

2.2 Risques zoonotiques liés au mammifères marins captifs, au Zoo de La

Flèche

2.2.1 Matériel et méthode

Le zoo de la Flèche où j'ai effectué un stage de deux mois se situe dans la Sarthe (72) au cœur de la ville du même nom. Ce parc zoologique dispose d'un secteur aquatique et polaire appelé « Complexe » qui permet au public d'avoir accès à diverses espèces comme les loutres, les manchots, les ours polaires, les loups arctiques et les otaries.

Nous nous sommes intéressés dans cette étude seulement aux otaries présentes sur le parc. Elles sont au nombre de 4 répondant au nom de Wally, Lucky, Jimmy et Cooky. Ce sont toutes des otaries de Californie (Figure 136). Leur journée se déroule de la manière suivante :

- sortie dans le bassin extérieur le matin vers 9h30,
- spectacle à 11 h et 16 h avec parfois un entraînement en plus sur une aire dédiée à cet effet,
- sortie libre dans le bassin extérieur dans la journée (si le temps le permet),
- rentrée et soins le soir vers 17h30.

Des soigneurs sont présents au quotidien avec les otaries. Ils sont au nombre de 4 et possèdent des parcours bien distincts avec un point commun celui de la formation de soigneur animalier. Le vétérinaire peut aussi être amené à côtoyer ces otaries. Afin de connaître les gestes et les connaissances des personnes présentes au contact des otaries, j'ai eu un entretien avec la responsable de ce secteur et j'ai pu observer directement les soins au quotidien.

Figure 136 : Otarie de Californie présente au parc du zoo de la Flèche (*Rougelin, 2012*)



2.2.2 Résultats

2.2.2.1 Bilan de l'entretien avec la responsable du « complexe »

La responsable du secteur s'occupant des otaries, a effectué lors de son parcours universitaire une licence de biologie ainsi qu'une formation soigneur. Lors de l'entretien, elle s'est montrée consciente des risques de transmission de maladies à l'homme par les mammifères marins mais a semblé plus soucieuse que les hommes puissent transmettre des maladies aux mammifères marins. Pourtant, sa responsabilité est plus marquée envers les soigneurs qui doivent impérativement travailler dans un environnement protégé.

En ce qui concerne la connaissance spécifique des maladies, la soigneuse a pu me citer quelques zoonoses comme la tuberculose, les maladies cutanées ainsi que la toxoplasmose surtout pour les femmes enceintes. La brucellose n'était plus qu'un souvenir ancien de ses études.

2.2.2.2 Mesures de prévention mises en place

Lors de l'observation d'une journée « type » auprès des otaries, j'ai pu déterminer quatre activités critiques où les risques sont accrus : les spectacles et l'entraînement, le nourrissage, les soins et la nage avec les otaries et j'ai également observé comment les soigneurs essaient de se protéger.

- Lors des spectacles et des entraînements

Les spectacles se déroulent deux ou trois fois dans la journée en fonction des périodes de l'année et du temps et les quatre otaries du zoo travaillent deux par deux durant le spectacle avec un final où les quatre animaux sont présents.

Lors de ces spectacles, le premier risque et le plus important est celui de la morsure. J'ai d'ailleurs pu assister à une bagarre entre deux otaries qui aurait pu être grave si le soigneur s'était retrouvé au centre du conflit. En effet, des précédents ont déjà été observés au zoo avec des morsures sur des soigneurs lors de conflit entre otaries.

Le second risque provient du fait que les soigneurs caressent et félicitent leurs otaries par des contacts cutanés multiples sans gants ainsi que des embrassades sur le visage. Le risque de contamination cutanée ou muqueuse voire même digestive est donc accru.

Le troisième provient de la nourriture donnée pendant le spectacle en récompense. Ces poissons sont eux aussi manipulés sans gants. D'ailleurs les soigneurs n'utilisent jamais de gants sauf pour la manipulation des produits chimiques.

Par contre l'hygiène des mains est respectée (lavage au savon et à l'eau) à chaque manipulation du poisson ainsi qu'avant et après les contacts avec les animaux lors des spectacles.

- Lors du nourrissage

Le risque de morsure lors du nourrissage est moindre que lors des spectacles mais existe tout de même surtout à la fin lorsqu'il n'y a plus de poissons. Au cours de cette activité le poisson est toujours manipulé sans gants (risque de contamination direct par le poisson mais risque de contamination par morsure aussi). Des gants de contention sont pourtant à disposition du personnel.

- Lors des baignades avec les otaries

Les baignades avec les animaux sont plus rares que les entraînements et ont pour but de familiariser les animaux au soigneur et de renforcer la relation de confiance établie entre l'otarie et son soigneur. Ses baignades sont aussi une récompense pour l'animal puisqu'elles sont effectuées sous forme de jeux et d'exercices.

Le risque de morsure est bien sûr toujours présent mais ne peut cependant pas être contrecarré par des moyens techniques. Par contre, le risque lié à la contamination de l'eau par les mammifères marins est, lors de cette activité, le plus important et est limité par le port d'une combinaison de plongée laissant apparaître seulement les mains et le visage.

- Lors de soins aux animaux

Durant mon séjour, une des otaries Lucky, la plus âgée mais qui est aussi le mâle dominant du groupe, présentait une folliculite bactérienne au niveau du cou et des ulcères buccaux. Des soins locaux lui sont apportés quotidiennement avec :

- un lavage du cou avec un savon antiseptique et un rinçage à l'eau claire.

Lors du soin au cou, la soigneuse, utilise des gants afin d'effectuer le lavage avec le savon mais rince à l'eau claire sans gants. Le lavage des mains est ensuite effectué avec de l'eau claire sans savon,

- une application de pommade dans la cavité buccale.

Les animaux sont entraînés par leur soigneur à ouvrir la bouche et la garder ouverte suite à un signal. Cette méthode évite de se faire mordre par l'animal et de lui procurer des soins sur le mode du jeu et de la récompense. Cette méthode permet aussi au vétérinaire de pouvoir effectuer un examen clinique de la cavité buccale en toute sécurité.

2.2.2.3 Entretien des locaux et mesures de protection

Les locaux des otaries se divisent en 3 secteurs bien définis : les cases et le bassin pour dormir, l'aire des spectacles et le bassin de détente extérieur. En effet, le lieu de coucher des otaries est composé de 4 cases abritées dont 2 donnant sur un bassin intérieur.

L'aire de jeux est balayée tous les matins et chlorée une fois par mois.

Les cases de nuit sont lavées tous les matins au jet d'eau puis brossées et rincées à l'eau claire sans aucune protection. Lors de cette manœuvre, le risque le plus important est celui des éclaboussures. Elles sont nettoyées en plus avec du savon doux GLITTER une fois par semaine et un désinfectant VIRAKIL une fois tous les 15 jours. Les temps de contact des produits et leur délai d'action sont donc plus ou moins respectés et sont estimés à 5 minutes.

Les eaux des bassins sont testées deux fois par jour et les paramètres importants sont le pH (6,8-8) et le taux de chlore dans l'eau (0,4 mg/L). Le test du matin permet au soigneur de voir s'ils peuvent sortir les animaux sans risque et le test du soir permet de corriger les paramètres avec l'ajout de chlore, d'acides ou de bases. L'eau de ces bassins n'est jamais complètement changée mais un système de filtration et de remplissage continu des bassins permet le renouvellement de l'eau et l'élimination des déchets. Ce système fonctionne en deux parties avec :

- un pré-filtre qui permet d'éliminer les gros déchets comme les feuilles,
- un second filtre qui grâce à une cuve remplie de sable de diverses granulométries agit comme un tamis et les déchets sont ensuite rejetés dans les égouts sans traitement.

Des analyses bactériologiques (germes fécaux et coliformes) sur l'eau devraient être effectuées régulièrement mais ceci n'est pas fait.

Les jets à haute pression sont utilisés une à deux fois par an pour nettoyer surtout les murs des divers habitats. Aucune protection n'est prise lors de leur utilisation.

Des pédiluves avec du VIRAKIL sont mis en place à l'entrée du bâtiment et changés tous les jours.

2.2.2.4 Tenue de travail et entretien

Les soigneurs du parc ont une tenue de travail dédiée à cet effet et l'entretien de ces tenues est effectué sur le site. Les habits civils ne sont donc pas souillés et les vêtements de travail ne sont pas rapportés à la maison.

2.2.2.5. Procédures lors d'introduction de nouveaux animaux et lors des interventions du vétérinaire

Lors de l'arrivée d'un nouvel animal au zoo de la Flèche, il n'est pas possible d'effectuer une réelle quarantaine dans des locaux séparés. C'est pourquoi le vétérinaire du zoo fait effectuer un test tuberculose (intradermoréaction) par ses confrères avant l'arrivée de l'animal.

L'animal, lors de son arrivée, est donc mis dans un box intérieur sans accès aux bassins intérieur et extérieur.

Des prélèvements de selles et, si possible, un écouvillon rectal sont effectués sur l'animal. Celui-ci n'est mis en contact avec ses congénères que lors de la réception des résultats négatifs de coproculture en ce qui concerne les salmonelles.

Lors des soins, les risques de morsures sont relativement limités de par l'existence d'un training médical régulier effectué par les soigneurs, en la présence du vétérinaire, où les gestes médicaux les plus courants sont effectués ou mimés (examen clinique, examen de la cavité buccale, piqûre avec de l'eau, prise de sang etc...). Ce training régulier, alors même que les animaux sont en bonne santé, leur permet de s'acclimater aux soins et au vétérinaire. La seule prise de risque lors d'une intervention, d'après le vétérinaire, c'est lors d'une capture dans un filet lorsque l'animal n'est pas coopératif pour une anesthésie générale gazeuse.

2.2.3 Discussion

Pendant les deux mois passés au sein du zoo de la Flèche j'ai pu observer les procédures et les comportements des personnes au contact quotidien des otaries de Californie.

J'ai d'abord pu constater que les risques infectieux liés à ces contacts sont connus par les membres du personnel du zoo. En revanche la protection liée à ces risques est limitée.

Il y a donc quelques points qui pourraient être améliorés concernant l'équipement, les procédures et les produits.

- Améliorer l'équipement et l'hygiène générale

Le port de gants lors des contacts avec les animaux semble une règle primordiale. Les gants doivent être portés lors des spectacles pour manipuler les animaux et les poissons, lors des nourrissages pour manipuler les poissons et lors de soins du début à la fin.

Lors des entraînements en bassin, un masque ou des lunettes de plongée devraient compléter les tenues utilisées.

Un masque pour les voies aériennes devrait être porté lors de l'utilisation de jet à haute pression.

Le lavage des mains au savon doux ou désinfectant devrait être accentué et effectué après chaque contact avec les animaux et le poisson et avant de quitter les lieux.

- Améliorer les procédures

Les procédures de quarantaine pourraient être améliorées si les animaux récemment acquis pouvaient être isolés dans une case éloignée et sans aucun contact avec les animaux déjà présents.

La durée de la quarantaine devrait être fixe et ne pas dépendre de l'arrivée de résultats pour pouvoir observer l'apparition de signes cliniques pour des maladies non testées.

Des analyses bactériologiques (germes fécaux) sur l'eau des bassins devraient être réalisées régulièrement (une fois par mois).

- Critique des désinfectants utilisés

- Virakil :

Le Virakil est un désinfectant liquide composé de chlorure de didecyldiméthyl-ammonium, de glutaraldéhyde, de chlorure d'octyldécyl-diméthyl-ammonium, de chlorure de dioctyldiméthyl-ammonium et de chlorure d'alkyldiméthylbenzyl-ammonium. Ce produit, d'après la législation française, entre dans les désinfectants utilisables pour les locaux des animaux domestiques et se trouve être bactéricide, fongicide et virucide s'il est utilisé à la dilution de 2 %.

Ce produit correspond donc aux besoins du parc en ce qui concerne la désinfection des locaux transposée aux animaux sauvages.

Par contre, il devrait être utilisé avec précaution car il peut provoquer des brûlures et est corrosif. Il faut donc bien rincer les locaux après utilisation.

- Glitter :

Ce produit est un savon bactéricide utilisable pour l'hygiène des mains seulement. Il ne convient donc pas à l'usage qu'en fait le parc pour le nettoyage des locaux des animaux.

En conclusion, l'hygiène personnelle des mains et le port de gants lors des contacts avec les animaux en captivité pourraient être améliorés par les membres du personnel.
--

2.3 Recueil de données et zoom sur la brucellose et la tuberculose : Est-ce un danger émergent ?

2.3.1 Recueil de données sur la brucellose dans le RNE

Dans la bibliographie, nous avons vu que la brucellose est une zoonose fréquemment retrouvée chez les mammifères marins, surtout en milieu naturel, et qui possède un tropisme nerveux chez les hommes ce qui rend cette maladie dangereuse.

L'étude suivante est une étude rétrospective, effectuée sur 13 ans, rassemblant les données sérologiques et bactériologiques sur les mammifères marins échoués du CRMM.

Le but de l'étude, est de connaître le pourcentage d'animaux atteints par la maladie dans l'échantillon testé. Nous n'avons nulle intention de déterminer une prévalence de la maladie chez les mammifères marins.

L'étude consiste en un regroupement des données d'échouages sur 1997-2010 (nombre d'échouages, stade de décomposition des cadavres, nombre et types de prélèvement effectués, nombre d'analyse effectuées et résultats de celle-ci).

2.3.1.1 Matériel et méthode

Pour l'étude, tous les échouages sur toutes les côtes françaises ont été répertoriés, durant 13 ans à partir de 1997, par les correspondants ou les personnes travaillant dans les organisations comme le CRMM. Toutes les personnes déployées sur les échouages doivent remplir une fiche standardisée prévue soit pour les cétacés, soit pour les grands mammifères marins ou pour les phoques (Annexes 1, 2 et 3). Cette fiche aborde les principaux éléments importants pour cette étude : l'espèce de l'animal, l'état de décomposition, les prélèvements effectués.

Pour l'espèce de l'animal trouvé nous avons noté si c'est un pinnipède ou un cétacé. En effet, nous pourrions alors déterminer des pourcentages dans les deux échantillons de population. D'autant plus, que les erreurs d'identification sur les genres sont plus fréquentes.

En ce qui concerne l'état de décomposition, il existe une norme en 5 stades déterminée par le CRMM (Figure 138):

- stade 1 : animal frais avec un œil clair échoué depuis quelques heures ;
- stade 2 : animal avec un œil vitreux et quelques lésions cutanées échoué depuis quelques jours ;
- stade 3 : De larges lambeaux de peau localisés sont partis ;
- stade 4 : Tout le corps de l'animal est sans peau ;
- stade 5 : Des os commencent à apparaître.

Figure 138 : Stade de décomposition des animaux (CRMM, 2012)



En ce qui concerne les prélèvements, 3 protocoles différents existent et dépendent de l'état de putréfaction des animaux (Figures 139 et 140).

Figure 139 : Méthode pour faire les prélèvements (CRMM, 2012)

Fiche de terrain : dissection et échantillonnage

Prérequis :

- Le CRMM a été informé.
- L'animal est hors d'accès du public (périmètre de sécurité ou transféré).
- La fiche échouage est remplie et un numéro identifiant est attribué.

1- Disposer la carcasse sur le côté droit.

2 - Prélèvements externes

- Prélever deux morceaux de **lard** et un morceau de **peau**, en avant de la dorsale.
- Prélever un morceau de **muscle** en dessous.
- Prélever 5 **dents** au milieu de la mâchoire inférieure gauche.

3- Réaliser l'ouverture de la carcasse

4 - Echantillonnage des organes internes

- Prélever le **foie** et réaliser 2 tranches au travers des lobes.
- Prélever un **rein** et réaliser une tranche au milieu de l'organe.
- Ligaturer l'**estomac** aux deux extrémités et le prélever.
- La **rate** est adhérente à l'estomac, elle peut être laissée en place, ou prélevée séparément.
- Observer et identifier les gonades, inciser la **droite** et prélever les deux organes.

5- Regrouper les déchets biologiques en sacs.

Composition dessin, figures et mise en page : Denis W. 2008. CRMM/ULB

Figure 140 : Protocoles des prélèvements (CRMM, 2012)

Fiche de terrain : dissection et échantillonnage

Echantillonnage 1 : Données de population

Dents

Emballage sac plastique libellé étiqueté

Dents

Echantillonnage 2 : Protocole intermédiaire
(Démographie, génétique, écologie alimentaire, traceurs métaux et toxiques.)

Lard (2) Dent Peau Muscle Foie (2) Rein Rate

Estomac

Gonades (Ovaires ou testicules)

foie (POPS*) et lard (2) emballés aluminium

Emballage sac plastique libellé étiqueté

Rein Lard (Alu 2) Dent Foie (Alu) Peau Gonades (Ovaires ou testicules) Rate Estomac

Emballage sac plastique libellé étiqueté

Echantillonnage 3 : Protocole complet
(Démographie, génétique, écologie alimentaire, traceurs métaux et toxiques, histo-pathologie et bactériologie).

L'échantillonnage 2 additionné lésions, malformations, corps étrangers... ou lésions suspectant des agents pathogènes (bactéries, virus).

Histopathologie

Bactériologie

Tous les prélèvements doivent être conditionnés en sac plastique, libellés avec le numéro identifiant. Les deux prélèvements de lard et un prélèvement foie doivent être emballés dans de l'aluminium au préalable.

L'ensemble des prélèvements seront mis en un lot unique libellé, additionné d'une copie de la fiche échouage. Le tout est stocké en congélateur dédié à -20°C.

Tous les déchets organiques de la dissection doivent être regroupés en sacs et former un lot avec la carcasse pour l'enlèvement.

Restez attentif aux conditions d'Hygiène et de Sécurité.

Composition dessin, figures et mise en page : Denis W. 2008. CRMM/ULB

Nous ne nous sommes intéressés qu'aux prélèvements effectués pour les analyses bactériologiques en l'occurrence le protocole 2 ou 3 avec des prélèvements congelés à -20°C pour une durée variable, ce qui va influencer la lecture et surtout l'interprétation des résultats. Les prélèvements sont considérés comme potentiellement non informatifs (développement en culture difficile des brucelles) après 1 an de congélation.

Pour la recherche de brucellose, le prélèvement de choix et le plus effectué, est celui de la rate. D'autres prélèvements ont pu être envoyés comme du sérum lorsque cela est possible. Il faut pour cela que l'animal soit mort depuis moins de 48 heures. Des prélèvements de foie, poumons, reins et ganglions ont pu être envoyés aussi pour analyse.

Les analyses bactériologiques effectuées sur les tous les types de prélèvements (autre que le sérum) sont :

- isolement à partir de culture sur des milieux nutritifs très enrichis adaptés à la pousse de ces bactéries exigeantes. La culture suit la norme AFNOR (Association Française de Normalisation) établie en 2004 ;
- PCR selon la méthode interne de l'ANSES avec les « printers » IS 711, BCSP31, gene per, publiée par *Bounaadja et al. (2009)*.

Les analyses sur le sérum sont des tests ELISA indirect de compétition et une agglutination sur lame (EAT : Epreuve de l'Antigène tamponné) au rose Bengale.

- Méthode de culture et d'identification des brucelles

Les organes prélevés font l'objet d'un broyage fin, le plus complet possible. Un pré-découpage préalable du prélèvement au moyen de ciseaux permet souvent d'obtenir plus rapidement un broyage complet.

Ce broyage est mis en suspension dans une solution saline tamponnée au phosphate (STP), dont le pH est proche de la neutralité, dans une proportion de 1/2 à 1/5 de manière à obtenir une suspension ni trop dense ni trop liquide pour l'ensemencement.

0,1 à 0,2 mL de suspension sont étalés directement à la surface de trois milieux solides gélosés :

- un milieu gélosé solide non sélectif non enrichi (Trypticase-soja, gélose au sang ou géloses Colombia),
- un milieu gélosé solide non sélectif enrichi avec 2 à 5 % du volume de sérum de bovin ou de cheval,
- un milieu gélosé solide sélectif de Farell (agents sélectifs : Polymixine B sulfate, Bacutracine, Natamycine, Acide nalidixique, Nystatine et Vancomycine). Beaucoup de souches issues des pinnipèdes sont sensibles aux milieux sélectifs et peuvent ne pas se développer sur ceux-ci.

La technique de recherche par culture des brucelles étant une technique peu sensible et les prélèvements renfermant parfois peu de bactéries, il faut multiplier les ensemencements pour chacun des trois types de milieux. Il faut donc semer au moins 4 boîtes de Pétri par type de milieu.

Pour chaque type de milieu, les boîtes de Pétri sont incubées à 37 ± 2 °C, pour moitié en atmosphère normale et pour moitié en atmosphère renfermant 5 à 10 % de CO₂. Les boîtes sont examinées régulièrement jusqu'au 10^{ème} jour de culture. Les colonies commencent à apparaître entre 3 à 5 jours d'incubation. Les colonies de brucelles sont alors translucides, d'un jaune pâle ambré, à bords lisses et réguliers et d'un diamètre de 0,5 à 1 mm.

A ce stade les colonies suspectes sont ensuite repiquées sur un milieu solide gélosé non sélectif et sélectif et incubées dans l'atmosphère adéquate.

Suite au repiquage, le caractère lisse ou rugueux des colonies est déterminé après 4 jours d'incubation par observation directe des colonies à l'aide d'une loupe binoculaire. Les colonies doivent apparaître rondes, bleues et avec des grains fins. En effet, les critères de détermination se font à partir des souches parfaitement lisses.

Une agglutination sur lame par du sérum hyper-immun spécifique de *Brucella* en phase liquide est réalisée. Des épreuves à l'oxydase et à l'uréase sont aussi effectuées ainsi qu'une coloration de Gram.

La souche isolée suspecte peut être considérée comme probablement une *Brucella* lorsque :

- sa croissance est possible sur le milieu sélectif de Farell,
 - les colonies de cette souche apparaissent après plusieurs jours de culture et présentent une morphologie évocatrice dans une atmosphère adéquate,
 - elle présente un aspect au Gram de petit coccobacille à Gram négatif,
 - elle agglutine en présence de sérum spécifique anti-*Brucella*,
 - elle présente un caractère Oxydase + et/ou Uréase +.
- La bactériologie en milieu solide possède une sensibilité médiocre.

- Méthode de la PCR

Les bactéries sont mises en culture sur un milieu gélosé solide non sélectif (gélose au sang) enrichi en sérum équin à hauteur de 5 % et incubées à 37°C sous une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂ pendant 48 à 72 heures.

L'extraction de l'ADN est faite grâce à la mise en suspension des colonies dans du phénol et du chloroforme et à l'aide de deux kits commerciaux Instagen Matrix DNA (BioRad, France) et High pure PCR Template Preparation (Roche Diagnostics, France). La concentration en ADN est ensuite ajustée à 1 µg/mL grâce à de l'eau sans nucléase et stocké à -20°C dans l'attente des analyses.

Les primers utilisés sont au nombre de trois : IS711/IS6501, bcs31 et per.

Pour l'amplification en elle-même, on utilise 50 µL de solution :

- 38,4 µL d'eau sans RNase,
- 5 µL de PCR Buffer (Promega, France),
- 200 µM de dNTP mix,
- 2 mM de MgCl₂,
- 1 µM de chaque primer,
- 1 U de Taq polymérase (Progema, France),
- 1 ng d'ADN.

Pour le primer IS711, la solution obtenue a été dénaturée 5 minutes à 94°C. Puis 5 pré-cycles ont été effectués (1 minute à 94°C, 1 minute à 60°C et 1 minute à 72°C). 35 cycles ont ensuite été effectués à 55°C puis la solution est laissée pendant 7 minutes à 72°C.

Pour les primers bcs31 et per, la solution obtenue est laissée pendant 15 cycles à 55°C.

Les différents morceaux d'ADN obtenus dans la solution finale sont séparés sur un gel de migration adapté et interprété.

- Méthodes pour la sérologie

Le test au rose Bengale correspond à une agglutination utilisant des antigènes spécifiques de *Brucella* marqués au rose Bengale. Ce sont les IgM qui sont fixées par les antigènes. Ce test s'effectue selon la méthode suivante à une température de $22 \pm 4^\circ\text{C}$:

- prélever 25-30 μL de sérum à analyser et de sérum témoin et les déposer sur un support adapté,
- placer le même volume d'antigène à côté des 2 précédents dépôts,
- mélanger les sérums et les antigènes de façon circulaire à l'aide d'une baguette en verre propre afin d'obtenir une solution répartie 2 cm de diamètre,
- le mélange est ensuite agité pendant 4 minutes à température ambiante,
- effectuer une lecture immédiatement après l'incubation.

Toute réaction du sérum à tester est considérée comme positive. Le témoin doit donner une réponse positive minimale.

Ce test possède une spécificité modérée et de nombreux faux positifs peuvent apparaître. C'est pourquoi les tests suivants doivent être effectués.

Le test ELISA indirect de compétition est une méthode de détection des anticorps brucelliques grâce à des antigènes spécifiques et des anticorps anti-antigènes marqués. Ce test est commercialisé sous le nom de COMPELISA par Veterinary Laboratories Agency. Il fonctionne pour toutes les espèces car il ne fait pas appel aux anticorps anti-espèces qui ne sont pas disponibles pour les mammifères marins. Le test ELISA s'effectue de la manière suivante :

- une solution d'antigènes sLPS de *B. abortus* S1119-3 est préparée,
- placer 20 μL de sérum dans les puits de la plaque. Laisser 16 puits vides pour les contrôles,
- placer 20 μL de contrôles positif et négatif dans 12 des puits vides et les 6 derniers puits vides sont les contrôles pour la solution d'antigènes,
- tous les puits de la plaque sont remplis avec 100 μL de solution LPS,
- les plaques sont incubées à température ambiante en agitation pendant 30 minutes,
- les antigènes libres sont ensuite rincés cinq fois à l'aide d'une solution de lavage,
- laisser reposer les plaques pendant 10 minutes,
- ajouter 100 μL de solution chromogène dans chaque puits,
- laisser les plaques à température ambiante 10 minutes,
- ralentir la réaction avec l'ajout de 100 μL de solution de stoppage dans chaque,
- lire la plaque de manière automatisée à 450 nm.

Ce test est relativement spécifique et fonctionne pour toutes les espèces.

2.3.1.2 Résultats

Le recueil des données brutes sont dans l'Annexe 4. Ils regroupent tous les échouages avec prélèvements pour analyses bactériologiques de 1997 à 2010 en précisant certaines informations comme : la date de prélèvement, la date d'analyse et donc le délai entre les deux, l'espèce prélevée (pratiquement que des cétacés), la localisation des animaux échoués, les prélèvements effectués ainsi que le résultat des analyses (0 : négatif et 1 positif) pour les différentes méthodes. Il a été convenu qu'un résultat est positif si une des conditions suivantes est présente :

- la sérologie est positive,
- l'isolement est positif,
- la PCR est positive,
- l'isolement et la PCR sont positifs.

L'analyse des données est regroupée dans le tableau suivant (Tableau 25) :

Tableau 25 : Analyse des données bactériologiques et sérologiques sur la brucellose du CRMM de 1997 à 2010

Stades de décomposition	Nombre d'échouage	Pourcentage des divers stades /au total des échouages	Prélèvements	Pourcentage prélèvements /aux stades	Nombre de positifs	Pourcentage de positifs /aux stades
Inconnu	844	8 %	90	75,5 %	4	36 %
Stade 1	470	4,5 %	7	6 %	4	36 %
Stade 2	1628	15,5 %	12	10 %	1	9 %
Stade 3	2894	27,5 %	2	1,5 %	1	9 %
Stade 4	2962	28 %	0	0 %	0	0 %
Stade 5	989	9 %	1	1 %	0	0 %
VIVANTS	775	7 %	7	6 %	1	9 %
TOTAL	10562	100 %	119	100 %	11	99 %
Pourcentage positifs / total	0,1 %					
Pourcentage Prélèvements / total	1,1 %					
Pourcentage Positifs / prélèvements	9,2 %					
Pourcentage prélèvements périmés / total prélèvements	85 prélèvements envoyés après 1 an de congélation		71,4 %			
Pourcentage Stades ≥ 3 / total prélèvements	3		2,5 %			

Entre 1997 et 2010, il y a eu 10 562 échouages de mammifères marins sur nos plages quelques soit leur localisation : Nord, Méditerranée ou Atlantique. Parmi ces échouages, 2 873 soit 27% étaient des animaux dans un état de décomposition peu avancé (vivants et stade de décomposition < 3) compatibles avec des analyses bactériologiques dans de bonnes conditions. On pouvait donc espérer un nombre équivalent de prélèvements.

Cependant, seulement 199 animaux ont été prélevés soit 1,1% de la population totale des animaux échoués. Parmi les prélèvements effectués, il y a 2,5% des prélèvements issus d'animaux de stade de décomposition supérieure ou égale à 3. 71% des prélèvements ont été analysés après le délai de congélation de 1 an.

Sur les 119 prélèvements au total, il y a eu 11 positifs à la brucellose soit un pourcentage de 9,2% dans l'échantillon. Si on ne prend en compte que les analyses effectuées dans un délai de moins de 1 an de congélation, on obtient un résultat sensiblement différent avec un pourcentage de 29% de positifs dans l'échantillon.

Par ailleurs, nous avons réussi à mettre en évidence un animal positif alors qu'il était en stade de décomposition 3. Il est donc possible d'isoler des brucelles chez des animaux relativement avancé en décomposition.

En ce qui concerne les cétacés, on obtient un pourcentage de 8% sur les 112 prélèvements de cétacés et 15% sur les prélèvements de moins de 1 an.

Pour les pinnipèdes, l'effectif n'étant que de 7 nous ne pouvons pas faire d'analyse sur ce sous-groupe.

2.3.1.3 Discussion

En ce qui concerne les données de départ recueillies par les correspondants ou le personnel du CRMM, elles possèdent de nombreux points forts qui légitiment leur fiabilité. Ces données sont recueillies toute l'année et recouvrent toutes les côtes françaises. On a donc une pression d'observation des échouages stable dans le temps et l'espace. De plus, le biais de compétence de la personne observant les échouages est limité de par la création d'une feuille de recueil simple et standardisée (Annexe 1,2 et 3).

Par contre, nous ne pouvons pas dire, avec les résultats obtenus (prélèvements sur 1,1% de la population totale des échouages), que l'échantillon soit représentatif de la population vu son effectif réduit, c'est pourquoi nous nous intéresserons à l'échantillon en lui-même.

Les prélèvements ne sont pas effectués au hasard, mais sur des animaux dont le tableau nécropsique est évocateur de la brucellose, ce qui a tendance à engendrer une surestimation du pourcentage des animaux atteints dans l'échantillon. Ceci constitue un biais de sélection.

La congélation au-delà de 1 an peut engendrer une destruction des bactéries dans les prélèvements ou une difficulté pour elles à bien se développer sur des milieux de culture même enrichis. Ceci peut engendrer l'apparition de faux négatifs et donc une sous-estimation du pourcentage de positif dans l'échantillon. D'ailleurs, on observe des pourcentages de positifs bien différents pour l'échantillon entier avec 9,2% et pour l'échantillon analysé dans de bonne condition 29%. Nous ne savons pas dans quelle mesure ce procédé de conservation des prélèvements peut modifier les résultats. D'autant plus qu'un des prélèvements analysés après un an de conservation par culture est ressorti positif (14/08/97).

Parmi ces prélèvements, quelques résultats peuvent être sûrs lorsqu'ils sont associés à une sérologie. Pour valider ces résultats, il faudrait refaire des PCR sur les prélèvements.

En ce qui concerne de nouveau les prélèvements, on remarque que la rate est pratiquement le seul organe prélevé. Mais on observe qu'un des résultats considéré comme positif en isolement sur des ganglions est en parallèle négatif en PCR pour la rate.

A l'avenir, si une étude plus poussée doit être faite, il faudrait multiplier les prélèvements avec des ganglions, du poumon ou du rein pour diminuer le risque de faux négatifs.

En ce qui concerne l'état de décomposition des animaux, le doute subsiste sur le fait que les bactéries de putréfaction puissent rentrer en compétition avec les brucelles pour leur développement en culture et que des faux négatifs apparaissent. Pour notre étude, nous n'avons que 2,5% des prélèvements qui sont effectués sur des stades de décomposition supérieurs ou égaux à 3, ce qui reste correct.

De plus, ce phénomène peut être limité avec l'association d'une autre méthode comme la PCR.

D'ailleurs, un contre-exemple peut-être cité, avec un résultat positif obtenu en culture sur un stade 3.

En ce qui concerne les techniques de laboratoires, elles-mêmes, les spécificités et les sensibilités de chaque méthode ne sont pas connues en ce qui concerne les souches marines. Il semblerait tout de même que l'isolement soit peu sensible, la PCR sensible et spécifique, la sérologie spécifique.

Dans notre étude, on remarque d'ailleurs que pour 4 cas positifs, soit l'isolement soit la PCR peut être négative. D'où la nécessité d'effectuer les deux méthodes à chaque fois pour augmenter la spécificité et la sensibilité du résultat.

En ce qui concerne la méthode de détection par isolement bactérien, le temps de culture n'est que de 10 jours. Ceci peut-être un souci par rapport au fait que certaines souches de brucelles issues des pinnipèdes sont lentes et peuvent mettre plus de 10 jours pour se développer. Une autre source de faux négatifs est donc à considérer surtout chez les pinnipèdes.

2.3.2 Suspicion de brucellose lors d'une autopsie de dauphin commun au CRMM

Une autopsie de dauphin commun femelle adulte a été effectuée par mes soins lors de mon séjour au CRMM et s'est révélée être suspecte en ce qui concerne la brucellose. Le protocole de l'autopsie a été suivi comme décrit précédemment et toutes les précautions ont été prises en matière de risque de contamination infectieuse.

Ce spécimen n'a pas présenté, lors de l'autopsie, de signes de capture accidentelle dans les filets de pêche (pas de traces cutanées ou de blessures externes et poumons sans spume non agoniques). L'animal avait, de plus, un bon état corporel (pas de parasitisme et épaisseur de lard correcte).

Lors de l'autopsie, les lésions observées sont (Figure 141):

- une poly-adénomégalie généralisée,
 - une lactation
 - un utérus distendu et très vascularisé
 - la présence de corps jaune dans les ovaires
 - une cystite pyogène
- } Ces trois éléments évoquant un avortement

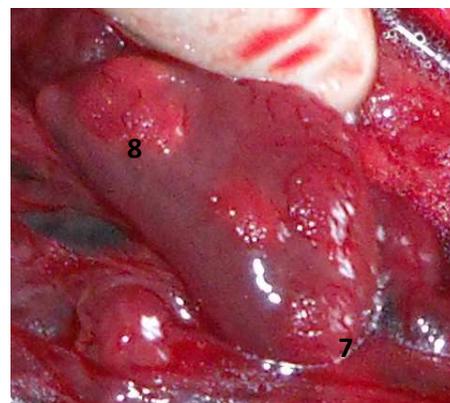
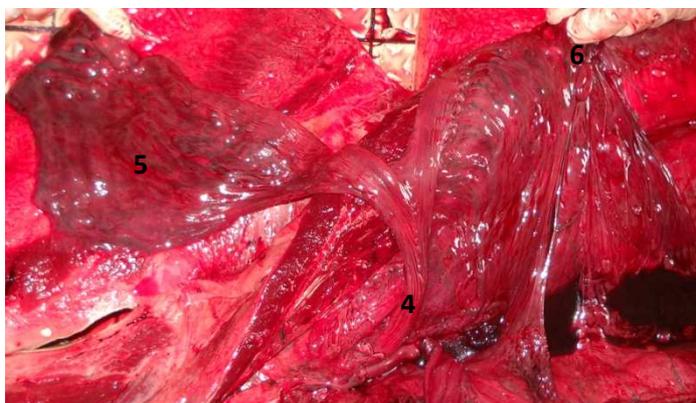
Cette femelle présente des caractéristiques évoquant la brucellose comme une mort non accidentelle, une mort non liée à une maladie systémique cachectisante, des symptômes (une polyadénomégalie et des troubles de la reproduction probables).

La rate et les nœuds lymphatiques pré-scapulaires, trachéo-bronchiques et mésentériques ont donc été envoyés à la bactériologie.

Figure 141 : Femelle en lactation (en haut) ; Appareil reproducteur femelle (en bas à gauche) ; ovaire avec corps jaunes (en bas à droite), d'après Rougelin (2012)



- 1 Fente mammaire lactante
 - 2 Orifice génital
 - 3 Orifice anal
 - 4 Corps utérin
 - 5 Corne utérine distendue et vascularisée
 - 6 Ovaire
 - 7 Ovule
 - 8 Corps jaune
- } Proches → femelle



2.3.3 Recueil de données sur la tuberculose dans les parcs zoologiques européens

Dans la bibliographie, nous avons vu que la tuberculose est une zoonose fréquemment retrouvée chez les mammifères marins, en particulier chez les pinnipèdes, surtout en milieu captif, et qui possède un tropisme respiratoire chez les hommes.

L'étude suivante est une étude rétrospective, effectuée en 2009, rassemblant les données sérologiques sur les pinnipèdes en captivité (parcs zoologiques et centres de soins) au niveau européen. Nous n'avons pas pu avoir les données strictes pour la France.

Le but de l'étude, est de connaître le pourcentage d'animaux atteints par la maladie dans l'échantillon testé. Nous n'avons nulle intention de déterminer une prévalence de la maladie chez les mammifères marins.

Les résultats sérologiques ont été rassemblés par le vétérinaire du zoo de Vincennes, Alexis Lécu.

2.3.3.1 Matériel et méthode

La population des pinnipèdes captifs est variée et comprend 6 espèces principales avec 705 individus :

- otarie de Californie (40 %),
- phoque veau marin (21 %),
- otarie de Patagonie (15 %),
- otarie à fourrure d'Afrique du Sud (10 %),
- phoque gris (9,5 %),
- otarie à fourrure d'Amérique du Sud (4,5 %).

Cette population a été recensée, grâce à un programme européen, l'EAZA (European Association of Zoo and Aquaria) qui comprend 345 membres (zoos et aquariums) de 41 pays différents. Parmi cette population, 140 animaux ont été testés, de façon aléatoire, en sérologie soit 20 % de la population cible.

Des prélèvements de sang ont été réalisés, par les parcs eux-mêmes ou par le vétérinaire du zoo de Vincennes, et des analyses sérologiques sur sérum ont été effectuées selon deux méthodes :

- un test ELISA ;
- un test rapide commercialisé de marque DPP ou RT.

Le résultat est considéré comme positif si au moins un des tests est positif.

2.3.3.2 Résultats

Les résultats bruts de ces analyses sérologiques sont dans le tableau suivant (Tableau 26).

Tableau 26 : Données sérologiques pour la tuberculose sur les pinnipèdes captifs en 2009 (Alexis Lécu)

Espèces de pinnipèdes	Nombre d'animaux testés	Nombre de séropositifs	Pourcentage de positifs
Otarie de Californie	51	10	20 %
Phoque veau marin	16	3	19 %
Otarie de Patagonie	55	14	25 %
Otarie à fourrure d'Afrique du Sud	11	2	18 %
Phoque gris	7	0	0 %
Total	140	29	20,7 %

Sur les 705 animaux captifs, 140 ont été testés par une méthode sérologique soit 20 % de la population initiale. Sur ces 140 individus testés, 29 étaient séropositifs soit 20,7 % de l'échantillon.

Par ailleurs, on remarque que pour chaque espèces testées le pourcentage de séropositifs est voisin de 20 % (et donc voisin du pourcentage total des séropositifs dans l'échantillon). Cette observation pourrait faire penser que la contamination des individus par la tuberculose n'est pas dépendante de l'espèce. Cependant, une seule espèce se démarque par un pourcentage de positifs nul, celle des phoques gris. Ce résultat pourrait être expliqué par un échantillon de départ trop faible pour cette espèce ou une sensibilité moindre de cette espèce pour la tuberculose.

2.3.2.3 Discussion

Le pourcentage d'animaux testés (20 %) peut être considéré comme important et l'échantillon suffisamment grand pour donner une idée assez précise de la séroposivité des animaux.

La sensibilité du test RT est médiocre (< 80 %) alors que sa spécificité pour les espèces marines de tuberculose est plutôt élevée (> 90 %). Cette information pourrait conduire à des résultats de faux négatifs et à sous-estimer le nombre de séropositifs dans l'échantillon. Ce fait est renforcé par l'existence d'un test RT négatif associé à un test DPP positif pour 10 animaux. Il faut donc multiplier les analyses sérologiques pour affiner les résultats et combiner au moins deux analyses RT et DPP.

On obtient un résultat de 20,7 % pour les séropositifs, ce qui est un chiffre important. Cependant, ce taux pourrait être sous-estimé par l'existence d'une séroconversion plus ou moins longue chez les animaux. Il faudrait donc tester les animaux deux fois entre 3 et 6 mois d'intervalle.

2.4 Discussion de synthèse

En ce qui concerne la brucellose chez les mammifères marins en milieu naturel, on obtient 29 % des animaux positifs pour les échantillons conservés dans de bonnes conditions. Ce taux assez élevé est inquiétant pour les personnes des réseaux échouages exposés aux fluides et aux organes des animaux. Cette zoonose devient donc majeure pour ces personnes qui doivent impérativement respecter les règles d'hygiène et de sécurité lors des autopsies.

En ce qui concerne la tuberculose chez les pinnipèdes en milieu captif, on obtient environ 21 % des animaux séropositifs pour les échantillons. Ce taux assez élevé est tout aussi inquiétant, d'autant plus qu'il peut être sous-estimé, pour les personnes travaillant aux contacts des animaux malades (particulièrement les soigneurs exposés de manière répétée). Cette zoonose devient donc majeure en milieu captif et les animaux devraient tous être testés et des décisions prises en ce qui concerne leur avenir au sein des structures d'accueil.

MCours.com