de terrain) sur les maladies transmissibles.
- **CVD: center for Vaccin Development:**

Le centre est Situé à Djicoroni Para dans l'enceinte du Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie (CNAM) de Bamako (Ex Institut Marchoux) sous la tutelle du ministère de la santé.

Il a été créé en 2002 dans le cadre de la coopération entre le ministère de la santé du Mali et le centre pour le développement des vaccins de l'Université de Maryland à Baltimore aux Etats-Unis.

Ce centre, ayant comme objectif la recherche des maladies infectieuses afin de développer de nouveaux vaccins en vue de leur introduction dans le PEV de routine pour réduire la morbidité et la mortalité maternelle et infantile.

Le centre est composé de :

Une Unité de laboratoire

Une Unité administrative

Une unité de gestion des données

Une unité clinique

Le laboratoire du Centre, mis en service le 17 Décembre 2004 est composé de :

Un (1) laboratoire de microbiologie

Un (1) laboratoire d'immunologie

Un (1) laboratoire pour la surveillance de la grippe

### **3.2. Période d'étude:**

Notre étude s'est déroulée en 2 phases :

- En janvier 2008: collecte des échantillons et test au Rose Bengale sur place au laboratoire du CS Réf de Mopti.
- L'immunocapture Brucellacapt et la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) en 2010 respectivement dans le laboratoire du CNAM et celui du CVD.

### **3.3. Type d'étude:**

Nous avons mené une étude transversale.

### **3.4. Echantillonnage:**

Nous avons réalisé un sondage en grappe, le ménage a été considéré comme base de sondage et dans chaque ménage sélectionné, tous les sujets répondant aux critères d'inclusion ont été systématiquement inclus dans l'étude.

Notre échantillonnage a été constituée par des personnes âgées de plus de 3 ans (au moment de l'enquête) consentantes, dans les ménages sélectionnés dans la commune de Fatoma et environnant.

### **3.5. Critères d'inclusion:**

Toute personne âgée de plus de 3 ans, habitant la commune de Fatoma et environnant, consentante.

### **3.6. Critères de non inclusion:**

Toute personne ayant moins de 3 ans, n'ayant pas donné son consentement et n'habitant pas la zone d'étude.

### **3.7. Collecte des données sociodémographiques:**

#### **3.7.1 Outil de collecte:**

Une fiche d'enquête tenant compte des différents paramètres (nom, prénom, âge, sexe, antécédents de maladies exemple paludisme, présence de signes cliniques, traitement en cours, profession, résidence...) et confettis pour PCR a été utilisée pour la collecte des données.

#### **3.7.2 Technique de collecte:**

Une mission de sensibilisation et de formation a été effectuée avant le début de l'enquête. Elle a permis la tenue de deux réunions, l'une à Mopti avec les responsables des services socio sanitaire et administrative, l'autre avec les chefs de villages et les conseillers communaux.

Ainsi, l'autorisation communautaire et administrative a été obtenue avant le début de l'enquête.

Tous les participants ont été informés des buts de l'enquête et un consentement écrit a été obtenu. Ainsi, les participants ont répondu aux questions sur la fiche d'enquête avant de passer au niveau du poste de prélèvement.

### **3.8. Procédures de Laboratoire:**

#### **3.8.1 Prélèvement :**

Un échantillon de 5 mL de sang a été prélevé chez chaque participant, 3 mL de sang dans un tube sec et 2 mL dans un tube avec citrate de Sodium.

Les prélèvements ont été transportés au centre de santé de référence de Mopti, où les tubes secs de 3 mL de sang ont été centrifugés à 1500 tours/minutes pour séparer le sérum du culot globulaire et les tests au Rose Bengale ont été faits sur place au CS Réf de Mopti.

Le reste du sérum a été conservé pour le test d'immunocapture Brucellacapt.

Les tubes de 2mL de sang avec du citrate de sodium ont été utilisés pour la biologie moléculaire (PCR).

#### **Réactifs, appareils et matériels utilisés :**

##### **Test Rose Bengale (EAT)**

Le Kit Vircell Rose Bengale

Une centrifugeuse

Un agitateur rotatif

Un chronomètre

Une micropipette 10 -1000 $\mu$ L

Des embouts 1000

Une carte ou une lame porte objet pour agglutination

Des bâtonnets d'homogénéisation

## **Test immunocapture Brucellacapt**

Le Kit Vircell Brucellacapt

Pipette multi Chanel (Finn pipette)

Embouts 200

## **Biologie moléculaire**

Le kit Qiagen

Un bain Marie maintenu à 70°C

Une centrifugeuse

Un vortex

Un thermocycleur

Une plaque à électrophorèse

Appareil à UV

Back à glace

Papier para film

Le marqueur 100BP

Simple loading

TAE (Tris Acétate EDTA)

Des tubes Falcon

Des micropipettes (20-200 et 10-1000) et embouts

Un erlenmeyer

### **3.8. 2 Protocole et méthode du test au Rose Bengale:**

Le test au Rose Bengale est un test rapide pour la détection d'anticorps *anti-Brucella* dans le sérum humain.

- **Principe:**

La méthode se pratique sur une carte spéciale qui détecte les anticorps agglutinants à l'aide de cellules de *Brucella* inactivées, colorées au Rose Bengale et remises en suspension dans un tampon acide. Le PH acide de la suspension empêche l'agglutination non spécifique des bactéries. Des anticorps agglutinants de type IgG, IgM et IgA interviennent dans la réaction.

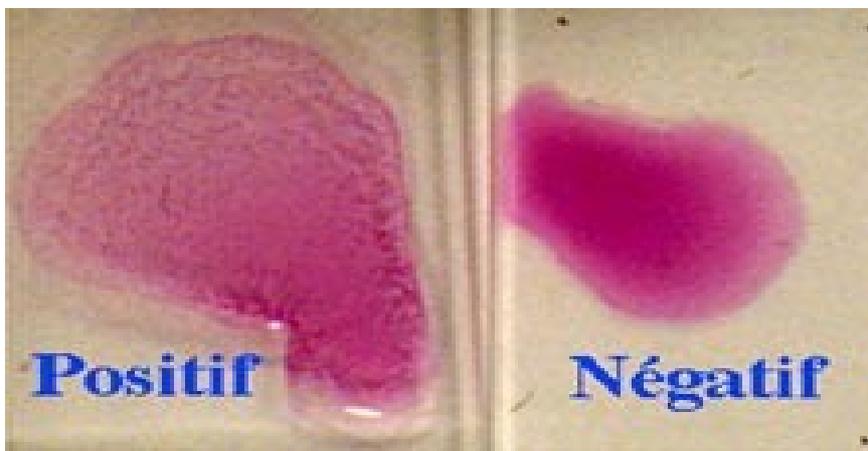
- **Procédure:**

1. Laisser les réactifs et les échantillons à la température ambiante.
  2. Homogénéiser la suspension antigénique en l'agitant doucement.
  3. Déposer 40  $\mu$ L de l'échantillon à analyser dans un des cercles individuels de la carte. Déposer 40uL de chacun des contrôles dans deux autres cercles de la carte.
  4. Ajouter dans chaque cercle une goutte de la suspension antigénique colorée au Rose Bengale.
  5. Mélanger les deux gouttes à l'aide d'un bâtonnet d'homogénéisation de manière à recouvrir toute la surface du cercle.
  6. Agiter la carte manuellement ou à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 4 minutes.
- Observer la présence ou l'absence d'agglutination.

- **Interpretation:**

La présence d'une agglutination révèle une réaction positive et indique l'existence d'anticorps dirigés contre *Brucella*. L'absence d'agglutination révèle une réaction négative et indique l'absence d'anticorps agglutinants dirigés contre *Brucella*.

Le test Rose Bengale est très sensible mais peu spécifique.



*Figure 10* : test au Rose Bengale positif à gauche (présence agglutination) et négatif à droite.

### **3.8.3 Protocole et méthode du test d'immunocapture BRUCELLACAPT:**

Brucellacapt est un test d'agglutination par immunocapture pour la détection des anticorps totaux *anti-Brucella* (les anticorps complets et incomplets). Il comporte 24 tests en dosage ou 96 tests en dépistage. Nous avons utilisé des tests de dosage, une plaque pouvant contenir 24 échantillons dont les contrôles positif et négatif.

- **Principe :**

Les puits à fond en U sont sensibilisés avec des anti-immunoglobulines humaines. Après addition et dilution des sérums directement dans la microplaque, l'antigène *Brucella abortus* est ajouté. La micro plaque est ensuite incubée pendant 24 heures. BRUCELLACAPT permet de détecter des anticorps agglutinants ainsi que les anticorps incomplets.

Le test Brucellacapt est encore plus spécifique par rapport au Rose Bengale.

- **Procédure:**

1. Laisser les réactifs à la température ambiante (18 à 25 °C) avant l'utilisation. On sélectionne le nombre de barrettes nécessaires en fonction du nombre de sérum à traiter, plus une barrette pour le contrôle positif et le contrôle négatif.

2. Ajouter 50 µL de diluant dans les puits de la rangée A. Puis ajouter 50 µL dans les puits de la rangée A à H. Déposer 5 µL de chaque sérum à tester et les contrôles positif et négatif respectivement dans les puits de la rangée A. Effectuer des dilutions sérielles au 1/2 par transfert de 50µL de chaque puits de la rangée A respectivement vers la rangée B, puis de 50 µl de la rangée B vers la rangée C et ceci jusqu'à la rangée H.

3. Ajouter 50 µL de la suspension bactérienne, après l'avoir agité pour l'homogénéiser, dans tous les puits utilisés.

4. Recouvrir à l'aide du film adhésif et incubé dans une étuve pendant 24 heures à 37°C dans une chambre humide et obscure.

5. Lire les résultats sachant que les titres obtenus sont de 1/40 pour les puits de rangée A, 1/80 pour les puits de la rangée B, 1/160 pour les puits de la rangée C, 1/320 pour les puits rangée D, 1/640 pour les puits rangée E, 1/1280 pour les puits

de rangée F, 1/2560 pour les puits de la rangée G/5120 pour les puits de la rangée H.

- **Interprétation des résultats:**

Le test est positif lorsqu'on observe une agglutination sur la majeure partie des puits. Le test est négatif lorsqu'on observe un culot au centre des puits.

Un titre supérieur à 1/320 est révélateur d'une brucellose. Si on obtient un résultat positif jusqu'à la dilution 1/5120, il est nécessaire de tester des dilutions plus élevées.

Après le test d'immunocapture Brucellacapt, les échantillons positifs au test

Rose Bengale (EAT) ont été encore soumis à la technique de diagnostic de biologie moléculaire: Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).

### **3.8.4 Méthode de la biologie moléculaire:**

Nous avons utilisé la PCR comme technique.

#### **3.8.4.1 Définition de la PCR :**

La PCR : " Polymerase by Chain Reaction "est une technique de réplication ciblée in vitro. Elle permet d'obtenir un grand nombre de copies de gènes par une série d'amplification d'un brin d'ADN en présence d'un excès d'amorces, de nucléotides et d'un ADN polymérase.

#### **Les différentes étapes :**

- L'extraction de l'ADN
- Préparation du mélange mixte
- Amplification
- Migration

- Visualisation

### **3.8.4.2 Extraction de l'ADN**

#### **Procédure de l'extraction de l'ADN selon le kit Qiagen**

Cette procédure décrit l'extraction de l'ADN à partir du sang total prélevé sur du citrate de sodium.

Avant de commencer l'extraction mettre les réactifs, les échantillons à la température ambiante.

Préparer les réactifs suivants les instructions du kit

Identifier les tubes Falcon de 15ml conformément au nombre d'échantillons à tester ;

1. Pipeter 200 $\mu$ L de la QUIAGEN protéase dans chaque tube Falcon de 15mL.
2. Ajouter 2mL de sang total et mélanger brièvement, ramener le volume à 2mL en ajoutant du PBS si nécessaire,
3. Ajouter 2,4mL de diluant AL, mélanger vigoureusement en renversant les tubes 15 fois, secouer vigoureusement une dernière fois,
4. Mettre les tubes en incubation à 70°C (dans le bain Marie),
5. Ajouter 2mL d'éthanol (96-100%) et mélanger en renversant les tubes 10 fois et agiter vigoureusement les tubes.
6. Transférer soigneusement une moitié de la solution de l'étape 5 dans la colonne QI AMP Midi placée dans un tube Falcon de 15mL et centrifuger à 3000 tours (3000 rpm) pendant 3munités.
7. Enlever les colonnes QI AMP Midi, jeter le filtrat et replacer les colonnes dans les tubes Falcon de 15mL, pipeter le reste de la solution de l'étape 5 pour ajouter à la

colonne QI AMP Midi, remettre les tubes dans la centrifugeuse et centrifuger à 3000 tours (3000 rpm) pendant 3 minutes.

Essuyer tout écoulement du liquide sur les bords des tubes Falcon de 15ml et les insérer dans la centrifugeuse.

8. Enlever les colonnes QI AMP Midi, jeter le filtrat et remettre les colonnes dans des tubes Falcon de 15mL,

9. Soigneusement, ajouter 2mL du diluant AW1 dans les colonnes QI AMP Midi, (éviter de toucher la bordure) remettre les tubes dans la centrifugeuse puis centrifuger à 5000 tours (5000rpm) pendant 3minutes.

10. Sans jeter le filtrat, ajouter soigneusement 2mL du diluant AW2 dans les colonnes QI AMP Midi, et centrifuger à 5000 tours (5000 rpm) pendant 15minutes.

NB : Le temps de centrifugation doit enlever les traces du diluant des colonnes QI AMP Midi avant l'élution.

11. Placer les colonnes QI AMP Midi dans de nouveaux tubes de 15mL et jeter le filtrat.

12. Ajouter 300µL du diluant AE sur la membrane des colonnes QI AMP Midi. Incuber les tubes à la température du laboratoire pendant 5minutes, puis centrifuger à 5000 rpm (5000 tours) pendant 2minutes.

Après cette centrifugation, l'ADN des échantillons ainsi obtenu se trouve dilué dans le diluant AE et est conservé à -20°C avant son utilisation.

### 3.8.4.2 Préparation du mélange mixte, Amplification et Migration:

- **Préparation du mélange mixte :**

Le mélange mixte est un mélange de réactifs qui interviennent dans la réaction de polymérisation.

#### **Procédure de préparation du mélange mixte:**

1. Faire sortir les réactifs de -20°C et les laisser décongeler.
2. Les mettre dans la glace, où ils y resteront durant le pipetage.
3. Identifier les tubes Eppendorf de 500µL conformément aux échantillons ainsi que les contrôles positif et négatif.
4. Identifier un tube ou plusieurs tubes Eppendorf pour le mélange mixte.
5. Pipeter les réactifs conformément au tableau ci-dessous.
6. Pipeter 50 µL du mélange mixte dans les tubes identifiés
7. Ajouter 5 µL d'ADN ainsi que les contrôles positif et négatif (respectivement *Brucella abortus* et l'eau distillée), vortexer.
8. Mettre les échantillons dans le thermocycleur pour l'amplification.

**Tableau II:** Différents volumes pour le mélange mixte.

<b>Réactifs</b>	<b>1 x vol (µL)</b>	<b>n x vol (µL)</b>
H2O	37	nx37
Buffer	5	nx5
Mgcl2 (50mM)	2.25	nx2.25
dNTP (10mM)	2.50	nx2.50
B4 (25mM)	1	nx1
B5 (25mM)	1	nx1
Taq	1.25	nx1.25

- **Amplification :**

Il est réalisé dans le thermocycleur.

C'est un processus suivant lequel on procède à une multiplication exponentielle d'un brin d'ADN ciblé pendant plusieurs cycles.

Il comprend plusieurs étapes :

**Tableau III** : Programmation du thermocycleur

Primers( Forward and Reverse)	Différents étapes				
	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Extension	Extension Finale
B4(F)	93°C	90°C	64°C	72°C	72°C
B5(R)	5 minutes	1minute	30secondes	1minute	10minutes
		Ce cycle se répète 35 fois			

Les produits d'amplification sont conservés dans le thermocycleur à 4 °C avant la migration.

### **Migration:**

La technique utilisée pour la migration est l'électrophorèse.

Elle a lieu sur du gel agarose à 1%.

### Principe de l'électrophorèse:

L'électrophorèse est une technique de séparation des molécules suivant leur charge et leur poids moléculaire sous l'influence d'un courant électrique.

Les molécules migreront de l'anode vers la cathode et se déposeront selon leur poids moléculaire.

**Préparation du gel d'agarose:**

1. Peser 1g de poudre d'agarose et mettre dans un erlenmeyer.
2. Ajouter 100mL de TAE (Tris Acétate EDTA)
3. Bouillir pendant 3minutes.
4. Ajouter 3 $\mu$ L de Bromure d'éthidium puis laisser refroidir légèrement puis couler le gel dans la plaque comportant des peignes.
5. Laisser solidifier le gel à la température ambiante environ 20 minutes, puis retirer les peignes.

**Loading** (mise des produits PCR dans les puits du gel):

1. Déposer la plaque contenant le gel solidifié dans la cuve pour électrophorèse contenant du TAE.
  2. Pipeter 4 $\mu$ L du marqueur 100BP dans le premier puits.
- NB : Le marqueur est l'ADN de référence qui permet de déterminer la taille des gènes.
3. Déposer 2 $\mu$ L de bleu de méthylène sur papier para film pour chaque échantillon.
  4. Pipeter 10  $\mu$ L des contrôles positif et négatif et les mélanger avec le bleu de méthylène.
  5. Pour chaque échantillon, mélanger 10 $\mu$ L de produit de PCR à 2 $\mu$ L de bleu de méthylène et déposer successivement dans les puits.
  6. Connecter la plaque électrophorèse aux pôles du voltmètre.

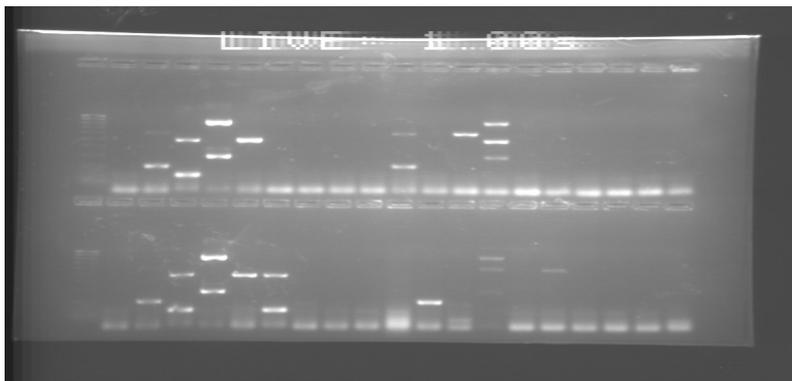
Le temps de migration dépend du voltage de l'électrophorèse, dans notre cas, elle a duré 40 minutes à un courant de 95Volt.

### Visualisation:

Après la migration, on procède à la lecture des bandes dans une chambre noire à l'UV (ultra violet) en portant des lunettes de protection :

Spécimens	Poids (bp)
Marqueur	100-1000
Contrôle ( <i>B.abortus</i> )	223
<i>B. abortus</i>	223
B. spp	Entre 400 et 600

Les bandes sont des traits blancs que nous observons sur la photo.



*Figure 11* : un exemple de photo de gel que nous avons fait après l'amplification.

### 3.9. Les variables mesurées:

L'âge, la profession, la sero prévalence de la brucellose avec le test sérologique rose Bengale, le test Brucellacapt et les résultats de la PCR.

### **3.10. Gestion des données**

Les données, collectées grâce à la fiche d'enquête ont été analysées avec le logiciel SPSS.

### **3.11. Aspects éthiques:**

Le protocole a été soumis au comité scientifique du CNAM.

Un consentement global de la communauté a été obtenu auprès des autorités administratives, sanitaires et coutumières des communes qui ont participé à l'enquête. Chaque participant a donné son consentement éclairé par écrit. La confidentialité des données a été assurée par les investigateurs.

La prise en charge des participants découverts séropositifs au test rose Bengale a été effectuée sur le terrain par l'équipe médicale.

Les participants ont été informés des avantages et des désagréments des prélèvements.

Le respect des références bibliographiques aussi est à signaler.

# ***RESULTATS***

## 4. RESULTATS

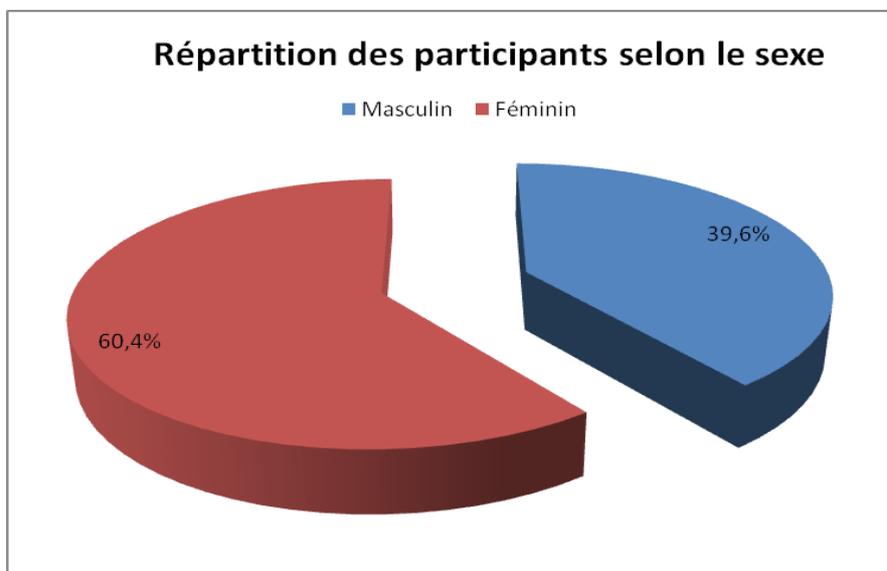
### 4.1. Résultats sociodémographiques:

Nous avons travaillé sur un total de 498 échantillons.

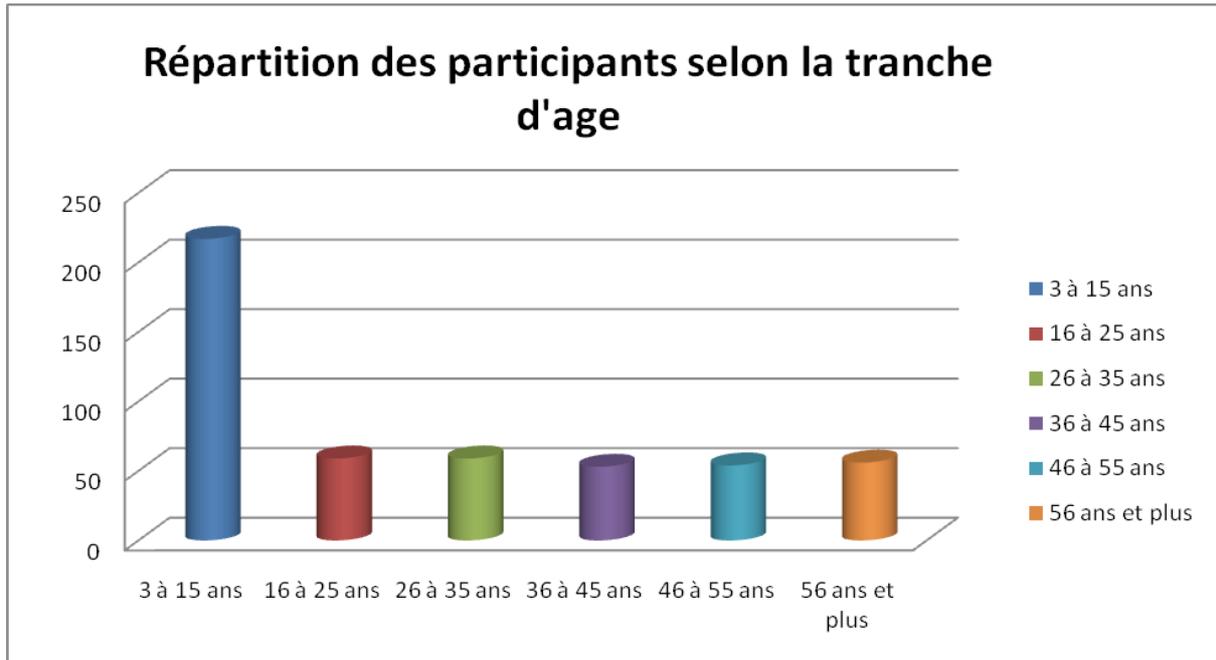
**Tableau IV : Répartition de la population d'étude selon le sexe**

Sexe	Effectif	Pourcentage
Masculin	197	39,60
<b>Féminin</b>	<b>301</b>	<b>60,40</b>
Total	498	100,00

Le sexe ratio était de 1,53 en faveur du sexe féminin.



***graphique1* : Répartition des participants selon le sexe.**



***graphique2*** : Répartition des participants selon la tranche d'âge.

La tranche d'âge [3-15] a été prédominante dans notre échantillonnage, suivie de [26-35], [46-55] et 56 ans et plus, avec respectivement 43,6%, 11,8%, 10,8%et 11,2%.

L'âge moyen des volontaires était de 26 ans environ, avec 3 ans comme minimum et 77 ans comme maximum.

**Tableau V: Répartition de la population selon le lieu de résidence.**

Residence	Effectif	Pourcentage
<b>Fatoma</b>	<b>328</b>	<b>65,86</b>
Karbaye	118	23,69
Thy	29	5,82
Guirowel	23	4,62
Total	498	100,00

Plus de 65% de nos participants résidaient à Fatoma.

**Tableau VI : Répartition de la population selon la profession**

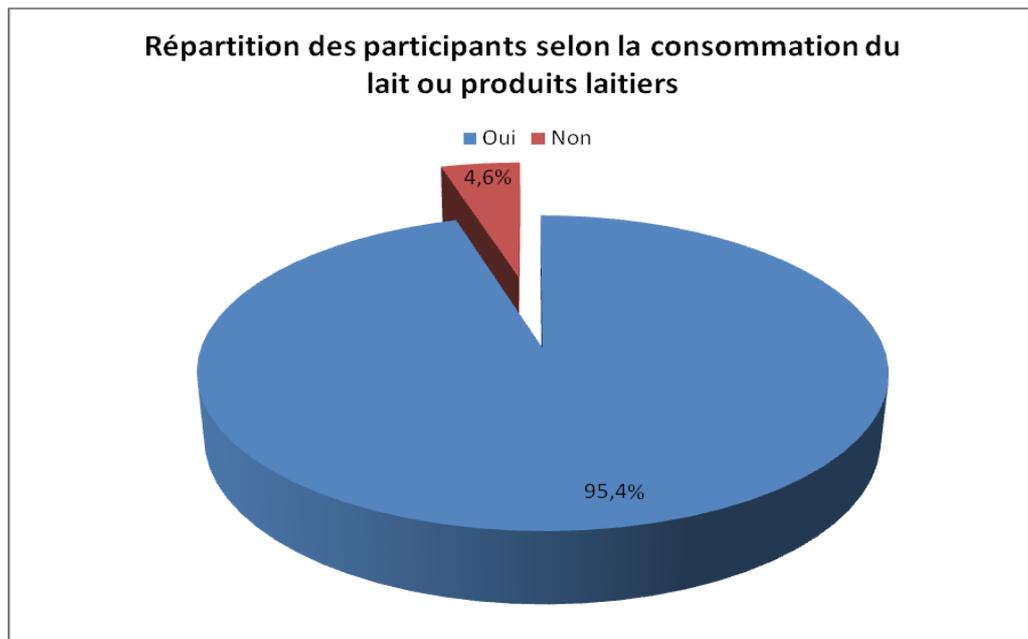
Profession	Effectif	Pourcentage
<b>Ménagère</b>	<b>176</b>	<b>35,34</b>
Elève	61	12,25
Cultivateur	40	8,03
Autres professions	221	44,38
Total	498	100.00

Les ménagères étaient plus nombreuses (35,34%) que les autres couches professionnelles.

**Tableau VII : Signes cliniques fréquemment évoqués par les volontaires**

Signes	Effectif	Pourcentage
<b>Paludisme</b>	<b>65</b>	<b>12,25</b>
Céphalées	40	6,43
Courbatures	23	3,82
Douleurs abdominales	11	2,21
Fièvre	10	2,01
Autres signes	365	73,29
Total	498	100.00

Le paludisme était le signe clinique le plus évoqué par les volontaires avec 12,25%.



**Graphique 3 : Répartition de la population selon la consommation du lait ou produits laitiers.**

Plus de 95% des participants ont affirmé être consommateurs de lait et/ou d'autres produits laitiers.

#### **4.2. Présentation des résultats analytiques :**

Avec le test rose Bengale, nous avons observé 78 cas positifs (78/498).

Les échantillons trouvés positifs au rose Bengale (78/498) ont été testés au Brucellacapt (test d'agglutination par immunocapture) et à la PCR. En rapportant les cas positifs obtenus par le Brucellacapt et la PCR sur les cas positifs obtenus par le rose Bengale, nous avons observé respectivement une positivité de 47,44% (37/78) pour le Brucellacapt et une positivité de 38,46% pour la PCR (30/78).

Quand nous avons rapporté les résultats du Brucellacapt et de la PCR à l'ensemble de l'échantillon, nous avons observé respectivement pour les deux tests 7,43% (37/498) et 6,02% (30/498).

- **Résultat du test Rose Bengale (ou Epreuve de l'Antigène Tamponné)**

**Tableau VIII : Répartition selon le résultat du test rose Bengale**

ROSE BENGALE	Effectif	Pourcentage
Positif	<b>78</b>	<b>15,7</b>
Négatif	420	84,3
TOTAL	498	100

Dans notre étude, 15,7% ont été positif au test Rose Bengale soit (78/498)

**Tableau IX: Répartition des cas positifs au Rose Bengale en fonction du sexe**

Sexe	Effectif	Pourcentage
<b>Féminin</b>	<b>44</b>	<b>56,41</b>
Masculin	34	43,59
Total	78	100,00

Le sexe féminin a été prédominant avec plus de 56%.

**Tableau X : Répartition des cas positifs au Rose Bengale par tranche d'âge.**

Age(ans)	Effectif	Pourcentage
3 - 15	16	20,51
46 - 55	16	20,41
26 -35	15	19,23
56 et plus	14	17,95
36 - 45	12	15,39
16 - 25	5	6,41
Total	78	100,00

Les tranches d'âges 3-15 et 46-55 ont été plus représentées parmi les cas positifs au Rose Bengale soit 20,51% chacune.

**Tableau XI : Répartition des cas positifs au Rose Bengale par profession.**

Profession	Effectif	Pourcentage
Ménagère	<b>36</b>	<b>46,15</b>
Cultivateur	<b>10</b>	<b>12,82</b>
Éleveur	<b>8</b>	<b>10,26</b>
Enfant	8	10,25
Elève	6	7,70
Autres	6	7,70
Artisan	2	2,56
Commerçant	2	2,56
TOTAL	78	100,00

Les ménagères, les cultivateurs et les éleveurs sont plus nombreux parmi les cas positifs au Rose Bengale.

**Tableau XII: Répartition des cas positifs au Rose Bengale selon la consommation du lait et des produits laitiers**

consommation	Effectif	Pourcentage
<b>Oui</b>	<b>74</b>	<b>94,87</b>
Nom	4	5,13
Total	78	100,00

Environ 95% des volontaires étaient des consommateurs de lait et de produits laitiers.

- **Résultat du test immunocapture Brucellacapt sur les cas positifs au Rose Bengale.**

**Tableau XIII:** Résultat du test d'immunocapture Brucellacapt sur les cas positifs au Rose Bengale.

Brucellacapt	Effectif	Pourcentage
Positif	<b>37</b>	<b>47,44</b>
Négatif	41	52,56
Total	78	100,00

Nous avons eu 47,44% de positifs par rapport au Rose Bengale soit (**37 cas/78**) avec un titre en anticorps compris entre 1/40 et 1/1280.

- **Résultat de la PCR sur les cas positifs au Rose Bengale.**

**Tableau XIV: Résultat de la PCR sur les cas positifs du Rose Bengale.**

PCR	Effectif	Pourcentage
Positif	<b>30</b>	<b>38,46</b>
Négatif	48	61,54
Total	78	100,00

Nous avons observé (30/78) soit 38,46% de positivité à la PCR par rapport au test rose Bengale.

- **Résultat de la PCR selon l'espèce de *Brucella***

Vu la difficulté que nous avons rencontré pour l'obtention des contrôles positifs considérés comme armes biologiques par les pays producteurs, nous avons travaillé uniquement avec celui de l'espèce *abortus*.

**Tableau XV** : répartition cas positifs des à la PCR selon l'espèce.

Espèce	Effectif	Pourcentage
<i>abortus</i>	19	63,34
spp	11	36,66
Total	30	100,00

Nous avons observé 63,34% de l'espèce *abortus*, cette espèce a pour hôte préférentiel les bovins.

# ***COMMENTAIRES ET DISCUSSION***

## **5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION:**

### **Contraintes de l'étude:**

Les difficultés que nous avons rencontrées au cours du déroulement de cette étude ont été entre autre :

- La difficulté d'obtention des contrôles positifs considérés comme armes biologiques par les pays producteurs.
- Durée prolongée de conservation des échantillons, due à une mise à la disposition tardive des fonds de recherche.

### **Caractéristiques Sociodémographiques:**

Les tranches d'âges (3-15), (26-35) et 56 ans et plus ont été prédominantes avec respectivement 43,6%, 11,8%, et 11,2%.

L'âge moyen des volontaires était de 26 ans environ, avec 3 ans comme minimum et 77 ans comme maximum.

Le sexe ratio était de 1,53 en faveur du sexe féminin, ceci serait dû au fait que les hommes d'un certain âge adhérent peu aux activités de santé.

Les ménagères étaient plus nombreuses (35,34%) que les autres couches professionnelles dans notre étude.

Les résultats similaires ont été obtenus lors de l'étude réalisée au cabinet médical DUFFLO de Mopti par KOITA et collaborateurs chez les patients. La tranche d'âge (26-35ans) était plus représentée soit 32,6% et les ménagères prédominaient avec 26,6%.

## **Résultats du test au Rose Bengale**

Sur les 498 prélèvements de sang, 78 étaient positifs au test d'agglutination rose Bengale (15,7%). En 2003, Bonfoh B. et col. [26] ont effectué des prélèvements sur 170 patients, dont 77 à Bamako et 93 à Mopti et ont observé 2 cas confirmés de brucellose humaine par le test d'agglutination Rose Bengale et par l'ELISA.

Dans notre étude, sur les 78 cas positifs au Rose Bengale, 37 ont été confirmés par le test d'immunocapture (Brucellacapt). Cette positivité avec le rose Bengale pourrait s'expliquer par les réactions croisées [27].

Le sexe féminin était plus représenté parmi les cas positifs au Rose Bengale 44/78.

Les tranches d'âge 46-55ans et 26-35ans ont été prédominantes parmi les cas positifs avec respectivement 20,51% et 19,00%.

Nous avons constaté avec le test Rose Bengale, les cultivateurs et les éleveurs étaient les couches les plus touchées avec 46,15%, 12,82%.

Dans notre étude, 74/78 cas positifs au RB ont affirmé avoir consommé du lait non pasteurisé et de produits laitiers.

Bonfoh et Al. 2002, à Bamako au Mali ont trouvé des anticorps contre les *Brucella* dans environ 30% des échantillons de lait.

### **Test d'agglutination par immunocapture Brucellacapt :**

Les échantillons révélés positifs au Rose Bengale ont été soumis au test d'immunocapture Brucellacapt :

Nous avons eu comme positifs 37/78 soit 47,44% par rapport au Rose Bengale.

Lorsque nous avons rapporté ce résultat à la population totale d'étude, nous avons eu 37/498 soit 7,43%. Le test Brucellacapt, nous a permis de titrer le taux d'anticorps,

ainsi nous avons observé des titres allant de 1/40 à 1/1280. Ce test à l'avantage de détecter les anticorps agglutinants et non agglutinants que seuls les tests de coombs et ELISA sont capables. Il a l'avantage de détecter les infections pendant les phases précoces et chroniques [2].

### **Biologie moléculaire : PCR**

(Réaction de polymérisation en chaîne)

De toutes les investigations dans le cadre de la prévalence de la brucellose faites au MALI, la particularité de notre étude a été la détection de la brucellose par la méthode de la biologie moléculaire. Cette méthode demeure de nos jours la plus spécifique. Elle est basée sur la présence du germe à travers son acide nucléique (ADN dans le cas de la brucellose).

La longueur de la bande est caractéristique pour chaque germe.

Nous avons observé 30/78 par rapport au Rose Bengale soit 38,46% dont 19 a été l'espèce *abortus*. Cette espèce est rencontrée chez les bovins, Tounkara K et col. (Laboratoire Central vétérinaire /Mali) ont trouvé une prévalence de 23% ±

2,5 de *B abortus* sur 1000 sérum de bovins testés par la méthode ELISA en 1994.

En se rapportant à la population générale d'étude, nous avons eu 30/498 soit environ 6,02% de positivité à la PCR.

**Au terme de cette étude, nous avons observé une séroprévalence élevée dans notre population d'étude avec le test de Rose Bengale. Le test Brucellacapt et la PCR confirment une transmission active de la maladie et l'exposition de la population générale. L'espèce *Brucella abortus* a prédominé parmi les cas positifs à la PCR, 19 / 30.**

***CONCLUSION***

***ET***

***RECOMMANDATIONS***

## **6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS :**

### **6.1. CONCLUSION**

**La présente étude, portant sur la prévalence de la brucellose humaine a été effectuée au moyen de 3 tests dont deux tests sérologiques, à savoir le Rose Bengale et le test d'immunocapture Brucellacapt ; le troisième test a été la PCR (Réaction de polymérisation en Chaîne).**

Cette étude fait ressortir les conclusions suivantes

- **Importance de la brucellose comme maladie humaine :**

Les de Mopti résultats des différentes analyses faites sur les échantillons, réalisés aux laboratoires de CNAM et du CVD ont montré que la brucellose humaine est assez importante dans le centre péri urbain.

Nous avons observé une prévalence d'environ 17% soit 78/498 au Rose Bengale. Nous avons observé une positivité de 47,44% (37/78) pour le Brucellacapt et une positivité de 38,46% pour la PCR (30/78).

Quand nous avons rapporté les résultats du Brucellacapt et de la PCR à la population générale, nous avons observé respectivement pour les deux tests 7,43% (37/498) et 6,02% (30/498).

Ces chiffres sont inquiétants vue la gravité de cette maladie et ses répercussions socio économiques et démontre que la brucellose sévit dans cette zone.

La brucellose est peu diagnostiquée dans nos formations sanitaires parce que cliniquement nous avons d'autres affection (le paludisme, les arthralgies...) en zone tropicale qui présentent la même symptomatologie.

De notre étude est ressorti que les éleveurs et les ménagères étaient les couches les plus nombreuses parmi les cas positifs. Plus de 95% des cas positifs étaient consommateurs de lait.

## **6.2. RECOMMANDATIONS :**

Vue les résultats obtenus, nous formulons les recommandations suivantes :

### **AUX AUTORITES SANITAIRES :**

- Mettre en place un programme national pour la surveillance de la brucellose.
- Faciliter le diagnostic rapide de cette maladie en mettant à la disposition des structures sanitaires sur place des réactifs comme le Rose Bengale.
- Collaboration entre vétérinaires, et les autres professionnels de la santé.

### **AUX AGENTS DE SANTE :**

- Faire des investigations par rapport à cette maladie surtout face à des personnes vivants dans les zones d'élevage.
- Plus d'applications et de prudences lors de la technique avec les réactifs de sérodiagnostic.

### **A LA POPULATION :**

- Eviter la consommation de lait non pasteurisé ainsi que la viande mal cuite.
- Prendre des précautions d'hygiène en cas du contact avec les animaux.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

## **7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :**

1. **Alton, G.G et Al.** La brucellose, technique de laboratoire 2<sup>o</sup> édition, Genève OMS 1977.
2. **Fon., M.D, Kaufman, A.F** Brucellosis in the USA, journal of infections diseases 136(2):312-316, 1977
3. **Protocole de recherche de la brucellose** dans le district sanitaire de Mopti, 2007.
4. **Tasei JP, Ranque P, Balique H, Traoré A.**, human brucellosis in Mali. Results of epidemiological study. 39(3):254-264 September 1982
5. **Toukara K, Maiga S, Traoré A, Seck B M, Akakpo AJ.** Epidémiologie de la brucellose bovine au Mali, enquête sérologique et isolement des premières souches de *Brucella abortus*.  
Revue scientifique technologique internationale 13(3) 777-786, 1994.
6. **Sy D, Toukara K, Traoré A , Sidibé S, Diarra A.**, Revue du CNRST, 2004.
7. **Institut de Veille Sanitaire:** la brucellose humaine de 1998 à 2000, page 199-201.
8. **Mailles A. et Vaillant V.** les brucelloses humaines déclarées en France en 2001 et 2002 : Surveillance nationale des maladies infectieuses, 2001-2003. Saint Maurice : Institut de veille sanitaire.
9. **Bonfoh B.** hygiène et qualité du lait et des produits laitiers au Mali : Implication en production laitière et santé publique. Lait sain pour le sahel, Bamako, rapport d'étude 2002:25-35.
10. **Bonfoh B. Wassem A., Traoré , Fané A., Spilmann H., Simbé, C.F, I.O , Nicolet J., Farat Z., and Zinstag J.** : Microbiological quality of cow's milk taken

at different intervals from the cow's udder to the selling point in Bamako (Mali), rapport d'étude 2002, page 40-46.

11. **World Health Organisation:** food technologies and public health. Report WHO/FNU/FOST/95.12-WHO GENEVA, 1995, 65 pages.

12. **Sidibé Y. Traoré M, Bassirou B.** les effets de la contamination du lait pour la santé dans les zones urbaines et périurbaines de Bamako et Mopti, Mali, rapport d'étude ,2003 pages 3-11.

13. **Dictionnaire medicale,** Brucellose, Caractères cultureux et Ecologie. 2006.

14. **Benett JJ.,** cours de maladies contagieuses 2000, pages 110-115

15. **Garin-Bastuji B., F. Delcueillierie,** les brucelloses humaines et animales en France en l'an 2000, situation épidémiologique, programme de contrôle et d'éradication. Médecine masse infecte. 2001, 31 Suppl. 2 pages 202-216

16. **J.Roux,** Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, 57(2), 179-194 (1979)

17. **Gidel R. et AL,** Epidémiologie de la brucellose humaine et animale en Afrique de l'Ouest. Résultats de 10 enquêtes effectuées en Cote D'ivoire Haute Volta et Niger In : International symposium on brucelloses, Rabat, 2-4 Jun 1975, **Basel S., Karger.** 1976 pages 187-200 (Developpement in Biological Standardization vol.31)

18. **OMS,** série de rapports techniques numéro 464, 1971.

19. **Kielwein G.,** Leitfaden der Mlichkunde und Milchhygiene. Blackwell wissenschafts-Verlag. Berlin 1994, pages 210-215

20. **Eric Pichard, Jean Beytout, Jean Delmont, Bruno Marchous.**

Malintrop, Manuel de maladies infectieuses pour l'Afrique,

21. **Lennette, E.H., Balows, A., Hausler Jr., W.J, and Shadomy, H.J...**1985, Manual of Clinical Microbiology, 4th Ed. American Society for Microbiology. Washington D.C.
22. **Garnier J.M, Pierre Begue, Jacques Astrid.** Pathologie infectieuse de l'enfant.
23. **Brigitte, Ranque, Sarah Bursaux, Capneine Morelot-Panzini,** Maladies infectieuses, édition Vernazabres GREGO.
24. **Institut de Veille en Santé.** Etude sur les brucelloses humaines en France métropolitaine, 2002-2004.
25. **Acha P.N et Szyfres B.** Zoonoses et maladies transmissibles commune à l'homme et aux animaux (OIE) 1989, pages 304-320.
26. **Sidibé Y., Traoré M., Bassirou B.,** Les effets de la contamination du lait pour la santé publique dans les zones urbaines et périurbaines de Bamako et Mopti, Mali rapport d'étude ,2003 p.3-11
27. **Salem M.N et al.** / Veterinary Microbiology 140(2010) 392-398
28. **Antonio Orduna et al,** Journal of Clinical Microbiology, Nov 2000, p. 4000-4005.
29. **Anne Décoster, Jean-Claude Lemahien, Dr Eric Deherq, PR Marc Duhamel,** Cours de Bactériologie, édition 2008.

# ***RESUME***

## **8. RESUME**

La brucellose, également appelée fièvre de Malte, fièvre Sudéro algique ou fièvre ondulante est une anthrozoose due à des coccobacilles du genre *Brucella*.

Nous avons mené une enquête transversale sur 498 participants en vue de déterminer la prévalence de la brucellose humaine dans une zone d'élevage du Mali: Mopti.

Un échantillon de 5 mL de sang a été prélevé chez chaque participant, 3mL de sang dans un tube sec et 2 mL dans un tube avec citrate de Sodium.

Les prélèvements ont été transportés au centre de santé de référence de Mopti, où les tubes secs contenant 3mL de sang ont été centrifugés à 1500 tours/min puis le sérum a été séparé du culot globulaire et les échantillons ont été testés sur place à l'EAT (Epreuve d'Antigène Tamponné ou Rose Bengale) au laboratoire du CS Réf de Mopti.

Le restant des sérums a été ensuite traité au test d'Immunocapture Brucellacapt au laboratoire du CNAM.

Les tubes de sang avec du citrate de Sodium ont été utilisés pour la biologie moléculaire PCR (Polymérase Chain Réaction).

Les échantillons trouvés positifs au rose Bengale (78/498) ont été testés au Brucellacapt (test d'agglutination par immunocapture) et à la PCR.

Nous avons observé respectivement une positivité de 47,44% (37/78) pour le Brucellacapt et une positivité de 38,46% pour la PCR (30/78).

Quand nous avons rapporté les résultats du Brucellacapt et de la PCR à l'ensemble de l'échantillon, nous avons observé respectivement pour les deux tests 7,43% (37/498) et 6,02% (30/498).

Le test Brucellacapt et la PCR confirment une transmission active de la maladie et l'exposition de la population générale. L'espèce abortus a prédominé parmi les cas positifs à la PCR, 19 / 30.

## **Summary:**

Brucellosis is an anthroponosis due to coccobacilli of the genus *Brucella*.

We conducted a cross-sectional survey on 498 subjects in order to determine the prevalence of human brucellosis in a farming area of Mali: Mopti.

A 5 mL sample of blood have been collected from each participant, 3 mL of blood in a dry tube and 2 mL in a tube with sodium citrate.

The samples were transported to the reference health center of Mopti, where the dry tubes containing 3 mL of blood were centrifuged at 1500 rpm and serum was separated from red blood cells and samples were tested on site at the EAT (Buffered Antigen test or Rose Bengal) in the laboratory of Mopti reference center.

The remaining serum was then treated by Brucellapt immunocapture test in the laboratory of CNAM.

Blood tubes with sodium citrate were used for molecular biology PCR (Polymerase Chain Reaction).

The samples found positive to Rose Bengal (78/498) were tested by Brucellapt (immunocapture agglutination test) and PCR.

We observed a positivity respectively 47.44% (37/78) for Brucellapt and 38.46% positivity for PCR (30/78).

When we reported the results of Brucellapt and PCR in the whole sample, we observed for the two tests respectively 7.43% (37/498) and 6.02% (30/498).

Brucellapt test and PCR confirm active transmission of the disease and the exposure of the general population. The species *abortus* predominated among the cases positive by PCR, 19 / 30.

# ***ANNEXES***

## **9. Annexes :**

### **Annexe1 : Composition du CVD/Mali :**

Le centre est composé actuellement de 3 grands blocs :

#### **Un bloc administratif organisé comme suit :**

Un (1) bureau du directeur général

Un (1) secrétariat principal

Un (1) bureau du gestionnaire

Un (1) bureau de comptable

Deux (2) bureaux des médecins

Une (1) salle de conférence

Une (1) salle informatique et deux (2) bureaux des informaticiens,

Une salle (1) d'attente,

Un (1) magasin

Deux (2) toilettes. (Hommes et femmes)

#### **Une unité clinique composée de :**

Cinq (5) boites de consultation,

Trois (3) bureaux,

Une (1) salle d'attente.

#### **Le laboratoire de recherche :**

Un (1) bureau du microbiologiste,

Un (1) bureau de l'immunologiste,

Un (1) bureau des techniciens,

Une (1) chambre noire (lecture sous UV),

Une salle de préparation des milieux de travail,

Une salle de stérilisation,

Une chambre froide

Une toilette.

- Le personnel :

Un (1) Pharmacien microbiologiste,

Un (1) Pharmacien immunologiste,

Cinq (5) Pharmaciens généralistes,

Trois (3) internes (pharmaciens),

Trois (3) techniciens de labo,

Un (1) technicien supérieur.

Au CHU-GT :

Une unité composée des médecins chercheurs

Un laboratoire de bactériologie

Le laboratoire de microbiologie du CVD/ CNAM :

Il est équipé de :

Une (1) hotte à flux laminaire avec un incinérateur électrique pour la stérilisation des anses.

Un (1) microscope binoculaire de model : (MC-0421)

Un (1) incubateur à 37° C de model : (N° 1917-2 0809360 220V 8a 60Hz),

Un (1) incubateur à 42° C de model : (N° 152 1461060805267 240V 0,6A 150W 50/60Hz),

Un (1) microwave de model : R-242DC (W)

Un (1) réfrigérateur de 4°C pour réactifs et milieux de travail,

Un (1) ordinateur,

Un (1) appareil sophistiqué pour faire de la glace de marque Scots Man, model N° : AFE325 AS – 6A,

Un (1) micro centrifugeuse de model : (C0260-18- 230 230V – 50/60Hz, 6A),

Deux (2) thermocycleurs de model (N° 5331 46154 2,4A 230V 50/60Hz 500W),

Un (1) Heat block de model : (CAT N° 460 – 2310 230V AC 100W 50/60Hz),

Un (1) Mini -BeadBeater model : (N° 693 EUR 0-2860 SPM, 230V, 4.7A),

Deux (2) GENES MATE (Appareil à électrophorèse) alimentés par un High voltage de model 250,

Deux (2) Vortex

## **Annexe 2 : Protocole et méthode du test au Rose Bengale:**

### **Composition du coffret :**

Nous avons utilise le kit VIRCELL:

VIRCELL Rose Bengale suspension : 5 mL d'une suspension acide de *Brucella* inactivée et colorée au Rose Bengale, contenant du phénol.

VIRCELL Rose Bengale Positive Control : 1 mL de sérum de contrôle positif, contenant du phénol.

VIRCELL Rose Bengale Négative control: 1 mL de sérum de contrôle négatif, contenant du phénol.

### **Annexe3 : Protocole et méthode du test d'immunocapture Brucellacapt:**

#### **Composition du coffret:**

BRUCELLACAPT PLATE: 2 plaques de 12 barrettes de 8 puits a fond en U sensibilisées par une anti-immunoglobuline humaine spécifique.

BRUCELLACAPT SERUM DILUANT: 14 ml de diluant pour sérum colore.

BRUCELLACAPT SUSPENSION: 12 ml de suspension bactérienne de *Brucella abortus* colorée et inactivée par traitement au formaldéhyde.

BRUCELLACAPT POSITIVE CONTROL: 250 µL de contrôle positif additionné de Proclin.

BRUCELLACAPT NEGATIVE CONTROL: 250 µL de contrôle négatif additionné de Proclin.

#### **Annexe4: La biologie moléculaire**

Nous avons utilisé le Kit Qui Agen MIDI pour l'extraction (protéase, AW1, AW2, AL Buffer)

#### **Amplification :**

- **Préparation du mélange mixte:**

Les différentes amorces et réactifs utilisés :

B4 (5'-TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA-3'), concentration 5 pMol/µL (26)

*Séroprévalence de la brucellose humaine dans la zone peri-urbaine de la région de Mopti.*

B5 (5'-CGC GCT TGC CTT TCA GGT CGT-3') 5pMol

B4 et B5 : nous sommes partis d'une solution mère de concentration initiale 100mM.

Nous avons réalisé une dilution au  $\frac{1}{4}$  pour obtenir notre solution de travail à 25 Mm.

La Taq polymérase.

**QUESTIONNAIRE :**

Date : .....

Nom et prénoms du sujet : .....

Numéro d'identification du sujet : .....

Sexe : .....

Age : .....

Résidence : .....

Profession : .....

Antécédent de maladie : .....

Signes cliniques : .....

Traitement en cours : .....

Résultats sérologiques(RB) : .....

Confettis pour PCR OUI [ ] NON [ ]

**FICHE SIGNALYTIQUE :**

**Nom :** SIDIBE

**Prénoms :** Mama dite Dialla

**Titre de la thèse :** Prévalence de la Brucellose humaine dans le centre urbain de Mopti.

**Année universitaire :** 2010-2011

**Ville de soutenance :** Bamako

**Pays de soutenance :** Mali

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

**Secteurs d'intérêt :** Microbiologie, Santé Publique, Biologie Moléculaire.

**Mots clefs :** Brucellose, Prévalence, PCR, CNAM, CVD.

## **SERMENT DE GALIEN**

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement;

D'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobres méprisés de mes confrères si j'y manque

***Je le jure.***