

ZV0000605

nl

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLES (I.S.R.A.)

LABORATOIRE NATIONAL DELL'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERI NAI RES

DAKAR-HANN

DEPARTEMENT DE RECHERCHES
SUR LES PRODUCTIONS
ET LA SANTE ANIMALES

MYCOPLASMES A TROPISME RESPIRATOIRE
CHEZ LES PETITS RUMINANTS AU SENEGAL

Par M. KONTE et D. DESBUTTER

Communication aux
xi^{èmes} Journées Médicales et Pharmaceutiques
de Dakar. JANVIER 1988

REF. N° 93/MICROBIO
DECEMBRE 1987

MYCOPLASMES A TROPISME RESPIRATOIRE CHEZ LES PETITS RUMINANTS

R E S U M E

*L'élevage des Petits Ruminants connaît un regain d'intérêt face aux exigences de l'autosuffisance en protéines animales. L'une des contraintes majeures liées à cette spéculation est d'ordre pathologique et relève des affections respiratoires. Entre autres agents bactériens, deux espèces de mycoplasmes : *Mycoplasma arginini* et *Mycoplasma ovipneumoniae*, sont identifiées au niveau du tractus respiratoire lors de pneumopathies et au cours d'études de portage. Le succès de ces isollements pose le délicat problème des milieux de cultures et des techniques bactériologiques à mettre en oeuvre.*

L'élevage des Petits Ruminants connaît un regain d'intérêt en zone soudano-sahélienne, en général, au Sénégal, en particulier. En effet, face à la détérioration constante des conditions d'élevage liées à des aléas climatiques persistants, les ovins et les caprins offrent l'alternative souhaitée pour maintenir, accroître et diversifier la production de viande. De plus, le rôle social et religieux des Petits Ruminants n'est plus à démontrer.

L'une des contraintes majeures liées à cette spéculation est d'ordre pathologique et relève des affections respiratoires.

Nous dirons, comme LE JAN et al. (7), que "l'impact économique de ces affections doit être apprécié plus en terme de lésions infracliniques, donc de réduction des capacités zootechniques et de la production de protéines animales qu'en termes de morbidité et de mortalité".

Entre autres agents bactériens incriminés dans ce processus pathologique, deux espèces de mycoplasmes sont identifiées au Sénégal | au niveau du tractus respiratoire : *Mycoplasma arginini* et *Mycoplasma ovipneumoniae*, soit lors d'étude de portage sur animaux sains d'abattoir, soit lors d'examen de poumons atteints de pneumonie.

Il est examiné dans ce qui suit les problèmes posés au niveau des techniques bactériologiques mises en oeuvre, quant à l'isolement et l'identification de ces germes,

MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL

1°) - Les prélèvements

- Etude de portage

Elle est effectuée en 1981 et 1982 par DOUTRE (2 ; 3) à partir d'or-

ganes prélevés sur animaux sains, moutons et chèvres, à l'abattoir de Dakar. Pour chaque espèce ont été examinés :

- 100 fragments de parenchyme pulmonaire
- 100 fragments de muqueuse trachéale
- 200 fragments de muqueuse laryngienne
- 100 fragments de muqueuse sinusale

- Examen de matériel pathologique

Il s'agit essentiellement de poumons atteints de pneumonie à divers stades d'évolution. En particulier, il a été examiné un poumon hépatisé prélevé sur un mouton mort au cours d'une expérience d'ingestion de tourteau d'arachide contaminée par l'aflatoxine pour suivre et dépister la toxine d'*Aspergillus flavus* dans les résidus de viande (6).

2°) - Les milieux de cultures

Les Mycoplasmes, bactéries sans paroi, exigent des conditions particulières de culture. Le grand nombre de milieux de culture préconisés en atteste.

Aussi, est-il judicieux d'utiliser en parallèle plusieurs d'entre eux (4).

Les milieux testés et utilisés à Dakar sont au nombre de 5 :

- Milieu HIB (liquide et solide)

Heart Infusion Broth Difco :	25 g
Neopeptone Difco :	2,5 g
Bacto-casitone Difco :	2,5 g
Glucose :	2 g
Eau distillée :	700 ml

Extrait de levure fraîche à 25 p 100 :	100 ml
Sérum de cheval décomplémenté :	200 ml
Pénicilline	200 000 U.I.
Acétate de thallium à 10 p 100 :	1,25 ml
Agar Noble Difco (pour milieu solide)	10 g
PH :	7,6

- Bouillon tryptose pénicilline (BTP) ou milieu PPLO

Bacto-tryptose :	20 g
Glucose :	2 g
NaCl	5 g
Phosphate di sodique	2,5 g
Extrait de levure Difco	5 g
Eau distillée :	1 000 ml
Pénicilline :	1 000 U.I.
Sérum de cheval	100 ml
PH :	7,5 - 7,6

- Milieu de Hayflick modifié

Bacto PPLO Broth Difco	175 ml
sérum de cheval	50 ml
Extrait de levure fraîche à 15 %	25 ml
PH :	7,6 - 7,8

Pénicilline ou acétate de thallium sont utilisées ou non en fonction des préoccupations d'isolement ou d'entretien.

- Milieu DE (IEMVT)

Bacto PPLO broth. Difco	21 g
Bacto Tryptan	10 g
Glucose	1 g
Bacto Yeast extract	5 g
Eau distillée	700 ml

Puis ajouter : extrait de Levure fraîche 25 % 100 ml
serum de cheval 200 ml
PH : 7,6 - 7,8

- Milieu A.C. pour F 38

Brain Heart infusion broth	14,8 g
Lactalbumine hydrolysate Difco	2 g
Bacto yeast extract Difco	2 g
ADN	0,01 g
Solution de Hanks	200 ml
Eau déminéralisée	200 ml
Serum de cheval ou de chèvre	100 ml

B - METHODES

Dans le cadre de l'étude du portage, le milieu solide (HIB) coulé en boîte de Petri est directement ensemencé par application à partir des fragments d'organes prélevés, puis incubé en atmosphère enrichie en CO₂.

Le clonage est effectué en BTP (ou milieu PPLO) après une semaine de culture à 37°C.

Bien que préconisé, l'acétate de thalium n'a pas été utilisé au cours de cette étude ; il a par contre été pour le poumon hépatisé prélevé sur le cadavre du mouton soumis à l'ingestion d'aflatoxine (6).

Les souches de mycoplasmes isolées étaient envoyées pour diagnose d'espèces au laboratoire Pierre PERREAU de l'I.I.E.M.V.T. à Maisons-Alfort en France. Ce travail met en oeuvre le protocole d'étude suivant : morphologie, étude des caractères culturels et biochimiques; sérologie à l'aide d'anti-sérums de référence, analyse électrophorétique.

Les trois autres milieux (Hayflick modifié ; DE et M F38) sont aussi testés pour l'isolement et surtout pour l'entretien des souches sauvages ou de collection.

RESULTATS

1°) - Isolement de *Mycoplasma arginini*

C'est la seule espèce de mycoplasme mise en évidence, aussi bien à partir des prélèvements destinés à l'étude du portage que sur la quasi totalité des poumons atteints de pneumonie (2 ; 3).

El le répond aux caractères suivants :

résistance à la digitonine : +

"f i fms and spots" : -

hydrolyse du glucose : -

hydrolyse de l'arginine : +

Phosphatase : -

pourvoi protéolytique : -

t-Éduction du chlorure de tétrazolium : 0/+ (aérobie/anaérobie)

La sérologie et l'analyse électrophorétiques donnent un profil identique à celui obtenu avec la souche de référence G230 de *M. arginini*.

La répartition des isolaments s'est révélée fonction de l'espèce animale prélevée (ovine ou caprine) et du niveau de prélèvement sur le tractus respiratoire. DOUTRE (2, 3) a obtenu les résultats suivants :

Espèces	Sinus	Larynx	Trachée	Parenchyme pulmonaire	Total
Ovine	30	32	0	0	62
Caprine	1	2	0	0	3

2°) - Isolament de *Mycoplasma ovipneumoniae*

Ce mycoplasme est isolé une seule fois, à partir du poumon hépatisé provenant du mouton soumis à l'ingestion d'aliment contaminé par l'aflatoxine (6)

Cette souche sénégalaise de *M. ovipneumoniae* montre une légère différence d'avec

.../...

la souche de référence Y-98 par la luxuriance de sa culture en bouillon.

Elles sont identiques par ailleurs, pour les autres caractères qui sont :

- . croissance (notée de 0 à 4+) : 2+
- . aspect des colonies : type *M. ovipneumoniae*, petite colonie à centre diffus, vacuolée et granuleuse
- . sensibilité à la digltonine : + (9 mm)
- . hydrolyse du glucose : - (après 12 jours)
- . réduction du chlorure de tétrazolium : -/2+ (aérobie/anaérobie)
- . phosphatases : -
- . digestion du sérum coagulé : -
- . tests d'inhibition de croissance
 - sérum anti *-M. ovipneumoniae* Y-98 : +6 mm (nets)
 - sérum anti *-Mycoplasma sp. Fg 50*
Mycoplasma sp. F38, Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC 10114, Mycoplasma mycoides subsp. capri Pg3, Mycoplasma bovirhinis Pg43, Mycoplasma mycoides subsp. mycoides LC Y-Goat, Mycoplasma capricolum C. Kid : - (tous négatifs)
- . Immunofluorescence directe sur bouillon de culture :
 - sérum témoin négatif
 - anti F 38
 - anti-D₃
 - anti-Pg 50
 - anti-Pg 3
 - anti VC 2 (*M ovipneumoniae*) : 3 à 4+
 - . analyse électrophorétique : le schéma de l'antigène de la souche sénégalaise montre un profil très proche de celui obtenu à partir de l'antigène *M ovipneumoniae* Y-98.

M. arginini n'a pas été mis en évidence dans ce prélèvement.

3°) - Qualité des cultures pour les différents milieux

Mycoplasma arginini pousse de façon satisfaisante sur tous les types de milieux expérimentés, dans un délai de 2 à 4 jours après la mise en culture en milieu liquide se caractérisant par une croissance que l'on qualifiera de moyenne (par rapport à la croissance luxuriante de *M. mycoides mycoides* LC). *M. ovipneumoniae* se révèle beaucoup plus exigeant quant à la qualité du milieu de culture, ne donnant de résultats intéressants pour les milieux testés que pour le milieu de Hayflick modifié sur lequel sa croissance reste cependant lente et peu abondante.

DISCUSSIONS

1°) - Milieux de culture

L'isolement ou l'entretien des mycoplasmes pose le délicat problème de choix du milieu de culture adéquat. Ces milieux doivent nécessairement contenir un substrat de base constitué par un extrait de viande ou une peptone ou les deux, un extrait de levure de bière (frais, de préférence à celui du commerce), du sérum (de cheval, boeuf, mouton, porc, lapin, etc...), des inhibiteurs bactériens (pénicilline, acétate de thalium). La réussite des cultures dépend de la qualité de ces constituants : qualité de l'eau déminéralisée utilisée pour préparer ces milieux, qualité du sérum qui ne doit pas contenir d'anticorps inhibant les mycoplasmes. L'origine de l'agar n'est pas sans importance, la gélose OXOID permettant une meilleure croissance que la gélose DIFCO pour certaines espèces de mycoplasmes (4).

La culture des mycoplasmes est encore compliquée par le fait qu'il n'exista pas un milieu standard unique pour les différentes espèces de mycoplasmes des Petits Ruminants ; Il est préconisé l'emploi simultané d'un milieu permettant la croissance de *M. sp F38* (A.C), d'un milieu permettant la croissance de *M. ovipneumoniae* (milieu de Hayflick modifié) et d'un troisième milieu type milieu DE.

2°) - Etude du portage de mycoplasmes

La trachée et le parenchyme pulmonaire apparaissent comme stériles et nous remarquons avec DOUTRE (2, 3) que tout se passe comme si le portage normal, c'est-à-dire la croissance des micro-organismes sans que n'apparaissent des lésions chez l'animal, allait décroissant d'amont en aval au niveau des voies respiratoires supérieures pour s'annuler à partir du larynx ; ce serait le résultat de la mise en oeuvre d'un système immunitaire local efficace (2, 3).

La fréquence du portage de *M. arginini* est très inférieure chez la chèvre par rapport au mouton,

M. arginini est aussi isolé de lésions pulmoniques du mouton (très fréquent) et de la chèvre (race) (2, 3).

Le passage chez l'animal, de l'état porteur sain à celui de malade pulmonique, se ferait à la faveur d'une dépression du système immunitaire local du fait de facteurs stressants primaires. Ces facteurs sont, selon DOUTRE (2, 3), la peste des Petits Ruminants pour les caprins (donc agents d'ordre virai ou infectieux) et le mauvais état physiologique pour les ovins (du fait de parasitisme d'une mauvaise alimentation, du froid, etc...). Cette présentation dichotomique expliquerait les pneumonies des Petits Ruminants (2 ; 3).

3°) - Isolement de *M. ovipneumoniae*

Ce germe a été isolé une seule fois, malgré le nombre important de poumons pneumoniques examinés. Il faut noter qu'il a été isolé à la faveur d'une agression de l'organisme par une mycotoxine (6) ; il serait alors un germe de sortie, ce qui supposerait un portage préalable au niveau du tractus respiratoire. Malheureusement, l'opportunité ne nous a pas été donnée d'effectuer une recherche systématique de *M. ovipneumoniae* à partir d'écouvillonnages nasaux pratiqués chez tous les animaux concernés par l'expérience (1).

G. IONAS et al. (5) ont émis l'idée que la colonisation secondaire du parenchyme pulmonaire se ferait à partir d'un portage nasal préalable du germe sans pour autant que celui-ci fasse partie intégrante de la flore normale ; du reste cette aptitude n'est pas reconnue à toutes les souches de *M. ovipneumoniae*.

Il est possible que l'aflatoxine ait eu une action favorisante sur la colonisation du tractus respiratoire par *M. ovipneumoniae*.

De plus, l'usage de l'acétate de thallium pourrait avoir eu un effet favorable sur son développement in vitro, soit en modulant l'interférence microbienne en faveur de *M. ovipneumoniae* au détriment de germes saprophytes, soit en minimisant un éventuel effet inhibiteur de la pénicilline G parfois observé sur certaines espèces de mycoplasmes.

Quant au rôle exact joué par *M. ovipneumoniae* dans l'apparition des symptômes observés, l'étude du pouvoir pathogène par la reproduction expérimentale de la maladie chez les Petits Ruminants est en cours ; elle implique la toxine d'*Aspergillus* comme facteur stressant.

Les foyers de "pasteurelloses" de plus en plus signalés à travers le pays incitent à plus d'attention quant à l'existence probable de *Mycoplasma* sp. F 38 agent spécifique de la pleuropneumonie contagieuse caprine. L'utilisation systématique d'un milieu favorable à son isolement est faite dans cette optique.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ALLEY (M.R.), QUILAN (J.R.) and CLARKE (J.K.) - The prevalence of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in the respiratory tract of sheep, W.Z. Vet. J., 1975, 23 : 137-141
- 2 - DOUTRE (M.P.) et PERREAU (P.) - Le portage de *Pasteurella* sp. et de *Mycoplasma arginini* chez les moutons sains au Sénégal.
Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1981, 34 (4) : 365-368
- 3 - DOUTRE (M.P.) et PERREAU (P.) - Le portage de *Pasteurella* sp. et de *Mycoplasma arginini* chez la chèvre au Sénégal.
Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop., 1983, 36 (1) : 11-14
- 4 - I.E.M.V.T./C.I.R.A.D. - Mycoplasmes et Mycoplasmoses des Ruminants.
Documents techniques ; 10, rue Pierre Curie, 94704 - Maisons-Alfort,
juin 1985, 82 p.
- 5 - IONAS (G.), MEW (A.J.), ALLEY (M.R.), CLARKE (J.K.), ROBINSON (A.J.) and MARSHALL (R.B.) - Colonization of the respiratory tract of lambs by strains of *Mycoplasma ovipneumoniae*
Veterinary Microbiology, Vol. 10, N° 6, Décembre 1985 ; 533-539
- 6 - KONTE (M.) et BREARD (A.) - Premier isolement de *Mycoplasma ovipneumoniae* au Sénégal.
A paraître dans Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1987, 40 (2)
- 7 - LE JAN (C.), SOW (A.D.) et CISSE (T.) - Rapport final du service de Virologie du CNERV - Réseau d'étude des pneumopathies des Petits Ruminants Mauritanie - Octobre 1986 non publié.