

## **AVIS**

### **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

#### **relatif à la survie de *Brucella* dans les produits laitiers**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont rendus publics.*

---

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le 24 avril 2012 par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) d'une demande d'avis relatif à la survie de *Brucella* dans les produits laitiers.

#### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Les éléments de contexte suivants sont précisés dans la saisine de la DGAI :

« La section IX de l'annexe III du règlement (CE) n°853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale indique que le lait cru et le colostrum doivent provenir d'animaux de cheptels indemnes ou officiellement indemnes de brucellose.

Toutefois, des dérogations à ce principe sont possibles. Du lait cru ne respectant pas cette condition peut être utilisé avec l'autorisation de l'autorité compétente, si les animaux ne présentent pas de réaction positive aux tests de dépistage de la brucellose, ni aucun symptôme de brucellose :

- dans le cas de vaches ou de bufflonnes, après avoir subi une pasteurisation,
- dans le cas de chèvres ou de brebis :
  - pour la fabrication de fromages d'une durée de maturation d'au moins deux mois,
  - ou après avoir subi une pasteurisation.

Dans tous les cas, le lait des élevages infectés placés sous arrêté préfectoral portant déclaration d'infection n'est pas utilisé. »

L'Agence est saisie des questions suivantes:

- Les produits laitiers issus de bovins provenant de cheptels non indemnes présentent-ils un risque supérieur aux produits laitiers issus de chèvres ou de brebis provenant de cheptels non indemnes ?

- Dans un cheptel de bovins non indemne de brucellose, le lait issu d'animaux ne présentant pas de réaction positive aux tests de dépistage individuels, ni aucun symptôme de brucellose peut-il être utilisé pour la fabrication de fromages affinés plus de 60 jours, sans risque pour les consommateurs ?
- Des distinctions en fonction de la technologie fromagère utilisée doivent-elles être réalisées, par exemple : pâtes molles à croûte lavée (ex. munster), pâtes molles à croûte fleurie (ex. brie), pâtes persillées (ex. bleu), pâtes pressées non cuites (ex. cantal), pâtes pressées cuites (ex. emmental). »

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par les CES « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments » et « Santé Animale » sur la base d'un rapport initial établi par un groupe de rapporteurs issus des deux CES.

Le CES « Santé Animale » était sollicité sur l'excrétion de *Brucella abortus* et *Brucella melitensis* (fréquence, intensité) dans le lait de bovins, de chèvres et de brebis, selon le statut des animaux au sein d'un troupeau non indemne.

Le CES « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments » était sollicité sur :

- l'impact d'une maturation des fromages de 60 jours sur la survie de *Brucella*,
- le risque pour le consommateur lié à la consommation de fromages affinés de plus de 60 jours fabriqués à partir de lait issu de bovins provenant de cheptels non indemnes de brucellose.

L'expertise s'est appuyée sur les articles scientifiques référencés et les textes réglementaires relatifs à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la brucellose bovine, ovine et caprine.

## **3. ANALYSE ET CONCLUSION DES CES**

### **1. Eléments d'informations sur l'excrétion de *Brucella abortus* et *Brucella melitensis* (fréquence, intensité) dans le lait de bovins, de chèvres et de brebis, selon le statut des animaux au sein d'un troupeau non indemne**

La question posée concerne les troupeaux « non indemnes », c'est-à-dire ne répondant pas à la définition des troupeaux indemnes ou officiellement indemnes tels que définis pour la brucellose bovine par la directive 64/432/CEE du Conseil du 26 juin 1964 relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine, et pour la brucellose des petits ruminants, par la directive 91/68/CEE du Conseil du 28 janvier 1991 relative aux conditions de police sanitaire régissant les échanges intracommunautaires d'ovins et de caprins. Les conditions de délivrance et de maintien de ces qualifications sont précisées pour la brucellose bovine dans l'arrêté du 22 avril 2008 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la brucellose des bovinés. Pour la brucellose des petits ruminants, les experts ont tenu compte du projet d'arrêté fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la brucellose ovine et caprine (destiné à remplacer l'arrêté du 13 octobre 1998) présenté à la réunion du Comité consultatif de la santé et de la protection animales (CCSPA) du 22 mars 2012.

Au regard de l'arrêté et du projet d'arrêté susvisés, les troupeaux non indemnes, c'est-à-dire non qualifiés vis-à-vis de la brucellose, sont représentés par les troupeaux « infectés », « suspects d'être infectés » et « susceptibles d'être infectés » de brucellose. Les deux premiers statuts découlent de celui des animaux composant le cheptel. Les troupeaux « susceptibles d'être infectés » sont les troupeaux en lien épidémiologique avec un animal ou un troupeau infectés.

Quatre statuts définissent les animaux composant ces troupeaux : « infectés », « suspects d'être infectés », « contaminés » et « de statut en cours de confirmation vis-à-vis de la brucellose ». Nonobstant les critères reconnus pour la détection de l'infection brucellique (qui peuvent différer chez les bovins et les petits ruminants), les définitions relatives à chaque statut sont équivalentes pour les bovins et les petits ruminants. Ainsi un bovin, ovin ou caprin est reconnu :

- « infecté » : après isolement et identification ou mise en évidence par PCR de la bactérie à partir d'un prélèvement effectué sur cet animal, ou lorsque, appartenant à un troupeau infecté de brucellose, l'animal a présenté un résultat sérologique ou allergique (épreuve cutanée allergique - ECA) individuel positif ;
- « suspect d'être infecté » : après un avortement associé à l'obtention de résultats positifs individuels aux tests sérologiques ou allergique ou après obtention de deux résultats positifs obtenus suite à deux contrôles sérologiques à partir d'échantillons prélevés à intervalle de soixante jours au plus, ou après obtention de résultats positifs en ECA ;
- « contaminé » : lorsque, appartenant à un troupeau déclaré infecté de brucellose, il ne répond pas aux critères précédents ;
- « de statut en cours de confirmation vis-à-vis de la brucellose », lorsqu'en dehors des cas précédents, il a présenté un résultat non favorable suite à un contrôle sérologique, a avorté ou appartient à un troupeau suspect ou susceptible d'être infecté.

Afin d'envisager toutes les éventualités en rapport avec la saisine, il est ajouté le cas d'une vache indemne, car appartenant à un cheptel indemne, mais potentiellement contaminée dans l'intervalle de deux contrôles sérologiques, ou non détectée en l'absence éventuelle de réponse sérologique décelable au moment du contrôle.

Une synthèse des données disponibles sur l'excrétion de *Brucella* dans le lait de bovins, de chèvres et de brebis est présentée en fonction des statuts précédemment listés.

## **I.1. Excrétion de *Brucella* dans le lait de bovins**

### **I.1.1. Cas des bovins infectés**

Le lait des vaches brucelliques peut contenir des *Brucella*, qu'il s'agisse de cas d'infection par *B. abortus* ou d'autres espèces comme *B. melitensis* ou *B. suis*. Les données disponibles concernent essentiellement l'infection par *B. abortus*, mais il n'y a pas lieu de penser à une différence liée à l'espèce bactérienne en cause (Verger, 1985). L'excrétion dans le colostrum et le lait est la conséquence d'une infection du parenchyme mammaire.

Déjà, Carpenter et Boak, en 1928, insistaient sur l'importance de cette excrétion en santé publique, tout en soulignant, en fonction des investigations, la grande variété des résultats relatifs à la proportion de vaches infectées excrétrices (29,9 à 83,3%). Les multiples études, tant sur des vaches naturellement infectées que des vaches artificiellement infectées, ne remettent pas en cause ces observations, sachant qu'une excrétion dans le colostrum et le lait peut être observée en l'absence de tout symptôme de brucellose, et notamment d'avortement. On estime ainsi que 20 à 60 % des vaches sérologiquement positives, sans symptôme de brucellose, éliminent la bactérie dans le colostrum et le lait et ce taux s'élève à 70-80% après un avortement. Les proportions les plus élevées sont observées dans les cas d'infection expérimentale : ainsi Philippon *et al.*, en 1971, rapportent pour 54 vaches infectées par voie conjonctivale au 6<sup>ème</sup> mois de gestation, que 91% éliminent *B. abortus* dans le colostrum (59% dans les quatre quartiers, 20% dans trois quartiers, 9% dans deux quartiers et 2% dans un seul quartier) et 85% dans le lait. L'excrétion est précoce (colostrum) et transitoire (souvent limitée à quelques jours après la mise bas). Mais en fait sa durée est liée, comme le souligne l'étude précédemment citée (30 vaches sur les 49 excrétrices éliminent la bactérie dans le lait durant cinq à six semaines, six semaines correspondant à la durée d'observation des animaux après avortement ou mise bas), à l'intensité de l'infection des nœuds lymphatiques rétro-mammaires. Elle peut atteindre trois mois dans certaines infections expérimentales (Saegerman *et al.*, 2010).

Un point capital au regard de la saisine est la quantité de bactéries excrétées dans le lait des vaches infectées. Les données disponibles varient avec les circonstances dans lesquelles elles ont

été obtenues (infection naturelle ou expérimentale), le stade de l'infection, la nature (lait entier, crème et/ou culot après centrifugation, mélange ou non de lait des quatre quartiers) et la quantité de matériel testé, ainsi que les techniques de recherche des *Brucella* (inoculation au cobaye dans les études les plus anciennes, culture et/ou PCR dans les plus récentes). La limite de détection, qui varie selon la nature et la taille de l'inoculum et la technique utilisée, est rarement fournie, notamment dans les études anciennes. Dans une étude récente réalisée sur des laits de bufflonnes naturellement infectées (Capparelli *et al.*, 2009), elle était estimée à 30 UFC (unités formant colonies) par mL lorsque les bactéries étaient détectées par culture et 15 UFC par mL par PCR quantitative. L'amélioration des techniques d'extraction de l'ADN pour la détection des *Brucella* par PCR peut néanmoins permettre de réduire ce seuil, et certains auteurs considèrent que cette technique peut être plus sensible que la culture.

L'ensemble des données disponibles souligne la variabilité de la quantité de *Brucella* excrétées dans le lait de vaches brucelliques.

Après infection expérimentale, les quantités retrouvées dans le lait par Philippon *et al.* (1971) varient de quelques unités à quelques centaines d'UFC par mL (jusqu'à 499 colonies dénombrées dans 1 à 1,5 gramme de crème et culotensemencés séparément). D'autres auteurs signalent des chiffres atteignant  $10^3$  UFC par mL de lait (Saegerman *et al.*, 2010).

Carpenter et Boak, en 1928, faisaient état de différences entre le lait de vaches expérimentalement infectées et celui de cas d'infection naturelle, citant des chiffres de 145 000 bacilles par mL dans le premier cas, et des chiffres plus faibles dans le deuxième cas, en moyenne de 20 à 440 par mL. Dans une étude limitée à la crème (1 à 1,5 mL), mais portant sur 390 cultures positives issues de vaches naturellement infectées, Perdrix et Chirol (1975) dénombraient moins de 1 à 12 colonies de *Brucella* dans 64% des échantillons, 13 à 30 colonies dans 28% des échantillons et plus de 30 colonies dans les 8% restant, soit au plus quelques dizaines d'UFC par mL. Certaines études donnent cependant des chiffres plus importants. Dans les laits de neuf vaches naturellement infectées, testés par PCR (O'Leary *et al.*, 2006), les résultats suggéraient la présence de  $2 \times 10^2$  à  $2 \times 10^4$  bactéries par mL. Capparelli *et al.* (2009), lors de leur étude portant sur 101 bufflonnes excrétrices, dénombraient (mise en culture et PCR) moins de  $10^3$  UFC par mL de lait chez 85 d'entre elles (84,2%), considérées « faibles excrétrices », et plus de  $10^4$  UFC par mL chez les 16 autres (15,8%), considérées comme de « fortes excrétrices ». Ces auteurs signalent que l'excrétion reste stable durant toute la durée du suivi chez les fortes excrétrices, alors qu'elle est irrégulière chez les faibles excrétrices.

Par ailleurs, plusieurs études de survie de *Brucella* dans les produits laitiers publiées plus récemment (ex. O'Leary *et al.*, 2006 ; Saegerman *et al.*, 2010), utilisent comme valeur de référence une concentration de  $10^3$  UFC/mL de lait, ce qui recoupe assez bien l'ensemble des données citées plus haut et résumées dans le tableau I. Cet élément donne un ordre de grandeur (empirique) du niveau d'excrétion de *Brucella* contenu dans le lait.

**Tableau 1 : Valeurs d'excrétion mammaire de *Brucella abortus* chez les bovinés rapportées dans la littérature**

Référence	Espèce animale	Excrétion (UFC par ml)			Technique de détection	Infection	
		Lait	Crème et culot séparément	Crème		Expérimentale	Naturelle
Philippon <i>et al.</i> (1971)	Bovins ( <i>Bos taurus</i> )		$5-5 \times 10^2$		Bactériologie	X	
Saegerman <i>et al.</i> (2010)		$10^3$			Bactériologie	X	
Carpenter et Boak (1928)		$1,5 \times 10^5$			Bactériologie	X	
		$0,2-5 \times 10^2$			Bactériologie		X
Perdrix et Chirol (1975)				$10-10^2$	Bactériologie		X
O'Leary <i>et al.</i> (2006)		$2 \times 10^2-2 \times 10^4$			Bactériologie		X
Capparelli <i>et al.</i> (2009)	Buffles ( <i>Bubalus bubalis</i> )	$<10^3-$	$>10^4$		Bactériologie et PCR		X

Indépendamment des différences inhérentes aux modalités de dénombrement des *Brucella* dans le lait, l'importante variabilité des résultats tient à de multiples paramètres. Elle tient au stade de l'infection des animaux testés, souvent inconnu lors de recherches effectuées sur les vaches naturellement infectées. L'excrétion bacillaire peut être faible et intermittente, notamment pour les animaux anciennement infectés. Un parallèle est souligné par certains auteurs, entre le niveau d'excrétion et le nombre de *Brucella* détecté dans les nœuds lymphatiques, rétro-mammaires notamment (Philippon *et al.*, 1972 ; O'Leary *et al.*, 2006). D'autres paramètres, tels que l'âge, la génétique, le régime alimentaire et les conditions d'élevage pourraient aussi intervenir dans le niveau d'excrétion (Capparelli *et al.*, 2009). Le niveau d'excrétion est plus élevé dans le colostrum et a tendance à se réduire dans le lait (Philippon *et al.*, 1971).

### **I.1.2. Cas des bovins suspects d'être infectés**

Les animaux concernés sont des vaches (n'appartenant pas à un cheptel reconnu infecté) ayant obtenu deux contrôles sérologiques positifs à partir d'échantillons prélevés à intervalle de 60 jours, ou chez lesquelles une suspicion d'avortement brucellique est renforcée par la mise en évidence d'anticorps anti-brucelliques. La réglementation désignait antérieurement ces animaux comme infectés. La faible valeur prédictive positive des tests de dépistage sérologique dans le contexte de la situation sanitaire française (absence de foyer depuis 2003) est à l'origine, depuis 2008, des dispositions réglementaires actuelles.

Les experts ne disposent pas des statistiques relatives au nombre d'animaux ayant eu, depuis 2008, ce statut de bovins suspects d'être infectés, dont on sait qu'aucun n'a été reconnu infecté et ne pouvait donc être considéré excréteur.

L'expérience acquise en milieu infecté souligne néanmoins la nécessité de considérer ces animaux comme potentiellement infectés et excréteurs tant que les investigations n'auront pas permis de conclure à l'absence d'infection. La proportion de vaches excrétrices et le niveau d'excrétion sont ceux envisagés précédemment.

### **I.1.3. Cas des bovins contaminés**

Il s'agit de bovins sérologiquement négatifs appartenant à un cheptel reconnu infecté (donc dans lequel *B. abortus* a été isolée de l'un, au moins, des animaux le composant).

Trois catégories d'animaux composent éventuellement le groupe des contaminés : ceux qui sont encore réellement indemnes, ceux qui ont été récemment contaminés (au sens épidémiologique du terme) chez lesquels la réaction sérologique n'est pas encore détectable, et des animaux anciennement infectés mais pourtant non détectés (et peut-être à l'origine d'une résurgence de l'infection du cheptel).

Le délai au-delà duquel la réponse sérologique est détectable a été déterminé sur des bovins infectés expérimentalement. Dans ces conditions, les IgG sériques apparaissent au bout de 10-15 jours et les animaux infectés sont détectables, avec des variations selon la technique utilisée, à partir de deux à trois semaines post-infection. Dans ces expériences, les vaches sont souvent inoculées vers le 6<sup>ème</sup>-7<sup>ème</sup> mois de gestation, et la recherche des *Brucella* est effectuée seulement après le part ou l'avortement dans le colostrum et le lait. Une étude de Heck *et al.* (1981) montre néanmoins, à l'occasion du suivi d'une vache inoculée par voie conjonctivale, qu'une culture positive a pu être obtenue à la 4<sup>ème</sup> semaine post-inoculation, alors que la fixation du complément n'était positive qu'à la 5<sup>ème</sup> semaine. La méconnaissance de la date de contamination rend plus aléatoire la détermination du délai d'apparition des anticorps lors d'infection naturelle. Certaines observations (Schoenaers, 1976) soulignaient ainsi la possibilité d'une apparition tardive des anticorps, de l'ordre de 5 mois ou plus chez certains sujets, mais aucune donnée n'est disponible sur l'éventualité d'une excrétion mammaire de *Brucella* durant ces périodes. Des observations ont été également faites de vaches infectées ne devenant positives qu'au moment de la mise bas ou deux à trois semaines plus tard. L'absence prolongée d'anticorps est d'ailleurs bien connue chez certaines génisses nées de vache brucellique (Plommet *et al.*, 1971 et 1973), chez lesquelles l'infection n'est détectée qu'à l'occasion de la 1<sup>ère</sup> gestation. En outre, certains bovins contaminés ne présentent pas de réaction sérologique alors qu'une réaction allergique cutanée est le plus souvent présente (Fensterbank, 1977, Pouillot *et al.*, 1997 ; Saegerman *et al.*, 1999).



Bien que cette éventualité soit faible dans un troupeau dans lequel le dépistage sérologique est réalisé régulièrement dans le cadre de la surveillance programmée des élevages bovins, des vaches anciennement infectées (donc atteintes de brucellose chronique) pourraient avoir été conservées dans l'élevage. Le cas de tels animaux sera évoqué dans le paragraphe suivant, ayant trait aux bovins de statut en cours de confirmation vis-à-vis de la brucellose.

#### **I.1.4. Cas des bovins de statut en cours de confirmation vis-à-vis de la brucellose**

Ce statut regroupe des situations très diverses.

Une vache ayant avorté ne sera considérée comme suspecte qu'en cas des résultats sérologiques positifs individuels à l'épreuve à l'antigène tamponné (EAT) ou l'ELISA et à la fixation du complément (FC). L'expérience acquise lorsque la brucellose était encore répandue en France avait montré, chez des vaches ayant avorté, des discordances entre le sérodiagnostic (réalisé à partir du sérum), négatif au moment de l'avortement, et la culture positive du prélèvement placentaire. La fuite plasmatique lors de la préparation de la mamelle, entraînant une baisse du titre des anticorps sériques, en est l'explication, et la sérologie devient (ou redevient) positive en général quelques jours plus tard. Des chiffres allant jusqu'à 14% des bovins brucelliques avec une chute possible du titre sérologique en dessous des niveaux de positivité, y compris lors de vêlage apparemment, étaient cités autrefois (Schoenaers, 1976), mais dans un contexte d'infection enzootique où n'étaient pas envisagés les cas de réactions sérologiques non spécifiques. En contexte indemne, cette éventualité pourrait néanmoins être une cause de non détection d'un foyer de brucellose, la réglementation ne prévoyant la recherche par culture des *Brucella* qu'en cas de sérodiagnostic positif. Sa prise en compte dans un contexte épidémiologique favorable à la survenue d'un cas de brucellose (notamment dans le cas d'un cheptel « susceptible d'être infecté » car en lien épidémiologique avec un animal ou une exploitation reconnus infectés) peut néanmoins permettre de limiter ce risque, et d'éviter la commercialisation d'un lait contaminé si la femelle s'avère excrétrice. De plus, en contexte historiquement indemne, la probabilité de survenue de cas isolés d'avortement brucellique est certainement très faible. Lors d'un avortement brucellique, l'importance de l'excrétion bactérienne est telle qu'hormis dans des situations très particulières (et donc rares), les avortements et les séroconversions devraient se multiplier assez rapidement dans l'élevage atteint. La probabilité que toutes les vaches qui avortent soient séronégatives après l'avortement est alors très réduite.

Le cas d'animaux ayant fourni un résultat non favorable à un contrôle sérologique est également à considérer. De tels animaux ne sont réglementairement considérés comme suspects qu'après obtention de 2 résultats sérologiques positifs obtenus à partir d'échantillons prélevés à intervalle de 60 jours au plus.

- Il peut s'agir d'animaux récemment infectés, chez lesquels les tests sérologiques peuvent donner des résultats discordants. Le second contrôle, dont il est prévu qu'il soit réalisé 15 jours plus tard dans un contexte épidémiologique défavorable, doit permettre, cependant, de les identifier. L'éventualité d'être en présence d'un animal qui, comme dans le cas décrit par Heck *et al.* (1981), présente des titres faibles (avec des résultats discordants d'un type de test à l'autre), et se « négative » durant plusieurs semaines avant de fournir de nouveau un résultat positif et finalement d'avorter, doit être considérée comme exceptionnelle.
- Le cas d'une vache anciennement infectée, chez laquelle le titre des anticorps sériques est faible et fluctue de part et d'autre du seuil de positivité, est aussi à envisager. De tels animaux peuvent ne pas être détectés. En l'absence d'une réactivation de l'infection, peu probable chez un animal où la multiplication bactérienne est contrôlée par l'immunité cellulaire, les *Brucella* restent cantonnées dans certains nœuds lymphatiques, notamment les rétro-mammaires. Des cas de ce type ont été décrits par le passé, mais dans un contexte de brucellose enzootique et dans une population où une partie des animaux était vaccinée, révélant l'isolement chez des animaux âgés infectés plusieurs années auparavant, jusqu'à 11 ans après l'infection (Lambert *et al.*, 1961). Une telle probabilité de maintenir une vache atteinte de brucellose chronique est très faible dans un troupeau qui bénéficie d'une surveillance à la fois événementielle<sup>1</sup> et

<sup>1</sup> Surveillance événementielle : forme de surveillance passive fondée sur la détection/notification d'événements, cliniques par exemple, comme un avortement

programmée. En outre, le territoire français étant reconnu indemne depuis 2005, et le dernier foyer ayant été déclaré en 2003, il s'agirait d'un animal âgé d'au moins 9 ans. En l'absence de multiplication active des *Brucella* dans le parenchyme mammaire (et dans ce cas elle devrait être associée à une réactivation sérologique), l'excrétion dans le lait chez ces animaux est peu probable. Cette hypothèse est étayée par diverses observations, telles celle d'une relation entre la fréquence de la présence de *B. abortus* dans le lait et l'intensité de l'infection brucellique de la vache, en particulier des nœuds lymphatiques rétro-mammaires (Philippon *et al.*, 1971). De même, un certain parallélisme a été observé chez des vaches âgées, entre l'intensité de la réaction sérologique (à l'époque, sérodiagnostic de Wright) et le pourcentage de contamination des nœuds lymphatiques rétro-mammaires (Simintzis, 1974), les excrétrices s'avérant rarement séronégatives (Perdrix et Chirol, 1975). S'intéressant à la fréquence des vaches excrétrices, Perdrix et Chirol (1973) constataient en outre que si elle était souvent grande dans un effectif récemment infecté, elle était généralement réduite ou nulle dans un troupeau anciennement atteint. Capparelli *et al.* (2009) ont montré, enfin, chez des bufflonnes testées en zone infectée, sans exclure totalement des faux négatifs chez d'éventuels sujets atteints de brucellose chronique, que toutes les femelles détectées excrétrices (culture et PCR) dans le lait présentaient également des réactions positives aux trois tests sérologiques utilisés (EAT, FC et cytométrie de flux).

Le statut en cours de confirmation vis-à-vis de la brucellose caractérise aussi les bovins appartenant à un troupeau suspect ou susceptible d'être infecté. Les cas de figures correspondant à ces animaux, s'il s'avère que le cheptel est réellement infecté, sont ceux déjà évoqués précédemment, notamment celui des animaux « contaminés ».

#### **I.1.5. Cas des bovins appartenant à un cheptel indemne**

Deux situations méritent d'être commentées dans un cheptel officiellement indemne.

La première est celle de la contamination récente de ce cheptel, sa détection, en l'absence d'avortement (déclaré), étant liée à la fréquence des contrôles sérologiques. La possibilité de commercialiser le lait d'une femelle excrétrice existe durant ce délai.

La seconde est le maintien, dans un cheptel anciennement infecté à une période où l'assainissement était encore fondé sur un abattage partiel des seuls animaux ayant présenté des résultats positifs ou nés des femelles reconnues infectées, d'une femelle réellement infectée (contaminée en tant que jeune femelle bovine, atteinte de brucellose chronique) mais non détectée. Cette éventualité, bien que certainement rare, ne peut être écartée. Le cas de ces animaux et le fait qu'ils puissent excréter des *Brucella* dans leur lait a été discuté plus haut.

#### **I.2. Excrétion de *Brucella* dans le lait des petits ruminants**

Les différents statuts des ovins et caprins réglementairement définis dans des troupeaux non indemnes sont comparables à ce qui a été décrit chez les bovins. La seule différence tient aux cheptels eux-mêmes puisque le projet d'arrêté mentionné conserve, parallèlement à la notion de « cheptel officiellement indemne de brucellose », celle de « cheptel indemne » pour les troupeaux possédant des animaux vaccinés (depuis moins de 2 ans). La vaccination des jeunes femelles ovines (ou caprines, dans les troupeaux mixtes) a été poursuivie jusqu'en 2008 dans quelques zones d'élevage plus à risque et un programme de vaccination des jeunes béliers est mis en place en 2012 dans un département du Sud-Ouest pour lutter contre l'épididymite contagieuse ovine due à *B. ovis*.

Le raisonnement qui s'attache à chaque statut est identique à celui utilisé dans le cas de la brucellose bovine.

Comparativement à la brucellose bovine, peu de publications traitent du niveau d'excrétion de *B. melitensis* dans le lait des femelles de petits ruminants infectées. Carpenter et Boak (1928) soulignaient la variabilité de la quantité de *Brucella* présentes dans le lait des chèvres infectées avec des chiffres atteignant 30 000 bactéries par mL. Des chiffres variant de  $4 \times 10^3$  à  $2 \times 10^6$  UFC par mL sont aussi cités, en indiquant que l'excrétion est plus intense chez la chèvre que chez les autres femelles (Jouve, 1952). D'autres données disponibles font état de concentration de *B. melitensis* au moins égales à  $10^3$  UFC par mL dans des laits de chèvres et de brebis infectées (Hamdy et Amin, 2002). Comme cela a été démontré à l'occasion d'infections expérimentales de

brebis, l'excrétion dans le lait peut être observée pendant toute la lactation et se maintenir ainsi pendant au moins trois lactations successives (Grilló *et al.*, 1997).

Comme chez les bovins, certains animaux infectés peuvent échapper au dépistage sérologique. C'est le cas notamment des femelles ovines nées de mère infectée ou contaminées par consommation de lait virulent, capables de demeurer négatives jusqu'à leur première gestation (Grilló *et al.*, 1997 ; León *et al.*, 2010).

La détection de brebis séronégatives et pourtant excrétrices dans le lait est aussi signalée ponctuellement par divers auteurs (Hamdy et Amin, 2002) et certains auteurs ont souligné l'intérêt de la PCR pour la détection des brebis infectées, en obtenant plus de positifs que par la sérologie (Leal-Klevezas *et al.*, 1995) dans des troupeaux anciennement infectés. D'autres auteurs, sur des chèvres suivies pendant 2,5 ans après infection (expérimentale ou par contact), soulignent cependant que des réactions sérologiques (fixation du complément) coïncident avec la majorité des cultures de lait positives (Renoux, 1961).

Ces données, obtenues en zones d'infection enzootique et sur des cheptels anciennement infectés sont cependant à tempérer dans le contexte épidémiologique français. Le taux important de renouvellement des ovins et caprins réduit d'ailleurs le risque de maintien dans les cheptels de sujets infectés chroniques, sachant que les derniers cas de brucellose ovine ou caprine datent en France de 2003.

## **II. Comparaison des niveaux de contamination des laits issus de troupeaux non indemnes de bovins et de petits ruminants**

Les éléments de réponse à cette question ont déjà été traités dans le paragraphe précédent. La situation est bien entendu très variable selon le statut du cheptel qui, non indemne, peut-être « infecté », « suspect d'être infecté » ou « susceptible d'être infecté ».

Quel que soit ce statut, le niveau de contamination des laits est fonction de la proportion d'animaux présents effectivement infectés et excréteurs, et du volume de lait collecté. Nous avons indiqué que la quantité de *Brucella* éliminées par un animal dans le lait était irrégulière, variant de « non détectable » à  $10^6$  bactéries par mL comme cela a été parfois signalé. Il semble que le niveau d'excrétion soit globalement plus faible chez les bovins que chez les petits ruminants, mais il faut tenir compte de la possibilité de la présence éventuelle dans le troupeau de vaches « fortes excrétrices », éliminant plus de  $10^4$  *Brucella* par mL de lait (Capparelli *et al.*, 2009). A moins d'être en présence d'un cheptel très infecté avec de nombreuses femelles excrétrices, situation peu probable (et en tout cas très rapidement identifiée) dans le contexte épidémiologique et le programme de surveillance actuel en France, les *Brucella* présentes dans le lait de tank doivent l'être en faible quantité, expliquant les difficultés de leur mise en évidence. Les données bibliographiques portent d'ailleurs uniquement sur la recherche des *Brucella* dans le lait individuel des femelles testées (le plus souvent d'ailleurs dans le but de déterminer les animaux infectés du troupeau comme alternative au dépistage sérologique). Quoi qu'il en soit, il est impossible de distinguer les troupeaux de bovins et de petits ruminants sur la base de la quantité de bactéries éliminées. La différence en faveur d'une moindre dangerosité des laits de bovins est due notamment à l'espèce bactérienne infectante. *B. abortus* est en effet reconnu comme moins pathogène pour l'homme que *B. melitensis*, mais l'actualité montre le développement possible de foyers bovins dus à *B. melitensis* (Mailles *et al.*, 2012). De plus, il existe une forte probabilité que l'excrétion des *Brucella* dans le lait soit associée à la présence d'anticorps détectables dans le lait (Hamdy et Amin, 2002). La recherche d'anticorps dans le lait étant effectuée chez les bovins, mais pas chez les petits ruminants, la probabilité de détection d'une infection brucellique est plus élevée chez les bovins laitiers, d'où un risque moindre associé à ces troupeaux.

L'existence éventuelle d'animaux, bovins ou petits ruminants, ne présentant pas de réaction positive aux tests de dépistage individuels, ni aucun symptôme de brucellose a été également évoquée dans le chapitre précédent :

- Il peut s'agir de sujets récemment infectés chez lesquels la réponse sérologique n'est pas encore détectable ou de sujets qui, selon la périodicité des contrôles, n'ont pas été encore détectés. Il peut s'agir de femelles testées au moment de la mise bas et chez lesquels les anticorps circulants, en quantité trop faible, sont provisoirement non détectables. Dans ces cas,



il est fort probable qu'on se trouve dans un contexte épidémiologique local d'infection brucellique. Leur détection est en outre facilitée dans les troupeaux laitiers bovins qui sont testés par des tests ELISA pratiqués sur le lait.

- Il peut s'agir aussi de femelles infectées *in utero* ou à la suite de la consommation de lait infecté, chez lesquels les anticorps n'apparaissent qu'ultérieurement à la faveur de leur 1<sup>ère</sup> gestation, voire à l'issue d'une mise bas qui peut apparaître normale. Il peut s'agir enfin de sujets chroniquement infectés dont la réponse sérologique est devenue négative. Dans ces cas, il est fort probable qu'on se trouve dans un contexte épidémiologique particulier de cheptels anciennement infectés dans lesquels des animaux brucelliques non détectés ont été conservés. Les femelles infectées *in utero* ou à la naissance seront détectées au plus tard après leur premier part. Seuls les animaux chroniquement infectés poseront sans doute des difficultés de détection (à moins peut-être d'un recours à l'ECA, ce qui n'est actuellement pas possible en l'absence de commercialisation de la brucelline). Cependant, de tels animaux, peu ou faiblement excréteurs (sauf réactivation de l'infection brucellique, éventuellement associée à une contamination secondaire d'autres sujets) et forcément en faible nombre dans un troupeau, n'auront qu'un impact nul ou mineur sur la qualité sanitaire du lait produit.

**Conclusion sur l'excrétion de *Brucella* dans le lait de bovins et de petits ruminants de troupeaux non indemnes de brucellose**

Chez les bovins et petits ruminants infectés de brucellose (à *B. abortus* et/ou *B. melitensis*), l'excrétion mammaire apparaît extrêmement variable en intensité, fréquence et durée d'un animal à l'autre, de l'absence totale d'excrétion à une excrétion durable tout au long de la lactation, voire sur plusieurs périodes de lactation, en passant par une excrétion intermittente et variable en intensité chez le même animal. L'excrétion moyenne chez les bovins infectés est, selon la littérature, de l'ordre de 10<sup>3</sup> UFC/ml.

La concentration en *Brucella* dans le lait de mélange d'une exploitation infectée est plus ou moins importante selon le nombre d'animaux infectés et excréteurs et le nombre d'animaux non excréteurs de l'exploitation dans le lait desquels les laits infectés se trouvent dilués.

Aucun élément de la littérature ne conduit à suggérer de différence entre les bovins, les ovins et les caprins en termes d'intensité, de fréquence et de durée d'excrétion de *Brucella* dans le lait. En revanche, la fréquence de l'infection humaine d'origine alimentaire par *B. melitensis*, habituellement très supérieure à celle liée à *B. abortus*, y compris dans les pays où les deux espèces de *Brucella* coexistent, est à mettre en rapport avec la virulence considérée comme très supérieure chez l'homme pour l'espèce *B. melitensis*.

Pour les cheptels non indemnes (au sens réglementaire), et tant que des contrôles ultérieurs n'ont pas permis de définir leur statut infectieux, il n'est pas possible d'émettre un avis sur la probabilité d'excrétion des *Brucella* dans leur lait. En fait, ce statut est directement lié à leur probabilité d'être réellement infecté, qui dépend elle-même de la prévalence de la brucellose dans la région considérée.

Ainsi en région indemne ou officiellement indemne de brucellose et dans un contexte épidémiologique favorable, dans un cheptel bovin non indemne de brucellose, la probabilité de présence de *Brucella* dans le lait de mélange provenant d'animaux ne présentant pas de réaction positive aux tests de dépistage individuels, ni aucun symptôme de brucellose peut être considérée comme quasi-nulle.

### III. Impact d'une maturation des fromages de 60 jours sur la survie de *Brucella*

Pour les fromages au lait de vache, la durée de 60 jours semble avoir été établie de façon empirique dans les années 40, aux États-Unis, en dépit d'une survie supérieure à 60 jours, mais en considération de constatations épidémiologiques (Gilman *et al.*, 1946). En effet, cette durée apportait « une protection raisonnable contre *B. abortus* dans le cheddar » et « on jugea déraisonnable d'exiger une durée d'affinage suffisante pour garantir la mort de tous les pathogènes, car la durée exacte d'affinage nécessaire pour garantir l'innocuité des fromages était inconnue » (Johnson *et al.*, 1990 cité par d'Amico 2008). Cette décision, qui a parfois été contestée, semble s'être avérée efficace dans les périodes et les zones où la brucellose était enzootique.

L'efficacité de la règle des 60 jours a été remise en cause récemment aux États-Unis, mais à propos des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines ou Véro-toxines (STEC ou VTEC) ainsi que de *Listeria monocytogenes*.

#### III.1. Survie de *Brucella* dans les fromages

La bibliographie sur cette question est limitée et disparate. La nature et l'âge des fromages sont indiqués de façon imprécise dans de nombreux articles. Le tableau 2 résume ces publications. Lorsque la dernière colonne n'indique pas une durée, cela signifie que la présence de *Brucella* a été étudiée sur des fromages d'âge inconnu prélevés dans le commerce. La mention entre parenthèse « biblio. » indique que l'article cité ne contient pas de résultats originaux. Sauf indication contraire, les fromages sont fabriqués avec du lait de vache.

Tableau 2 : Données bibliographiques concernant la survie de *Brucella* dans les fromages

Référence	Genre-espèce	Fromage	Survie maximale ou positifs/analysés
Gilman <i>et al.</i> 1946	<i>B. abortus</i>	Cheddar	6 mois, mais pas d'épidémie avec des fromages de > 63 j, donc 60 j d'affinage est une protection raisonnable qui peut être recommandée contre <i>B. abortus</i>
Carrère <i>et al.</i> 1960	<i>Brucella</i> spp.	Pâte molle d'acidité variable	32 j survie 40 j conseillés pour une protection raisonnable
Dutheil 1960	<i>B. melitensis</i> et <i>B. abortus</i>	Roquefort (brebis)	<20 j
Sabbaghian 1975	<i>Brucella</i>	Chèvre ou brebis frais	40% négatifs après 1 semaine et 1,1% encore infectés après 8 semaines
Cosseddu et Pisanu 1985	<i>B. melitensis</i>	Chèvre sarde	10 j survie 45 j pas de survie 75 j conseillés pour une protection raisonnable
Plommet <i>et al.</i> 1988	<i>B. abortus</i>	Camembert	<25 j (12°C)
El-Daher <i>et al.</i> 1990	<i>B. melitensis</i>	Pâte molle	72 h survie 96 h pas de survie
Abdallah <i>et al.</i> 1992	<i>B. melitensis</i>	Pâte molle légèrement salée prélevé sur les marchés	3 positifs sur 40 analysés

Référence	Genre-espèce	Fromage	Survie maximale ou positifs/analysés
Garin-Bastuji et Verger 1994 Reproduit dans Garin-Bastuji 2011 (biblio.)	<i>Brucella</i>	Feta*	4-16 j
		Pecorino**	<90 j
		Roquefort	20-60 j
		Camembert	<21 j
		Erythréen	44 j
		Fromage blanc	1-8 semaines
		Cheddar	6 mois
Diaz <i>et al.</i> 1998	<i>B. abortus</i>	Blanc mexicain à pâte molle	0 positif /3 analysés au bout de 21 j à 5°C
AQIS 1999 (biblio.)	<i>Brucella</i> et autres pathogènes ( <i>Mycobacterium</i> )		>90 j
Sammartino <i>et al.</i> 2006 (biblio.)	<i>Brucella</i>		affinage optimal pour assurer la sécurité inconnu, mais durée de 3 mois considérée convenable dans les fromages acidifiés et salés de façon appropriée
Papademas 2000	<i>Brucella</i>	Domiaty*	12 j à 18-22°C, 25 j à 2-4°C
		Gruyère ou emmental	6 j
		Tilsit***	15 j
		Camembert ou munster	57 j
D'Amico 2008 (biblio.)	<i>Brucella</i>		suppose que l'absence d'épidémies de brucellose et de typhoïde avec des fromages affinés de plus de 63 j (pour la consommation de cheddar aux États-Unis) est à l'origine de la règle des 60 j
Di Giannatale <i>et al.</i> 2009	<i>Brucella</i> spp.	Mozzarella de bufflonne	0 positif/315 analysés
Akbarmehr 2011	<i>B. melitensis</i>	Fromage au lait non pasteurisé	0,7% positifs
	<i>B. abortus</i>	Fromage au lait non pasteurisé	1,5% positifs
	<i>B. melitensis</i>	Roquefort	>10 j
Mendez-Gonzalez <i>et al.</i> 2011	<i>B. melitensis</i>	Chèvre affiné	>50 j

\* fromage à la saumure (feta : traditionnellement laits de brebis et chèvre ou vache ; domiaty : traditionnellement laits de vache et bufflonne)

\*\* fromage de lait de brebis à pâte pressée

\*\*\* pâte pressée non cuite à croûte lavée

### III.2. Informations disponibles concernant les différents types de fromages

D'après le tableau ci-dessus, peu de types de fromages ont été étudiés : un, au plus deux, par grande catégorie. Le tableau indique que la règle des 60 jours convient pour :

- parmi les pâtes molles à croûte lavée, le munster ;
- parmi les pâtes molles à croûte fleurie, le camembert ; pas d'indication pour les bries ;
- parmi les pâtes persillées, le roquefort (fromage au lait de brebis) ; pas d'indication pour les bleus ;

- parmi les pâtes pressées non cuites, le cheddar ; pas d'indication pour le cantal ;
- parmi les pâtes pressées cuites, le gruyère et l'emmental.

En raison des différences subtiles qui existent entre les types de fromages au sein d'une même catégorie, il n'est pas possible de généraliser les conclusions.

#### **IV. Epidémiologie des cas de brucellose humaine liés aux produits laitiers**

Les études citées plus haut indiquent une possibilité de survie des *Brucella* sur des périodes plus ou moins longues selon les fromages, mais dépassant exceptionnellement les 60 jours. Si les fromages maturés (hors « fromages frais ») sont classiquement cités comme source potentielle de contamination pour l'homme par voie alimentaire, ils n'apparaissent qu'exceptionnellement dans les sources de cas humains rapportées dans la littérature.

S'agissant de la source des cas humains de brucellose en France, l'exposition professionnelle et autochtone était la plus représentée initialement. Il apparaît, selon les informations issues des éditions successives du Bulletin épidémiologique hebdomadaire (depuis 1985), qu'au fur et à mesure de l'éradication de la brucellose animale en France, l'origine alimentaire (et exotique) est progressivement devenue la principale exposition identifiée. Néanmoins, de 1985 (période de prévalence encore importante des cheptels bovins (1,3%), ovins (> 3%) et caprins (> 0,5% infectés) à 2000 (soit 3 ans avant l'éradication totale de la brucellose bovine, ovine et caprine), les seules sources alimentaires identifiées n'ont été que le fromage frais et le lait cru (majoritairement de chèvre ou de brebis) (BEH).

Aucun fromage affiné, et ce, quelles que soient l'espèce animale d'origine et la durée d'affinage, n'est cité comme source probable de cas humain en France sur la période (BEH).

#### **CONCLUSIONS DES CES « EVALUATION DES RISQUES BIOLOGIQUES LIES AUX ALIMENTS » ET « SANTE ANIMALE »**

- **Les produits laitiers issus de bovins provenant de cheptels non indemnes présentent-ils un risque supérieur aux produits laitiers issus de chèvres ou de brebis provenant de cheptels non indemnes ?**

Les produits laitiers issus de bovins provenant de cheptels non indemnes de brucellose ne présentent pas, selon les données de la littérature, un risque supérieur aux produits laitiers issus de chèvres ou de brebis provenant de cheptels non indemnes.

Le risque est avant tout lié à la nature du produit laitier, le lait cru et les fromages frais étant, parmi les produits laitiers au lait cru, pratiquement les seuls produits incriminés dans les cas de brucellose humaine d'origine alimentaire survenus en France depuis 1985.

- **Dans un cheptel de bovins non indemne de brucellose, le lait issu d'animaux ne présentant pas de réaction positive aux tests de dépistage individuels, ni aucun symptôme de brucellose peut-il être utilisé pour la fabrication de fromages affinés plus de 60 jours, sans risque pour les consommateurs ? Des distinctions en fonction de la technologie fromagère utilisée doivent-elles être réalisées ?**

Dans un cheptel bovin non indemne de brucellose, la probabilité de présence de *Brucella* dans le lait de mélange provenant d'animaux ne présentant pas de réaction positive aux tests de dépistage individuels, ni aucun symptôme de brucellose peut être considérée comme quasi-nulle en région indemne ou officiellement indemne de brucellose et dans un contexte épidémiologique favorable.

Dans l'hypothèse où, néanmoins, certains de ces animaux seraient effectivement excréteurs, les études disponibles tendent à démontrer l'absence de survie des *Brucella* après 60 jours pour certains types de fromages. Il est cependant impossible, en l'absence de données, de généraliser ces conclusions à l'ensemble des fromages.

Néanmoins, le maintien d'un délai d'affinage de 60 jours peut être considéré, bien que tout risque ne puisse être écarté, comme apportant une protection raisonnable pour le consommateur. D'ailleurs, la consommation de fromages affinés de plus de 60 jours et préparés à partir du lait d'exploitations non-indemnes, du temps où cette dérogation était encore permise par la réglementation européenne, n'a pas été rapportée comme à l'origine de cas de brucellose humaine, y compris lorsque la brucellose bovine, ovine et caprine était encore répandue en France.

En conclusion, les CES considèrent que ces différents éléments ne permettent pas de justifier la distinction introduite dans la réglementation européenne entre les fromages affinés plus de soixante jours issus de lait de bovins et ceux issus de lait d'ovins et de caprins.

#### **4. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE**

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions des CES « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments » et « Santé Animale ».

**Le directeur général**

**Marc MORTUREUX**

#### **MOTS-CLES**

*Brucella*; lait ; fromages ; excrétion ; bovins ; ovins ; caprins.



**BIBLIOGRAPHIE**

- Abdallah, M.I.M., Dawoud, A.S. and Bazalou, M.S. (1992) *Occurrence of Brucella in some unheattreated dairy products in Damietta governorate regarding its health importance*. Damiette (Égypte): Food Inspection Laboratory.
- Acha, P. N., B. Szyfres. 2005. Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Vol. 1 : bactérioses et mycoses ; 3e éd. Organisation Mondiale de la Santé Animale, Paris, 382 p.
- Akbarmehr, J. (2011) The prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in local cheese produced in Sarab city, Iran and its public health implication *African J of Microbiol Res* **5**, 1500-1503.
- Anonyme, 1986, Les brucelloses en 1985, BEH, N°36 :141-142.
- AQIS (1999) *Importation of dairy products into Australia for human consumption*. Canberra: Australian Quarantine and Inspection Service.
- Capparelli R, Parlato M, Lannaccone M, Roperto S, Marabelli R, Roperto F, Lannelli D (2009). Heterogeneous shedding of *Brucella abortus* in milk and its effect on the control of animal brucellosis. *J Appl Microbiol* **106**, 2041-2047.
- Carpenter CM, Boak R (1928). *Brucella abortus* in milk and dairy products. *Am J Public Health*; **18**, 743-751.
- Carrère, L., Lafenêtre, H., Quatrefages, H. and Noronha, F. (1960) Length of survival of *Brucella* in Roquefort cheese. *Bull Acad Vét Fr* **33**, 469-473.
- Chirol C, Perdrix J (1973). La détection des vaches excrétrices de *Brucella* dans le lait. *Bull Soc Vét et méd comparée, Lyon*, **75** : 161-16.
- Chirol C, Perdrix J (1975). Les vaches excrétrices de *Brucella* dans le lait. *Bull Soc Vét et méd comparée, Lyon* **77**, 371-373.
- Cosseddu, A., Pisanu, S. (1985) Survival of *Brucella melitensis* in goats' milk cheese. *Atti della Societa Italiana delle Scienze Veterinarie* **39**, 624-626.
- D'Amico, D. (2008) Incidence, ecology, and fate of target foodborne pathogens in the cheesemaking continuum. Ph.D. Thesis: University of Vermont.
- Davies, G. and Casey, A. (1973) The survival of *Brucella abortus* in milk and milk products. *British Vet J* **129**, 345-353.
- Di Giannatale, E., Alessiani, A., Prencipe, V., Matteucci, O., Persiani, T., Zilli, K. and Migliorati, G. (2009) Polymerase chain reaction and bacteriological comparative analysis of raw milk samples and buffalo mozzarella produced and marketed in Caserta in the Campania region of Italy. *Vet Ital* **45**, 437-442.
- Díaz, C., Acedo, F. and León, D. (1998) Survival of *Brucella abortus* in the Mexican white soft cheese processing. *Recent Research Developments in Nutrition Research* **2**, 47-57.
- Durr U, Valanciano M, Vaillant V, 2003. La brucellose humaine en France de 1998 à 2000. In : Surveillance nationale des maladies infectieuses 1998-2000. Ed. Institut de Veille Sanitaire, Département des Maladies Infectieuses, Saint-Maurice, 199-201.
- Dutheil, M.H. (1960) Survival of *Brucella* in Roquefort cheese. *Bull Acad Vét Fr* **33**, 463-468.
- El-Daher, N., Na'Was, T. and Al-Qaderi, S. (1990) The effect of the pH of various dairy products on the survival and growth of *Brucella melitensis*. *Ann Trop Med and Parasitol* **84**, 523-528.
- Fensterbank R (1977). Allergic diagnosis of bovine brucellosis. 2. Use of the allergic test in infected herds. *Ann Rech Vét* **8**, 195-201.
- Garin-Bastuji, B. (2011) Pathogens in Milk/*Brucella* spp. In *Encyclopedia of Dairy Sciences, Volume 4 (Second Edition)* eds. Fuquay, J., Fox, P. and McSweeney, P. pp.31-39. San Diego: Academic Press.
- Garin-Bastuji, B. and Verger, J.M. (1994) *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. In *The significance of pathogenic microorganisms in raw milk* ed. Gehriger, H. pp.167-185. Bruxelles: International Dairy Federation.

- Gilman, H., Dahlberg, A. and Marquardt, J. (1946) The Occurrence and Survival of *Brucella Abortus* in Cheddar and Limburger Cheese. *J Dairy Sci* **29**, 71-85.
- Grilló MJ, Barberán M, Blasco JM (1997). Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs. *Vet Rec*, **140**, 602-605.
- Hamdy ME, Amin AS (2002). Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Vet J* **163**, 299-305.
- Heck FC, Williams JD, Zink DL, Gilmore WC, Adams L (1981). Serologic profile for a cow experimentally infected with *Brucella abortus*. *British Vet J* **137**, 520-526.
- Jouve GP (1952). Melitococcie ovine et caprine. Thèse Vét., Alfort, n°17.
- Juffs, H. and Deeth, H. (2007) *Scientific evaluation of pasteurisation for pathogen reduction in milk and milk products*. Canberra (Australia) and Wellington (New Zealand): Food Standards Australia New Zealand.
- Keogh, B.P. (1971) Reviews of the progress of dairy science. *J Dairy Res* **38**, 91-111.
- Kronenwett, F.R., Lear, S.A. and Metzger, H.J. (1954) Thermal death time studies of *Brucella abortus* in milk. *J Dairy Sci* **37**, 1291-1302.
- Lambert G, Ameurault TE, Manthei CA, Goode ER (1961). Further studies on the persistence of *Brucella abortus* infection in cattle. *Proc United States Livestock San Assn, 66th Ann. Meet.*, p 109-117. Cité in: Philippon A, Renoux G, Plommet M (1970) Brucellose bovine expérimentale. II.- Répartition de *Brucella abortus* dans l'organisme six semaines après le part et trois mois à cinq mois et demi après l'épreuve infectante. *Ann Rech Vét*, **1**, 203-213.
- Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino A, Martínez-Soriano JP (1995). Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* **33**, 3087-90.
- León FC, Ferri EFR, Ferrer MD (2010) Brucellosis in small ruminants. in *Infectious and parasitic diseases of livestock*. C. Lefèvre, J. Blancou, R. Chermette, G. Uilenberg, Editors, Edition Tec et Doc Lavoisier Eminter (Paris), p. 1021-1045.
- Mailles A, Rautureau S, Le Horgne JM, Poignet-Leroux B, d'Arnoux C, Denetière G, Faure M, Lavigne JP, Bru JP, Garin-Bastuji B, 2012. Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health. *Euro Surveill*, **17**(30).
- Méndez-González, K.Y., Hernández-Castro, R., Carrillo-Casas, E.M., Monroy, J.F., López-Merino, A. and Suárez-Güemes, F. (2011) *Brucella melitensis* survival during manufacture of ripened goat cheese at two temperatures. *Foodborne Pathogens and Disease* **8**, 1257-1261.
- O'Leary S, Sheahan M., Sweeney T (2006). *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res Vet Sci* ; **81** : 170-176.
- Papademas, P. (2000) *Brucella*/Problems with dairy products. In *Encyclopedia of Food Microbiology* eds. Batt, C.A., Patel, P.D. and Robinson, R.K. pp.324-328. London: Academic Press.
- Perdrix J & Chirol C, 1975. Les vaches excrétrices de *Brucella* dans le lait. Bull. Soc. Sci. Vét. Et Méd. Comparée, Lyon, 1975, **77**, n°6, 371-376.
- Perdrix J & Chirol C, 1973. La détection des vaches excrétrices de « *Brucella* » dans le lait. Bull. soc. Sci. Vét. Et Méd. Comparée, Lyon, 1973, **75**, n°3, 161-162.
- Philippon A, Renoux G, Plommet M (1971). Brucellose bovine expérimentale. V. - Excrétion de *Brucella abortus* par le colostrum et le lait. *Ann Rech Vét*, **2**, 59-67.
- Plommet M, Fensterbank R, Renoux G, Gestin J, Philippon A (1973). Brucellose bovine expérimentale. XII.- Persistance à l'âge adulte de l'infection congénitale de la génisse. *Ann Rech Vét*, **4**, 419-435.
- Plommet M, Renoux G, Philippon A, Gestin J, Fensterbank R (1971). Transmission congénitale de la brucellose bovine d'une génération à l'autre. *Bull Acad Vet Fr* **44**, 53-59.
- Plommet, M., Fensterbank, R., Vassal, L., Auclair, J., Mocquot, G., Vachot, J., Courault, M. and Musset, D. (1988) Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. *Le Lait* **68**, 115-120.

- Pouillot R, Garin-Bastuji B, Gerbier G, Coche Y, Cau C, Dufour B, Moutou F, 1997. The Brucellin skin test as a tool to differentiate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet Res*, **28**, 365-374.
- Renoux G (1961). Brucellose caprine. I.- Bactériologie et sérologie d'un troupeau de chèvres observé pendant deux ans et demi. *Ann Zootech*, **10**, 233-277.
- Sabbaghian, H. (1975) Fresh white cheese as a source of *Brucella* infection. *Public Health* **89**, 165-169.
- Saegerman C, Berkvens D, Godfroid J, Walravens K (2010). Bovine brucellosis. In *Infectious and parasitic diseases of livestock*. C. Lefèvre, J. Blancou, R. Chermette, G. Uilenberg, Editors, Edition Tec et Doc Lavoisier Eminter (Paris), p. 991-1021.
- Saegerman C., Vo T. K-O., De Waele L., Gilson D., Bastin A., Dubray G., Flanagan P., Limet J.N., Letesson J-J, Godfroid J. (1999). Bovine brucellosis diagnosis by skin test : conditions for its use and evaluation of its performance. *Vet Rec* **145**, 214-218.
- Samaha H, Al-Rowaily M, Khoudair RM, Ashour HM (2008). Multicenter study of brucellosis in Egypt. *Emerg Infect Dis*, **14**, 1916-8.
- Sammartino, L.E., Gil, A. and Elzer, P. (2006) Capacity building for surveillance and control of bovine and caprine brucellosis. In *Capacity building for surveillance and control of zoonotic diseases - FAO/WHO/OIE Expert and Technical Consultation Rome, 14 -16 June 2005* eds. Murrell, D. and Meslin, F. Rome: FAO.
- Schoenaers F (1976). Eléments du diagnostic de la brucellose bovine. *Ann Méd Vét* **120**, 5-8.
- Simintzis G. (1974). Corrélation entre le sérodiagnostic de Wright et la contamination brucellique du ganglion mammaire chez la vache. *Bull Acad Vét*, **47**, 29-33.
- Smith, J. (1932) *Brucella abortus* in milk. *Journal of Hygiene, Cambridge* **32**, 354.
- Tchakamian S, Lepoutre A, Pierre V, 1996, La brucellose en France de 1990 à 1994, BEH, N°34, 146-147.
- Van den Heever, L.W., Katz, K.W. and Te Brugge, L.A. (1982) On the inactivation of *Brucella abortus* in naturally contaminated milk by commercial pasteurisation procedures. *J South African Vet Assoc* **53**, 233-234.
- Verger JM. (1985) *B. melitensis* in cattle, In: *Brucella melitensis*, JM Verger & M Plommet Eds, Martinus Nijhoff Publishers, for the CEC, 197-203.