

ETUDE SUR L'AGALAXIE CONTAGIEUSE DES CHEVRES ET DES MOUTONS

par

G. Bory et F. Entessar

PARTIE I

En vue de préparer un vaccin contre l'Agalaxie contagieuse des chèvres et des moutons (A. C.) nous nous sommes livrés à une étude préliminaire concernant la morphologie et la biologie de quatre souches de capromyces agalactiae (C. A.) disponibles dans la collection de notre Institut.

Les Souches.

La souche C. est isolée d'un mouton à Hessarak, Iran, en décembre 1954. Son pouvoir pathogène contrôlé lors de son isolement sur six moutons, a provoqué chez cinq animaux des symptômes caractéristiques de la maladie sans aucune mortalité.

Souche Evron (E).

Isolée du lait d'un mouton en mars 1955 à Tel-Aviv, Israël.

Souche (86).

Isolée du testicule d'un bouc à Tel-Aviv en décembre 1955. Les deux souches palestiniennes nous étaient envoyées en beuillon Martin, contenant 15% de sérum bovin inactivé. Le pouvoir pathogène nous était inconnu.*

(*) *Les souches palestiniennes nous étaient envoyées par la bienveillance de l'Institut Veterinaire du Ministère de l'Agriculture (Tel-Aviv), pour lesquelles nous exprimons nos remerciements.*

Souche Ghala-Morghi (G. M.).

Isolée du lait des brebis dans un troupeau près de Téhéran en 1959.

Les milieux.

Nous avons utilisé dans nos études les milieux suivants:

Bouillon sérum (B. S.)

Bouillon sérum pénicilliné (B. S. P.)

Gélose sérum (G. S.)

Gélose sérum pénicilliné (G. S. P.)

La base de ces milieux était un bouillon peptone préparé avec de la viande de bœuf ou de veau. Le sérum ajouté au milieu était le même sérum du cheval en proportion de 18-20% sans inactivation, filtré, sur Seitz EK filtre. La pénicilline était de la sodium pénicilline G cristalline, ajoutée au milieu en proportion de 100, 200, 500, et 1000 unités par cc.

Milieux liquides.

La nature de la viande.

Nous avons préparé des milieux liquides avec le cœur du veau, la viande du veau, la viande du bœuf et le cœur du bœuf avec un PH 7.4.

Ces quatre bouillons sont repartis dans des tubes en raison de 10 cc. par tube et on les aensemencés avec 0.2 cc. de culture de souche 86. Au sixième jour de la culture une quantité égale était anlevée de chaque tube et remise à centrifuger dans des tubes Hapkin (4500 tours, 30 minutes). Le sédiment déposé dans la partie capillaire des tubes était si minime, qu'il n'était pas mesurable par le jaugage des tubes et on ne pouvait déceler aucune différence quantitative des sédiments. Après cette expérience, et en raison de la facilité de l'opération nous avons décidé pour la culture des souches de C. A. l'utilisation d'un bouillon préparé avec la viande du bœuf.

Dans ce milieu une semence donnait un résultat positif en général dans 48 heures. Avec un ensemencement abondant nous avons obtenu mainte fois une culture positive après 16-18 heures d'incubation. En agitant une culture devant une source lumineuse, il n'était pas difficile de reconnaître une ondulation soyeuse, très fine.

Adjonction de la levure.

L'expérience était faite avec des B. S., auxquels nous avons ajouté une préparation commerciale de levure (Bacto Yeast Extract Difco en proportion de 0.25%; 1% et 5%. L'extrait était ajouté aux milieux après

filtration sur Seitz E. K. Après six jours de culture de chaque tube 10 cc. de culture était enlevé et centrifugé dans des tubes à centrifugation cônica (4500 tours 30 minutes). Dans les milieux contenant de levure en raison de 1 et 5%, le sédiment était visiblement supérieur par rapport aux tubes, qui ne contenaient pas de levures. D'ailleurs la poussée nette du germe dans ce milieu se manifestait par l'apparition précoce sur la surface de ce milieu d'une pellicule, formée dès le 4^e ou 5^e jour, tandis que dans un B. S. non levuré la formation de la pellicule se manifeste après 7-8 jours parfois encore plus tard.

La formation des pellicules sur la surface de nos cultures en B. S. simple était assez régulière après 7-10 jours de culture et elle se présentait sous deux aspects:

a) Une couche mince, mate, fragile, étendue sur la surface de milieu liquide. En agitant le tube, la pellicule se casse et nage sur la surface du milieu en forme de petits îlots.

b) Quelques fois la pellicule se présente sous la forme de micelles minuscules flottant sur la surface du milieu près des parois du tube.

Le PH des milieux

Au commencement de nos recherches les bouillons étaient préparés avec un PH 7.2 à 7.4, plus tard avec PH 7.8 à 8. Dans ces derniers milieux la tamponnage des bouillons avec phosphate mono ou disodique est nécessaire. Sur la surface des bouillons fortement alcalins nous n'avons jamais vu la formation des pellicules, alors qu'elles apparaissaient régulièrement sur les cultures ayant le PH 7.2-7.4, même en cas de souillure de la culture.

Le sérum dans les milieux.

Le microbe de C.A. exige un milieu riche en matière protéinique; la seule source d'énergie de ces microbes sont les acides aminés. Pour satisfaire cette exigence du microbe, divers auteurs ont expérimenté des milieux riches en matière protéinique, contenant du sang, du sérum sanguin, des liquides ascitiques, des hémoglobines, des matières lipidiques, comme l'extrait lipidique de jaune d'oeuf.

Le milieu synthétique de Smith (1954) contient une grande quantité d'acides aminés, quelques sels minéraux, des enzymes, de la lécitine, du cholestérol et un facteur lipoprotéinique. Le milieu Difco B. 441 est une fraction de sérum coagulable par la chaleur. (Taylor, Fabricant 1957). D'autres ont expérimenté un bouillon embryonné et un bouillon additionné de cholestérol. Dans ces deux derniers milieux quelques souches de P.P.L.O.

poussent, d'autres ne se cultivent pas.

Parmi tous ces milieux le plus simple est le bouillon additionné de sérum filtré de cheval à PH élevé. Dans ce milieu nos quatre souches ont donné à toute occasion une culture positive. Mais l'emploi du sérum présente parfois un inconvénient à cause de la souillure ultérieure des milieux.

La substitution au sérum d'un liquide sérique non coagulable par la chaleur

Pour remplacer le sérum dans le milieu nous avons expérimenté un liquide d'origine sérique, que nous avons obtenu par coagulation du sérum du cheval dans l'autoclave (110° C). Ce liquide, dépourvu des protéines coagulables du sérum était une sérosité opaque, mais il se laissait clarifier par centrifugation et ce centrifugat a donné la réaction de biuret positive. Cette sérosité était utilisé comme milieu à l'état pur et en ajoutant aux bouillons normaux en proportion de 10, 25, 50 et 75%. Ces milieux encencés avec les quatre souches, n'ont pas donnés des cultures positives.

La substitution du serum par un extrait embryonnaire du poulet.

Ce milieu était préparé par Lecce et Stinebring (1953) et ajouté pour la culture de P.P.L.O. humaine aux milieu tissulaires. Adler et Yamamoto (1957) ont élaboré un milieu embryonné pour la culture de la souche aviaire de P.P.L.O. Ce dernier milieu était une suspension de tissus embryonnaires hachés et stérilisés sur 100°C pendant 20 minutes.

Pour la culture de C.A. nous avons préparé les milieux embryonnés suivant trois variantes.

- 1) Bouillon de viande du boeuf PH 7.3, auquel était ajouté l'embryon haché en proportion de 0.5%.
- 2) Le même bouillon avec 0.5% de glucose et 0.5% de maltose, additionné d'embryon haché à 3%.
- 3) Le même bouillon sans sucres avec embryon haché en proportion de 5, 10 et 20%.

L'embryon haché était ajouté à la viande hachée et le bouillon était préparé avec ce mélange, parce que la consistance visqueuse de la viande hachée embryonnée rend pratiquement impossible sa filtration.

Résultat: le 2 ème et 3 ème variantesensemencées ont donné des cultures positives (sur 7 ensemencements 5 cultures positives). La première variante restait toujours négative. Par conséquent la C.A. est cultivable dans certains bouillons embryonnés sucrés et non sucrés, si la proportion de tissu embryonné est au moins de 3%. Du point de vue industriel ces milieux ne sont ni économiques ni pratiques.

L'incertitude concernant le succès de l'ensemencement d'une part, d'autre part la grande quantité d'embryon nécessaire pour la préparation massive du milieu (pour un litre de bouillon environ 15 embryons sont nécessaires), rendent ce milieu impropre à servir comme milieu de base pour la préparation de vaccin en grande quantité.

L'incertitude concernant le succès de l'ensemencement d'une part, d'autre part la grande quantité d'embryon nécessaire pour la préparation massive du milieu (pour un litre de bouillon environ 15 embryons sont nécessaires), rendent ce milieu impropre à servir comme milieu de base pour la préparation de vaccin en grande quantité

Remplacement du sérum par le Cholesterol.

Edward et Fitzgerald (1954) ont utilisé ce milieu la première fois pour la cultivation de P. P. L. O. d'origine animal, le milieu liquide étant additionné de cholesterol en proportion de 0.1mg/ml. Smith et Lynn (1958) ont obtenu une culture positive de P. P. L. O. humaine et aviaire dans un milieu liquide contenant 0.01mg/ml cholesterol.

Considérant, que le cholesterol n'est pas soluble dans l'eau, ni dans un liquide comme le bouillon, nous avons préparé la solution de cholesterol en éthanol chaud (80° C) et cette solution alcoolique était ajoutée au bouillon chaud. Le bouillon ainsi préparé est devenu transparent après filtration sur papier. Le cholesterol était ajoutée à ce bouillon en proportion de 0.01mg/ml.

Sur 14 tubes encemencés six tubes seulement ont donné une culture positive. Par conséquent nous ne jugeon pas ce milieu adéquat pour la préparation des vaccins.

Remplacement du sérum par du bouillon de foie.

L'idée de préparer un bouillon du foie nous est venue à partir du bouillon cholesteroliné. Parmi les organes des animaux c'est le foie, qui est relativement le plus riche en cholesteroline et nous pouvons considérer un tel milieu comme un milieu naturellement cholesteroliné. Le bouillon au foie était préparé avec du foie de mouton avec des pH divers (7.2, 7.8, 8).

Résultat: Nous n'avons pas obtenus des cultures positives.

Remplacement du sérum par un bouillon synthétique.

La base de ce milieu était un bouillon au foie à pH 7.7, auquel nous avons ajouté un hydrolysate de caséine (Bacto casamino acid Difco) en différentes concentrations (1,3,5,10 et 20%). Dans une autre série, nous avons ajouté à ce complexe quelques sels minéraux aussi (chlorure de po-

tasse, sulfate de magnésium, phosphate monosodique et nitrate ferrique). L'ensemencement répété de ces milieux n'a jamais donné une culture positive.

En résumé pour remplacer le sérum dans les bouillons pour la culture de C. A., nous avons expérimenté 5 milieux différents sans résultat positif. Dans quelques-uns de ces milieux le germe a poussé, mais l'incertitude de cette poussée rend leurs emplois impraticables.

L'aspect de culture de nos souches dans le B. S.

Le développement de nos 3 souches dans ce milieu était nettement différent. La souche C a donné un trouble très léger, difficilement appréciable. La poussée des souches E et 86 se manifestait régulièrement par un trouble plus accentué. Un sédiment fin et modéré dans un B. S. âgé de 10-14 jours est normal. Une sédimentation prononcée après quelques jours de culture, ou bien un trouble accentué de la culture est le signe d'une contamination.

La culture en bouillon sans sérum.

Dans la littérature nous avons trouvé des allusions, que les souches non pathogènes des P. P. L. O. poussent aussi dans les bouillons ordinaires. Par conséquent une culture positive de C. A. dans un bouillon ordinaire (sans sérum) doit prouver son caractère non pathogène.

Pour le contrôle de pouvoir pathogène de nos souches, nous les avons également repiqué de temps en temps dans des bouillons ordinaires. Ces repiquages restaient toujours stériles; même notre souche C, qui a perdu complètement son pouvoir pathogène pendant son séjour au laboratoire, n'était pas non plus cultivable dans un bouillon ordinaire.

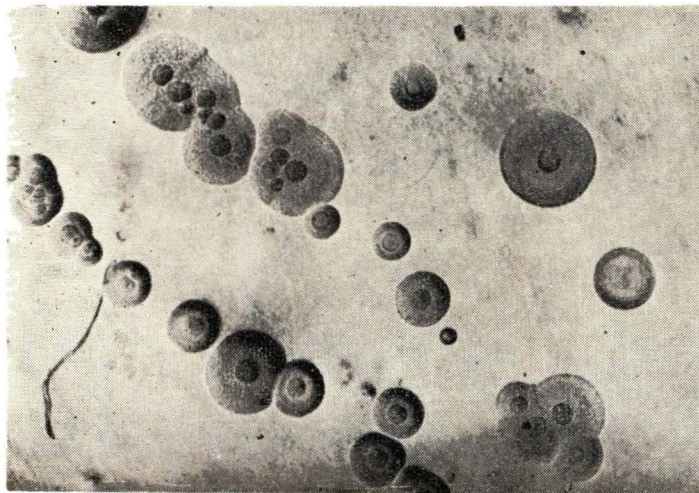
Les milieux solides.

La base de G. S. était une gélose ordinaire à PH élevé, additionnée de sérum de cheval, solidifiée en boîtes de Petri. La concentration de la gélose était 1.5%. Le milieu servait pour l'identification des formes coloniales avec un agrandissement de 30 fois. Ces milieux étaient gardés au réfrigérateur à 5° C et utilisés dans un laps de temps très court (2-3 semaines). Sur ce G. S. les colonies se présentaient macroscopiquement sous deux aspects:

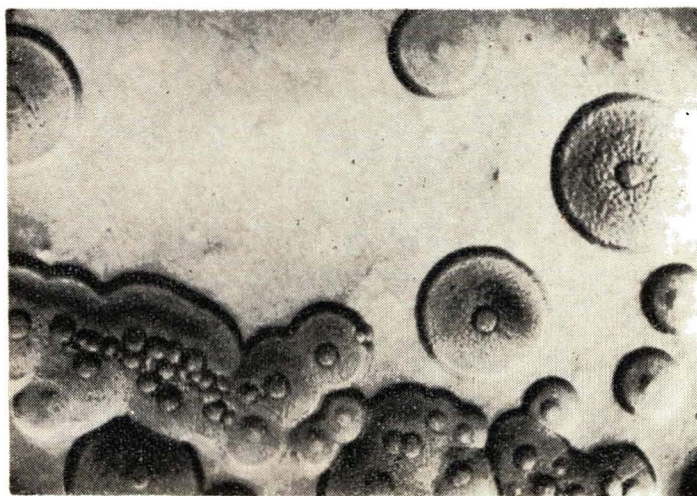
a) colonies isolées, grandeur à peine visible, mais quelques fois nous avons vu des colonies ayant comme diamètre de 1 mm. même 2 mm. Les germes n'ont pas de tendance à se reprendre sur la surface de la gélose.

Les colonies isolées se présentent sous trois formes différentes.

1) Colonies rondes, un peu bombées avec plasma homogène, lisse ou finement granuleuses au milieu desquels il y a une petite saillie jaunâtre, quelques fois circumvallée (mamelle). Quelques fois les colonies semblent posséder plusieurs mamelles. Ce sont les colonies superposées dans lesquelles les limites de parties plasmatiques sont plus ou moins effacées. Les

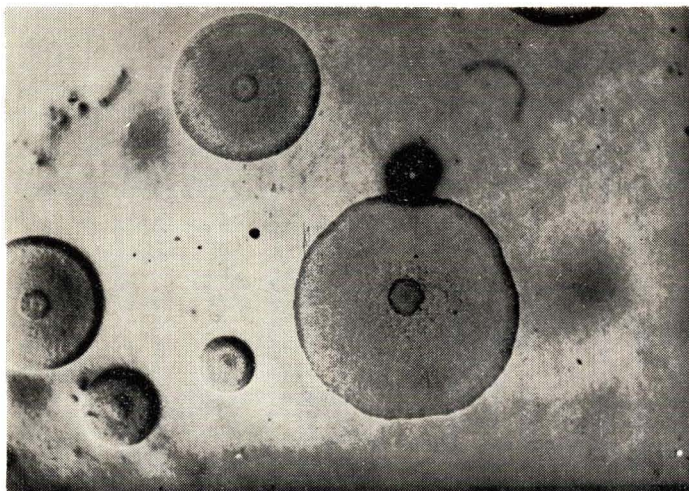


1 - Colonies normales et T colonies



2 - Colonies confluentes. Surface lisse et rough

colonies initiales n'ont pas de mamelles visibles, cela se manifeste à un certain moment de leur évolution. A cause de leur petite taille et du manque de mamelle, cette forme de colonie a une ressemblance avec les T formes (tiny formes) des colonies de P. P. L. O. Shepard (1956). La différenciation de ces deux formes coloniales est possible sur la base suivante: le diamètre



3 - Colonies géantes.



4 - Colonie teratologique.

des colonies initiales est plus large, que celui des T formes, tandis que les colonies des T formes restent toujours petites et elles ne deviennent jamais mamelées.

2) Colonies minuscules. Elles sont rondes, lisses, transparentes, sans structure,. Ce sont les Tiny formes ou T formes de P. P. L. O., publiées pas Shepard (1956).

3) Colonies géantes (diamètre 14-30 mm). Elles ont la forme normale, ou bien celle d'une assiette; dans le centre de l'assiette est une saillie colorée, la mamelle. C'est surtout la forme coloniale observée dans une culture âgée.

Toutes ces formes coloniales sont en générale perceptibles sur le même milieu. Les colonies sont solidement fixés dans la profondeur de la gélose. par grattage léger de la surface du milieu, on peut enlever une fine couche superficielle, facile à émulsionner, mais les centres de colonies restent fixés visiblement dans la profondeur de la gélose.

Dans les cultures âgées de 2-3 semaines, nous avons constaté des changements remarquables des formes coloniales. Les bourgeonnements de la surface coloniale sont telles, que l'aspect de la colonie devient verruqueuse, la dissolution de forme coloniale avec une limite vague et irrégulière de la partie plasmotique et la concavité de surface coloniale: forme d'assiette. Izildar - Yalcin (1960). Fig 1-4

b) Cultures en nappe. C'est une couche unique, mince, mâte, faiblement grisâtre, pas de colonies isolées visibles à l'oeil nu, excepté quelques colonies développées isolément à la périphérie de la nappe.

La coloration.

Les colorants spéciaux comme le bleu de Stevenel, le bleu de Victoria, le rouge de Magenta, fuchsine phéniquée et diluée, le Giemsa, le Fontana-Tribondeau, etc. recommandés pour la coloration des P. P. L. O. présentent des multiples inconvénients. C'est pourquoi nous avons cherché dès le commencement de nos études une coloration plus satisfaisante. Après une vingtaines de colorations infructueuses, nous avons essayé une méthode de coloration, publiée par Vágó, (1947) et utilisée pour la coloration rapide des Spirochaetes dans les prélèvements pathologiques humains. Cette méthode dans sa forme originale donnait une coloration excellente avec le C. A. Même en diluant la solution mère avec de l'eau distillée, le germe prends la couleur très nettement pour ainsi dire instantanément (5-10 secondes).

La coloration est faite avec:

- a) une solution aqueuse saturée de mercurochrome (mordant).
- b) une solution aqueuse saturée de méthylviolette B (colorante).

La coloration: Après fixation avec méthanol, mordancage avec mercurochrome, ensuite coloration avec la méthylviolette B. Fixation, mordancage et coloration pendant 5-10 secondes, rincer la lame après chaque phase.

Le germe est violet foncé, le fond incolore ou faiblement violacé. Nous avons adopté cette méthode comme technique habituelle. C'est le sédiment de centrifugation d'une culture en B. S., qui donne le plus riche tableau microscopique. La coloration d'une goutte prise d'une culture en B. S. est en général pauvre en éléments microbiens, mais dans des circonstances particulières même cet étalement donne un très beau et riche tableau microscopique.

La morphologie de C. A.

Les observations étaient faites avec les cultures en B. S., avec le culot de centrifugation des cultures en B. S. emmulsionnés dans une quantité minimum d'eau physiologique et avec la raclage pris à la surface d'une culture sur G. S. Aggrandissement: oculaire 8, objectif 1/16 et 1/18. Les formes observées.

1) Coccoides. (graines, granules). Grandeur à peine visible, quelques fois avec un contour et coloration vague. Les coccoides un peu plus grandes ont des contours nets. Leur diamètre était de 0.6 à 1 micron. Ces formes présentent une dualité tinctorielle, en fixant la violet de méthyl avec une avidité différente.

2) Formes bacillaires. Batonnets courts, minces, peu courbés, longueur 2-3 micron.

3) Des filaments. Longueur 4-6 micron, plus rarement plus long (10-14 micron), courbés ou fortement sinueux.

4) Formes annulaires. Diamètre des anneaux 1-2 micron. La paroi de l'anneau a quelques fois une épaisseur uniforme, quelques fois elle montre 2-3 tuméfactions. Les anneaux étaient dans les étalements des éléments assez rares, quelques fois complètement manquants. Mais dans des conditions particulières (dans un bouillon levuré, dans une culture âgée, en présence de pH élevé) ils se présentèrent en grande abondance.

5) Des tâches fortement colorées. Elles sont sans structure reconnaissable.

Avec un colorant fortement dilué (1 à 10) nous avons constaté, que ces taches sont composées de coccoides et des boules dans une masse homogène faiblement colorée. Nous avons trouvé ces taches plus abondantes dans les prélèvements pris de la surface d'une culture sur G. S. Dans une

telle préparation les formes bacillaires et filamenteuses sont rares ou manquantes.

Nous avons procédé une fois comme suit: La surface de la culture sur G. S. était légèrement grattée avec une lame de rasoir, ensuite la surface de la gélose était lavée plusieurs fois par de l'eau physiologique. Après lavage nous avons découpé une particule minuscule de la gélose, l'avons posé sur une lamelle et nous l'avons écrasé entre deux lamelles. Le tableau microscopique de cet étalement coloré était dominé par les éléments filamenteux. Selon notre impression le centre de la colonie, qui est enfoncé dans la profondeur de la gélose, est composé des éléments filamenteux. Sur la surface de gélose ce sont les autres éléments du microbe, qui forment une couche facile à enlever par grattage.

6) De grandes formes sphériques (les boules). Diamètre 2-3 micron. Ce sont des éléments ronds, fortement colorés, dont le centre quelques fois prend faiblement la couleur, donnant l'impression, qu'il est vide.

7) Formes rarement observées. :

a) Une petite graine avec une queue longuement étirée et courbée (2-3 micron).

b) Filaments fragmentés, dans l'intérieur des formations coccoides.

c) En culture dans le B. S. en surface large (Erlenmayer, Fernbach), nous avons vu quelques fois en grande abondance l'apparition des formes bacillaires et filamenteuses. Bridré et Donatien (1923); Klieneberger (1934); Ledingham, (1934); Novak et Lominsky (1934); Wroblewski (1935); Zavagli (1951).

Filtrabilité par Seitz EK.

Dans deux essais les filtrats repiqués largement dans B. S. ont donné des cultures positives au 4^e et 5^e jour. Le filtre laisse passer les germes, mais la poussée tardive du filtrat laisse supposer, qu'une grande quantité de germes reste adsorbée sur le filtre.

Pouvoir hémolytique des souches.

Les propriétés hémolytiques des souches étaient étudiés sur G. S., additionnée de sang defribiné du cheval en proportion de 5% et dans une autre série en proportion de 1%. Le milieu était versé dans des boîtes de Petri, en couche mince et la surface de la gélose était humectée avec quelques gouttes de B. S. Résultat: aucune des souches n'était hémolytique.

Discussion: Les publications originales Italiennes, Zavagli (1949) concernant les propriétés biologiques des souches de C. A. n'étaient pas à notre disposition. Edward (1953) a fait une détermination semblable avec 5

souches de C. A. et il a trouvé, que aucune des souches étudiées n'avait fait fermenter les 13 carbohydrates examinés, mais que les 5 souches téaient toutes hémolytiques. Nos souches n'étaient pas hémolytiques. Nos détermination aboutissent aux mêmes résultats, que celles de Freundt (1954) avec les souches humaines de P. P. L. O.

Antibiotiques et viabilité.

L'étude de l'effet de quelques antibiotiques et sulphamides a été faite avec une série de Difco Bacto testing disks, notamment avec la terramycine, tetracycline, viomycine, polymixyne, streptomycine, dihydrostreptomycine, néomycine, magnamycine (carbomycine), erythromycine, chloromycetine, bacitracine, auréomycine, gantrisine, sulfadiazine et triple-sulpha. La streptomycine, dihydrostreptomycine et magnamycine étaient inhibitrices, les autres négatives. La zone d'inhibition de magnamycine était le double de celle des deux autres. L'utilisation de la magnamycine pour le traitement des chèvres naturellement infectées mérite la considération.

Des investigation semblables ont été faites par Mornet et Balis, Mornet et Orue (1951), Christodoulou et Tarlakis (1954), avec quelques antibiotiques in vitro et in vivo. Ils ont trouvé, que la Streptomycine, l'auréomycine et terramycine ont quelques actions inhibitrices sur le germe de C. A. Les investigations de Hamdy et coll (1957) sont en relation avec la souche aviaire et celles de Orfila (1958) avec les souches humaines et bovines de P. P. L. O. La dihydrostreptomycine était efficace dans le traitement des maladies respiratoires chroniques de volaille Perek - Perk (1958).

La conservation des souches.

Les sous cultures en B. S. des trois souches étaient gardées dans des conditions différentes.

1) En tubes à essai sous huile de paraffine, et sans huile de paraffine, gardés continuellement à 4° C, fermeture au coton. La vitalité des cultures était contrôlée sur G. S. après 1-2 et 4 mois avec résultat positif.

2) Culture en B. S. dans des ampoules soudées sans huile de paraffine, gardées continuellement à 4° C Repiquées après un deux et quatre mois, nous avons obtenu des cultures positives. L'essai n'a pas été continué d'avantage. Ces méthodes de conservation épargnent la nécessité du repiquage des souches en intervalles de 2-3 semaines.

La lyophilisation.

La question de lyophilisation n'a pas été étudiée par nous. Nous renvoyons à la publication de Zavagli (1951), Kuyumgiiev (1955), Priestly

(1952). Nous mentionnons seulement une observation à ce propos, faite avec notre souche C. Cette souche était gardée dans notre Institut à l'état lyophilisé. Repiquée après trois ans et demi, elle se montra viable, mais elle avait perdue complètement son pouvoir pathogène original.

Le caractère pathogène vis à vis des animaux de laboratoire.

L'infection des animaux se faisait dans des conditions particulières. Nous avons infecté des lapins, des cobayes et des souris avec des doses excessives (4 à 5 cc), par voie péritonéale et intraveineuse. Nous avons infecté les mêmes animaux en état de gravidité avancée et deux jours après la mise bas. Nous avons infecté des lapereaux, des cobayes nouveaux-nés, des souris âgées de deux jours et des poulets âgés de 6 semaines. Aucune pathogénicité n'était observée.

Les lésions anatomo-pathologiques chez les chèvres infectées artificiellement.

L'infection des animaux était effectuée par voie sous cutané à la face intérieure de la cuisse. Dans la majorité des cas, les lésions montraient un caractère œdémateux; infiltration séreuse de tissu sous cutané au voisinage de l'infection, englobant quelquefois la mamelle et montant jusqu'à la région hypochondriale; infiltration séreuse de la musculature de la cuisse et quelquefois loin du lieu de l'injection (muscles sous-scapulaire, pectorale, les psoas); œdème de la mamelle; sérosité dans les articulations, dans la cavité abdominale, péricardiale et dans les sacs pléuraux, quelquefois en quantité considérable. La sérosité dans la plupart des cas était claire, transparente, exceptionnellement louche ou hémorragique. Péricardite et pléurite fibrineuse, légèrement adhésive; la masse fibrineuse était d'une épaisseur considérable. En plusieurs occasions, une hyperémie péricardiale et des veines gorgées au point d'infection. Lésions rarement observées: petechies péricardiales, tuméfaction des articulations, keratoconjonctivite, abcès et ulcérations cornéales, amaigrissement. Le germe était isolé des lésions pathologiques presque toujours en culture pure.

Les lésions pathologiques présentent l'aspect d'une maladie septicémique. Même, quand l'aspect clinique de la maladie était local (lésion articulaires et oculaires), dans les cadavres nous avons trouvé des lésions également dans les autres organes internes avec possibilité d'isoler l'agent pathogène. Deux fois nous avons observé une pleuropneumonie avec une péritonite fibrineuse, sèche, adhésive et le germe était isolé en culture pure.

Symptomatologie chez les chèvres infectées artificiellement.

L'infection était faite comme plus haut. Les premiers symptômes se

présentent en général au 2ème ou 4ème jour après l'infection. Une fois nous avons vu une réaction forte chez plusieurs chèvres 12 heures après l'infection. Dans ce temps il y a une tuméfaction au lieu de la piqûre et l'animal boite du pied situé du côté de la piqûre. Ces deux symptômes se présentent soit simultanément soit séparément. Un peu plus tard on constate un changement dans la fonction mammaire: diminution de quantité de lait et changement qualitatif du lait, comme la coagulation du lait, des laits aqueuses. Si l'infection prend un caractère progressif, les symptômes initiaux s'aggravent, la lactation cesse. La tuméfaction à l'endroit de la piqûre peut atteindre un diamètre de 3 à 15 cm, ou bien il se produit un œdème étendu au dessus duquel la surface de la peau est quelques fois couverte d'une sérosité collante. La boiterie s'accroît. Plus rarement et beaucoup plus tard apparaissent des lésions oculaires (15-25 jours). Si l'infection est mortelle, l'animal montre une faiblesse générale en se couchant presque continuellement et poussant des cris de tonalité faible. Dans cet état il y a aussi anorexie. La mort survient dans 8 à 15 jours, quelques fois après 3 semaines. Un bouc manifestant une évolution chronique, le 6ème semaine est devenu apparemment sain, mais après une vingtaine de jours il se développa chez lui une keratoconjunctivite et 10 jours après cette rechute, l'animal est mort, 62 jours après l'infection. Autopsie: Septicémie sévère, la souche infectante isolée à partir de tous les organes. Les arthrites provoquées quelques fois guérissent automatiquement et sans rechute.

Quelquefois les symptômes initiaux (boiterie, tuméfaction locale) cessent graduellement dans un intervalle de 7-12 jours.

Isolement des souches à partir des chèvres nouveaux-nés naturellement infectés.

Nous avons mis dans un box d'isolement un groupe de chèvres. A la fin de Mars 1958 nous avons eu 10 nouveaux-nés dans la box. Deux semaines après leur naissance les petites étaient transférées à un box contaminé. Dans un intervalle de 6 semaines 3 des petites étaient mortes sans présenter des symptômes particuliers. Isolation de C. A. chez deux animaux était positive à partir du cœur et du rein, chez la 3ème l'isolement n'a pas réussi. Il s'en suit, que dans un milieu infecté chez les animaux nouveaux-nés une infection mortelle peut se développer très vite, par contact direct, sans que les animaux montrent des symptômes appréciables. (arthrite ou keratoconjunctivite; voir: les données de Zavagli, 1951).

Isolement des souches à partir des organes des chèvres artificiellement infectées.

L'infection de 14 chèvres femelles étaient effectuée avec deux souches virulentes et avec une souche traitée par le formol et la chaleur pendant 48 heures. Une partie des chèvres était en lactation, l'autre partie dans le période d'interlactation. Tous les animaux sont morts. L'essai d'isolement de la souche infectante donnait un résultat positif chez les 14 animaux.

Chez une chèvre, malgré les symptômes manifestes, le milieu servant à l'isolement restait stérile. Dans la majorité des cas nous avons isolé des souches en culture pure et abondante sur G. S. P., même en B. S. P. sans difficulté. Pour être sûr à obtenir un résultat positif lors de l'isolement, on doit faire un prélèvement à partir de plusieurs organes, de préférence sur la mamelle et ses ganglions, le coeur, le foie, et les reins, éventuellement d'autres organes (cerveau, poumons).

Isolement des souches à partir du lait chez les chèvres infectées artificiellement.

Chez une brebis en lactation le germe peut se présenter dans la mamelle déjà 20 heures après l'infection, dans un délai où il n'y a encore aucun autre symptôme de l'infection. Dans le même temps le pH du lait infectée devient alcalin. Zavagli (1951).

Expérience: nous avons infecté 11 chèvres en lactation avec la souche virulente 86. Deux jours après l'infection nous avons pris leur lait pour la mesure de leur pH et pour faire un isolement sur G. S. P. Résultat:

pH du lait	7.6	7.2	7.5	7.7	7.0	7.4	7.2	6.75	6.9	6.75	6.6
Isolement de la souche	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—

Analyse du résultat: Chez 7 chèvres le lait présentait un pH alcalin, chez 4 animaux le pH était normal, légèrement acide. Dans le lait des 3 chèvres avec un pH normal, la souche infectante n'était pas présente.

Ces animaux résistèrent à l'infection pendant 3 mois d'observation. Un lait, ayant une réaction normale (pH 6.75), a donné aussi une culture positive, mais chez cet animal après quelques jours se développait une mammite et le pH du lait était devenu alcalin. Les 7 animaux dont le lait avait un pH alcalin, donnait une culture positive.

La facilité et la régularité de l'isolement de la souche infectante à partir des laits des animaux artificiellement infectés nous a donné l'idée

d'utiliser le lait des animaux naturellement infectés pour la diagnose bactériologique de la maladie. La diagnose différentielle de la maladie est faite actuellement par la réaction de fixation du complément. L'agglutination et la précipitation ne donnent pas de résultats satisfaisants. Zavagli, (1951).

Isolement de la souche à partir du lait chez les animaux naturellement infectés.

Pour la diagnostique bactériologique nous avons effectué 13 ensemencements avec le lait provenant des animaux divers. Seulement 4 échantillons ont donné de résultats positifs, la majorité restant négative. Ce résultat maigre étant d'autant plus d'incompréhensible, que l'isolement des souches à partir du lait des animaux artificiellement infectés était obtenu de manière simple et régulière. Cette observation nous a donné l'impression, que la cause du résultat négatif devait être dûe à un facteur inhibiteur agissant sur le lait pendant le transport.

Pour étudier la vitalité de C. A. dans le lait des animaux naturellement infectés, nous avons fait 4 expériences:

1 - La vitalité du germe dans le lait desséché.

Des laits stérilisés étaient ensemencés abondamment avec la souche 86, ensuite nous avons trempé des petites boules de coton et du papier buvard dans les cultures et nous les avons desséché à l'air libre. Après 2,5 et 10 jours nous avons jeté ces matériels dans des B. S. P. et après quelques jours de culture, chaque tube était ensemencé sur G. S. P.

Tous les milieux restèrent stériles, montrant, que dans le lait desséché le germe perd sa vitalité très rapidement.

2 - La vitalité du germe dans le lait additionné des produits chimiques.

Des échantillons de laits stérilisés étaient ensemencés avec la souche 86. Après deux jours d'incubation la vitalité était contrôlée sur G. S. et nous avons ajouté à ces cultures soit du formol soit du bichromate de potasse en concentrations diverses. Après 7 jours de culture les repiquages sur G. S. restèrent stériles. Les souches étaient tuées dans ces milieux.

3 - La vitalité de C. A. dans le lait conservé dans le frigidaire (+ 4° C)

Nous avons conservé 5 échantillons de lait provenant des animaux naturellement malades à +4° C pendant 19 jours. Les souches pouvaient être cultivées à partir de chacun des 5 échantillons.

4 - La vitalité de C. A. dans B. S. contenant de l'acétate de thallium.

Au B. S. nous avons ajouté de l'acétate de thallium en proportion

de 1 à 5000.

Le lait d'une chèvre saine était contaminé artificiellement avec la culture de la souche 86, de telle façon, que la dilution de la culture dans le lait était 10^{-4} . Repiquée sur G. S., cette dilution donnait une culture abondante. Une goutte de lait contaminé était ensemencé dans le milieu mentionné plus haut. Nous avons ensemencé deux tubes. L'un de ces milieux ensemencé était gardé à $+4^{\circ}\text{C}$, l'autre à $+37^{\circ}\text{C}$. Après 5, 10 et 21 jours nous avons fait un repiquage sur G. S. P. de chacun des deux tubes. Résultat: Culture pure et abondante de C. A. même au 21ème jour après le mélange. Comme témoin nous avons utilisé le lait d'une chèvre saine mélangé avec la culture de la souche 86 dans la même proportion. Gardée à $+4^{\circ}\text{C}$ et $+37^{\circ}\text{C}$ les deux lait étaient coagulé et 24 heures après l'ensemencement, la souche n'était pas repiquable.

L'isolement du microbe à partir du lait de l'animal naturellement infecté semble être un procédé sûr, si le lait est recueilli fraîchement. Dans un lait infecté avec le microbe de C. A. le germe perd très vite sa vitalité, sur tout dans les saisons chaudes et pendant l'expédition du lait à un laboratoire lointain.

Dans des circonstances pareilles, le germe peut perdre sa vitalité après 24 heures de conservation. Par conséquent un prélèvement de lait ne doit pas être expédié au laboratoire à l'état pur. On doit l'envoyer dans un milieu particulier, dans un B. S., contenant comme conservateur d'acétate de thallium à proportion de 1 à 5000. Dans ce milieu conservateur le microbe reste vivant au moins 21 jours et l'isolement de l'agent pathogène est un procédé simple et sûr en le repiquant sur G. S. ou G. S. P. L'isolement du microbe à partir de ce liquide conservateur est possible même pendant la période d'incubation de la maladie, c'est-à-dire 1-2 jours après une infection, quand il n'y a encore aucun autre signe de l'infection, que le virage de pH du lait de l'acide à alcalin. Zavagli (1951).

Une seule goutte de lait suspect jetée dans un petit flacon contenant 10-15 cc de liquide conservateur est suffisant pour conserver la vitalité du germe pendant la durée de son expédition et son isolement même trois semaines après sa prise est assuré.

5 - Essai de l'isolement du germe à partir des yeux des animaux vivants.

Dans un troupeaux de moutons (200 têtes) en période de lactation atteint de la maladie, deux moutons montrèrent des lésions oculaires. Nous avons instillé dans les yeux de ces animaux une goutte d'eau physiologique et le liquide était recueilli par un bout de coton et jété dans un milieu d'isolement (B. S. avec thallium acétate). Après une incubation d'une nuit,

le reensemencement sur G.S.P. était effective. Nous avons obtenu le même resultat positif, a partir du corps vitré d'une chèvre (51) mort de septicemie agalactique.

Conclusion

L'étude morphologique et biologique des 4 souches de capromyces agalactiae (*mycoplasma agalactiae*) furent étudiés.

Nous avons essayé de remplacer le serum dans les milieux de culture, avec d'autres produits, sans un resultat appreciable.

Le sérum rest l'element indispensable pour la culture de C. A., même pour les souches avirulents.

Une nouvelle methode de la coloration des germes est élaboré.

Nos souches n'étaient pas hemolytiques.

Parmi les antibiotiques la carbomycine donne la plus large zone d'inhibition in vitro.

Les souches se conservent en bouillon sérum penicilliné a +4°C au moins pendant 3 mois.

Les petits animaux de laboratoire contaminés dans des conditions particulières et sévères avec des souches virulents restent refractaires.

Les signes cliniques et les lésions anatomo-pathologiques chez les chèvres infectés artificiellement sont étudiés.

La contamination des chevreaux nouveau-nés furent étudiés.

L'isolement des souches s'effectue avec facilité avec du lait ou des organes des animaux naturellement ou artificiellement infectés.

Pour la diagnostic bactériologique de la maladie, nous utilisons le lait des malades et pour l'expédition des laits, un bouillon sérum, additionné d'acétate de thallium, assurant la vitalité du microbe dans leur prélèvement pendant au moins 21 jours, même dans les conditions extrêmes (chaleur).

Bibliographie

- Adler-Yamamoto: Avian Dis. 1957, 1, 19.
Adler-Yamamoto: Am. J. Vet. Res. 1954, 15, 463.
Adler-Yamamoto: Poultry Sci. 1956, 35, 1396.
Bridré-Donatien: C. R. Ac. Sci. 1923, 177, 841.
Bridré-Donatien: A. I. P. 1925, 39, 925.
Ceccarelli-Fontanelli: O. I. E. 1957, 48, 510.
Edward-D. G. : Y. Gen. Microb. 1947, 1, 238.

Edward-D. G. : Vet. Rec. 1953, 65, 873.
 Edward-Fitzgerald: J. Path. and Bact. 1954, 68,23.
 Freundt E. A. : Acta Path. Micr. Scand. 1954, 34, 127.
 Hamdy-Ferguson: Poultry Sci. 1957, 36, 748.
 Hartsell S. E. : Appl. Microb. 1956, 4, 350.
 Isildar-Yalcin: Tûrk Vet. Hek. Dern. Derg. 1960, 30, 592.
 Klieneberger E. : J. Path. Bact. 1934, 39, 409.
 Kujungiev I. : Veterinaria Ital. 1955, 6, 913.
 Kujungiev I. : Zooprofilassi 1957, 12, 545.
 Laws L. : Austr. Vet. J. 1956, 32, 326.
 Lecce - Stinebring: J. Bact. 1953, 66, 622.
 Ledingham J. G. G. : Vet. Bul. 1934, 4, 725.
 Melanidis - Zarifopoulos: Arch. I. P. Hellen. 1959, 2, 71.
 Mornet - Balis: Bull. Ac. Vet. 1947, 20, 225.
 Mornet - Orue: Bull. Ac. Vet. 1951, 24, 213.
 Nowak - Lominski: A. I. P. 1934, 53, 438.
 Orfila. J. : A. I. P. 1958, 94, 516.
 Priestley F. W. : J. Comp. Path. 1952, 62, 125.
 Perek - Perk: Avian Dis. 1958, 2, 269.
 Shepard M. C. : J. Bact. 1956, 71, 362.
 Smith - Lecce: J. Bact. 1954, 68, 627.
 Tarlatzis - Spais: B. Ac. Vet. Fr. 1954, 27, 441.
 Taylor - Fabricant: Corn. Vet. 1957, 47, 112.
 Vágó S. : Pr. Med. 1951, 1809.
 Wroblewski W. : A. I. P. 1935, 47, 94.
 Zavagli V. : Zooprofilassi 1949, 4, 464.
 Zavagli V. : O. I. E. 1951, 36, 336.
 Zinser: Bacteriology, 1957, 559.