

BRUCELLA, UN GENRE BACTÉRIEN EN EXPANSION : NOUVELLES ESPÈCES, NOUVEAUX RÉSERVOIRS

BRUCELLA, A BACTERIAL GENUS IN EXPANSION: NEW SPECIES, NEW RESERVOIRS

Par Claire PONSART⁽¹⁾, Luca FREDDI⁽¹⁾, Acacia FERREIRA-VICENTE⁽¹⁾,
Vitomir DJOKIC⁽¹⁾, Maryne JAY⁽²⁾, Gina ZANELLA⁽³⁾, Guillaume GIRAULT⁽¹⁾
(Communication présentée le 31 Octobre 2019,
Manuscrit accepté le 5 Septembre 2020)

RÉSUMÉ

Au cours des vingt dernières années, le nombre d'espèces du genre *Brucella* a doublé, avec l'identification de six espèces bactériennes et l'élargissement du spectre d'hôtes chez les mammifères (babouins, renards, mammifères marins) et de façon plus surprenante, chez plusieurs espèces d'anoures. L'étude phénotypique de ces espèces bactériennes montre des caractéristiques parfois originales (réactions négatives à l'oxydase), des courbes de croissance différentes et des capacités de survie améliorées dans certains environnements appauvris en nutriments ou en milieu acide. Cet article présente les connaissances acquises récemment sur ces espèces et notamment, les investigations réalisées chez les anoures, premier réservoir non mammifère hébergeant des bactéries de ce genre et associé à quelques rares infections humaines.

Mots-Clés : *Brucella*, souches atypiques, *B. microti*, anoures, réservoir.

ABSTRACT

Over the past twenty years, the number of species of the genus *Brucella* has doubled, with the identification of six bacterial species together with an enlarged range of mammalian hosts (baboons, foxes, marine mammals) and, more surprisingly, in several species of anurans. The phenotypic study of these bacteria species shows sometimes original characteristics (negative oxidase reactions), different growth curves and improved survival capacities in certain nutrient-depleted environments or acidic conditions. This article presents the knowledge acquired recently on these species and the investigations carried out recently in anurans, the first non-mammalian reservoir harboring bacteria of this genus and being associated with rare human infection cases.

Key words: *Brucella*, atypical strains, *B. microti*, anourans, host.

INTRODUCTION

Brucella est un genre bactérien en expansion, comprenant des espèces pathogènes potentiellement zoonotiques, associées initialement aux animaux domestiques et aux animaux de compagnie. La brucellose a été caractérisée comme entité nosologique, au XIX^e siècle, par des médecins militaires anglais installés sur l'île de Malte (Wyatt, 2013). Depuis l'isolement de *Brucella melitensis* (nommé initialement *Micrococcus melitensis*) en 1886 par le médecin anglais David Bruce, puis la description du rôle de la

chèvre comme réservoir de l'agent de la brucellose sur l'île de Malte en 1905 par le médecin maltais Themistocles Zammit, de nombreux mammifères terrestres ont été identifiés comme réservoir pour les six espèces « classiques » du genre *Brucella* : les petits ruminants et les camélidés pour *Brucella melitensis*, les bovidés pour *Brucella abortus*, les suidés pour *Brucella suis*, les canidés pour *Brucella canis*, les ovins pour *Brucella ovis* et les rats du désert (*Neotoma lepida*) pour *Brucella neotomae*, espèce isolée dans

(1) Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de Santé animale, LNR Brucellose, 94701 Maisons-Alfort, France.
Courriel : claire.ponsart@anses.fr

(2) UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Laboratoire de Lyon, ANSES, Université de Lyon, VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France

(3) Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de Santé animale, Unité d'Epidémiologie (EPI), 94701 Maisons-Alfort, France.

l'Utah (USA) en 1957 (Moreno, 2014). Depuis les années 1990, six espèces ont été caractérisées et isolées. Il s'agit tout d'abord de deux espèces de *Brucella* marines, infectant plusieurs espèces de mammifères marins : *Brucella ceti* et *Brucella pinnipedialis*. Plus récemment, au cours de la dernière décennie, quatre autres espèces ont été caractérisées, nommées *B. microti* (campagnol), *B. inopinata* (infections humaines), *B. papionis* (isolée du placenta de primates) et *B. vulpis* (renard), présentant des phénotypes ou des génotypes différant de ceux des espèces classiques (Corbel & Banai, 2015). Ces espèces du genre *Brucella* ont été découvertes à partir d'investigations réalisées dans de nouveaux réservoirs, notamment avec la description de *Brucella microti* directement à partir de prélèvements de sol (Scholz et al. 2008a) et plusieurs souches proches de *Brucella inopinata* dites « atypiques » issues d'amphibiens anoures, seul réservoir non-mammifère associé aux infections brucelliques (Eisenberg et al. 2012; Fischer et al. 2012). En outre, ces dernières espèces dites « atypiques » ont élargi la diversité génétique du genre *Brucella*, renforçant les liens avec le genre apparenté *Ochrobactrum* - genre bactérien retrouvé dans le sol, l'eau, l'appareil racinaire de certains végétaux et responsable d'infections opportunistes chez l'homme - en raison de leur profil métabolique atypique partagé avec *Ochrobactrum* et de leurs caractéristiques génétiques (Scholz et al. 2018).

NOUVELLES ESPÈCES DE BRUCELLA : PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES HISTORIQUE

En 1994, des bactéries appartenant au genre *Brucella* sont isolées à partir de quatre phoques veaux-marins, deux marsouins com-

muns et un dauphin commun, échoués sur les côtes écossaises (Ewalt et al. 1994 ; Tableau 1). Après avoir été initialement nommées *Brucella maris* (Jahans et al. 1997), les souches isolées de mammifères marins ont été réparties en deux espèces : *Brucella ceti* (principalement retrouvée chez les cétacés, notamment dauphins et marsouins), et *Brucella pinnipedialis* (principalement retrouvée chez les phoques, otaries et morses (Ewalt et al. 1994 ; Foster et al. 2007 ; Ross et al. 1994). Cette découverte a relancé l'intérêt médical pour ces bactéries, notamment avec la description de cas probables d'infections humaines liées à ces espèces marines (Brew et al. 1999 ; McDonald et al. 2006 ; Sohn et al. 2003) et de génotypes bactériens associés à ce risque zoonotique (Whatmore et al. 2008). Les *Brucella* isolées sont représentées par des mammifères marins vivant dans les mers et océans entourant l'Europe et l'Amérique du Nord (océans Atlantique et Pacifique, mer du Nord, mer Méditerranée ; Whatmore et al. 2017). Plus récemment, quatre autres espèces ont été identifiées : *Brucella inopinata* isolée à partir d'une prothèse mammaire (Scholz et al. 2010), d'une biopsie pulmonaire (Tiller et al. 2010), *Brucella microti* isolée à partir du sol et de plusieurs espèces de la faune sauvage (campagnol, renard et sanglier ; Rónai et al. 2015; Scholz et al. 2009; Scholz et al. 2008b), *Brucella papionis* à partir d'un écouvillon vaginal prélevé chez un babouin ayant présenté un avortement (Whatmore et al. 2014) et *Brucella vulpis* à partir de nœuds lymphatiques mandibulaires de deux renards (Scholz et al. 2016b ; **Tableau 1**). Enfin, plusieurs souches de *Brucella* ont été isolées chez différentes espèces d'anoures, comme le crapaud buffle et la grenouille taureau (Al Dahouk et al. 2017 ; Eisenberg et al. 2012 ; Fischer et al. 2012 ; Jaý et al. 2018, 2020 ; Whatmore et al. 2015), démontrant le large spectre d'hôtes de ce genre bactérien. Néanmoins, la pathogénicité chez l'animal

Espèce	Biovars	Répartition géographique principale	Hôte animal habituel	Pathogénicité chez l'homme
<i>B. abortus</i>	1 à 6, 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
	2	Europe centrale et occidentale	suidés et lièvres	faible
	4	Amérique du Nord, Russie	rennes	modérée
	5	Russie	rongeurs sauvages	forte
<i>B. canis</i>	-	Ubiquitaire (notamment Amérique du sud)	chiens	faible
<i>B. ovis</i>	-	Bassin méditerranéen	ovins	nulle
<i>B. neotomae</i>	-	Utah (Etats-Unis)	rats du désert	2 cas décrits
<i>B. ceti</i>	-	Océans Atlantique et Pacifique, mer du Nord, mer Méditerranée	cétacés (dauphins, baleines, marsouins)	faible
<i>B. pinnipedialis</i>	-		pinnipèdes (phoques, otaries)	non connue
<i>B. inopinata</i>	2 souches	Australie, Oregon (États Unis)	-	2 cas décrits
<i>B. microti</i>	-	Europe Centrale	canidés sauvages (renards), suidés, rongeurs sauvages	non connue
<i>B. papionis</i>	2 souches	Texas (États Unis)	babouins (parc zoologique)	non connue
<i>B. vulpis</i>	2 souches	Autriche	canidés sauvages (renards)	non connue

Tableau 1 : Caractères épidémiologiques et pouvoir pathogène chez l'homme des différentes espèces et différents biovars du genre *Brucella* (d'après Ponsart & Maurin, 2018).

n'est pas encore très bien caractérisée chez ces espèces hôtes contrairement aux brucelloses cliniques classiquement décrites chez les animaux domestiques.

Caractères bactériologiques

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 (Shapiro & Wrong, 1999). 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 de *Brucella* en primoculture nécessite classiquement des temps d'incubation prolongés, de deux à trois semaines en moyenne et parfois plus (Ponsart & Maurin, 2018). Les *Brucella* sont des bactéries aérobies strictes, catalase positive, oxydase habituellement positive à l'exception de *B. ovis* et *B. neotomae* (Shapiro & Wrong, 1999). Les caractéristiques phénotypiques sont présentées de façon exhaustive dans le chapitre « *Brucella* » du manuel de l'OIE (OIE, 2016). Les caractéristiques des espèces de *Brucella* décrites depuis 1990 sont résumées dans le tableau 2 ci-dessous. Notons en particulier que :

- les nouvelles espèces ne produisent pas d'H₂S, à l'exception de *B. inopinata* ;
- seule *B. pinnipedialis* montre une dépendance au CO₂ ;
- les souches *B. papionis* et *B. vulpis* décrites pour le moment sont oxydase négative ;
- les profils d'agglutination peuvent varier selon les souches de l'espèce *B. microti*.

Des vitesses de croissance différentes sont observées entre espèces. Parmi les espèces classiques, les croissances les plus rapides sont observées pour *B. suis* biovar 1 et 3 et *B. canis*. La croissance est moins rapide pour *B. ovis* et *B. vulpis*, suivie par de nombreuses souches de *B. melitensis* biovar 1 et *B. suis* biovar 2. A la différence des espèces classiques et en raison de leur proximité métabolique avec *Ochrobactrum*, *B. microti* et *B. inopinata* sont deux espèces à croissance rapide, formant des colonies de 1 à 4 mm en 24 h sur des milieux standards de culture. Les colonies peuvent devenir d'apparence mucoides sur milieux glucosés, ressemblant à *Ochrobactrum tricitii*. Certaines souches de *B. microti*

peuvent prendre une couleur marron après plus de 24 h de croissance (Scholz *et al.* 2018).

Hétérogénéité des lipopolysaccharides

Le lipopolysaccharide (LPS) est l'antigène le plus immunogène. La présence ou non de l'antigène O au sein du LPS est 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. Seules *B. canis* et *B. ovis* possèdent naturellement un R-LPS, qui est associé à une virulence diminuée (Mancilla, 2015). Actuellement, les espèces lisses sont regroupées en 3 sérotypes en fonction de leur profil d'agglutination obtenu à l'aide de sérums mono-spécifiques polyclonaux dirigés contre *B. abortus* (A), *B. melitensis* (M) : A+M-, A-M+, A+AM+. Ces profils sont utilisés pour l'identification des espèces. Il est intéressant de constater que des variations intra-espèces sont décrites chez plusieurs espèces décrites depuis 1990 (*Brucella* marines, *B. microti* ; **Tableau 2**).

Caractères métaboliques

Les bactéries du genre *Brucella* sont capables d'infecter plusieurs types de cellules eucaryotes de l'hôte et de s'y multiplier, comme l'indique leur caractère de bactéries intracellulaires facultatives. Ce processus d'internalisation et de survie intracellulaire implique l'adaptation fine des voies métaboliques. L'utilisation de systèmes rapides d'identification API 20 NE® (BioMérieux, Marcy-L'étoile, France) permet la détection de leur caractère aérobique, l'obtention de réactions positives aux tests oxydase et uréase, la capacité de réduction des nitrates. L'ensemble des autres caractères métaboliques (hydrates de carbone, protéines, acides aminés, acides nucléiques) est généralement négatif. Certaines des nouvelles espèces montrent des caractères particuliers, notamment des réactions négatives au test oxydase chez *B. papionis* et *B. vulpis*, ainsi que l'absence d'enzyme de réduction des nitrates chez *B. vulpis* (Scholz *et al.*, 2016). Par ailleurs, le nombre limité de tests biochimiques peut conduire à une fausse identification comme *Psychrobacter phenylpyruvicus* (anciennement dénommé *Moraxella phenylpyruwica*). De même, *B. microti* caractérisée par ses capacités métaboliques très larges a été initialement identifiée en tant qu'*Ochrobactrum* par son profil biochimique (API 20 NE). Des approches plus spécifiques

Espèces	Oxydase	Production d'H ₂ S	Dépendance au CO ₂	Profil d'agglutination		Croissance sur colorants	
				A	M	Thionine	Fuchsine
<i>B. cetii</i>	(+)	-	-	+	(-)	(+)	(+)
<i>B. pinnipedialis</i>	(+)	-	+	(+)	(-)	+	(+)
<i>B. inopinata</i>	Non décrit	+	-	-	+f	+	+
<i>B. microti</i>	+	-	-	(-)	(+)	+	+
<i>B. papionis</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. vulpis</i>	-	-	-	+	-	+	+

(+)/(-) la plupart des isolats sont positifs ou négatifs ; f=faible agglutination

Tableau 2 : Principales caractéristiques phénotypiques des espèces de *Brucella* décrites depuis 1990 (d'après Manuel Terrestre OIE, 2016)

(basées sur des plaques de 96 puits ; système Micronaut™) ont été développées par Al Dahouk *et al.* (2010), permettant de déterminer un typage métabolique des différentes espèces de *Brucella*, basé notamment sur les profils H-hydroxyproline- beta-naphthylamide (H-hydroxyproline-bNA +), acide D-glutamique-gamma-4-nitroanilide (Glu(pNA)-OH) et acide L-pyroglytamique 4-nitroaniline (Pyr-pNA ; Al Dahouk *et al.* 2010; Scholz *et al.* 2016b). Ce système positionne les espèces atypiques comme proches de *B. canis*, *B. ovis*, et des espèces marines *B. ceti* et *B. pinnipedialis*.

Étude de la pathogénicité de *Brucella*

La pathogénicité des souches de *Brucella inopinata* n'a pas encore été démontrée de manière concluante vu le nombre très limité de cas humains rapportés (2 cas ; Scholz *et al.* 2010 ; Tiller *et al.* 2010). Leur potentiel pathogène est généralement étudié à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo*. *Brucella* spp. sont capables d'infecter des cellules phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques, polynucléaires neutrophiles) et des cellules non-phagocytaires comme les fibroblastes, les cellules épithéliales notamment trophoblastiques (Moreno & Gorvel, 2005). L'infection expérimentale *in vitro* de macrophages par des espèces de *Brucella* s'est avérée être un bon modèle pour l'étude des interactions entre l'agent pathogène et la cellule hôte, ainsi que pour l'identification des facteurs de virulence en direction des macrophages (Köhler *et al.* 2002). En effet, la virulence de *Brucella* est corrélée *in vitro* par sa capacité de multiplication à l'intérieur de la cellule hôte, en s'adaptant à des conditions environnementales pauvres en nutriments et en oxygène, à des pH acides et en échappant au système immunitaire de l'hôte. Néanmoins, l'utilisation de modèles animaux reste une étape clé pour une meilleure compréhension des facteurs de virulence bactérienne et de leurs rôles dans les interactions hôte / pathogène. *B. microti* fut la première espèce de *Brucella* récemment décrite pour laquelle une multiplication dans les monocytes humains ainsi que des macrophages humains et murins a été démontrée (Jiménez de Bagüés *et al.* 2010). D'une part, le taux de répllication de *B. microti* dans les modèles d'infection cellulaire a été augmenté par rapport à celui d'une souche classique telle que *B. suis* (Jiménez de Bagüés *et al.* 2010). D'autre part, des mortalités de souris ont été rapportées pour la première fois après l'injection intrapéritonéale de *B. microti* (Hubálek *et al.* 2007; Jiménez de Bagüés *et al.* 2010). De même, une croissance plus efficace a été observée dans un modèle cellulaire de macrophages, lors d'infections avec une autre souche atypique proche de *B. inopinata*, également isolée à partir d'anoures (Al Dahouk *et al.* 2017; Soler-Lloréns *et al.* 2016). Ces caractéristiques particulières ont conduit à étudier plus finement ces espèces atypiques de *Brucella* qui présentent également une meilleure capacité d'adaptation aux environnements acides par rapport à celle observée chez les souches classiques. Il a été découvert la présence, chez *B. microti*, d'un système GAD (glutamate décarboxylase-dépendant) actif permettant une survie des bactéries à pH 2,5 (Damiano *et al.* 2015) et participant à la réussite de l'infection des souris par voie orale (Occhialini *et al.* 2012). De plus, un deuxième système d'acido-résistance (AR2-Q), système glutaminase-dépendant a été détecté (Freddi *et al.* 2017).

Son activité semble couplée à celle du système GAD ; il est fonctionnel chez *B. microti* et les autres espèces atypiques de *Brucella*, tandis qu'il est absent chez les espèces classiques. La présence de ces systèmes peut apporter un avantage dans la persistance de ces espèces dans certains milieux particuliers (Damiano *et al.* 2015; Freddi *et al.* 2017; Occhialini *et al.* 2012). La réalisation d'infections expérimentales de *Brucella* chez l'animal représente un risque biologique élevé pour les manipulateurs, nécessitant l'accès à des installations de soins très coûteuses et des protocoles stricts de sécurité biologique. La recherche de modèles alternatifs *in vivo* est un enjeu important pour améliorer la connaissance des interactions hôte / pathogène. Récemment, un protocole pour l'infection expérimentale d'embryons de poulet a été réalisé avec l'espèce *B. microti* (Wareth *et al.* 2015). Ces données suggèrent que, même si les poulets ne sont pas des mammifères, ils pourraient fournir un nouvel outil pour mieux comprendre la pathogénicité de *Brucella*. Enfin, l'utilisation de *Galleria mellonella* et de planaires comme modèles d'infection pour *Brucella* a été rapportée et pourrait constituer d'autres modèles alternatifs d'intérêt (Abnave *et al.* 2014 ; Sprynski *et al.* 2014).

Organisation génomique

Le génome de *Brucella* est composé de deux chromosomes circulaires d'approximativement 2.11 Mb et 1,18 Mb pour les chromosome I et chromosome II respectivement (DelVecchio *et al.* 2002; Halling *et al.* 2005; Paulsen *et al.* 2002), à l'exception de *B. suis* biovar 3 qui possède un seul chromosome. Environ 3200-3400 gènes sont décrits, et le pourcentage de GC, défini comme proportion de bases cytosine (C) ou guanine (G), est en moyenne de 57,2 %. Des bactériophages de *Brucella* ont été isolés (Corbel *et al.* 1988), mais pas de plasmides ni de phages lysogéniques. Les différentes espèces de *Brucella* sont phylogénétiquement très proches puisque le pourcentage d'homologie est de plus de 90 %. Ceci a conduit certains auteurs à proposer un système de classification où toutes les espèces de *Brucella* seraient considérées comme des biovars (Verger *et al.* 1985), et non des espèces distinctes. Toutefois, ces « espèces » présentent des différences de pathogénicité pour l'homme, de spectres d'hôtes et cette proposition n'a pas été retenue pour des raisons pratiques, scientifiques et de biosécurité. En fait, même les espèces dites « atypiques », plus diverses sur le plan génétique partagent des pourcentages d'homologie ADN-ADN élevés avec *B. melitensis*, par exemple supérieurs à 80 % pour *B. inopinata* (Scholz & Vergnaud, 2013). Des approches phylogénétiques basées sur le séquençage complet du génome sont en plein développement (Figure 1). Ces approches permettent de regrouper 10 espèces, les deux autres espèces (*B. inopinata* et *B. vulpis*) formant une branche divergente. *Brucella microti* se situe à la base du groupe majoritaire comportant cinq branches majoritaires (*B. abortus* / *B. melitensis*, *B. ovis* / *B. papionis* ; *B. ceti* / *B. pinnipedialis* ; *B. canis* / *B. suis* et *B. neotomae*). Malgré des caractéristiques phénotypiques (croissance rapide, métabolisme) proches des bactéries du genre *Ochrobactrum*, *B. microti* est très proche de *B. suis* biovar 1 sur le plan génomique (Audic *et al.* 2009).

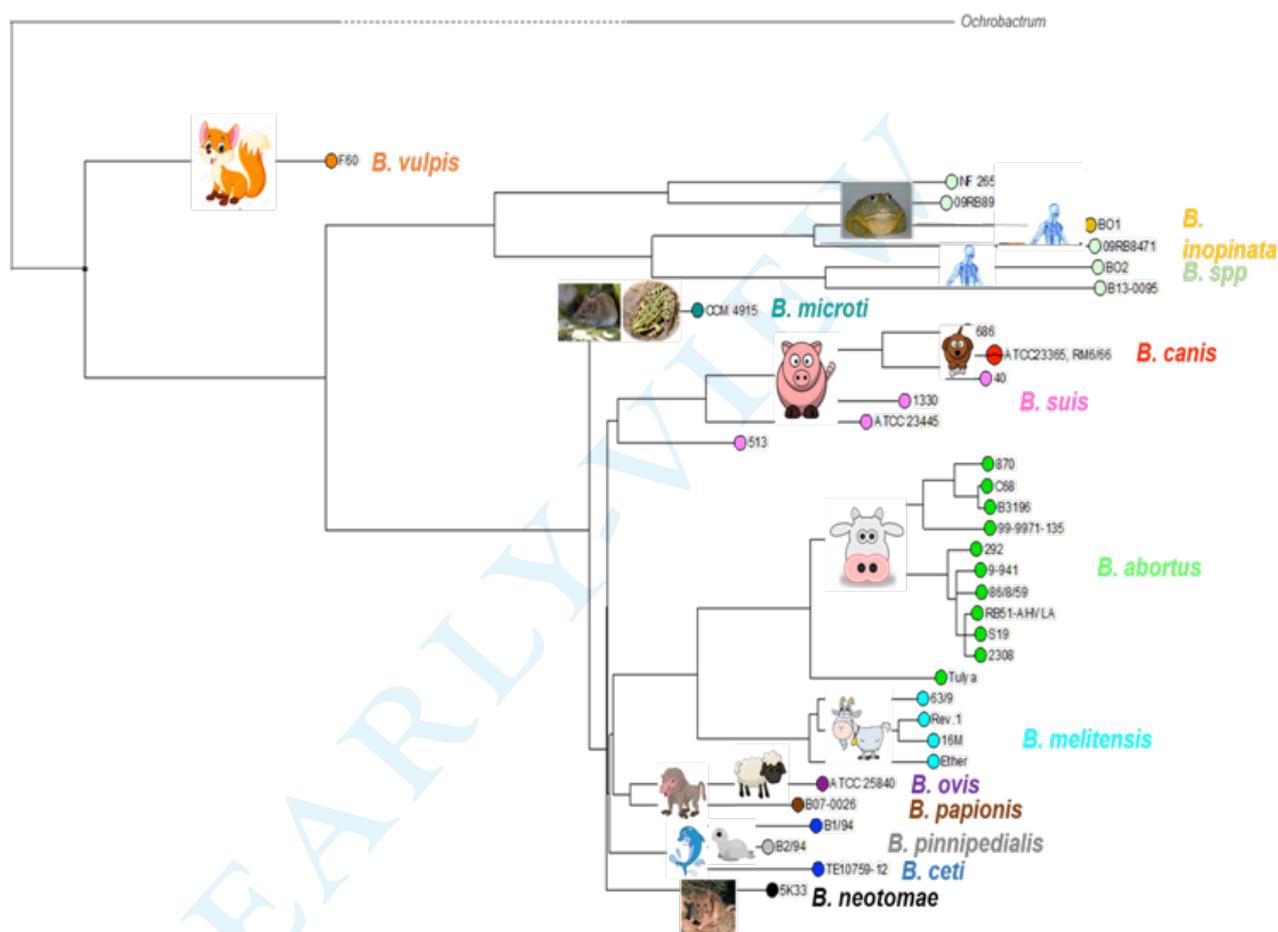


Figure 1 : Positionnement phylogénétique des espèces de *Brucella* (arbre incluant les souches de référence des différentes espèces ; Girault G, communication personnelle).

LES ANOURES, UN NOUVEAU RÉSERVOIR DE BRUCELLA ?

Anoures d'origine sauvage

Plusieurs isolements de souches de *Brucella* chez différentes espèces d'anoures d'origine sauvage ont été rapportés ces dernières années (Tableau 3). Ces cas ont été décrits dans différents continents (Australie, Amérique du Nord, Asie, Europe) chez des espèces exotiques ou autochtones. Ces isolements n'ont pas systématiquement été associés à l'observation de lésions, bien qu'en général, les analyses microbiologiques aient été réalisées suite à l'observation de lésions. Le caractère pathogène de *Brucella* chez ces espèces d'amphibiens reste donc controversé.

À ce jour, aucune étude épidémiologique extensive n'a été réalisée dans les populations d'anoures sauvages ou captives, si bien qu'il est difficile de connaître la répartition, la pathogénicité et l'importance du portage de *Brucella* dans ces espèces. De même, l'origine de la contamination par *Brucella* et le lien entre la présence de la bactérie chez ces animaux dans le milieu sauvage ou leur maintien en captivité ne sont pas élucidés. La contagiosité entre les animaux maintenus en captivité reste

également hypothétique : si des isolations ont été réalisées chez plusieurs animaux partageant le même terrarium, tous les individus présents n'ont pas systématiquement été trouvés infectés. Les souches isolées chez les espèces sauvages d'anoures n'ont pas été à ce jour affiliées à une espèce particulière. Elles présentent des caractères d'identification phénotypiques et moléculaires proches de *Brucella inopinata* (Al Dahouk *et al.* 2017; Mühlendorfer *et al.* 2017). Le groupe de *B. inopinata* et des *Brucella* isolées chez les anoures est un groupe bien distinct des *Brucella* dites « atypiques » (Al Dahouk *et al.* 2017). La pathogénicité pour l'Homme de ces souches est probablement limitée, puisque *B. inopinata* a été isolée seulement à partir de deux cas humains (Scholz *et al.* 2010 ; Tiller *et al.* 2010). À noter que chez ces deux cas, aucun lien avec des anoures n'a pu être établi.

Anoures d'élevage

L'élevage de grenouilles est une industrie française récente et innovante qui fournit des cuisses de grenouilles pour la consommation humaine, comme alternative à l'importation de cuisses congelées. Il est principalement basé sur l'élevage intensif d'une lignée sélectionnée (variété Rivan 92®) de grenouilles des marais capable de se nourrir de nourriture sèche, développée par l'unité

Espèce	Nombre individus atteints	Signes cliniques/ Lésions	Origine des animaux	Organe d'isolement	Souche	Référence
Crapaud buffle (<i>Chaunus [Bufo] marinus</i>)	15	Lésions intervertébrales	Sauvage Australie	Prélèvement intervertébral	Liée à <i>Ochrobactrum anthropi</i>	(Shilton <i>et al.</i> 2008)
Grenouille taureau (<i>Pyxicephalus edulis</i>)	24	Peau sèche et décolorée, ulcères cutanées, anorexie, léthargie, mort spontanée	Sauvage Tanzanie	Foie, poumon, rate, rein, ovaire, intestin, peau	<i>Brucella</i> atypique	(Eisenberg <i>et al.</i> 2012)
Leptopelis (<i>Leptopelis vermiculatus</i>)	1	Abcès cutanés	Animalerie Allemagne	Pus	<i>Brucella inopinata</i> -like	(Fischer <i>et al.</i> 2012)
Rainette de White (<i>Litoria caerulea</i>)	2	Œdèmes cutanés	Collection animaux Royaume Uni	Peau	<i>Brucella</i> atypique	(Whatmore <i>et al.</i> 2015)
Grenouille cornue d'Argentine (<i>Ceratophrys ornata</i>)	1	Anorexie, apathie, ingestion de corps étrangers	Animalerie Etats-Unis	Foie, péritoine	<i>Brucella inopinata</i> -like	(Soler-Lloréns <i>et al.</i> 2016)
Rainette aux yeux rouges (<i>Agalychnis callidryas</i>)	1	Abcès membre postérieur	Zoo Allemagne	Ecouvillonnage de l'abcès	<i>Brucella</i> atypique	(Mühldorfer <i>et al.</i> 2017)
Grenouille lait amazonienne (<i>Trachycephalus resinifictrix</i>)	2	Granulome solide entre le cœur et le foie Une sans lésions	Zoo Allemagne	Poumon, foie, reins	<i>Brucella</i> spp.	(Mühldorfer <i>et al.</i> 2017)
Grenouille lait amazonienne (<i>Trachycephalus resinifictrix</i>)	2	Ganglion paravertébral enflé	Zoo Allemagne	Ganglion et intestin	<i>Brucella</i> spp.	(Mühldorfer <i>et al.</i> 2017)
Crapaud rouge de Madagascar (<i>Dyscophus antongilii</i>)	6	Morts	Zoo Allemagne	Poumon, foie, reins, intestin, frottis de peau	<i>Brucella</i> atypique	(Mühldorfer <i>et al.</i> 2017)
Grenouille cornue de Cranwell (<i>Ceratophrys cranwelli</i>)	2	Panophtalmie purulente	Zoo Allemagne	Liquide intra-oculaire	<i>Brucella</i> atypique	(Mühldorfer <i>et al.</i> 2017)
Rainettes de White (<i>Litoria caerulea</i>) Rainette vietnamienne bleue (<i>Polypedates dennysi</i>)	13	Trouvées mortes (autres grenouilles dans les mêmes conditions ont été testées négatives)	Sauvage Asie du sud-est	Moelle osseuse, foie	<i>Brucella inopinata</i> -like	(Kimura <i>et al.</i> 2017)

Tableau 3 : Références bibliographiques sur *Brucella* chez les anoures par date de publication (ANSES, 2017)

expérimentale d'écologie aquatique et d'écotoxicité de l'Institut national de la recherche agronomique (Jaÿ *et al.* 2020). Une première souche a été isolée en avril 2017 dans un élevage de grenouilles à partir de prélèvements d'animaux adultes sacrifiés en laboratoire (pool d'organes internes, n=8) dont certains présentaient des lésions (hydropisie, n=2 ; abcès articulaires, n=1 ; Jaÿ *et al.* 2018). Cette souche a été confirmée comme appartenant au genre *Brucella* par ses propriétés phénotypiques et en PCR temps réel ciblant un gène spécifique du genre (Jaÿ *et al.* 2018). Il est intéressant de noter que les souches présentaient quelques caractères « non typiques » compliquant l'identification bactériologique, comme le profil de lyse par les phages non compatibles avec *B. inopinata* et le profil d'agglutination original, décrit une

seule fois pour *B. microti*. Différentes approches moléculaires ont alors été mises en œuvre, permettant de confirmer l'espèce *B. microti* (Tableau 4 ; Jaÿ *et al.* 2018). Le génome de cette souche a été également séquencé (Illumina, couverture de 100X) et l'assemblage *de novo* a permis d'évaluer le pourcentage d'identité nucléotidique avec la souche de référence *B. microti* (CCM4915) à 99,89 %, contre 98,33 % avec *B. inopinata* et entre 97,77 et 98,2 % avec les génomes de *Brucella* isolées d'amphibiens déposés dans la base de données NCBI (O9RB8910, O9RB8471, B13-0095 ; Jaÿ *et al.* 2018 ; Scholz *et al.* 2016a). L'analyse phylogénomique comparative des "single nucleotide polymorphism" (SNP) de cette souche a mis en évidence un lien très proche avec *B. microti* (CCM4915), avec 73 nucléotides (SNPs) de différence

Type analyse	Méthode (référence)	Résultat
PCR de genre	PCR temps réel (Bounaadja <i>et al.</i> 2009).	<i>Brucella spp.</i>
PCR d'espèces	PCR multiplex (Bruce-Ladder, López-Goñi <i>et al.</i> 2011)	<i>B. microti</i> ou <i>B. suis</i>
PCR d'espèces et biovars	PCR multiplex (Bruce-Ladder modifiée, López-Goñi <i>et al.</i> 2011)	<i>B. microti</i>
Typage moléculaire	MLVA-16 (Al Dahouk <i>et al.</i> 2012)	<i>B. microti</i>
Séquençage du génome bactérien et assemblage <i>de novo</i>	Séquençage (Illumina, 100X) et l'assemblage <i>de novo</i> (algorithme SPAdes)	99,89% d'identité nucléotidique avec <i>B. microti</i> (CCM4915) vs 98,33% avec <i>B. inopinata</i>

Tableau 4 : Synthèse des analyses moléculaires effectuées sur des prélèvements de grenouilles d'élevage et résultats obtenus (ANSES, 2017; Jař *et al.* 2018).

entre les deux souches contrairement aux autres souches décrites chez les anoues. Suite à ces premiers résultats, des investigations complémentaires ont été conduites dans cette ferme, ainsi que dans l'unité expérimentale en lien épidémiologique.

Dans la ferme, les pratiques d'élevage ont été étudiées et des échantillons comprenant des grenouilles à différents stades de développement, des écouvillonnages de surface, des prélèvements d'eau, des aliments et du sol ont été analysés par PCR en temps réel et par des méthodes bactériologiques (Jař *et al.* 2020). De nombreux pools d'animaux ont été analysés (8 pools de têtards à 2 stades de développement, $n = 140$; 5 pools de petites grenouilles adultes, $n = 55$ et 4 pools de grandes grenouilles adultes, $n = 40$) à partir d'un échantillon des bassins contenant des animaux. Dans tous les pools analysés, des acides nucléiques spécifiques de *Brucella* ont été détectés et des souches présentant des caractéristiques très proches des souches initiales ont été isolées puis identifiées comme *B. microti*-like (Jař *et al.* 2020). La valeur médiane de la prévalence vraie a été estimée à 92,6% dans les pools de têtards (intervalle de crédibilité à 95 % = 66,3 % - 99,7 %) et de 93,7 % dans les pools de grenouilles adultes (intervalle de crédibilité à 95 % = 70,4 % - 99,8 %). De même, la présence de la bactérie a été détectée à partir des autres types d'échantillons de grenouilles (prélèvements cutanés, animaux morts, lésions) ainsi que des échantillons environnementaux, mais pas dans les aliments destinés aux grenouilles. La détection quasi systématique de *Brucella* chez les grenouilles s'est ainsi accompagnée de sa détection sur les écouvillons de surface des bassins dans lesquels les animaux ont été collectés. Tenant compte du fait que quelques petites zones de chaque bassin ont été prélevées, ces résultats ont confirmé la présence massive de *B. microti*-like dans l'environnement direct des grenouilles. Elle pourrait s'expliquer par l'excrétion bactérienne des grenouilles, mais leur multiplication pourrait également être favorisée par la température modérée de l'eau, améliorant la transmission aux grenouilles et la dissémination entre bassins. Dans ce foyer, une souche de type *B. microti* a également été isolée et détectée dans

des échantillons de grenouilles et d'environnement. Ces résultats montrent que les organismes de type *B. microti* sont capables de coloniser les anoues et de persister dans leur environnement. Les questions principales à élucider concernent l'origine de cette souche proche de *B. microti* (origine environnementale, contamination via des rongeurs ou détection d'un réservoir chez les anoues), sa persistance et sa survie ainsi que les caractéristiques liées à leurs pouvoirs pathogène et zoonotique. Ces questions nécessitent la mise en œuvre d'approches complémentaires et expérimentales.

CONCLUSION

L'étude phénotypique des espèces de *Brucella* décrites depuis les années 2000, et notamment celles isolées à partir d'anoues, interroge sur la pathogénicité de ces nouvelles espèces, leur pouvoir zoonotique et sur la détection potentielle de réservoirs qui pourraient redéfinir les contours de ce genre bactérien. Leurs caractéristiques originales (réactions métaboliques, courbes de croissance et capacités de survie améliorées dans certains environnements appauvris en nutriments ou des milieux acides) renforcent l'intérêt de mener des investigations complémentaires ciblant des biotopes peu explorés et incluant un volet environnemental. Actuellement, peu d'études exhaustives se sont intéressées à ces espèces « atypiques » de *Brucella*, qui restent associées pour le moment à un nombre très limité de cas humains décrits dans la littérature. Malgré ce faible impact sur la santé publique, la connaissance de ces nouveaux réservoirs et la description des facteurs de virulence de ces espèces pourraient aider à mieux comprendre les mécanismes responsables du pouvoir pathogène de *Brucella spp.*, les conditions favorisant leur multiplication et leur survie. Enfin, l'étude comparative d'espèces classiques et atypiques pourrait permettre de comprendre l'évolution de la spécificité d'hôte du genre *Brucella*.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les personnes ayant contribué aux investigations épidémiologiques réalisées dans les élevages de grenouilles : pour les prélèvements, les éleveurs et personnels des élevages, le LVD 61, les services vétérinaires (DDPP26), les équipes INRAE ; pour la réalisation des analyses et la préparation des milieux et réactifs, l'équipe technique du LNR Brucellose, l'équipe Appui technique et maintenance de l'Unité des Zoonoses Bactériennes.

BIBLIOGRAPHIE

- Abnave P, Mottola G, Gimenez G, Boucherit N, Trouplin V, Torre C *et al.* Screening in planarians identifies MORN2 as a key component in LC3-associated phagocytosis and resistance to bacterial infection. *Cell Host & Microbe*. 2014;16(3): 338-350.
- Al Dahouk S, Hofer E, Tomaso H, Vergnaud G, Le Flèche P, Cloeckaert A *et al.* Intraspecies biodiversity of the genetically homologous species *Brucella microti*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012 ; 78(5): 1534-1543.
- Al Dahouk S, Köhler S, Occhialini A, Jiménez de Bagüés MP, Hammerl JA, Eisenberg T *et al.* *Brucella spp* of amphibians comprise genomically diverse motile strains competent for replication in macrophages and survival in mammalian hosts. *Scientific Reports*. 2017; 7: 44420.
- Al Dahouk S, Scholz HC, Tomaso H, Bahn P, Göllner C, Karges W *et al.* Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system. *BMC Microbiology*. 2010 ; 10: 269.
- ANSES. Rapport d'enquête épidémiologique conduite suite à la découverte d'une souche de *Brucella* chez des grenouilles d'élevage. Demande d'appui scientifique et technique 2017-SA-0157. 2017 ; 1-34.
- Audic S, Lescot M, Claverie JM, Scholz HC. *Brucella microti* : The genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics*. 2009; 10: 352.
- Bounaadja L, Albert D, Chénais B, Hénault S, Zygmunt MS, Poliak S *et al.* Real-time PCR for identification of *Brucella spp* : A comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. *Veterinary Microbiology*. 2009; 137(1-2): 156-164.
- Brew SD, Perrett LL, Stack JA, MacMillan AP, Staunton NJ. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *The Veterinary Record*. 1999; 144(17): 483.
- Corbel MJ, Tolari F, Yadava VK. Characterisation of a new phage lytic for both smooth and non-smooth *Brucella* species. *Research in Veterinary Science*. 1988; 44(1): 45-49.
- Corbel MJ & Banai M. *Brucella*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, 2015 ; pp 1-30.
- Damiano MA, Bastianelli D, Al Dahouk S, Köhler, S, Cloeckaert A, De Biase D *et al.* Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Brucella spp* : distribution and contribution to fitness under extremely acidic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015; 81(2): 578-586.
- DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T *et al.* The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(1): 443-448.
- Eisenberg T, Hamann HP, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerer N, *et al.* Isolation of potentially novel *Brucella spp* from frogs. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012; 78(10): 3753-3755.
- Ewalt DR, Payeur JB, Martin BM, Cummins DR, Miller WG. Characteristics of a *Brucella* species from a Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1994; 6(4): 448-452.
- Fischer D, Lorenz N, Heuser W, Kämpfer P, Scholz HC, Lierz, M. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*) *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2012; 43(3): 625-628.
- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. *Brucella ceti sp. nov.* and *Brucella pinnipedialis sp. nov.* for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007; 57(11): 2688-2693.
- Freddi L, Damiano MA, Chaloin L, Pennacchiotti E, Al Dahouk S, Köhler S *et al.* The glutaminase-dependent system confers extreme acid resistance to new species and atypical strains of *Brucella*. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8: 2236.
- Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuermer RL, Qing Z, Li LL *et al.* Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Journal of Bacteriology*. 2005; 187(8): 2715-2726.
- Hubálek Z, Scholz HC, Sedláček I, Melzer F, Sanogo Y, Nesvadbová J. Brucellosis of the Common Vole (*Microtus arvalis*) *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2007; 7(4): 679-688.
- Jahans KL, Foster G, Broughton ES. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals *Veterinary Microbiology*. 1997; 57(4): 373-382.
- Jaÿ M, Freddi L, Mick V, Durand B, Girault G, Perrot L *et al.* *Brucella microti*-like prevalence in French farms producing frogs. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2020; 67(2): 617-625.
- Jaÿ M, Girault G, Perrot L, Taunay B, Vuilmet T, Rossignol F *et al.* Phenotypic and molecular characterization of *Brucella microti*-like bacteria from a domestic marsh frog (*Pelodytes punctatus*) *Frontiers in Veterinary Science*. 2018; 5: 283.
- Jiménez de Bagüés MPJ, Ouahrani-Bettache S, Quintana JF, Mitjana O, Hanna N, Bessoles S *et al.* The new species *Brucella microti* replicates in macrophages and causes death in murine models of infection *Journal of Infectious Diseases*. 2010; 202(1): 3-10.
- Kimura M, Une Y, Suzuki M, Park ES, Imaoka K, Morikawa S. Isolation of *Brucella inopinata*-like bacteria from White's and Denny's tree frogs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2017; 17(5): 297-302.
- López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Barquero-Calvo E, Guzmán-Verri C *et al.* New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Veterinary Microbiology*. 2011; 154(1-2): 152-155.
- Mancilla M. Smooth to rough dissociation in *Brucella* : the missing link to virulence *Frontiers in cellular and infection. Microbiology*, 2015 ; 5 : 98
- McDonald WL, Jamaludin R, Mackereth G, Hansen M, Humphrey S, Short P *et al.* Characterization of a *Brucella sp* strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006.; 44(12): 4363-4370.
- Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*. 2014; 5: 213.
- Moreno E & Gorvel JP. Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional phagocytes In *Brucella : Molecular and cellular biology*. 2005; pp 280-306.
- Mühlendorfer K, Wibbelt G, Szentiks CA, Fischer D, Scholz HC, Zschöck M *et al.* The role of 'atypical' *Brucella* in amphibians : Are we facing novel emerging pathogens? *Journal*

- of Applied Microbiology. 2017; 122(1): 40-53.
- Occhialini A, Bagués MPJ, Saadeh B, Bastianelli D, Hanna N, Biase DD *et al.* The glutamic acid decarboxylase system of the new species *Brucella microti* contributes to its acid resistance and to oral infection of mice. *Journal of Infectious Diseases.* 2012; 206(9): 1424-1432.
 - OIE. Brucellose (*Brucella abortus*, *B melitensis* et *B suis*). In : Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres 2019, Chapitre 3.1.4, version anglaise (mai 2016). Disponible à : https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf (consulté le 19/6/2020).
 - Paulsen IT, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002; 99(20): 13148-13153.
 - Ponsart C & Maurin M. "Brucella". In: Précis de bactériologie Clinique, 3ème édition. Freney J, François Renaud F, Leclercq R, Riegel P. Editeurs ESKA / LACASSAGNE ; 2018, pp 1244-1254.
 - Rónai Z, Kreizinger Z, Dán Á, Drees K, Foster JT, Bányai K *et al.* First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar. *BMC Veterinary Research.* 2015; 11: 147.
 - Ross HM, Foster G, Reid RJ, Jahans KL, MacMillan AP. *Brucella* species infection in sea-mammals. *The Veterinary Record.* 1994; 134(14): 359.
 - Scholz HC, Banai M, Cloeckeaert A, Kämpfer P, Whatmore AM. *Brucella*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J, DeVos P, editors. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc ; 2018, pp 1-38.
 - Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, Le Fleche P, Whatmore AM, Al Dahouk S *et al.* Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector Borne and Zoonotic Diseases.* 2009; 9(2): 153-156.
 - Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, Le Flèche P *et al.* Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerging Infectious Diseases.* 2008a; 14(8): 1316-1317.
 - Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, *et al.* *Brucella microti* sp nov, isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2008b; 58(2): 375-382.
 - Scholz HC, Mühlendorfer K, Shilton C, Benedict S, Whatmore AM, Blom J *et al.* The change of a medically important genus : worldwide occurrence of genetically diverse novel *Brucella* species in exotic frogs PLOS ONE. 2016a; 11(12): e0168872.
 - Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H *et al.* *Brucella inopinata* sp nov, isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2010; 60(4): 801-808.
 - Scholz HC, Revilla-Fernández S, Dahouk SA, Hammerl JA, Zygmunt MS, Cloeckeaert A *et al.* *Brucella vulpis* sp nov, isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2016b; 66(5): 2090-2098.
 - Scholz HC & Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics).* 2013; 32(1): 149-162.
 - Shapiro D & Wrong J. *Brucella*. In: *Manual of clinical microbiology* American Society for Microbiology. Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenoer F, Tenover R, editors. Washington DC; 1999, pp 625-631.
 - Shilton CM, Brown GP, Benedict S, Shine R. Spinal arthropathy associated with *Ochrobactrum anthropi* in free-ranging cane toads (*Rhinophrynus dorsalis*) in Australia. *Veterinary Pathology.* 2008; 45(1): 85-94.
 - Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace *et al.* Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerging Infectious Diseases.* 2003; 9(4): 485-488.
 - Soler-Lloréns PF, Quance CR, Lawhon SD, Stuber TP, Edwards JF, Ficht TA *et al.* A *Brucella* spp isolate from a Pac-Man frog (*Ceratophrys ornata*) reveals characteristics departing from classical Brucellae. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2016; 6:116.
 - Sprynski N, Valade E, Neulat-Ripoll F. *Galleria mellonella* as an infection model for select agents. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ),* 2014; 1197: 3-9.
 - Tiller RV, Gee JE, Lonsway DR, Gribble S, Bell SC, Jennison AV *et al.* Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiology.* 2010; 10: 23.
 - Verger J-M, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 1985; 35(3): 292-295.
 - Wareth G, Böttcher D, Melzer F, Shehata AA, Roesler U, Neubauer H *et al.* Experimental infection of chicken embryos with recently described *Brucella microti* : pathogenicity and pathological findings. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 2015; 41: 28-34.
 - Whatmore AM, Davison, N, Cloeckeaert A, Al Dahouk S, Zygmunt M, Brew SD *et al.* *Brucella papionis* sp nov, isolated from baboons (*Papio spp*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2014; 64(Pt 12): 4120-4128.
 - Whatmore AM, Dawson C, Groussaud P, Koylass MS, King A *et al.* Marine mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection. *Emerging infectious diseases.* 2014; 14(3): 517.
 - Whatmore AM, Dawson C, Muchowski J, Perrett LL, Stubberfield E, Koylass M. Characterisation of North American *Brucella* isolates from marine mammals PLoS ONE. 2017; 12(9).
 - Whatmore AM, Gopaul KK, Koylass M, Lawrie A, Muchowski J, Dale E *et al.* Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*) JMM Case Reports. 2015; 2(1).
 - Wyatt HV. Lessons from the history of brucellosis. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics).* 2013 ; 32(1) : 17-25.