

~~RE~~ REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DU DEVELOPPEMENT RURAL

DEPARTEMENT DE RECHERCHES SUR LES
PRODUCTIONS ET LA SANTE ANIMALES

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

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

DAKAR - HANN

634
240000 634

DIAGNOSTIC DE **LA** PERIPNEUMONIE
CONTAGIEUSE BOVINE (PPCB)

SEMINAIRE FAO SUR LA PRODUCTION DE
VACCINS CONTRE LA PPCB

Bamako, Mali, du **19** au 24 septembre 1988

Par **M.** KONTE

REF. N° 057/MIBROBIO.
SEPTEMBRE 1988.

SEMAINAIRE SUR LA PRODUCTION DE VACCINS

CONTRE LA PERIPNEUMONIE BOVINE (PPCB)

19 - 24 SEPTEMBRE 1988 - LCV BAMAKO

LA PERIPNEUMONIE CONTAGIEUSE BOVINE (PPCB)

DIAGNOSTIC

1 - DIAGNOSTIC CLINIQUE

- En pays indemne : difficile et délicat
- En territoire endémique : penser à la PPCB lors d'un processus contagieux chez les bovins, évoluant lentement dans l'effectif avec manifestation fébrile, de la pleuropneumonie exsudative.

Le syndrome complet est reconstitué par l'examen de plusieurs malades d'un même foyer et non sur un seul animal.

II- DIAGNOSTIC NECROPSIQUE

- Lésions pathogéomoni ques : type d'hépatisation très particulière des lobules pulmonaires : aspect marbré évoluant en aspect "fromage de tête" selon une progression centripète, lorsque différents stades d'infection cohabitent.

.../...

. La pleurésie exsudative (jusqu'à 30 l) et les "omelettes" de fibrine.

- Dans les cas chroniques :

. présence de séquestres
. à la place de l'exsudat sérofibrineux un tissu fibreux provoquant des adhérences entre feuillets pleuraux.

III- DIAGNOSTIC **EXPERIMENTAL**

L'isolement et l'identification de Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC est relativement facile.

A) - **PRELEVEMENTS**

1°) - Sur l'animal vivant

- Mucus nasal ou liquide de jétage, plus ou moins riche en germes en fonction du stade lésionnel.
- Liquide pleural prélevé par ponction thoracique (P.G t A.TH.).
- Sang pour prélèvement de sérum

2°) - Sur le cadavre

- Fragment de poumon hépatisé
- Lymphe thoracique
- Exsudat bronchique
- Ganglions lymphatiques broncho-pulmonaires
- Serum du caillot sanguin intracardiaque.

Envoyer tous les prélèvements sous froid (0 à 4°C) ;
si envoi différé savoir qu'à +4°C, conservation de quelques jours ;
à -20 ou à -25°C : plusieurs semaines à plusieurs mois ; à +4°C ou mieux
à -20°C : survie de plusieurs années pour des lyophilisats.

.../...

B) - DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE

1°) - Milieux de culture

a) - Constituants obligatoires

- Un milieu de base : constitué par un extrait de viande (infusion de coeur de boeuf, par exemple) ou une peptone (tryptose difco, tryptone difco ou Oxoid) ou les deux.

- Un extrait ou un autolysat de levure de bière (frais ou du commerce (apporte les facteurs de croissance : vitamines du groupe B, précurseur des acides nucléiques).

- Un sérum à 10 % (concentration finale recommandée favorable à l'apparition de comètes), décomplémenté 30 minutes à 56°C dépourvu d'anticorps et de substances inhibitrices ; de préférence choisir le sérum d'un vieux cheval.

b) - Constituants conseillés

- Glucose : 1 à 2 g/l
- Un système tampon (phosphate par exemple)
- Du glycérol
- De l'ADN.

c) - Inhibitions bactériens : Obligatoires au moment de l'isolement.

- Pénicilline G : 250 à 1000 UI/ML
- Acétate de thallium : 1/5000 - 1/10 000

S'il existe des risques de contaminations fongiques, ajouter de la fungizone.

Les milieux utilisés sont soit liquides soit solides (par adjonction de gélose : 15g/l ou d'agarose).

Les milieux liquides sont stérilisés par filtration, les milieux solides seront autoclavés.

.../...

2") - Isolement

a) - Sur milieu solide (avec les inhibiteurs bactériens).

- Dépot et étalement de quelques gouttes de lymphe pulmonaire, liquide pleural ou broyat de poumon.

- Empreinte directe sur la gélose, avec ou sans étalement, à partir de poumon lésé ou section de ganglion.

- Incubation 3 à 5 jours à 37°C en atmosphère humide. CO₂ inutile.

- Résultats : une culture positive montre des colonies caractéristiques en "oeuf sur le plat", d'un mm au plus, à centre dense incrusté dans la gélose. Observation directe au stéréomicroscope ou après coloration soit au May - Grünwald - Giemsa, soit mieux à l'aide du colorant de Dienes.

b) - En milieu liquide (avec les inhibiteurs bactériens).

- la meilleure méthode reste celle de la dilution pastorienne. C'est l'exemple de l'action de deux systèmes : les dilutions jointes à l'action des inhibiteurs pour éliminer les contaminations.

Résultats : en 3 à 5 jours de culture, apparaissent un trouble léger et homogène, avec souvent, mais pas toujours, des "comètes" (milieu pauvre en sérum = 10 % favorable). Puis opacité uniforme avec onde moirée (ganque de galactane).

L'état frais montre des particules ni cocci, ni bacille, de taille très inférieure à des bactéries, en petits points grappes et longs filaments grêles, agités d'un fort mouvement brownien (culture jeune).

3°) - IDENTIFICATION

Procéder à une purification préalable de la colonie observée par clonage. L'idéal est de réaliser 3 purifications consécutives. Si bouillon contaminé, filtrer sur disque à 0,45 u ou à 0,22 u de porosité.

.../...

a) - Elimination des formes L

Par suppression des inhibiteurs bactériens après 3 subcultures, en l'occurrence la pénicilline, la bactérie d'origine reprend sa forme et est aisément détectée.

b) - Test à la digitonine

Permet de différencier les mycoplasmes sensibles des acholéplasma indifférents à la digitonine.

c) - Caractères biochimiques

Mycoplasma mycoides subsp. *mycoides* (SC biotype bovin) répond aux caractères suivants :

- film et tâches : -
- hydrolyse du glucose : +
- hydrolyse de l'arginine : -
- hydrolyse des phosphates : ▪
- réduction des sels de tétrazolium : +/+
- pouvoir protéolytique : -(ou faible)

Ces caractères métaboliques sont communs avec d'autres mycoplasmes. L'identification définitive utilise des moyens sérologiques : l'inhibition de croissance (ou inhibition du métabolisme du glucose avec un immunosérum de référence), l'immunofluorescence directe ou indirect.

d) - Inhibition de croissance

Technique de Clyde. Lecture entre 48 et 72 h, test positif si zone d'inhibition supérieure ou égale à 2mm. Limites : problème de distinction entre les souches de *mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype bovin (SC, PPCB) et *mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (biotype caprin (LC), rarement pathogène pour les bovins.

Les souches LC sont caractérisées par :

- très grande vitesse de croissance
- diamètre des colonies supérieur à 2mm apparaissant en 24 h.

- pouvoir protéolytique considérable
- thermorésistance : survie de 48 h à 45°
- il n'y a jamais de comètes
- différence SC-LC par emploi de sérum de bovin naturellement infecté.
- le complément de cobaye ne freine ni n'inhibe la croissance du biotype caprin/SC bovin.

e) - Immunofluorescence

Complète le test d'inhibition. Travailler de préférence sur des colonies entières sur blocs de gélose, mais fixées. La méthode indirecte, plus longue, permet une meilleure spécificité. Utiliser un sérum témoin négatif.

B) - DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

1°) - Recherche de l'antigène circulant

L'antigène spécifique, la galactane est facilement mis en évidence pendant la période d'état dans l'organisme, en particulier dans le sérum, les liquides lymphatiques, pulmonaire et péricardique, et dans l'urine. La recherche de la galactane dans le torrent circulatoire met en oeuvre deux tests immunologiques :

a) - Le test de précipitation interfaciale en milieu liquide :

Analogue à la réaction d'Ascoli pour le diagnostic du charbon bactérien. Lecture en 2 à 10 minutes.

b) - L'immunodiffusion double en gélose :

En particulier la méthode simplifiée.

Les deux protocoles sont faciles d'exécution et très fiables, à condition de posséder un bon sérum précipitant. Une réaction positive a valeur de certitude.

Les chances maximales de mise en évidence de l'antigène circulant chez un malade se situent aux alentours de un mois et demi à deux mois et demi après le début de la maladie.

2°) - Recherche des anticorps spécifiques

a) - Agglutination sur lame

Ce test utilise un antigène coloré. Résultat obtenu en moins de 2 minutes ; il est qualitatif ou semi-quantitatif. Le sang total est utilisable, mais préférer le sérum. Retenir : une bonne fiabilité des résultats pendant la phase aiguë décroissant rapidement à mesure qu'on entre dans la phase chronique du fait d'une quantité grande d'immunocomplexes circulants.

Le test garde toute sa valeur si utilisé à l'échelle du troupeau, ne doit jamais être un test individuel.

b) - La fixation du complément

Reste la méthode sérologique de base pour le diagnostic de la PPCB. Deux variantes existent :

- Méthode de Campbell et Turner : c'est la technique recommandée par l'O. I. E. Elle est peu sensible (ce qui élimine les sérums à titre douteux et d'interprétation délicate). Par contre elle est très spécifique : les fausses réactions positives sont extrêmement rares.

- Méthode de Kolmer : C'est la méthode à froid, ayant la faveur de beaucoup d'utilisateurs francophones d'Afrique.

. En tous les cas, les anticorps spécifiques ont une longue persistance dans le sang des animaux infectés, même après la guérison clinique (porteur de séquestre).

. Les anticorps vaccinaux rendent positive la fixation du complément pendant un certain temps mais à des titres assez faibles. S'abstenir de procéder à tout dépistage sérologique dans les 3 mois qui suivent une vaccination.

. Les bovins vaccinés et immuns peuvent devenir positifs lors de contacts infectants sans être malades pour autant.

. Certains cas de fausses réactions négatives peuvent exister lors de PPCB grave par suite d'invasion du torrent circulatoire par l'antigène circulant. Les fausses réactions positives, très rares, sont le fait d'antigènes communs avec d'autres germes.

c) - L'hémagglutination passive

Utilise des globules rouges sensibilisés par la galactane. Elle révèle les mêmes anticorps que la séro-agglutination. Elle est quantitative et très sensible.

d) - Le test immunoenzymatique (ELISA....)

Très sensible par nature, révèle l'ensemble des anticorps anti-pneumoniques lorsque l'antigène employé est un lysat de Mycoplasma mycoides.

Le seuil de positivité est à déterminer ou à moduler ce qui constitue une entrave à la standardisation de la méthode.

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

- CHANTAL (J.) - La péripneumonie contagieuse bovine. Cours magistral. E.I.S.M.V. Dakar. 1976.
- HUDSON (J.R.) - La péripneumonie contagieuse des bovidés. FAO. Rome. 1972.
- I.E.M.V.T./CIRAD : Mycoplasmes et mycoplasmoses des ruminants. Document technique du service de Pathologie infectieuse. Juin 1985.
- O.I.E. - Les mycoplasmoses des ruminants. In : Revue scientifique et technique de l'O.I.E., 1987, 6 (3).