

Importance du microbisme dans les spermes d'étalons

par Josée VAISSAIRE*, E. PLATEAU**, Claire COLLOBERT-LAUGIER***
avec la collaboration technique de M. LAROCHE, M.H. COCONNIER,
G. MIRIAL, J. HARDY et P. GUERY

RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent l'importance du microbisme dans les spermes d'étalons. L'étude a été faite sur 235 spermes de différentes races de chevaux. La contamination par les *Klebsiella*, les *Streptococcus (equisimilis et zoepidemicus)*, les *Staphylococcus aureus* et les *Escherichia coli* peut être importante.

D'autres germes saprophytes potentiellement pathogènes peuvent être trouvés : *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Acinetobacter*, etc.

63 % des spermes sont contaminés : soit par 1 germe (45 %), soit par 2 germes (16,3 %), soit par 3 germes (1,2 %).

Le contrôle bactériologique des reproducteurs avant la saillie devrait être systématique.

Mots clés : Sperme - Cheval - Reproduction - Maladies bactériennes - *Klebsiella* - *Hemophilus* - Staphylocoques - Streptocoques - Germes saprophytes.

SUMMARY

IMPORTANCE OF MICROBISM IN THE SEMEN OF STALLION

The authors described the important intervention of bacterial potential pathogens in the semen of stallion. The study was effected on 325 semens in different breeds.

The contamination was *Klebsiella*, *Streptococcus equisimilis* and *zoepidemicus*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

* Ministère de l'Agriculture, Direction Générale de l'Alimentation, Services Vétérinaires, Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, Service de Bactériologie, 22, rue Pierre-Curie, B.P. 67, 94703 Maisons-Alfort Cédex.

** Idem, Service de Virologie Equine.

*** Vétérinaire-Inspecteur, Institut de Pathologie du Cheval, Goustranville, 14430 Dozulé.

N.B. — Cette communication a fait l'objet d'une présentation orale limitée au cours de la 13^e Journée de la Recherche Chevaline (11 mars 1987, Paris).

Other saprophytic and potentially pathogenic to the stallion's reproductive tract and mare's reproductive tract are *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Acinetobacter*, etc.

63 % of the semens were contaminated with one bacteria (45 %), with two bacteria (16,3 %), with three bacteria (1,2 %).

The bacteriological controls of mares and stallions are necessary before breeding and the research of bacterial organisms is necessary.

Key words : Semen - Horse - Reproduction - Bacterial diseases - *Klebsiella* - *Hemophilus* - *Staphylococcus* - *Streptococcus* - *Saprophytic bacteria*.

I. INTRODUCTION

Lors d'une récente communication sur la métrite contagieuse équine (VAISSAIRE J. et coll., 1986), nous concluons que « la recherche de cette affection n'est pas aisée pour de multiples raisons, et que les prélèvements chez l'étalon pourraient être réduits au sperme surtout chez les animaux suspects ou infectés chroniques.

« Des résultats plus rigoureux seraient obtenus si les recherches étaient étendues à l'ensemble des germes pouvant provoquer des métrites et qui peuvent masquer l'agent de la métrite contagieuse équine ».

C'est dans cet esprit d'une part que nous avons entrepris une enquête sur le microbisme des spermes d'étalons au cours et après la saison de monte 1986. Nous avons commencé par des étalons suspects, trouvés négatifs alors que des juments de leur harem étaient trouvées positives, puis les examens ont été généralisés à tous les germes trouvés, à tous les étalons de certains haras privés ou publics.

Cette étude a été faite d'autre part pour d'autres raisons :

1. Nous avons précédemment montré :

— l'importance des streptocoques dans les troubles de la reproduction chez la jument (VAISSAIRE J. et coll., 1985) ;

— l'émergence de bactéries dites saprophytes dans les avortements bactériens chez la jument (VAISSAIRE J. et coll., 1986) ;

— l'importance des bactéries dans les troubles d'infécondité et d'avortements chez la jument (VAISSAIRE J. et coll., 1986).

2. Nous avons souvent vérifié que les problèmes d'infécondité et d'avortements bactériens étaient liés non seulement aux germes du tractus génital de la femelle mais aussi à la contamination par le mâle suite à la saillie. Des analyses ont été faites avant et après la monte chez les mêmes femelles et sur les étalons.

3. Des auteurs anglo-saxons (MANSMANN Ph., ALLISTER E.S., PRATT P.W., 1982) ont vérifié particulièrement aux Etats-Unis que les étalons

sont souvent porteurs de germes dans leur tractus génital et que leurs semences peuvent héberger des quantités importantes de bactéries. Leur fertilité est normale, des règles d'hygiène rigoureuse sont appliquées au moment de la saillie, mais ces germes sont retrouvés dans les avortements de la jument.

Qu'en est-il en France ? Quels germes rencontre-t-on plus particulièrement ?

Nous avons effectué notre enquête sur plus de deux cents spermes d'étalons en provenance de certaines régions : régions de forte densité équine, régions où l'on trouve de la métrite contagieuse équine.

Ces spermes ont été recueillis dans des vagins artificiels et c'est l'évaluation qualitative de la flore présente qui a été effectuée. Dans certains haras nous avons effectué parallèlement des écouvillonnages des organes génitaux externes (fourreau, fosse urétrale, canal urétral) pour la flore de surface.

II. OBSERVATIONS CLINIQUES

Cette enquête a porté sur 235 spermes et 228 écouvillons des mêmes chevaux appartenant à divers haras répartis dans toute la France pendant l'année 1986 et début 1987.

Les prélèvements nous sont envoyés soit pour la recherche de l'étiologie des troubles observés, soit seulement pour des contrôles.

● 38 % des spermes et écouvillons des organes génitaux externes d'étalons nous ont été envoyés dans le cadre de la recherche de la métrite contagieuse équine et lors de suspicion de portage.

— Une ou deux juments de leur harem étaient positives, elles présentaient soit une métrite clinique, soit une infécondité avec retours en chaleurs.

— Un étalon dans un haras était trouvé positif ou suspect, les autres étaient examinés à leur tour.

L'examen bactériologique du sperme est une analyse intéressante dans le cas de portage chronique récidivant (étalon positif plusieurs années malgré les traitements) ou d'étalon suspect.

Le germe, particulièrement fragile (*Hemophilus* ou *Taylorella equigenitalis*), est retrouvé plus facilement dans le sperme qui est un excellent milieu de transport dans la mesure où le prélèvement est acheminé rapidement.

● 62 % des spermes et écouvillons d'étalons nous ont été adressés dans le cadre d'une enquête sur des animaux sains pour contrôler le microbisme et leur portage éventuel d'*Hemophilus equigenitalis*.

Lorsqu'il y avait des problèmes cliniques sur le terrain, les symptômes étaient signalés uniquement sur les juments. Les étalons n'ont jamais présenté de signes cliniques.

Les juments présentaient :

— soit de l'infécondité et les propriétaires demandaient un contrôle bactériologique sur l'animal puis sur l'étalon ;

— soit des symptômes de métrite clinique aiguë ou subaiguë ;

— soit à l'issue d'un retour en chaleur des signes discrets de métrite (le jour de la chaleur) et ces symptômes sont les plus fréquents.

III. ETUDES BACTERIOLOGIQUES

Ces études ont porté sur 12 haras privés ou publics répartis dans toute la France mais particulièrement en Normandie, Bretagne, Lorraine, Bourgogne, Centre, Rhône-Alpes, Sud-Ouest et façade Ouest.

1. MATÉRIEL

235 spermes et 228 écouvillonnages (fourreau, fosse urétrale, canal urétral, liquide prééjaculatoire) ont été étudiés pour ces 12 haras.

Les races des étalons sont très diverses, nous avons un bon échantillonnage des différents animaux. Les spermes provenaient de :

53 : r. Trait Breton	8 : r. Anglo-Arabe
45 : r. Trotteur Français	5 : r. Cob
46 : r. Selle Français	5 : r. Trait Ardennais
34 : r. Pur Sang	5 : r. Welsh
20 : r. Trait Percheron	5 : r. Poney
9 : r. Arabe	

Les spermes sont prélevés en vagin artificiel dont les membranes sont changées pour chaque cheval. Après la collecte, le sperme est placé dans des flacons stériles étiquetés. Les organes génitaux externes de l'étalon sont nettoyés avant collecte. Le premier éjaculat est généralement recueilli.

Les écouvillonnages sont effectués à l'aide d'écouvillons stériles qui sont placés immédiatement après le prélèvement dans des milieux de transport : *milieu de Stuart ou d'Amiès*, le dernier étant à privilégier. Les écouvillons sont étiquetés et le lieu de prélèvement indiqué.

Les prélèvements doivent être acheminés le plus rapidement possible à + 4° C. *Il est souhaitable qu'ils soient adressés dans la journée au laboratoire, impératif dans les vingt-quatre heures ou trente-six heures par les P et T en « Echantillon médical urgent ».*

Certains germes fragiles, tels que l'*Hemophilus equigenitalis*, *Streptococcus equi*, pourraient disparaître lors du transport en raison de la durée de celui-ci ou en raison de la compétitivité entre bactéries.

2. MÉTHODES

Les écouvillonnages et les spermes sont mis en culture dès réception :

- sur gélose Columbia à 5 % de sang de cheval ;
- sur gélose chocolat à 10 % de sang de cheval avec Polyvitex ;
- sur gélose chocolat à 10 % de sang de cheval avec Polyvitex et Streptomycine (200 µg/ml) ;
- sur bouillon enrichi.

Les boîtes de gélose et les tubes de bouillon sont placés en atmosphère ordinaire ou en atmosphère CO² à 37° C pendant 18 à 24 heures.

Les souches sont isolées et identifiées les jours suivants et les boîtes d'ensemencement sont gardées au moins 8 jours pour la recherche de l'agent de la métrite contagieuse.

La caractérisation des souches bactériennes est faite soit par des gammes classiques, soit par des galeries miniaturisées rapides de type Api system ou de type Pseudomonas Pasteur.

- Api 20 E pour les entérobactéries
- Api 20 NE pour les non-entérobactéries
- Api 20 Strept pour les streptocoques
- Api 20 staph pour les staphylocoques

Le pH des spermes est pris et noté dès réception après la mise en culture à l'aide de bandelettes papier « Dosatest » (Prolabo).

Les bactéries du sperme ne sont appréciées que sur le plan qualitatif et non quantitatif.

3. RÉSULTATS

Les écouvillonnages des organes génitaux externes sont très souvent fortement contaminés, particulièrement le fourreau :

— par des germes saprophytes banals : *Bacillus*, *Staphylococcus*, streptocoques fécaux, *Pseudomonas*, *Proteus*, levures ;

— par des germes qui pourraient être potentiellement pathogènes pour la reproduction : *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, streptocoques pathogènes, corynebactéries, *Moraxella*.

Les spermes sont :

- soit stériles, ce qui est très rare, 4/235 dans cette étude,

- soit porteurs
- de germes saprophytes,
- de germes potentiellement pathogènes, dans le cadre de la reproduction, pour l'appareil génital de la jument.

Les germes potentiellement pathogènes sont :

- *Klebsiella pneumoniae*,
- *Streptococcus equisimilis*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Streptococcus zooepidemicus*,
- *Escherichia coli*,
- *Corynebacterium pyogenes*,
- *Hemophilus equigenitalis*.

Les germes saprophytes en général mais pouvant devenir pathogènes accidentels sont :

- *Moraxella uretralis*,
- *Aeromonas hydrophila*,
- *Enterobacter aerogenes*,
- *Enterobacter agglomerans*,
- *Serratia liquefaciens*,
- *Serratia marcescens*,
- *Staphylococcus epidermidis*,
- *Staphylococcus xylosus* 1 et 2,
- *Staphylococcus sciuri*,
- *Staphylococcus hyicus*,
- *Staphylococcus capitis*,
- *Staphylococcus simulans*,
- *Citrobacter freundii*,
- *Acinetobacter lwoffii*.

Certains de ces germes sont retrouvés comme responsables d'avortements chez la jument ; pour les autres germes, quelquefois trouvés en grande quantité, leur rôle est encore inconnu.

Les bactéries telles que les *Bacillus spp*, les streptocoques fécaux, les staphylocoques autres qu'*aureus*, ainsi que les levures et les *Aspergillus* sont retrouvés comme contaminants extérieurs. Ces germes sont beaucoup plus rencontrés sur les organes génitaux externes.

Les *Salmonella*, les *Actinobacillus* ou les *Pasteurella* n'ont pas pu être mis en évidence dans cette étude. Les contaminations par des *Escherichia coli* sont peu fréquentes.

Pour les germes potentiellement pathogènes :

Sur les 235 spermés, les résultats sont :

- 65 spermés contaminés avec *Streptococcus equisimilis*, soit 27,6 % ;
- 53 spermés contaminés avec *Klebsiella pneumoniae*, soit 22,5 % ;
- 44 spermés contaminés avec *Staphylococcus aureus* (staphylslide test +), soit 18,7 % ;
- 13 spermés contaminés avec *Streptococcus zooepidemicus*, soit 5,5 % ;
- 6 spermés contaminés avec *Escherichia coli* (pathogène pour les petits animaux de laboratoire), soit 2,5 % ;
- 12 spermés contaminés avec *Hemophilus equigenitalis* (Taylorella), soit 5,1 %.

Pour les germes saprophytes accidentellement pathogènes :

Sur les 235 spermés, les résultats sont :

- 83 spermés porteurs d'*Acinetobacter lwoffii*, soit 35,3 % ;
 - 25 spermés porteurs d'*Aeromonas hydrophila*, soit 10,6 % ;
 - 26 spermés porteurs d'*Enterobacter agglomerans*, soit 11,0 % ;
 - 17 spermés porteurs de *Serratia liquefaciens*, soit 7,2 % ;
 - 10 spermés porteurs de *Serratia marcescens*, soit 4,2 %.
- *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia liquefaciens* et *marcescens* sont rencontrés dans les avortements de la jument. Le rôle d'*Acinetobacter lwoffii* n'est pas bien connu mais ce germe est retrouvé majoritairement dans les spermés.

Dans le cadre de cette enquête, chez 165 chevaux de 5 exploitations, nous avons pu mettre en évidence que :

- 104 spermés étaient porteurs de germes potentiellement pathogènes avec l'association de germes saprophytes (*Aeromonas*, *Enterobacter* ou *Serratia*), soit 63 % ;
- 75 spermés contaminés avec 1 seul germe pathogène, soit 45 % ;
- 27 spermés contaminés avec 2 germes pathogènes, soit 16,3 % ;
- 2 spermés contaminés avec 3 germes pathogènes, soit 1,2 %.

Nous avons noté les associations de bactéries suivantes :

- *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equisimilis* ;
- *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ;

- *Klebsiella pneumoniae*, *Hemophilus equigenitalis* ;
- *Hemophilus equigenitalis*, streptocoques pathogènes.

Dans l'ensemble de l'enquête :

Les spermés porteurs d'*Hemophilus (Taylorella) equigenitalis* se sont révélés souvent fortement contaminés, particulièrement par des germes pathogènes.

4 spermés sur les 12 positifs avaient une association :

- *Streptococcus equisimilis*,
- *Streptococcus zooepidemicus*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Hemophilus equigenitalis*.

5 spermés sur 12 avaient l'association :

- *Klebsiella pneumoniae*,
- *Hemophilus equigenitalis*,

ce qui étaye l'hypothèse pour laquelle des recherches sont en cours : les animaux porteurs chroniques de l'agent de la métrite sont des sujets plus fragiles et plus réceptifs à des affections bactériennes ou virales.

D'autres éléments recueillis pendant la saison de monte 1986 semblent renforcer cette hypothèse.

Dans un haras nous avons noté la présence dans les spermés d'étalons de *Streptococcus uberis*, germe rare dans l'espèce équine, rencontré plus fréquemment dans l'espèce bovine mais qui provoque des avortements chez la jument, fait que nous avons signalé antérieurement (VAISSAIRE J. et coll., 1985).

Ce haras se trouve d'ailleurs dans une région traditionnellement d'élevage bovin à spéculation laitière.

La présence de streptocoques du groupe E, plus particulièrement pathogène pour le chien et le porc, a été notée dans les spermés d'étalons d'un haras.

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence, au travers des résultats bactériologiques des spermés d'étalons, un microbisme propre aux haras. Un haras est plus contaminé par les *Klebsiella*, un autre l'est plus par l'association staphylocoques-streptocoques pathogènes. D'autres haras par des traitements locaux ou généraux intempestifs ou répétés, ont sélectionné une flore saprophyte des genres *Serratia-Aeromonas-Enterobacter* qui peut devenir dominante.

Certaines règles d'hygiène devraient être plus draconiennes au niveau du personnel intervenant dans les soins au moment de la monte : étalonniers, soigneurs, etc.

Le pH des spermés est compris entre 6,7 et 8,0, le plus souvent entre 7,0 et 7,7, et correspond à ceux requis par la majorité des germes pour les cultures, ce qui explique aussi l'importante contamination quelquefois retrouvée.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les spermés d'étalons semblent, dans l'ensemble, assez contaminés et le taux d'animaux porteurs est important.

La contamination bactérienne quantitative n'a pu être appréciée, mais des travaux sont en cours.

Les prélèvements de sperme doivent s'effectuer dans de très bonnes conditions de collecte. La verge de l'étalon doit être lavée, rincée et séchée avant et après le premier éjaculat. Les cultures bactériennes d'un deuxième éjaculat devraient être faites pour mieux évaluer le type de contamination des spermés. Dans cette étude les spermés correspondaient soit à un premier éjaculat, soit à un second. Pour les mêmes haras, les degrés moyens de contamination n'ont pas beaucoup varié suivant l'éjaculat.

La corrélation entre l'importance des contaminations et le taux de fécondité est en cours aussi. Dans cette enquête, les haras examinés n'ont pas des étalons dont les taux de fécondité sont très élevés mais en général très moyens (entre 50 et 60 %). Le microbisme génital des juments qui viennent à la monte est aussi très variable.

Il faudrait veiller à des soins attentifs pour chaque étalon, mais les juments avant la saillie devraient être mieux contrôlées et devraient arriver indemnes de germes potentiellement pathogènes. Toute jument présentant des écoulements vaginaux, même peu abondants, devrait être refusée à la monte.

Avec des précautions minimales et somme toute normales, le taux de microbisme devrait chuter, entraînant une remontée du taux de fécondité et une baisse des avortements d'origine bactérienne en fin de gestation.

Les haras qui appliquent ce genre de discipline aidés par les vétérinaires, les étalonniers et les propriétaires ont de très bons résultats et peu de problèmes de reproduction liés au microbisme.

Il faut se rappeler que, si les spermés sont porteurs de divers germes pathogènes, le tractus génital de la jument, dont le col utérin est largement ouvert au moment de l'œstrus, sera fortement contaminé.

Si la jument est en parfaite condition, elle éliminera rapidement ces germes du fait que ses défenses générales et locales seront très bonnes.

Le pH vaginal est normalement de 8 à 10 et permet aussi l'élimination de la plupart des germes potentiellement pathogènes.

Si la jument, du fait de son âge élevé, de nombreux poulinages antérieurs, de déséquilibres hormonaux, lutte mal contre cet apport exogène de germes, on assistera aux troubles de la reproduction : métrites, infécondité, avortements, etc.

Il faut se rappeler aussi que ces germes pathogènes présents lors de la saillie, s'ils n'empêchent pas la fécondation, s'ils ne provoquent pas l'avortement, font peser une menace sur l'avenir économique du produit par des problèmes sanitaires à la naissance ou dans les premiers mois de la vie (troubles respiratoires, septicémie, arthrites, diarrhées, etc.).

REMERCIEMENTS

Nous remercions très vivement les Directeurs ou Propriétaires de Haras publics ou privés ainsi que leur personnel, nos Confrères praticiens ainsi que certains Directeurs des Laboratoires Départementaux des Services Vétérinaires qui nous ont aidés dans la réalisation de ce travail par l'envoi de prélèvements.

BIBLIOGRAPHIE

- ASBURY (A.C.), 1983. — Bacterial endometritis. In Current therapy in equine medicine by Robinson E., Saunders Company W.B., 410-414.
- ATHERION (J.G.), 1975. — The identification of equine genital strains of Klebsiella and Enterobacter species. *Equ. Vet. J.*, 7, 207-209.
- COLAHAN (P.T.), PEXTON (L.C.), CONNELLY (M.R.), PETERSON (R.) (1984). — Serratia spp infection in 21 horses. *J.A.V.M.A.*, 185, 2, 209-211.
- HURTGEN (J.P.) (1983). — Disorders affecting stallion fertility. In : Current therapy in equine medicine by Robinson E. Saunders Company W.B., 443-455.
- LOVE (R.J.), COVE (D.N.) (1984). — Aeromonas hydrophila isolated from polyarthrititis in a calf. *Austr. Vet. J.*, 61-65.
- MANSMANN (P.), ALLISTER (E.S.), PRATT (P.W.) (1982). — In equine medicine and surgery 1 3rd edition American veterinary Publication Drawer kk. Santa Barbara Colifornia, 374-376, 734-737.
- ROSSDALLE (P.D.), RICKETTS (S.W.) (1974). — In the Practices of equine Stud. medicine. Baillière Tindall, London, 220-227.
- SHAFTOE (S.) (1984). — Serratia marcescens, Septicaemia in a neonatal Arabian foal. *Equ. Vet. J.*, 16 (4), 389-392.
- SMITH (R.E.), REYNOLDS (I.M.) (1970). — Serratia marcescens association with bovine abortion. *J.A.V.M.A.*, 157, 1200-1203.
- VAISSAIRE (J.), PLATEAU (E.), LAROCHE (M.), MIRIAL (G.) (1985). — Importance des Streptocoques dans les troubles de la reproduction chez la jument. Données actuelles. *Bull. Acad. Vét. de Fr.*, 58, 131-138.
- VAISSAIRE (J.), PLATEAU (E.), LAROCHE (M.), MIRIAL (G.). — *Aeromonas hydrophila* : importance dans les avortements de la jument (sous presse). *Bull. Soc. Vét. Prat. Fr.*

- VAISSAIRE (J.), PLATEAU (E.), COLLOBERT-LAUGIER (Cl.), LAROCHE (M.), MIRIAL (G.) (1986). — Importance des affections microbiennes dans l'infécondité et les avortements chez la jument : étude rétrospective sur 3 ans. 12^e Journée d'étude, CEREOPA, 12 mars 1986.
- VASSAIRE (J.), PLATEAU (E.), COLLOBERT-LAUGIER (Cl.) (1986). — Emergence de bactéries dites saprophytes des genres *Aeromonas*, *Enterobacter* (*Erwinia*) et *Serratia* dans les avortements bactériens chez la jument. *Bull. Acad. Vét. de France*, 59, 113-122.
- VAISSAIRE (J.), PLATEAU (E.), COLLOBERT (Cl.) (1986). — La métrite contagieuse équine. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France*, avril 1986, R. 70, n° 4, p. 209.
- VAISSAIRE (J.), PLATEAU (E.), COLLOBERT-LAUGIER (Cl.) (1986). — Importance du microbisme dans les spermes d'étalons. 13^e Journée d'Etude, CEREOPA, 11 mars 1987, 70-79.
- WOHLGEMUTH (K.), PIERCE (R.L.), KIRKBRIDE (C.A.) (1972). — Bovine abortion associated with *Aeromonas hydrophila*. *J.A.V.M.A.*, 160, 1001-1002.
-