

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTRE t DU DEVELOPPEMENT RURAL

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

DEPARTEMENT DE RECHERCHES SUR LES
PRODUCTIONS ET LA SANTE ANIMALES

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES
B.P. 2057

VAKAR- HANN

2V0000692

622

LA PARATUBERCULOSE
DIAGNOSTIC D'UN PREMIER CAS CHEZ UN BOVIN
D'IMPORTATION AU SENEGAL

Par M. KONTE
avec la collaboration technique de
MBENGUE (A.B.) et NDIAYE (A.M.S.)

REF. N°59/MICROBIO.
JUILLET 1987.

LA PARATUBERCULOSE
DIAGNOSTIC D'UN PREMIER CAS CHEZ UN BOVIN
D'IMPORTATION AU SENEGAL

Par M. KONTE*
avec la collaboration technique de
MBENGUE (A.B.)* et NDIAYE (A.M.S.)*

R E S U M E

La paratuberculose est diagnostiquée pour la première fois au Sénégal sur un bovin importé de France. Les circonstances d'isolement de Mycobacterium paratuberculosis sont rapportées. Les particularités culturales du germe sont évoquées et discutées. L'auteur conclue en invoquant la nécessité d'appliquer les mesures de police sanitaire arrêtées en la matière.

INTRODUCTION

La demande en lait frais et produits dérivés est très forte en milieu urbain. Si la production laitière des bovins locaux (zébu Gobra et taurin Ndama) satisfait les besoins du monde rural, tel n'est pas le cas s'agissant de ceux de la population urbaine.

L'une des solutions à ce problème d'alimentation est la mise à profit des particularités écologiques favorables autour des villes pour une exploitation de races étrangères manifestant les caractères d'un gène laitier intéressant. A ce titre, des races ont été introduites au Sénégal : Montbéliard, Red Sindhi et Sahiwal.

Cependant, cette spéculation connaît des contraintes, d'ordre pathologique essentiellement, dues à la Cowdriose, la Babesiose, l'Anaplasmose et l'Ehrlichiose bovine (12). Toutes ces maladies reflètent une pathologie tropicale contractée sur place.

.../...

* Laboratoire national de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires (ISRA)
BP 2057 - DAKAR-HAMM (Sénégal). Service de Parasitologie.

Une pathologie nouvelle pour le Sénégal, jugée d'importation à priori, vient d'être diagnostiquée dans ce troupeau laitier, il s'agit de la paratuberculose ou maladie de Johne, objet de la présente publication.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

- Prélèvements

Deux anses intestinales et des ganglions mésentériques satellites réactionnels prélevés sur une vache montbéliarde (MTB 14/Unité 29) par un vétérinaire de l'encadrement technique des exploitations nous ont été apportés pour analyse bactériologique. Les commémoratifs étaient les suivants : depuis la fin de l'hivernage (septembre - octobre dans la région de Dakar), amaigrissement progressif de la vache jusqu'à^{la} cachexie, mais alimentation et habitus normaux. Aggravation en fin décembre avec inappétence, hyperthermie, diarrhée. L'animale est morte le 3 janvier. A l'autopsie, les lésions sont uniquement abdominales, avec hypertrophie des ganglions mésentériques, succulents à la coupe, épaississement de la paroi intestinale, la muqueuse dessinant des "circonvolutions cérébroïdes". Recherche de la paratuberculose demandée.

- Réactifs et milieux de culture

. Kit-réactif pour la coloration de Ziehl.

. Milieu de culture

C'est le milieu de Herrold (milieu agar à l'oeuf) additionné d'une solution alcoolique de mycobactine J (fabriquée par Allied Laboratories INC, commercialisée par RHONE-MERIEUX, Lyon, France).

. Décontaminant des prélèvements

Le bromure de cétylpyridinium (1-hexadecylpyridinium bromide - SIGMA), seul disponible sur le moment, est utilisé à la place du chlorure de benzalkonium (5) ou, mieux, selon le Professeur MERKAL (6, 7) à la place du chlorure de cétylpyridinium (1-hexadecylpyridinium chloride - SIGMA).

Méthodes

L'ensemble des techniques utilisées (coloration de Ziehl, décontamination des prélèvements, ensemencement et culture) procède d'un amalgame des méthodes conseillées d'une part par LAGADIC, LE MENEC et ARGENTE (5) parmi le grand nombre de méthodes proposées dans la littérature (2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 73) et d'autre part par les Laboratoires RHONE-MERIEUX (non référenciés). Le détail est donné en annexe.

RESULTATS

- Coloration de Ziehl

Elle met en évidence des amas de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) et quelques rares formes dispersées montrant de petits bacilles rouges sur fond bleu, isolés (13).

Les lames correspondant aux ganglions montrent une plus grande richesse en germes que celles des intestins qui ont d'avantage de formes dispersées.

- Culture

Les résultats obtenus après 8 semaines et 5 jours d'incubation sont notés dans le tableau ci-après :

Organes	N° tubes	Milieux de culture	Colonies visibles	Ziehl/colonies	Contamination
Ganglion	1	Herrold + Mycobactine	++++	++++	
	2	"	-	+++	
	3	"	-	+++	-
	4	Herrold		±	-
Intestin	5	Herrold + Mycobactine	-	-	-
	6	"		-	-
	7	"		-	-
	8	Herrold		-	-

Les 8 tubes ne révèlent aucune contamination par les moisissures ou les saprophytes banaux.

Après 8 semaines et 5 jours, on note dans le tube n° 1 (ganglion - Hémion - Mycobactine J) de petites colonies blanches, lisses et sèches, de diamètre variable mais inférieur à 1 mm. Aucune colonie n'est visible sur les 7 autres tubes.

La coloration de Ziehl effectuée à partir des colonies montre des bacilles acido-alcool-résistants en amas, associés à quelques rares bâtonnets relativement polymorphes.

Les frottis réalisés à l'aide de produit de reclage de la surface des géloses des 7 autres tubes montrent, pour les tubes n° 2 et n° 3, après coloration de Ziehl, quelques amas de BAAR et d'avantage de formes isolées. En outre, le tube n° 4, dépourvu de mycobactine, révèle quelques rares BAAR isolés, très grêles, dont le nombre ne dépasse pas 1 ou 2 Par champ microscopique.

Le temps d'observation des tubes a été prolongé jusqu'à 15 semaines sans qu'aucun changement n'ait été constaté.

L'identification de M. paratuberculosis a été confirmée par le Laboratoire Central de Recherches vétérinaires de Maisons-Alfort, en France.

DISCUSSIONS

La présence de bacilles acido-alcool-résistants en amas (sur les frottis microbiologiques et après culture), la mycobactine-dépendance de la culture à 28°C, essentielle selon TWORT et INGRAM cités par THOREL (13) et MERKLEY (14), la croissance lente, observée seulement après 8 semaines, établissent le diagnostic de Mycobacterium paratuberculosis.

Si aucune culture n'est obtenue à partir de la muqueuse intestinale, nous pensons, comme LAGADIC, LE MENEK et ARGENTE, qu'au départ le nombre de micro-organismes viables était insuffisant ou les germes trop débilités pour surmonter l'étape de la décontamination. En effet, la culture de M. paratuberculosis n'est positive que lorsque 50 à 100 germes viables sont présents par gramme de prélèvement, en raison du processus de décontamination qui tue un certain nombre de bacilles (5).

Avec le prélèvement ganglionnaire, 1 tube seulement sur les 3 contenant la mycobactine révèle des colonies. Sur les deux autres, la culture n'a dû donner que des colonies microscopiques, car des BAAR sont retrouvés dans les produits de raclage de la surface des géloses. L'association bromure de cétylpyridinium - fungizone a été efficace sur les contaminants éventuels qui auraient pu gêner le développement des colonies.

Le tube sans mycobactine, épreuve décisive pour le diagnostic bactériologique, montre quelques rares BAAR isolés, dans le produit de raclage du milieu. En considérant les résultats de façon globale, aucune valeur significative ne doit être accordée à cette observation. Sans vouloir avancer une explication absolue, on peut considérer qu'il s'agit de quelques rares germes devenus d'emblée mycobactine - indépendants, situation observée à priori lors de repiquage et seulement pour certaines souches (5).

CONCLUSION

Le diagnostic de laboratoire confirme ainsi les suspicions cliniques de paratuberculose. Révélée par un animal d'importation, cette pathologie préexisterait-elle au Sénégal, ou serait-elle réellement introduite ?

Un dépistage systématique chez les animaux locaux apporterait certainement des éclaircissements sur l'épidémiologie de cette affection dans ce pays.

Néanmoins, il serait opportun, compte tenu de la gravité de la maladie du point de vue économique, d'appliquer de façon immédiate et systématique, les mesures de police sanitaire à tous les niveaux du marché.

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

- 1 - AMSTEL (S.R. VAN) - Observations on the symptomatology and diagnosis of clinical cases of Johne's disease (two cases). Journal of the South African Vet. Assoc. (1984, 55 (1) : 45-46.
- 2 - DESMECHT (M.) - Rendement comparé de diverses méthodes de diagnostic de la paratuberculose. Ann. Méd. Vét., **1977**, 121 : **421-423**.
- 3 - DESMETTRE (Ph.) - Diagnostic expérimental de la paratuberculose des Ruminants : difficultés et limites. Bull. G.T.V., 1982, 2 : 45-51.
- 4 GHILARDI (G.), GATTI (R.), LODA (P.) - Severe outbreak of paratuberculosis in Italy in cattle imported from France. Obiettivi e Documenti Veterinar, 1984, 5 (7/8) : 31-33.
- 5 LAGADIC (M.), MENEC (M. LE), ARGENTE (G.) - Techniques de culture de Mycobacterium paratuberculosis : leur utilisation en routine dans un laboratoire de **diagnostic**. Recueil de Médecine vétérinaire, 1983, 159 (10) : 801-807.
- 6 **MERKAL (R.S.)** - Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. **3.** Amer. Vet. Med. Ass., 1973, **163** : 1100-1102.
- 7 - MERKAL (R.S.), KOPECKI (K.E.), LARSEN (A.B.), THURSTON (J.R.) - Improvements in the technics for primary cultivation of Mycobacterium paratuberculosis. Am. J. Vet. Res., 1964, 25 : 1290-1294.
- 8 - MERKAL (R.S.), LARSEN (A.B.), KOPECKY (K.E.), NESS (R.D.) - Comparaison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle. Am. J. Vet. Res., 1968, 29 : 1533-1538.
- 9 - MERKAL (R.S.), LYLE (P.A.S.), WHIPPLE (D.L.) - Decontamination media and culture methods for Mycobacterium paratuberculosis. Proceedings of the United States Animal Health Association, 1982, 86 : 519-523.

- 10 - MERKAL (R.S.), Mac CULLOUGH (W.G.), TAKAYAMA (K.) - *Mycobactins, the state of art.* Bull. Inst. Pasteur, 1981, 79 : 251-259.
- 11 - NYANGE (J.F.C.), MBISE (A.N.), OTARU (M.M.M.), KARISIAN (L.L.) - *Paratuberculosis in a herd of Jersey cattle : a case report.* In proceedings of the 1st Tanzania Veterinary Association Scientific Conference, 12 th - 14 th December 1983. Morogoro, Tanzania, 1983 : 167-176.
- 12 - THIBAUT (J.C.), DIAO (M.), KEBE (B.) et DENIS (J.P.) - *Analyse de la pathologie observée chez les animaux laitiers importés en production intensive au Sénégal. 7 - Conséquences physiologiques et économiques de la pathologie parasitaire sanguine.* Communication aux XIèmes Journées Médicales de Dakar, 74 - 20 janvier 1985. Réf. n° 007/ZOOT./LNERV, janvier 1985.
- 13 - THOREL (M.F.) - *Les Mycobactéries chez l'animal.* Cah. Méd. vét., 7975, 44 : 71-80.
- 14 - THOREL (M.F.) - *La paratuberculose.* Bull. Lab. Vét., 7987, n° 3 : 1-13.

A N N E X E

A - COLORATION DE ZIEHL

La méthode classique est mise en oeuvre, utilisant la fuschine phéniquée, l'acide sulfurique au 1/4, l'alcool absolu et le bleu de méthylène.

B - DECONTAMINATION DES PRELEVEMENTS

. 1 g de produit de raclage de la muqueuse intestinale dans 20 ml d'eau distillée stérile.

. 1 g de tissu lymphoïde ganglionnaire est broyé dans 20 ml d'eau distillée stérile.

. Laisser reposer quelques minutes à la température du laboratoire.

. Prélever 5 ml de surnageant et les transférer dans un tube à centrifuger de 50 ml contenant 30 ml de solution aqueuse à 1 p.100 de bromure de cétypyridinium. Agiter pour homogénéiser le mélange.

. Laisser reposer les tubes en position verticale une nuit à la température du laboratoire.

. Le culot servira à l'ensemencement des milieux de culture.

;

C - CULTURE

. Préparation du milieu de Herrold, dont la composition est la suivante (réf. Laboratoires RHONE-MERIEUX) :

Bacto-peptone (DIFCO)	9,0 g
Extrait de viande de boeuf (DIFCO)	2,7 g
Chlorure de sodium	4,5 g
Glycérol	27,0 ml
Bacto noble Agar (DIFCO)	15,3 g
Eau distillée	870,0 ml

.../...

Mycobactine (solution alcoolique) à 0,5 p.100.....	4,0 ml
Vert malachite sous forme d'oxalate (DIFCO)	
solution aqueuse à 2 p.100 stérile	5,1 ml
Jaunes d'oeufs fraîchement préparés (oeufs	
dépourvus d'antibiotiques) (6 oeufs)	120,0 ml.

Dans un flacon de verre stérile de 2 litres, placé dans un bain-marie bouillant, ajouter : l'eau distillée, le glycérol et l'extrait de viande de boeuf et agiter jusqu'à dissolution.

Ajouter la peptone, le chlorure de sodium, l'agar et agiter à nouveau jusqu'à dissolution.

Refroidir le milieu tout en le maintenant en surfusion. Ajuster si nécessaire le pff à 7,2 au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium 1 N (environ 4,1 ml).

Ajouter le contenu d'un flacon de Mycobactine repris par l'éthanol en évitant de le faire couler sur les parois du flacon de 2 l. Mélanger soigneusement.

Stériliser le milieu contenant la Mycobactine à l'autoclave durant 25 mn à 121°C.

Refroidir le milieu après autoclavage et le maintenir en surfusion au bain-marie à 56°C.

Ajouter stérilement la solution de vert malachite à 2 p.100 préalablement stérilisée à l'autoclave durant 15 mn à 121°C.

Laver les coquilles d'oeufs en les brossant soigneusement avec un détergent.

Tremper les oeufs dans l'éthanol à 70°, les essuyer au moyen d'un linge stérile, les casser et récupérer les jaunes dans un récipient stérile.

Ajouter les jaunes d'oeufs au mélange et agiter soigneusement.
Cet usage se justifie-t-il vis-à-vis du BCP ?

.../...

Ajouter la solution d'amphotéricine B et de pyruvate de sodium (13,5)
 (Amphotéricine B-SIGMA = Fungizon ND 10,0 ml
 Pyruvate de sodium = 4,1 g).

Répartir le milieu dans des tubes à vis et les identifier soigneusement afin de les distinguer des tubes de milieu ne contenant pas de mycobactine (témoin). Incliner les tubes pour former des pentes de milieu et les laisser refroidir durant 30 mn.

Incuber les tubes durant 48 h à 37°C pour tester la stérilité du milieu.

. Ensemencement - culture

Pour chaque prélèvement (intestin et ganglions), ensemer 4 pentes de milieu de Herrold (3 avec Mycobactine et 7 sans Mycobactine) en tubes à vis, avec 0,2 ml de culot de sédimentation décontaminée par tube, soit 8 tubes numérotés de 1 à 8.

Placer les tubes en position inclinée, bouchons dévissés, dans une étuve à 37°C de manière à permettre l'évaporation du liquide résiduel.

Après 4 jours, visser les bouchons et placer les tubes verticalement.

Observer les tubes après 4 jours, 4 semaines, 8 semaines et 13 semaines d'incubation à 37°C.

;