

Revue générale

La brucellose à l'aube du 21^e siècle

Brucellosis at the dawn of the 21st century

M. Maurin

Service de bactériologie–virologie, université Joseph-Fourier, CHU de Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble cedex, France

Reçu le 6 août 2004 ; accepté le 18 août 2004

Disponible sur internet le 10 décembre 2004

Résumé

La brucellose humaine est devenue rare dans les pays ayant instauré une politique d'éradication de la maladie chez les bovidés, notamment par la vaccination. En France, moins de 50 cas sont déclarés annuellement à l'INVS. La brucellose demeure endémique dans le bassin méditerranéen, au Moyen Orient, en Asie de l'Ouest, en Afrique et en Amérique latine. Les limites classiques du diagnostic spécifique de la brucellose (sensibilité variable de la culture, réactions sérologiques croisées), ont été partiellement compensées par les techniques de biologie moléculaire. Trois nouveaux défis ont relancé récemment l'intérêt médical et vétérinaire pour cette maladie : l'expansion de la brucellose dans la faune sauvage, qui représente une menace pour les animaux d'élevage ; l'émergence d'infections bovines à *Brucella melitensis*, pour lesquelles l'efficacité des vaccins disponibles n'est pas établie et la découverte d'un nouveau réservoir, constitué par les mammifères marins, dont l'impact en santé humaine est quasi inconnu.

© 2004 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Human brucellosis is now a rare disease in countries where eradication programs (especially vaccination) against brucellosis in cattle, sheep, and goats have been successfully implemented. In France, fewer than 50 brucellosis cases are annually notified to the National Institute for Infection Surveillance. Human brucellosis, however, remains endemic in the Mediterranean basin, Middle East, Western Asia, Africa, and South America. Shortcomings of standard diagnostic methods for brucellosis (variable sensitivity of culture, frequent serological cross reactions) have been only partially resolved by modern molecular biology techniques. There are now 3 new challenges to be faced by the medical and veterinarian community: the expanding wildlife reservoir of brucellosis, with a possible impact on domestic animals; the emergence of *Brucella melitensis* infections in cattle, for which prophylactic efficacy of available vaccines has not been established; and recent recognition of a huge animal reservoir of *Brucella* species in marine mammals, for which the potential virulence in humans remains unknown.

© 2004 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Brucellose ; Zoonose

Keywords: Brucellosis; Zoonosis

1. Historique

La brucellose a été caractérisée comme entité nosologique, au XIX^e siècle, par des médecins militaires anglais installés sur l'île de Malte [1]. Ainsi, la première description clinique fiable de la brucellose est attribuée à Allen Jeffery

Marston en 1859, et l'agent causal (nommé initialement *Micrococcus melitensis*) de cette maladie est isolé en 1886 par David Bruce, à partir de rates de militaires décédés de cette maladie à Malte. En 1897 Almroth Wright décrit le test diagnostique par séroagglutination en tube. Le rôle de la chèvre comme réservoir de l'agent de la brucellose sur l'île de Malte est décrit en 1905 par Themistocles Zammit, bactériologiste maltais. La brucellose ou fièvre de Malte est en-

Adresse e-mail : mmaurin@chu-grenoble.fr (M. Maurin).

suite décrite dans de nombreux autres sites, sous des dénominations variables : fièvre de Crimée, fièvre de Gibraltar, fièvre de Chypre, fièvre de Crète, fièvre de Constantinople etc.

Parallèlement, Bernard Bang, vétérinaire danois, isole en 1895 chez des bovins présentant des avortements à répétition une nouvelle bactérie, qu'il nomme *Bacillus abortus*. La relation entre *Micrococcus melitensis* et *B. abortus* n'est établie qu'en 1917 par Alice Evans, bactériologiste américain, qui propose la création du genre *Brucella* (et des espèces *Brucella melitensis* et *Brucella abortus*) en l'honneur des travaux de Bruce. Quatre autres espèces sont ensuite caractérisées : *B. suis* en 1914 isolée par Traum chez des truies présentant des avortements ; *B. canis* reconnue en 1966 par Carmichael comme agent d'avortements chez la chienne de race Beagle ; *B. ovis* isolée de moutons en 1953 ; et *B. neotomae* espèce isolé de rats du désert (*N. lepida*) dans l'Utah (États-Unis) en 1957. En fait, de nombreux mammifères terrestres constituent un réservoir potentiel pour les bactéries du genre *Brucella*.

Plus récemment, en 1994, un cas d'avortement chez un dauphin en captivité lié à une infection par des *Brucella* différentes des espèces précédemment caractérisées est rapporté en Californie (États-Unis) [2]. D'autres souches semblables sont ensuite isolées chez des dauphins, mais également chez d'autres mammifères marins, tel que des phoques ou des marsouins [3]. Cette découverte a relancé l'intérêt médical pour ces bactéries, notamment depuis la description de cas probables d'infections humaines liées à ces nouvelles *Brucella* [4].

2. *Brucella* et risque biologique

Les *Brucella* sont considérées depuis plusieurs décennies comme agents potentiels de guerre bactériologique [1,5]. Plus récemment, les *Brucella* ont été classées comme pathogènes potentiellement utilisables à des fins de bioterrorisme, dans la catégorie B du CDC (*Center for Disease Control and Prevention*, États-Unis) [5,6]. Après la première guerre mondiale, des programmes de production d'armes bactériologiques ont été lancés dans de nombreux pays, dont principalement les États-Unis, l'ex-URSS, et le Japon, mais aussi l'Allemagne, l'Angleterre, la France, etc. La plupart de ces programmes ont utilisé des agents infectieux ou des produits d'origine bactérienne à effet létal, tels que *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, ou la toxine botulique. Les bactéries du genre *Brucella* ont été utilisées comme armes biologiques aux États-Unis, en ex-URSS, et vraisemblablement en Iraq. Aux États-Unis, par exemple, des bombes contenant *B. suis* ont été produites pour l'*US Air Force* en 1955.

Les *Brucella* sont responsables chez l'homme d'une maladie sévère et invalidante, bien que rarement fatale, ce qui explique leur classification comme agents incapacitants. Leur pouvoir infectieux est élevé, notamment par voie aé-

rienne puisque 10 à 100 bactéries suffisent à entraîner une infection invalidante durant plusieurs semaines. L'impact d'une utilisation malveillante de ces bactéries serait toutefois vraisemblablement limité par certains facteurs : une incubation variable de la maladie, un grand nombre de patients exposés pouvant demeurer asymptomatiques, une quasi-absence de transmission inter humaine, et l'existence d'un traitement antibiotique efficace. Ce traitement pourrait toutefois être mis en défaut par l'utilisation de souches résistantes aux antibiotiques actifs. Par ailleurs, il n'existe pas à ce jour de vaccin anti-*Brucella* efficace et bien toléré chez l'homme.

3. Taxonomie

Les *Brucella* appartiennent au groupe alpha des *Proteobacteria* [7], et à la famille des *Rhizobiaceae* [8]. Les espèces bactériennes les plus proches sur le plan phylogénique sont notamment les *Bartonella*, autres bactéries responsables de zoonoses ; des bactéries de l'environnement, rarement isolées chez l'homme (*Ochrobactrum anthropi*, *Afipia*, *Bosea*) ; et des bactéries pathogènes ou symbiotes de plantes (*Rhizobium*, *Agrobacterium*).

Sur le plan taxonomique, le genre *Brucella* a été anciennement divisé en six espèces, elles-mêmes séparées en biovars, en fonction notamment d'une relative spécificité de l'hôte animal naturel (Tableau 1). En accord avec cette classification ancienne, des noms d'espèces ont été proposés pour différencier les souches isolées de mammifères marins [3] : *B. maris* regroupant l'ensemble des souches isolées de mammifères marins [9], puis plus récemment *B. cetaceae* (espèces isolées de dauphins) et *B. pinnipediae* (espèces isolées de pinnipèdes, notamment phoques, otaries et morse) [10,11].

Les études fondées sur l'hybridation ADN/ADN ou sur la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S ont montré que le genre *Brucella* est en fait monospécifique. Les anciennes espèces infectant les mammifères terrestres, ainsi que celles décrites récemment chez des mammifères marins, appartiennent à une espèce unique dont le nom proposé est *B. melitensis* [3,8,12–14]. Les anciennes espèces sont ramenées au rang de sous espèces ou noms espèces. Par soucis de simplification, les anciennes dénominations seront utilisées dans cette revue.

4. Bactériologie

Les *Brucella* sont de petits coccobacilles, à Gram négatif, mesurant 0,6–1,5 µm de long et 0,5–0,7 µm de diamètre [15]. Leur croissance nécessite l'utilisation de milieux enrichis au sang, et certaines souches se développent mieux en atmosphère contenant 5 à 10 % de CO₂. La température de croissance optimale est 34 °C. L'isolement des *Brucella* en primoculture nécessite classiquement des temps d'incubation prolongés, de deux à trois semaines en moyenne et parfois

Tableau 1

Les différentes espèces (nomspecies) et biovars du genre *Brucella*, leurs caractéristiques épidémiologiques, et leur pouvoir pathogène chez l'homme [28,31]
 Various species and biovars of the genus *Brucella*, epidemiological features, pathogenicity in humans [28,31]

Espèce	Biovars	Répartition géographique principale	Hôte animal habituel	Pathogénicité chez l'homme
<i>B. abortus</i>	1 à 6, et 9	ubiquitaire	bovins, ongulés sauvages	modérée
<i>B. melitensis</i>	1 à 3	bassin méditerranéen, moyen orient	ovins, caprins, ongulés sauvages	forte
<i>B. suis</i>	1 et 3	Amérique, Asie, Océanie	suidés	forte
<i>B. suis</i>	2	Europe centrale et occidentale	suidés et lièvres	Faible ^a
<i>B. suis</i>	4	Amérique du Nord, Russie	rennes	modérée
<i>B. suis</i>	5	Russie	rongeurs sauvages	forte
<i>B. canis</i>		ubiquitaire (fréquence élevée en Amérique du sud)	chiens	faible
<i>B. ovis</i>		bassin méditerranéen	ovins	nulle
<i>B. neotomae</i>		Utah (États Unis)	rats du désert	non connue
<i>B. cetaceae</i>		non connue	cétacés (dauphins)	non connue
<i>B. pinnipediae</i>		non connue	pinnipèdes (phoques, otaries)	non connue ^b

^a Rares cas d'infections humaines rapportés dans la littérature [30].

^b Deux cas probables d'infection humaine, rapportés chez des patients péruviens émigrés récemment aux États-Unis, et présentant une atteinte neurologique, et comme facteurs de risque une consommation régulière de fromages frais et de fruits de mer crus [4].

plus. L'utilisation de systèmes automatisés pour les hémocultures permet de réduire ce temps à moins de cinq jours [16].

Les *Brucella* sont des bactéries aérobies strictes, catalase positive, oxydase habituellement positive [15]. La plupart des souches isolées en pathologie humaine produisent une uréase d'action rapide et intense. Du fait d'une faible réactivité biochimique, l'identification de ces bactéries par les méthodes phénotypiques usuelles est difficile. De plus, l'utilisation de galeries d'identification de type API-NE peut conduire à une fausse identification de *Moraxella phenylpyruvica* [17].

Le lipopolysaccharide (LPS) est l'antigène le plus immunogène [18–20]. Ce LPS est caractérisé par une variation de phase, à l'origine des phénotypes lisse (S-LPS) et rugueux (R-LPS). Le S-LPS est retrouvé à l'état sauvage chez la plupart des espèces et biovars. *B. canis* et *B. ovis* possèdent naturellement un R-LPS. Les chaînes latérales polysaccharidiques (antigène « O ») du S-LPS sont constituées d'un homopolymère comprenant environ 100 résidus de 4-formamido-4,6-didéoxy-D-mannopyranosyl, support essentiel des réactions croisées entre *Brucella* spp. et *Yersinia enterocolitica* O :9, ou plus accessoirement *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* O :1, *Escherichia hermannii*, *E. coli* O :157, et *Salmonella* O :30. L'immunogénicité des protéines membranaires, périplasmiques ou cytoplasmiques est bien inférieure à celle du LPS [19,20]. Certaines protéines sont responsables de réactions sérologiques croisées entre *Brucella* spp. et d'autres membres de la famille des Rhizobiales [21].

Le génome des *Brucella* est original car constitué de deux réplicons circulaires, avec un ratio G+C de 58–59 %. Le génome de la souche *B. melitensis* 16M, comprend deux chromosomes circulaires de 1,15 et 2,1 Mb [22,23]. Cette organisation est retrouvée chez la plupart des espèces, sauf pour *B. suis* biovar 3 qui ne comprend qu'un seul chromosome circulaire de 3,2 Mb [24]. Les séquences complètes des génomes de *B. melitensis* souche 16M et *B. suis* souche 1330 sont disponibles depuis 2001 [22,25], et celui de *B. abortus* est en cours de détermination. Les *Brucella* ne possèdent pas de plasmide.

5. Épidémiologie

B. melitensis et *B. abortus* sont les espèces le plus souvent en cause en pathologie humaine [26,27], *B. melitensis* étant responsable des infections les plus graves. La brucellose humaine demeure endémique dans certains pays du bassin méditerranéen, au Moyen Orient, en Asie de l'Ouest, et dans certaines régions d'Afrique et d'Amérique latine [26,27]. Toutefois, son incidence réelle est souvent sans évaluée. En Europe, la brucellose demeure endémique dans certains pays tels que la Grèce, le Portugal, l'Espagne, ou l'Italie (Tableau 2). En France, la surveillance de la brucellose, maladie à déclaration obligatoire, est organisée depuis octobre 2002 par l'action conjointe de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), du centre national de référence des *Brucella* (Dr Garin-Bastuji, AFSSA), et du laboratoire associé au CNR (CHU de Grenoble), sous la tutelle du ministère de la Santé. L'incidence de cette maladie est actuellement inférieure à 0,1/100 000 habitants, soit moins de 50 cas déclarés annuellement à l'InVS [28,29]. Toutefois, la France n'est toujours pas considérée comme pays OBF (*officially brucellosis free*) ni ObmF (*officially B. melitensis free*) par le laboratoire de référence européen (*Community Reference Laboratory* ou CRL, Europe) [30]. Les cas de contamination autochtone surviennent habituellement dans les régions montagneuses, notamment dans les Alpes, les Pyrénées, ou la Corse [28]. Il s'agit de façon prédominante d'infections à *B. melitensis* biovars 1 (prédominant dans le Nord) et 3, et plus rarement à *B. abortus* biovars 3 et 4 (ce dernier étant cantonné au Massif central). L'espèce *B. suis* est exceptionnellement isolée depuis l'industrialisation des élevages porcins [28], et l'espèce *B. canis* n'a jamais été isolée chez l'homme en France. *B. suis* biovar 2 est actuellement très répandu chez les sangliers et les lièvres en Europe et notamment en France, et représente une menace pour les élevages porcins en plein air [30]. La pathogénicité de ce biovar chez l'homme est mal connue, mais vraisemblablement faible. Une majorité des cas de brucellose humaine diagnostiqués actuellement en France sont importés, notamment du Portugal, d'Espagne, d'Algérie, ou de Turquie [29].

Tableau 2
Infections à *Brucella* recensées en Europe depuis 1994, d'après [30]
Brucella infections reported in Europe since 1994, according to [30]

Pays	Infection des bovins (<i>B. abortus</i> ou <i>B. melitensis</i>)	Infection des ovins et caprins (<i>B. melitensis</i>)	Brucelloses humaines déclarées de 1995 à 2000
Norvège	Obf ^a	ObmF ^b	2 ^c
Finlande	Obf	ObmF	1
Suède	Obf	ObmF	15
Danemark	Obf	ObmF	0
Hollande	Obf	ObmF	13
Allemagne	Obf	ObmF	163
Grande Bretagne	Obf	ObmF	61
Irlande	non-Obf	ObmF	154 ^d
Belgique	non-Obf	ObmF	14
France	non-Obf	non-ObmF ^e	330
Autriche	Obf	non-ObmF	10
Italie	non-Obf	non-ObmF	7584
Espagne	non-Obf	non-ObmF	11 102
Portugal	non-Obf	non-ObmF	4589
Grèce	non-Obf	non-ObmF	1799

^a Obf : pays officiellement exempt de brucellose bovine.

^b ObmF : pays officiellement exempt de brucellose ovine et caprine.

^c Années 1999 et 2000 seulement.

^d Forte prédominance en Irlande du sud.

^e La France est en fait divisée en zone ObmF approximativement dans la moitié Nord, et non-ObmF dans la moitié Sud.

Le réservoir animal des *Brucella*, classiquement constitué de nombreux mammifères terrestres, s'est étendu récemment aux mammifères marins [3,31] (Tableau 1). Les *Brucella* isolées de mammifères marins sont représentées actuellement par des isolats de cétacés (dauphins) ou de pinnipèdes (phoques, otaries et morses) vivant dans les mers et océans entourant l'Europe et l'Amérique du Nord (océans Atlantique et Pacifique, mer du Nord, mer Méditerranée). Certains poissons de rivières (Barbue) ont pu être infectés par *B. melitensis* biovar 3, suggérant une source alimentaire de contamination des mammifères marins.

Chez les mammifères terrestres, *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* sont les espèces les plus répandues. L'infection des ovins et caprins par *B. melitensis* est fréquente dans la zone sud du bassin méditerranéen, et au moyen-orient. L'infection des bovins par *B. abortus* est de répartition mondiale, mais la maladie est considérée comme éradiquée dans certains pays d'Europe, au Canada, en Australie, en Nouvelle Zélande, en Israël et au Japon. L'infection des élevages porcins par *B. suis* est devenue plus rare actuellement, excepté en Asie du sud-est et en Amérique du sud. L'infection des suidés sauvages (sangliers) est plus répandue. Elle prédomine à *B. suis* biovar 1 en Amérique latine, en Asie et en Océanie, à *B. suis* biovar 2 en Europe centrale et Occidentale, à *B. suis* biovar 3 aux États-Unis et en Chine. Le lièvre est également réservoir de *B. suis* biovar 2 en Europe. Des infections croisées sont possibles, notamment chez les bovins dues à *B. melitensis* (Europe du sud, Israël, Koweït, Arabie Saoudite), ou à *Brucella suis* biovar 1 (Brésil, Colombie). La brucellose animale est souvent chronique, bien tolérée, mais responsable chez les femelles d'avortements à répétition. La baisse de fertilité et le risque sanitaire liés à la brucellose chronique

chez les bovidés rend compte de l'impact économique important de cette maladie.

Les animaux infectés essaient les bactéries dans l'environnement par leurs fèces, et dans le lait ou les produits d'avortement chez les femelles infectées. L'homme se contamine directement au contact d'animaux infectés, par voie cutanée directe, conjonctivale ou aérienne. La contamination peut se faire également de façon indirecte, par voie alimentaire, après ingestion de lait ou produits laitiers contaminés. Les éleveurs, les fermiers, les vétérinaires, et les travailleurs des abattoirs sont professionnellement exposés à la maladie. La transmission inter-humaine de la brucellose, exceptionnelle, a lieu habituellement par voie sexuelle [32]. Enfin, la brucellose peut être contractée de façon accidentelle chez le personnel de laboratoire lors de la manipulation des cultures de *Brucella* (maladie professionnelle) [17], ou lors de la manipulation des vaccins animaux chez les vétérinaires et éleveurs [33–35], par inoculation transcutanée (piqûre accidentelle) ou conjonctivale de la souche vaccinale.

6. Pathogénie

La voie de contamination principale au cours de la brucellose est vraisemblablement digestive. Après une période d'incubation variable, la brucellose se caractérise dans sa phase aiguë par une septicémie d'origine lymphatique, au cours de laquelle les bactéries colonisent les cellules du système réticulo-endothélial [19]. Cette phase se manifeste classiquement par une fièvre ondulante, correspondant aux décharges bactériémiques. La maladie évolue ensuite vers une phase sub-aiguë, avec possibilité de localisations secon-

daires. Celles-ci peuvent être notamment neuroméningées, cardiaques, ostéoarticulaires, hépatospléniques, ou génitales. Les formes chroniques se définissent par une évolution prolongée au delà d'un an, avec ou sans découverte d'un foyer infectieux focalisé [27].

Les *Brucella* sont des bactéries intracellulaires facultatives du monocyte-macrophage. Leur S-LPS est moins toxique pour les macrophages, moins pyrogène, et moins inducteur de sécrétion d'Interféron- γ et de TNF- α que celui des entérobactéries. Les *Brucella* sécrètent également un facteur empêchant l'apoptose des macrophages infectés [36]. La multiplication intracellulaire a lieu dans un autophagosome, après inhibition de la fusion phagolysosomiale [20]. L'acidification de la vacuole de phagocytose induit l'expression d'un système de sécrétion de type IV (VirB), essentiel à la virulence des *Brucella* dans les modèles expérimentaux cellulaires ou animaux [37–39].

7. Clinique

De nombreux patients demeurent asymptomatiques ou peu symptomatiques après infection par *Brucella*. Dans ce cas, le diagnostic ne peut être établi que de façon fortuite, par exemple au cours d'une enquête sérologique systématique après une exposition avérée.

Chez les patients symptomatiques, l'incubation varie habituellement de une à trois semaines, mais peut être plus longue [26,27]. Les manifestations cliniques sont classiquement protéiformes et peu spécifiques. Elles peuvent survenir sur un mode aigu, ou être plus insidieuses. La brucellose se manifeste le plus souvent sous forme d'un tableau pseudo-grippal : fièvre, sueurs, anorexie, asthénie, céphalées, myalgies, arthralgies. L'examen clinique est souvent normal. Une forme plus classique et plus tardive associe une fièvre ondulante avec sueurs nocturnes malodorantes, myalgies, arthralgies, et l'examen clinique peut retrouver des adénopathies, une splénomégalie, une hépatomégalie. Cette forme est en fait rarement observée actuellement.

L'évolution spontanée de la brucellose se caractérise surtout par la possibilité de survenue de localisations secondaires, ou brucellose focalisée, qui font la gravité de la maladie [26,27,40]. Les localisations secondaires les plus fréquentes sont ostéoarticulaires [41]. Une polyarthrite, asymétrique, intéressant les genoux, les hanches, les coudes, les articulations sacro-iliaques ou sternoclaviculaires est très évocatrice. L'atteinte des vertèbres lombaires (spondylites ou spondylo-discites) est également fréquente. On note également des monoarthrites, des bursites, des téno-synovites, des ostéomyélites. Les localisations cardiaques peuvent correspondre à une péricardite, une myocardite, ou surtout à une endocardite. Les endocardites brucelliennes représentent la première cause de décès en zone d'endémie brucellienne [42]. Elles surviennent chez 1 à 2 % des patients infectés, habituellement sur valvulopathie préalable, et intéressent le plus souvent la valve aortique. *B. melitensis* est l'espèce la plus

souvent en cause au cours de ces endocardites. Les localisations neurologiques s'observent chez 1,7 à 10 % des patients [40,43]. Il s'agit de méningites, de méningo-encéphalites, d'abcès cérébraux ou cérébelleux, de myélites, ou d'atteintes des nerfs crâniens ou périphériques [43]. Chez l'homme, l'atteinte de l'appareil génito-urinaire peut se traduire par une orchépididymite unilatérale ou bilatérale, une pyélonéphrite ou une prostatite. Chez la femme on peut observer une pyélonéphrite, ou plus fréquemment un abcès tubo-ovarien, une salpingite, une endométrite. D'autres manifestations cliniques ont été décrites plus rarement : abcès hépatiques, spléniques, ou pulmonaires [44], cholécystites, pancréatites, hépatites granulomateuses. Environ 5 % des patients présentent des manifestations cutanées non spécifiques (papules, rash, érythème noueux etc.).

La brucellose chronique est définie par une évolution de la maladie supérieure à un an, avec ou sans localisations secondaires identifiables [27]. Dans ce cas, un traitement antibiotique même tardif peut s'avérer efficace. Ce terme a été également utilisé pour définir une évolution prolongée de la phase de convalescence, caractérisée par des troubles fonctionnels non spécifiques (notamment asthénie physique et psychique, algies diffuses), une élévation persistante des IgG anti-*Brucella* sériques, une intradermoréaction à la brucelline positive témoin d'une hypersensibilité retardée, mais l'absence de signes cliniques objectifs ou d'atteinte localisée identifiable. Les cultures pour recherche de *Brucella* sont négatives, et l'antibiothérapie n'est pas efficace. La pathogénie de cette forme demeure inexpliquée.

Chez la femme enceinte, la brucellose peut être responsable d'avortements, d'accouchements prématurés et de mort in utero dans 10 à 46 % des cas [45]. La brucellose ne semble pas présenter de caractères cliniques particuliers chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine [46].

Deux cas d'infection humaine potentiellement liée à une souche de *Brucella* de mammifère marin ont été décrits à ce jour, chez deux patients péruviens vivant au États-Unis et présentant une atteinte neurologique [4]. Ces patients présentaient comme facteurs de risque potentiels une consommation régulière de fromages frais et de fruits de mer crus.

8. Diagnostic

8.1. Diagnostic non spécifique

La brucellose s'accompagne sur le plan hématologique d'une absence habituelle de leucocytose, voire d'une neutropénie, et parfois d'une thrombopénie. Un syndrome inflammatoire franc est généralement présent, avec notamment une élévation de la protéine C réactive sérique. Une élévation des transaminases hépatiques modérée peut être notée.

L'analyse du liquide synovial au cours des arthrites brucelliennes montre habituellement un taux élevé de leucocytes ($> 10\,000/\text{mm}^3$), avec prédominance de polynucléaires neu-

trophiles. L'analyse du liquide céphalorachidien au cours des méningites brucelliennes révèle la présence de leucocytes (avec une prédominance habituelle de lymphocytes), d'une protéinorrhachie élevée, et parfois d'une hypoglycorrachie.

8.2. Diagnostic spécifique

Le diagnostic de certitude de la brucellose demeure fondé sur l'isolement en culture des *Brucella* (Tableau 3). La sérologie n'est utile que lorsque cette culture est négative ou non réalisée, ce qui néanmoins représente la majorité des cas en France. Elle nécessite l'utilisation de plusieurs techniques, et pose le problème essentiel de son manque de spécificité lié à la fréquence des faux positifs par réactions sérologiques croisées. Les techniques d'amplification génique sont intéressantes, mais présentent comme limite essentielle une sensibilité faible, en particulier dans les situations où la culture est mise en défaut.

8.2.1. La culture

L'isolement des *Brucella* en culture demeure la technique de référence pour établir un diagnostic certain de brucellose [15]. Cet isolement est par ailleurs nécessaire pour réaliser un antibiogramme. Toute suspicion de brucellose doit être signalée au laboratoire réalisant la mise en culture des prélèvements biologiques, du fait du risque élevé de contamination du personnel technique. Les cultures de *Brucella* doivent être réalisées en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (P3).

Les *Brucella* sont le plus souvent isolées à partir du sang, par hémoculture, plus rarement à partir d'autres prélèvements en fonction du contexte clinique. L'isolement des *Brucella* nécessite classiquement plusieurs semaines d'incubation des cultures. Cet isolement est réalisé le plus souvent en moins de 5 jours dans les systèmes d'hémoculture automatisés [16]. La sensibilité des hémocultures est supérieure à 80 % en phase aiguë de la maladie [15,16], mais inférieure à 50 % en phase subaiguë ou chronique, ou si une antibiothérapie a été administrée avant prélèvement.

8.2.2. La sérologie

La technique d'agglutination en tube ou séroagglutination de Wright (SAW) est la première technique sérologique décrite, et demeure la référence préconisée par l'OMS du fait de sa standardisation. En effet, il existe un sérum étalon international titré à 1000 UI, distribué par le Laboratoire vétérinaire central en Angleterre (*Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, England*). De faux négatifs sont observés par phénomène de zone en excès d'anticorps, ou du fait de la présence d'anticorps bloquants. L'évaluation de différentes dilutions du sérum test permet de détecter un phénomène de zone. L'absence d'agglutination après mélange d'un sérum positif contrôle au sérum test permet de révéler la présence d'anticorps bloquants.

Les autres techniques sérologiques développées incluent notamment la technique d'agglutination sur lame ou épreuve de l'antigène tamponné (EAT) (dont le test au Rose Bengale), la réaction de fixation du complément (RFCp), la technique d'immunofluorescence indirecte (IFA) (Fig. 1), et les tests Elisa [15].

La détection des anticorps spécifiques se fait en moyenne deux à trois semaines après infection par *Brucella*. Les techniques IFA et Elisa sont mieux adaptées au titrage spécifique des IgG et des IgM anti-*Brucella*. L'IFA est classiquement plus tardive que la SAW ou l'EAT, mais demeure positive au cours des formes chroniques de brucellose, alors que les autres techniques peuvent être négatives à ce stade. La plupart de ces tests sérologiques utilisent comme antigène des suspensions inactivées de *B. abortus*, et détectent principalement les anticorps anti-LPS. Les tests Elisa ont été développés plus récemment, et sont mal standardisés. Toutefois, des tests Elisa « maison » permettent de détecter spécifiquement des anticorps anti-LPS ou des anticorps antiprotéines cytoplasmiques de *Brucella* [47,48]. Ces tests présenteraient une meilleure spécificité, notamment par diminution des réactions sérologiques croisées. Des titres en anticorps spécifiques > 80 en SAW ou > 160 en IgG-IFA sont habituellement considérés comme seuils. Toutefois, la persistance prolongée des anticorps après infection ne permet pas d'interpréter de

Tableau 3
Intérêt des différentes méthodes diagnostiques de la brucellose
Specificity of various diagnostic methods for brucellosis

Méthode	Brucellose			commentaire
	aiguë	focalisée	chronique	
Culture				
Hémoculture	+++	+	–	Spécificité ~100 % identification de l'espèce et du biovar en cause
Myéloculture	+++	++	–	Intérêt not. Si antibiothérapie préalable
Culture du foyer infectieux	–	++	–	Sensibilité souvent faible
Sérologie				
EAT	+++	+	–	détecte IgG, précoce réactions croisées +++
SAW	+++	+	–	référence OMS détecte IgM + IgG réactions croisées +++
IF / ELISA	++	+++	++	détecte IgM et IgG plus tardif / SAW réactions croisées +++
Amplification génique				
PCR <i>bcs</i> 31	++ (sang, sérum)	++ (pus, tissu)	–	sensible, spécifique [53] identification du genre
PCR IS711	++ (sang, sérum)	++ (pus, tissu)	–	gène multicopies détermination du biovar (AMOS PCR) [63]

façon fiable un titre sérologique unique. On recherche donc une séroconversion ou une multiplication par 4 au moins des titres sérologiques entre deux sérums, l'un prélevé en phase aiguë et l'autre en phase de convalescence.

La limite essentielle au diagnostic sérologique de la brucellose est représentée par la fréquence des réactions croisées entre *Brucella* spp. et d'autres espèces bactériennes, dont principalement *Yersinia enterocolitica* O :9, mais aussi *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* O :1 (notamment après vaccination contre le choléra), *Escherichia hermannii*, *E. coli* O :157, *Salmonella* O :30, *Afipia clevelandensis*, *Ochrobactrum anthropi* [49–51]. La technique du western blot ne permet pas de différencier les infections à *Brucella* sp. de celles à *Y. enterocolitica* O :9. La valeur prédictive positive des tests sérologiques est donc faible [15], en particulier dans les pays où la prévalence de la brucellose est faible, comme la France.

8.2.3. Les techniques d'amplification génique

Le diagnostic direct de brucellose par amplification génique est réalisé dans certains laboratoires de référence. La technique la plus couramment utilisée est la PCR [52–60]. Plus récemment, l'utilisation de la technique de PCR en temps réel dans le diagnostic de la brucellose a été rapportée [61,62]. La PCR est une technique sensible et spécifique, particulièrement utile dans le cas où l'administration d'une antibiothérapie empirique empêche l'isolement des *Brucella*. La détection de l'ADN de *Brucella* peut être réalisée à partir du sang ou du sérum, en phase aiguë bactériémique, permettant un diagnostic plus précoce (en 24 heures) que l'hémoculture [53,54,58,59]. La détection de l'ADN de *Brucella* dans diverses suppurations ou biopsies tissulaires, au cours des formes focalisées de brucellose, semble particulièrement intéressante du fait d'une sensibilité bien supérieure à celle de la culture [60].

La présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase dans les échantillons cliniques peut conduire à de faux négatifs, alors que les contaminations en laboratoire ou plus rarement des réactions d'amplification croisée peuvent induire des faux positifs. Les gènes cibles utilisés dans le cadre du diagnostic direct sont principalement le gène *bcsp31* codant pour une protéine de membrane externe de 31 kDa [53,57–60], et la séquence d'insertion IS711 [61–63] dont plusieurs copies sont présentes dans le génome des *Brucella*. La plupart des tests PCR utilisés sont spécifiques de genre, et ne permettent pas de déterminer l'espèce en cause.

8.2.4. Identification bactérienne

Dans le cas de l'isolement d'une souche bactérienne, le genre *Brucella* peut être suspecté sur des caractères cultureux et biochimiques (colonies non hémolytiques, de coccobacilles à Gram négatif, de croissance lente, en milieu enrichi, catalase et oxydase positives, uréase rapide). Il est couramment confirmé par l'utilisation de sérums anti-*Brucella* polyvalents. L'identification biochimique des *Brucella* est difficile, et peut conduire à de fausses identifications (ex.

Moraxella phenylpyruvica sur galerie API 20 NE [17]). L'identification phénotypique d'espèce et de biovar est classiquement obtenue par l'étude de la sensibilité à certains colorants, par la technique de lysotypie, ou par l'utilisation de sérums agglutinants monospécifiques. Le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S permet une identification moléculaire de genre [14]. Une technique d'identification rapide de genre fondée sur la détection en PCR en temps réel du gène *per* codant pour une perosamine synthétase a été rapportée récemment [64]. La différenciation des espèces impliquées en pathologie humaine, voire de certains biovars, peut être obtenue par analyse de profil de restriction en champ pulsé du génome bactérien [65], par amplification-séquençage du gène *omp2* [52], par technique d'amplification-hybridation (AMOS PCR) [63], ou plus récemment par technique de PCR en temps réel [62]. Une technique de typage de souche par analyse multi-locus de séquences d'ADN répété en tandem a été décrite récemment sous le terme de « HOOOF printing » [66]. La différenciation des espèces isolées de mammifères marins par rapport à celles isolées de mammifères terrestres peut être réalisée par amplification-séquençage des gènes *omp2a* ou *bp26* [4]. En particulier, la présence d'une séquence d'insertion IS711 en aval du gène *bp26* est considérée comme caractéristique des espèces issues de mammifères marins [67].

9. Traitement–prophylaxie

9.1. Sensibilité aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des *Brucella* aux antibiotiques nécessite l'utilisation de techniques adaptées aux exigences de croissance de ces bactéries. Elle est réalisée en laboratoire équipé de niveau 3 de sécurité biologique. In vitro, les *Brucella* sont sensibles à certaines bêta-lactamines : les pénicillines A, les céphalosporines de troisième génération (céfotaxime et ceftriaxone), l'imipénème [68–71]. Les macrolides sont modérément actifs, l'azithromycine étant le plus actif d'entre eux (CMI₉₀ = 0,5–2 mg/L) [72,73]. Le chloramphénicol est peu actif, et le cotrimoxazole possède une activité variable en fonction des souches testées [70]. Les antibiotiques les plus actifs sont les aminosides (streptomycine et gentamicine), les tétracyclines, la rifampicine, et les fluoroquinolones [68,70,74]. Seuls les aminosides, les tétracyclines et la rifampicine possèdent une activité bactéricide in vitro [68]. La résistance acquise à ces antibiotiques est rare en clinique [68]. Il est aisé de sélectionner in vitro des mutants résistants à la rifampicine [75].

Les études concernant l'activité des antibiotiques vis-à-vis des *Brucella* intracellulaires sont peu nombreuses et souvent anciennes. Elles ont montré notamment la faible activité intracellulaire de la streptomycine [76], comparée à son activité extracellulaire. Au contraire la rifampicine conservait une activité intracellulaire bactéricide [77]. Akova et al. [78] ont montré que, en milieu de culture acide (pH ~5), seule

la doxycycline et la rifampicine conservent leur activité bactériostatique vis à vis des *Brucella*, alors que la streptomycine, les macrolides ou les fluoroquinolones sont inactivées [78]. Or, les *Brucella* se multiplient en milieu intracellulaire à l'intérieur de phagosomes acides. On peut donc émettre l'hypothèse d'une inactivation de certains antibiotiques en milieu intracellulaire liée à cette acidité.

Les modèles animaux (notamment la souris ou le cobaye infectés par *B. abortus*) ont également permis de montrer l'efficacité des aminosides (streptomycine), des tétracyclines et de la rifampicine in vivo, de même que la supériorité de leur associations par rapport à une monothérapie, ou concernant les aminosides l'intérêt d'une formulation liposomale de ces antibiotiques [68]. Les fluoroquinolones sont inactives chez l'animal en monothérapie [79].

9.2. Traitement de la brucellose

C'est l'expérience clinique qui a permis l'élaboration des protocoles thérapeutiques actuellement préconisés par l'OMS [68,80–82]. En particulier, il est apparu très tôt que l'utilisation d'un traitement antibiotique en monothérapie [83,84] et/ou de courte durée [85,86] était liée à un taux élevé d'échecs thérapeutiques ou de rechutes à l'arrêt du traitement. Ces données ont été confirmées récemment concernant l'utilisation en monothérapie de céphalosporines de troisième génération ou des fluoroquinolones [83,84].

Le premier protocole thérapeutique de la brucellose aiguë non focalisée, préconisé par l'OMS en 1965, correspondait à l'association de la tétracycline (500 mg × 4 fois/jour per os, pendant quatre à six semaines) à la streptomycine (1 g/jour en injection intramusculaire, pendant les deux premières semaines) [87], avec un taux de rechutes réduit à moins de 10 %. La doxycycline (200 mg/jour en 1 à 2 fois, per os) a remplacé ensuite la tétracycline. En 1986, l'OMS a proposé comme deuxième alternative l'association de la doxycycline (200 mg/jour) à la rifampicine (600 à 900 mg/jour) pendant six semaines [88]. Toutefois, cette association est considérée comme d'efficacité inférieure à la précédente en cas de localisation ostéoarticulaire [86,89–91]. La gentamicine (5 mg/kg/jour, en une injection journalière, 7 à 10 jours) a été proposée comme alternative à la streptomycine [92]. Plus récemment, l'association d'une fluoroquinolone à la rifampicine s'est avérée aussi efficace que celle de la doxycycline à la rifampicine [93,94].

Plusieurs alternatives sont préconisées chez l'enfant avant l'âge de 8 ans, du fait du risque de coloration permanente des dents par les tétracyclines [80,92,95,96] : le cotrimoxazole (80 mg de triméthoprim/kg par jour × 2 fois/jour) pendant 45 jours associé à la streptomycine (30 mg/kg par jour, IM en 1 fois/j) pendant 21 jours ou à la gentamicine (5 mg/kg/jour, IM en 1 fois/jour) pendant 7 jours ; la rifampicine (15 mg/kg/jour) associée au cotrimoxazole ou à la streptomycine. Le cotrimoxazole seul ou en association avec la rifampicine est également utilisé chez la femme enceinte [80], du fait de la contre-indication à la fois des tétracyclines, des aminosides et des fluoroquinolones.

Le traitement optimal des formes focalisées de brucellose demeure à établir. Il est actuellement fondé sur l'administration des mêmes associations d'antibiotiques que pour la brucellose non focalisée, avec cependant une durée de traitement de deux à trois mois minimum à plus de six mois [80]. Du fait de la faible pénétration des aminosides et des tétracyclines dans le liquide céphalorachidien, l'administration d'une association antibiotique contenant la rifampicine ou une fluoroquinolone est parfois préconisée au cours de la neurobrucellose, mais sans qu'une supériorité clinique réelle ait été démontrée. Au cours de l'endocardite brucellienne, les associations antibiotiques classiques sont préconisées, pendant une durée minimale de huit semaines, mais la période optimale n'est pas définie. Un traitement chirurgical du foyer infectieux est parfois nécessaire, associé au traitement médical : remplacement valvulaire en cas d'endocardite [97], ou cure chirurgicale d'une localisation vertébrale en cas de déficit neurologique [41].

9.3. Prophylaxie

La meilleure prophylaxie collective de la brucellose humaine correspond au contrôle de l'infection chez les animaux d'élevage, principalement bovins, ovins et caprins [28]. Ce contrôle est à la fois médical (vaccination) et sanitaire (dépistage et abattage des animaux infectés). La prophylaxie vaccinale repose sur l'utilisation de vaccins vivants atténués : *B. abortus* souche S19 ou souche RB51 pour la vaccination des bovins, *B. melitensis* souche Rev1 pour la vaccination des ovins et caprins. En France, la brucellose animale a été considérablement réduite grâce à la vaccination, rendue obligatoire en 1975 pour les bovins, en 1977 pour les caprins, et en 1981 pour les ovins [28]. Cette vaccination n'est plus obligatoire actuellement, et a été remplacée par le dépistage sérologique des animaux infectés et leur abattage. La prophylaxie de la brucellose humaine correspond également au contrôle des infections d'origine alimentaire, et notamment à la pasteurisation du lait. Il existe également des mesures spécifiques de protection chez les personnes exposées professionnellement.

Sur le plan individuel, il existe peu de recommandations concernant la prise en charge d'un patient après exposition avérée et souvent accidentelle au risque de brucellose. Ainsi, l'administration prophylactique de tétracycline seule a été proposée en cas d'exposition vaccinale accidentelle, qui survient le plus souvent chez des éleveurs ou vétérinaires [98]. Plus récemment, l'administration prophylactique de doxycycline (200 mg/j) à la rifampicine (600 mg/j) pendant au moins trois semaines a été recommandée en cas d'exposition accidentelle du personnel de laboratoire, notamment lors de la manipulation de cultures sans précautions adaptées [17]. Le cotrimoxazole (160/800 mg × 2 fois/jour de triméthoprim-sulfaméthoxazole) est préconisé pendant trois semaines chez la femme enceinte. Dans tous les cas, un suivi sérologique prolongé (3 mois minimum) est recommandé. Il n'existe pas à ce jour de vaccin efficace et bien toléré chez l'homme

[33], et l'utilisation des vaccins animaux peut induire une brucellose liée à la souche vaccinale [99,100].

Références

- [1] Sarinas PSA, Chitkara RK. Brucellosis. *Sem Resp Infect* 2003;18: 168–82.
- [2] Ewalt DR, Payeur JB, Martin MB, Cummins DR, Miller WG. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Investig* 1994;6:448–52.
- [3] Bricker BJ, Ewalt DR, MacMillan AP, Foster G, Brew S. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol* 2000;38:1258–62.
- [4] Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis* 2003;9:485–8.
- [5] Hilleman MR. Overview : cause and prevention in biowarfare and bioterrorism. *Vaccine* 2002;20:3055–67.
- [6] Klietmann WF, Ruoff KL. Bioterrorism: implications for the clinical microbiologist. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:364–81.
- [7] Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16SrRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. *J Bacteriol* 1990;172:3569–76.
- [8] Yanagi M, Yamasato K. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol Lett* 1993;107:115–20.
- [9] Jahans KL, Foster G, Broughton ES. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet. Microbiol* 1997;57:373–82.
- [10] Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, et al. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals: polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect* 2001;3: 729–38.
- [11] Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O, Boumedine KS. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals: infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect* 2003;5:593–602.
- [12] Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:292–5.
- [13] Verger M, Grayon M, Cloeckaert A, Lefèvre M, Ageron E, Grimon F. Classification of *Brucella* strain isolated from marine mammals using DNA-DNA hybridization and ribotyping. *Res Microbiol* 2000;151: 797–9.
- [14] Gandara B, Lopez Merino A, Antonio Rogel M, Martinez-Romero E. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 2001;39: 235–40.
- [15] Shapiro DS, Wong JD. *Brucella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. p. 625–31.
- [16] Yagupsky P. Detection of *Brucellae* in blood cultures. *J Clin Microbiol* 1999;37:3437–42.
- [17] Robichaud S, Libman M, Behr M, Rubin E. Prevention of laboratory-acquired brucellosis. *Clin Infect Dis* 2004;38:119–22.
- [18] Freer E, Rojas N, Weintraub A, Lindberg AA, Moreno E. Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Res Microbiol* 1995; 146:569–78.
- [19] Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:65–78.
- [20] Michaux-Charachon S, Foulongne V, O'Callaghan D, Ramuz M. *Brucella* à l'aube du troisième millénaire : organisation du génome et pouvoir pathogène. *Pathol Biol* 2002;50:401–12.
- [21] Cloeckaert A, Tibor A, Zygmunt MS. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:627–9.
- [22] DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:443–8.
- [23] Michaux S, Paillisson J, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Allardet-Servent A, Ramuz M. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* genome. *J Bacteriol* 1993;175:701–5.
- [24] Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* 1998;27:99–106.
- [25] Paulsen I, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13148–53.
- [26] Corbel MJ. Brucellosis : an overview. *Emerg Infect Dis* 1997;3:213–21.
- [27] Young EJ. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1995; 21:283–90.
- [28] Garin-Bastuji B, Delcuelle F. Les brucelloses humaine et animale en France en l'an 2000. Situation épidémiologique – Programmes de contrôle et d'éradication. *Med Mal Infect* 2001; 31 suppl 2 : 202-216.
- [29] Durr U, Valenciano M, Vaillant V. La brucellose humaine en France de 1998 à 2000. Surveillance Nationale des maladies infectieuses. Institut de Veille Sanitaire. Rapport 1998-2000. 2003.
- [30] Godfroid J, Käsbohrer A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet Microbiol* 2002;90: 135–45.
- [31] Godfroid J. Brucellosis in wildlife. *Rev Sci Tech Off Epiz* 2002;21: 277–86.
- [32] Ruben B, Band JD, Wong P, Colville J. Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Lancet* 1991;1:14–5.
- [33] Sadusk JF, Browne AS, Born JL. Brucellosis in man, resulting from *Brucella abortus* (strain 19) vaccine. *JAMA* 1957;164:1325–8.
- [34] Young EJ. Human brucellosis. *Rev Infect Dis* 1983;5:821–42.
- [35] Centers for Disease Control and Prevention. Human exposure to *Brucella abortus* strain RB51, Kansas, 1997. *MMWR* 1998;47:172–5.
- [36] Gross A, Terraza A, Ouahrani-Bettache S, Liautaud JP, Dornand J. In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun* 2000;68:342–51.
- [37] O'Callaghan D, Cazeveille C, Allardet-Servent A, Boschirolu ML, Bourg G, Foulongne V, et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* 1999;33:1210–20.
- [38] Hong PC, Tsolis RM, Ficht TA. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun* 2000; 68:4102–7.
- [39] Boschirolu ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, et al. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;99:1544–9.
- [40] Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, Sanchez De Mora D, Delgado M, Causse M, et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. *Medicine* 1996;75:195–210.
- [41] Solera J, Lozano E, Martinez-Alfaro E, Espinosa A, Castillejos ML, Abad L. Brucellar spondylitis: review of 35 cases and literature survey. *Clin Infect Dis* 1999;29:1440–9.
- [42] Reguera JM, Alarcon A, Miralles F, Pachon J, Juarez C, Colmenero JD. *Brucella endocarditis*: clinical , diagnostic, and therapeutic approach. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2003;22:647–50.
- [43] Akdeniz H, Irmak H, Anlar O, Demiroz AP. Central nervous system brucellosis: presentation, diagnosis and treatment. *J Infect* 1998;36: 297–301.

- [44] Ariza J, Pigrau C, Canas C, Marron A, Martinez F, Almirante B, et al. Current understanding and management of chronic hepatosplenic suppurative brucellosis. *Clin Infect Dis* 2001;32:1024–33.
- [45] Khan MY, Mah MW, Memish ZA. Brucellosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* 2001;32:1172–7.
- [46] Moreno S, Ariza J, Espinosa FJ, Podzaczec D, Miro JM, Rivero A, et al. Brucellosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:319–26.
- [47] Goldbaum FA, Rubbi CP, Wallach JC, Miguel SE, Baldi PC, Fossati CA. Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring atiprotein humoral immune responses. *J Clin Microbiol* 1992;30:604–7.
- [48] Baldi PC, Araj GF, Racaro GC, Wallach JC, Fossati CA. Detection of antibodies to *Brucella* cytoplasmic proteins in the cerebrospinal fluid of patients with neurobrucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:756–9.
- [49] Drancourt M, Brouqui P, Raoult D. *Afipia clevelandensis* antibodies and cross-reactivity with *Brucella* spp. and *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:748–52.
- [50] Schoerner C, Wartenberg K, Rollinghoff M. Differentiation of serological responses to *Yersinia enterocolitica* serotype O9 and *Brucella* species by immunoblot or enzyme-linked immunosorbent assay using whole bacteria and *Yersinia* outer membrane proteins. *J Clin Microbiol* 1990;28:1570–4.
- [51] Erdenebaatar J, Bayarsaikhan B, Watarai M, Makino S-I, Shirahata T. Enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate the antibody responses of animals infected with *Brucella* species from those of animals infected with *Yersinia enterocolitica* O9. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:710–4.
- [52] Sifuentes-Rincon AM, Revol A, Barrera-Saldana HA. Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. *Mol Med* 1997;3:734–9.
- [53] Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:2927–30.
- [54] Zerva L, Bourantans K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:1661–4.
- [55] Casanas MC, Queipo-Ortuno MI, Rodriguez-Torres A, Orduna A, Colmenero JD, Morata P. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:127–31.
- [56] Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Miralles F, Lopez-Gonzalez JJ, Colmenero JD. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *J Clin Microbiol* 2001;39:3743–6.
- [57] Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J Clin Microbiol* 1996;34:477–8.
- [58] Morata P, Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2443–6.
- [59] Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcia-Ordóñez MA, Cardenas A, Colmenero JD. Development and evaluation of a PCR-enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:144–8.
- [60] Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Miralles F, Lopez-Gonzalez JJ, Colmenero JD. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *J Clin Microbiol* 2001;39:3743–6.
- [61] Newby DT, Hadfield TL, Roberto FF. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 5'-exonuclease, and hybridization probe assays. *Applied Environ Microbiol* 2003;69:4753–9.
- [62] Redkar R, Rosa S, Bricker B, DelVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes* 2001;15:43–52.
- [63] Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:2660–6.
- [64] Bogdanovich T, Skurnik M, Lübeck PS, Ahrens P, Hoorfar J. Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella*. *J Clin Microbiol* 2004;42:2261–3.
- [65] Allardet-Servent A, Bourg G, Ramuz M, Pages M, Bellis M, Roizes G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J Bacteriol* 1988;170:4603–7.
- [66] Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM. *Brucella* « HOOF prints » : strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTR). *BMC Microbiology* 2003;3:15–28.
- [67] Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O. An IS711 element downstream of the bp26 gene as a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:835–9.
- [68] Hall WH. Modern chemotherapy for brucellosis in humans. *Rev Infect Dis* 1990;12:1060–99.
- [69] Rubinstein E, Lang R, Shasha B, Hagar B, Diamanstein L, Joseph G, et al. In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1925–7.
- [70] Bosch J, Linares J, Lopez de Goicoechea MJ, Ariza J, Cissal MC, Martin R. In vitro activity of ciprofloxacin, ceftriaxone, and five other antimicrobial agents against 95 strains of *Brucella melitensis*. *J Antimicrob Chemother* 1986;17:459–61.
- [71] Gutierrez Altes A, Diez Enciso M, Pena Gracia P, Campos Bueno A. In vitro activity of N-formimidoyl thienamycin against 98 clinical isolates of *Brucella melitensis* compared with those of cefoxitine, rifampin, tetracycline, and co-trimoxazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;21:501–3.
- [72] Landinez R, Linarez J, Loza E, Martinez-Beltran J, Martin R, Baquero F. In vitro activity of azithromycin and tetracycline against 358 clinical isolates of *Brucella melitensis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:265–7.
- [73] Qadri SM, Halim MA, Ueno Y, Abumustafa FM, Postle AG. Antibacterial activity of azithromycin against *Brucella melitensis*. *Chemotherapy* 1995;41:253–6.
- [74] Trujillano-Martin I, Garcia-Sanchez E, Montes Martinez I, et al. In vitro activities of six new fluoroquinolones against *Brucella melitensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43 : 194–195.
- [75] De Rautlin de la Roy YM, Grignon B, Grollier G, Coindreau MF, Becq-Giraudon B. Rifampicin resistance in a strain of *Brucella melitensis* after treatment with doxycycline and rifampin. *J Antimicrob Chemother* 1986;18:648–9.
- [76] Fountain MW, Weiss SJ, Fountain AG, Shen A, Lenk RP. Treatment of *Brucella canis* and *Brucella abortus* in vitro and in vivo by stable plurilamellar vesicle-encapsulated aminoglycosides. *J Infect Dis* 1985;152:529–35.
- [77] Filice G, Carnevale G, Lanzarini P, Castelli F, Gorini G, Benzi-Cipelli R, et al. Intracellular killing of *Brucella melitensis* within mouse peritoneal macrophages: influence of treatment with rifampin. An ultrastructural study. *Microbiologica* 1986;9:189–98.
- [78] Akova M, Gür D, Livermore DM, Kocagoz T, Akalin HE. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1298–300.
- [79] Shasha B, Lang R, Rubinstein E. Therapy of experimental murine brucellosis with streptomycin, co-trimoxazole, ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin, doxycycline, and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:973–6.
- [80] Young EJ. *Brucella* species (brucellosis). In: Yu VL, Weber R, Raoult D, editors. *Antimicrobial therapy and vaccines*. New York: Williams & Wilkins; 2002. p. 121–40.
- [81] Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinosa A. Recognition and optimum treatment of brucellosis. *Drugs* 1997;53:245–56.
- [82] Rolain JM, Maurin M. Le traitement des brucelloses. *Antibiotiques* 2000;2:101–9.

- [83] Lang R, Dagan R, Potasman I, Einhorn M, Raz R. Failure of ceftriaxone in the treatment of acute brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992;14:506–9.
- [84] Lang R, Rubinstein E. Quinolones for the treatment of brucellosis. *J Antimicrob Chemother* 1992;29:357–63.
- [85] Acocella G, Bertrand A, Baytout J, Durrande JB, Garcia Rodriguez JA, Kosmidis J, et al. Comparison of three different regimens in the treatment of acute brucellosis: a multinational study. *J Antimicrob Chemother* 1989;23:433–9.
- [86] Ariza J, Gudiol F, Pallares R, Viladrich PF, Rufi G, Corredoira J, et al. Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampin or doxycycline plus streptomycin. *Ann Intern Med* 1992;117:25–30.
- [87] World Health Organization Technical Report Series N°. 289, Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 4th Report, Geneva, 1965.
- [88] World Health Organization Technical Report Series N°. 740, Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 6th Report, Geneva, 1986.
- [89] Colmenero Castillo JD, Hernandez Marquez S, Reguera Iglesias JM, Cabrera Franquelo F, Rius Diaz F, Alonso A. Comparative trial of doxycycline plus streptomycin versus doxycycline plus rifampin for the therapy of human brucellosis. *Chemother* 1989;35:146–52.
- [90] Montejo JM, Alberola I, Glez-Zarate P, Alvarez A, Alonso J, Casanovas A, et al. Open, randomized therapeutic trial of six antimicrobial regimens in the treatment of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1993;16:671–6.
- [91] Solera J, Rodriguez-Zapata M, Geijo P, Largo J, Paulino J, Saez L, et al. Doxycycline-rifampin versus doxycycline-streptomycin in treatment of human brucellosis due to *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2061–7.
- [92] Lubani MM, Dudin KI, Sharda DC, Ndhari DS, Araj GF, Hafez HA, et al. A multicenter therapeutic study of 1100 children with brucellosis. *Pediatr Infect Dis* 1989;8:75–8.
- [93] Akova M, Uzun D, Akalin HE, Hayran M, Unal S, Gur D. Quinolones in treatment of human brucellosis: comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1831–4.
- [94] Agalar C, Usubutun S, Turkyilmaz R. Ciprofloxacin and rifampin versus doxycycline and rifampin in the treatment of brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:535–8.
- [95] Al-Eissa YA, Kambal AM, Al-Nasser MN, Al-Habib SA, Al-Fawaz IM, Al-Zamil FA. Childhood brucellosis: a study of 102 cases. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:74–9.
- [96] Khuri-Bulos NA, Daoud AH, Azab SM. Treatment of childhood brucellosis: results of a prospective trial on 113 children. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:377–81.
- [97] Jacobs F, Abramowicz D, Vereerstraeten P, Le Clerc JL, Zech F, Thys JP. *Brucella* endocarditis: the role of combined medical and surgical treatment. *Rev Infect Dis* 1990;12:740–4.
- [98] McCullough NB. Medical care following accidental injection of *Brucella abortus*, strain 19, in man. *J Am Vet Med Assoc* 1963;143:617–8.
- [99] Spink WW, Thompson H. Human brucellosis caused by *Brucella abortus*, strain 19. *JAMA* 1953;153:1162–5.
- [100] Pappagianis D, Elberg SS, Crouch D. Immunization against *Brucella* infection. Effects of graded doses of viable attenuated *Brucella melitensis* in humans. *Am J Epidemiol* 1966;84:21–5.