

COMMUNICATIONS

Syndrome d'agalaxie contagieuse à *Mycoplasma mycoides subsp. capri*

Nouvelles observations

par P. PERREAU

avec la collaboration technique de A. BREARD,
C. BRIÈRE et C. LEGOFF

En 1972 et dans le département de la Charente-Maritime, une souche de mycoplasme pathogène étroitement apparenté à l'espèce *M. mycoides subsp. capri* avait été isolée à partir d'un lait de chèvre atteinte de mammite (PERREAU, TRAM CUONG et VALLÉE, 8). Celle-ci, très contagieuse dans le troupeau où elle sévissait, était accompagnée de l'évolution d'arthrites graves et le syndrome ne manquait pas d'évoquer l'agalaxie contagieuse, encore qu'il fût incomplet.

Le résultat de ce diagnostic microbiologique, pour le moins inattendu, avait fait naître la question suivante : s'agissait-il d'une pathologie ignorée ou d'un accident d'importation récente, car ce mycoplasme est l'agent officiel de la pleuropneumonie contagieuse, maladie alors inconnue en France ?

L'objet de cette note est justement de tenter de répondre à cette question, avec un recul d'une année, en même temps que de mieux définir cette mycoplasmosé, sur les plans clinique, épizootiologique et microbiologique.

(*) Nos vifs remerciements s'adressent à nos confrères L. CHEVRIER, du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires ; B. GARCIN, de COUHERVERAC ; A. CHOBERT, de MONTARGIS.

En effet, deux nouveaux foyers ont été observés en 1973, dans les départements de la Vienne et du Loiret et des prélèvements soigneux accompagnés de commémoratifs assez précis * nous permettent aujourd'hui d'apporter des renseignements plus complets sur cette affection.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *Prélèvements* :

Ce sont des laits de mammite, des liquides inflammatoires contenus dans les articulations infectées et des sérums. Ils proviennent aussi bien de chèvres adultes que de chevreaux, en phase aiguë de la maladie ou en début de forme chronique.

2. *Techniques microbiologiques* : déjà décrites (8).

Les tests d'identification sont les mêmes ; mais à l'hydrolyse du glucose, nous avons ajouté les tests d'hydrolyse de l'urée et de l'arginine et la réduction du chlorure de triphenyletrazolium.

Il n'y a pas de problème de culture, car ces souches se multiplient aisément sur les milieux classiques.

3. *Techniques sérologiques* : déjà décrites également (8), mais la méthode de fixation du complément a été abandonnée comme moyen d'identification des antigènes.

Le test d'inhibition de croissance sur milieu solide par la méthode des disques ne donnant que des résultats partiels à cause de son peu de sensibilité, le test d'inhibition du métabolisme lui a été substitué. Il a utilisé l'hydrolyse du glucose, très rapide avec ces souches, selon la méthode en microplaque (système Cooke) préconisée par le Centre de Référence pour les mycoplasmes des animaux, à Aarhus au Danemark.

La recherche des anticorps dans le sérum des malades s'est effectuée exclusivement par un test d'agglutination lente en tubes : à une série de dilutions du sérum allant de 1/10 à 1/2560 (volume unitaire de 0,4 ml dans chaque tube), on ajoute un égal volume d'un antigène constitué par une suspension de mycoplasmes dont l'opacité est ajustée au tube n° 2,5 de l'échelle de Brown. Il s'agit de germes dont la culture n'a pas excédé 72 heures afin d'éviter les agrégats spontanés et qui ont été

soigneusement lavés par centrifugation dans le P. B. S. de Dulbecco (pH : 7,2). Ce même tampon sert de diluant aussi bien pour les sérums que l'antigène.

La lecture est faite après 18 heures de séjour des tubes à 37 °C ; le simple examen à l'œil nu doit être complété par un examen des tubes au stéréomicroscope.

4. *Technique biochimique* : électrophorèse en gel de polyacrylamide selon la méthode originale de Razin (10).

5. *Antibiogrammes* :

L'antibiogramme des souches isolées a été effectué pour la raison suivante ; à plusieurs reprises, des échecs thérapeutiques nous avaient été rapportés, assez inexplicables puisqu'ils mettaient en cause des antibiotiques dont l'activité sur les mycoplasmes est parfaitement démontrée.

Le test retenu s'exécute en milieu liquide ; sa lecture est facilitée par l'introduction dans le milieu de glucose à 0,5 p. 100 et de rouge de phénol à 0,025 p. 1000, ce qui en fait un test coloré d'interprétation rapide étant donné la haute activité métabolique de ces souches.

La dilution des antibiotiques est faite directement dans le milieu de culture et pour chacun d'eux on a disposé d'une gamme de concentrations décroissantes allant de 25 µg/ml à 0,05 µg/ml, obtenues par dilution, avec des volumes *ad hoc* de milieu, d'une solution-mère titrant 0,5 ou 1 mg/ml et dont on avait préparé un grand volume (50 à 100 ml) pour donner à la pesée une précision satisfaisante.

Les antibiotiques choisis, réputés pour être actifs sur les mycoplasmes, appartiennent au groupe des tétracyclines : tétracycline (chlorhydrate), oxytétracycline (chlorhydrate) et chlortétracycline (chlorhydrate) et au groupe des macrolides : erythromycine (glutamate), spiramycine (adipate) et tylosine (tartrate).

Ces dilutions sont réparties en séries à raison de 2 ml par tube ; l'inoculum distribué est uniformément de 0,025 ml d'une culture de la souche à étudier, âgée de 2 jours et diluée au 1/10.

Deux lectures sont effectuées après 24 et après 48 heures de séjour à 37° et comparativement avec des tubes témoins sans antibiotiques.

6. Souches de mycoplasmes :

a) de référence : *M. mycoides subsp. capri*, souches Pg 3, OSB 42 et Farcha ;

b) examinées : la première décrite (IPX) originaire de Charente-Maritime a été reprise ici, comparativement avec les souches Vienne et Loiret. En cours d'étude, deux autres souches reçues fortuitement au laboratoire, mais isolées de lésions pulmonaires de chèvre, leur furent associées dans les mêmes examens (souches Limoges et Lisbonne).

RÉSULTATS

A. — Observations cliniques

Les commémoratifs fournis par nos confrères du Loiret et de la Vienne indiquent que dans un troupeau la maladie commence toujours par un premier cas de mammite chez une chèvre adulte, au moment de l'entrée en lactation ou peu après l'introduction d'animaux étrangers dans l'exploitation. La contagion est ensuite rapide ; elle touche les adultes et les jeunes.

Chez les chèvres adultes, l'infection atteint non seulement la mamelle, mais provoque aussi des arthrites et des lésions oculaires ; l'association de ces diverses localisations n'est pas obligatoire. Des femelles en gestation avortent.

Les chevreaux sont très sévèrement atteints ; l'ingestion de lait virulent constitue pour eux un mode d'infection inexorable. C'est ainsi que, dans un des foyers du Loiret, un lait de pré-mammite, d'aspect presque normal, mélangé à d'autres laits et distribué à onze chevreaux nourris artificiellement, provoqua leur mort en peu de jours ; les uns succombèrent à une forme septicémique accompagnée de signes méningés, les autres atteints de kératite et d'arthrites graves, en decubitus définitif en dépit d'un traitement intensif aux antibiotiques, durent être sacrifiés.

Tout ce syndrome, sur lequel nous n'insisterons pas, est celui, parfaitement classique, de l'agalaxie contagieuse tel qu'on peut le trouver décrit dans des traités déjà anciens (2).

B. — Résultats d'ordre microbiologique

A partir des laits de mammite et des liquides d'arthrite, furent isolées simultanément et dans chaque foyer des souches de mycoplasmes qui, après examen approfondi, se révélèrent abso-

lument identiques entre elles, chacune pouvant être considérée comme représentative du lot ; identiques aussi à la souche isolée l'année précédente dans le foyer de Charente-Maritime.

D'une façon très homogène, elles ne produisent ni « films » ni « spots » sur les milieux à 20 p. 100 de sérum de cheval, contrairement aux souches de *M. agalactiae*. Toutes fermentent rapidement le glucose (en 24 heures) avec un pH d'arrêt remarquablement constant compris entre 5,25 et 5,4 et réduisent le chlorure de triphényltétrazolium ; aucune n'hydrolyse l'arginine et l'urée.

L'homogénéité structurale de ces souches se caractérise par un schéma électrophorétique unique, avec concordance absolue de toutes les bandes, en gel de polyacrylamide ; il est extrêmement voisin de celui des souches de référence de *M. mycoïdes subsp. capri*.

Les tests sérologiques d'identification confirment l'identité des souches de la Charente-Maritime, du Loiret et de la Vienne : les immunosérums préparés avec chacune d'elles fournissent des titres identiques dans les réactions croisées d'agglutination et d'immunofluorescence. Enfin, en immuno-diffusion en milieu gélifié, apparaît un ensemble constant de 6 lignes de précipitation, pour chacun des antigènes traités aux ultra-sons.

Ces mêmes tests démontrent l'appartenance au groupe *capri* :

- les sérums anti-Pg 3 et anti-OSB 42 agglutinent ces souches à 1/320 en moyenne, avec un décalage ordinaire de 3 dilutions par rapport au titre homologue (1/2560) ;
- en immunofluorescence indirecte, ces mêmes sérums employés à leur dilution-limite de brillance maximum sur l'antigène homologue se montrent positifs au même titre sur les frottis des souches étudiées, si bien que ce test les identifie davantage au groupe *capri* que l'agglutination en tubes.
- en précipito-diffusion, cette parenté antigénique se révèle par l'existence de trois systèmes précipitants communs aux souches de référence Pg 3 et OSB 42 et aux souches de France, dont un majeur provoque l'apparition d'un hexagone régulier dans les boîtes de Petri contenant 6 antigènes autour du sérum central ;
- en inhibition du métabolisme, des résultats particulièrement significatifs ont été obtenus avec un sérum anti-souche Vienne qui a inhibé au même titre de 1/128 l'hydrolyse du glucose par les souches Charente-Maritime, Loiret et Pg 3 tandis que le titre homologue atteignait 1/1024.

D. — Résultats des antibiogrammes

Ils sont colligés dans le tableau joint : pour chaque antibiotique et pour chaque souche examinée, deux concentrations sont indiquées : la première est inhibitrice après 24 heures d'incubation, la seconde après 48 heures.

Dans tous les cas, les tubes témoins sans antibiotiques et ensemencés de la même façon virent en moins de 24 heures, avec une culture abondante ayant atteint son pH d'arrêt (5,25 à 5,4) ; l'inhibition de la culture par les antibiotiques est caractérisée non seulement par la limpidité du milieu, mais aussi et surtout par un pH intact (7,6).

Concentrations minimums inhibitrices (C. M. I.) en $\mu\text{g/ml}$ pour les souches étudiées

Antibiotiques	Souches de Mycoplasmes									
	Pg 3		Charente Maritime		Vienne		Loiret		Limoges	
Tétracycline	0,25	- 0,5	0,25	- 0,5	0,25	- 0,5	0,1	- 0,25	0,25	- 0,5
Chlortétracycline	0,5	- 10	1	- 10	0,5	- 10	0,25-10		1	- 10
Oxytétracycline	0,5	- 5	0,5	- 10	1	- 10	0,5 - 10		0,5	- 10
Erythromycine	0,1	- 0,5	0,1	- 0,1	0,1	- 0,1	0,05- 0,1		0,1	- 0,1
Spiramycine	0,5	- 2	0,1	- 1	0,5	- 1	0,1 - 1		0,1	- 1
Tylosine	0,1	- 0,1	0,1	- 0,1	0,1	- 0,1	0,1 - 0,1		0,1	- 0,1

Pour chaque antibiotique et chaque souche, deux C. M. I. sont indiquées, l'une 24 heures, l'autre 48 heures après le virage de la culture témoin.

Les chiffres indiqués sont les moyennes des résultats de trois séries identiques d'antibiogrammes.

Ces résultats peuvent se résumer ainsi ; *in vitro*, et sans qu'on puisse extrapoler à ce qui se passe *in vivo*, les antibiotiques étudiés peuvent se classer selon leur activité en trois groupes :

a) la tylosine et l'érythromycine semblent les plus efficaces avec des concentrations minimums actives de l'ordre de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, très stables pendant les premières 48 heures ;

b) ensuite viennent la tétracycline et la spiramycine, avec une concentration moyenne active légèrement plus élevée, mais de l'ordre de 1 $\mu\text{g/ml}$ au bout de 48 heures ;

c) enfin la chlortétracycline et l'oxytétracycline apparaissent moins efficaces, avec des concentrations minimums inhibitrices de 0,5 à 1 $\mu\text{g/ml}$ durant le premier jour, qui atteignent et parfois dépassent 10 $\mu\text{g/ml}$ à la 48^e heure.

Si on s'en tient à la lecture faite au terme des premières 24 heures, on voit que ces différences s'effacent notablement et que seules l'oxytétracycline et la chlortétracycline se singularisent par une concentration active nettement plus élevée que celle des quatre autres antibiotiques.

Il est à souligner que ces concentrations sont *bactériostatiques* car, si l'on prolonge l'incubation des tubes à l'étuve jusqu'à 5 jours, le nombre des tubes positifs s'accroît de jour en jour, partant des concentrations faibles pour aller vers les plus élevées. Ce phénomène qui correspond à la fois à la dénaturation progressive des antibiotiques et à une adaptation des souches est particulièrement net avec la chlortétracycline, l'oxytétracycline et la spiramycine.

L'apparition de vrais mutants résistants n'a été observée qu'avec l'érythromycine ; en effet, dès le 3^e jour, des cultures positives apparaissent de façon anarchique dans la gamme des concentrations, à 2,5 $\mu\text{g/ml}$ par exemple alors qu'il n'y a toujours rien à 0,5 et 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Repiquées immédiatement, ces cultures « anormales » repartent sans aucun délai sur le même milieu contenant 10 $\mu\text{g/ml}$ d'érythromycine, ce qui représente une concentration 100 fois supérieure à celle qui inhibe régulièrement durant les premières 48 heures la multiplication des mêmes mycoplasmes.

En conclusion, il apparaît bien que la sensibilité de ce groupe de souches aux antibiotiques habituellement employés dans la thérapeutique des mycoplasmoses animales est d'une part très homogène et d'autre part tout à fait conforme aux connaissances déjà acquises (3, 5, 6, 7 et 11).

Les échecs de traitement enregistrés ne doivent certainement pas trouver leur explication dans une antibiorésistance des souches, mais doivent être imputés plutôt à des sous-dosages d'antibiotiques ou à des interventions trop tardives.

On sait aussi que les chèvres traitées avec succès lors d'une première atteinte ne sont pas *microbiologiquement stérilisées* et deux cas au moins de récidence, l'un après dix mois, l'autre après treize, nous ont été signalés.

E. — Résultats d'ordre sérologique

Cette infection entraîne l'apparition d'anticorps spécifiques décelables par l'agglutination, après un temps d'évolution assez bref qui peut être évalué à une douzaine de jours.

Les titres des dix sérums de chèvres adultes, que nous avons pu examiner en utilisant la méthode citée, étaient les suivants : 2 à 1/640, 2 à 1/320, 2 à 1/160, 2 à 1/80, 1 à 1/40. Le sérum d'un chevreau immobilisé par des arthrites atteignait 1/2560.

Il nous semble que les titres égaux ou supérieurs à 1/100 sont à considérer comme significatifs si les agglutinats sont nets, c'est-à-dire avec un éclaircissement total du surnageant.

L'intérêt de ce test n'existe qu'à l'échelon du troupeau, comme dans la plupart des mycoplasmoses ; il permet un diagnostic rétrospectif dans les quelques semaines qui suivent l'apparition d'un foyer, lorsqu'aucun prélèvement n'a pu être effectué ou lorsque l'antibiothérapie a éliminé les mycoplasmes du lait ou des liquides articulaires.

En aucun cas, il ne peut servir à déceler des porteurs de germes et notamment les chèvres guéries depuis plusieurs mois qui peuvent héberger encore des mycoplasmes infectieux, dans leurs ganglions mammaires notamment, des mois après leur guérison clinique. A noter que la fixation du complément s'est révélée infructueuse avec ces mêmes sérums de chèvres infectées.

Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux de BAHARSEFAT et YAMINI (1) qui, au terme d'une étude sur les possibilités de diagnostic sérologique de l'agalaxie contagieuse vraie (à *M. agalactiae*), ont conclu à la nette supériorité de l'agglutination en tubes sur la fixation du complément dont les titres étaient toujours nuls ou très bas, aussi bien dans les infections naturelles que dans les infections expérimentales. Ces mêmes auteurs estiment toutefois que la méthode la plus sensible est le test à l'antiglobuline ; les titres obtenus, bien que parallèles à ceux de la simple agglutination, sont en effet nettement supérieurs à ces derniers.

COMMENTAIRES ET CONCLUSIONS

Il existe donc en France un syndrome d'agalaxie contagieuse dû à des souches de mycoplasmes, rigoureusement identiques dans les trois foyers étudiés et dont l'apparement à l'espèce *M. mycoides subsp. capri* ne fait aucun doute.

Cette espèce est l'agent de la pleuropneumonie contagieuse de la chèvre et on peut donc trouver curieux que cette forme clinique soit toujours inconnue dans notre pays.

Depuis plusieurs années, à chaque fois que nous avons pu disposer de lésions pulmonaires de chèvre, quel que soit d'ailleurs le contexte clinique et même s'il ne s'agissait que de simples trouvailles d'autopsie, nous avons cherché systématiquement à isoler des mycoplasmes dans l'espoir de retrouver ces souches d'« agalaxie » au niveau des poumons, mais en vain. Toutefois *M. arginini* et des souches apparentées à *M. dispar* (9), hôte habituel de l'arbre respiratoire des bovins ont été identifiés.

Une seule souche (Limoges), isolée d'une lésion circonscrite de pneumonie lobaire ancienne, s'est révélée sérologiquement apparentée à la sous-espèce *capri*, par le moyen des tests d'agglutination, d'immunofluorescence et de précipito-diffusion ; en dépit de l'identité des antigènes de surface, elle ne peut lui être complètement assimilée pour trois raisons au moins : elle hydrolyse l'arginine après une adaptation de quelques jours, son métabolisme n'est pas inhibé par les anti-sérums des souches de la variété *capri* ni par ceux des souches françaises d'« agalaxie », enfin sa structure protéique révélée par l'électrophorèse diffère sensiblement de celle commune aux autres mycoplasmes étudiés ici.

Jusqu'à maintenant donc, ces souches de la Charente-Maritime, de la Vienne et du Loiret sont représentatives d'un variant de la sous-espèce *capri* dont le tropisme semble exclusif vers la mamelle, l'utérus gravide, les synoviales articulaires et l'œil.

Il faut aussi ne pas oublier qu'en France le syndrome d'agalaxie contagieuse peut être provoqué par d'autres souches que celles-là.

L'agalaxie contagieuse vraie à *M. agalactiae* peut être introduite, au moins de temps à autre, dans les pâturages pyrénéens à partir du territoire espagnol comme le relate une thèse récente de doctorat vétérinaire (4) consacrée à l'étude d'une enzootie qui dura trois années (1966, 1967, 1968) au pays basque. En fait, il ne semble pas que la souche responsable ait été isolée et identifiée par les moyens microbiologiques actuels, tant et si bien qu'on ne sait pas s'il s'agissait réellement de *M. agalactiae* ; la chose est cependant très probable, étant donné que la maladie y sévissait exclusivement chez les brebis.

Enfin, signalons qu'en Touraine, dans un troupeau de chèvres atteintes d'une mammite contagieuse grave, nous avons isolé un

mycoplasme pathogène, parfaitement distinct de *M. agalactiae* comme de *M. mycoides subsp. capri*.

Il nous apparaît donc comme d'un grand intérêt, sur le plan épizootiologique, de parfaire cet inventaire des mycoplasmoses des petits ruminants en France, afin de les combattre plus efficacement.

BIBLIOGRAPHIE

1. BAHARSEFAT (M.) et YAMINI (B.). — *Mycoplasma agalactiae*. III. — The comparison of different serological tests with *M. agalactiae* antigen. *Arch. Inst. Razi.*, 1968, **20**, 43-48.
2. BRIDRE (J.). — Agalaxie contagieuse, in Les ultravirus des maladies animales, par C. LEVADITI, P. LÉPINE et J. VERGE, Librairie Maloine, Paris, 1938.
3. EL NASRI (M.). — The effect of tylosin against experimental and natural infection with *Mycoplasma* in goats. *Vet. Rec.*, 1964, **76** (32), 876-77.
4. MASSOT (D.). — Contribution à l'étude de l'agalaxie contagieuse une enzootie dans le pays basque. Thèse Doctorat Vétérinaire n° 60, Toulouse, 1973.
5. MORENO HERNANDEZ (F. A.). — Sensitivity to tylosin of ten strains of *Mycoplasma agalactiae*, isolated from cases of contagious agalactia of sheep and goats in Spain. *Zootechnica*, 1972, **21** (11-12), 485-497.
6. NEWNHAM (A. G.) et CHU (H. P.). — An in vitro comparison of the effect of some antibacterial, antifungal and antiprotozoal agents on various strains of *Mycoplasma* (pleuropneumonia-like organisms : P.P.L.O.). *J. Hyg. Camb.*, 1965, **63** (1), 1-23.
7. NICOLET (J.) et DE MEURON (P. A.). — Sensibilité « in vitro » des mycoplasmes bovins et plus spécialement des mycoplasmes pathogènes du veau à l'adipate de spiramycine. *Cah. Méd. vét.*, 1970, **39**, 13-16.
8. PERREAU (P.), TRAM CUONG et VALLÉE (A.). — Isolement d'un mycoplasme du groupe *Mycoplasma mycoides var. capri* à partir d'un lait de mammité chez la chèvre. *Bull. Acad. vét.*, 1972, **45** (3), 109-116.
9. PERREAU (P.). — Mycoplasmes de la chèvre apparentés à l'espèce *Mycoplasma dispar*. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1973, **26** (1), 13-25.
10. RAZIN (S.). — *Mycoplasma* taxonomy studied by electrophoresis of cell proteins. *J. Bact.*, 1968, **96** (3), 687-94.
11. SPAIS (A.) et GIANTZIS (N.). — Research on the effectiveness of erythromycin and spectinomycin in contagious agalactia of sheep and goats under field conditions. *Kten. Nea, Thessaloniki*, 1970, **2**, 107-109.