



HAL
open science

Infection génitale à *Ureaplasma diversum* : enquête chez les bovins en France

D Le Grand, F Poumarat, JI Martel

► To cite this version:

D Le Grand, F Poumarat, JI Martel. Infection génitale à *Ureaplasma diversum* : enquête chez les bovins en France. *Veterinary Research*, 1995, 26 (1), pp.11-20. hal-00902301

HAL Id: hal-00902301

<https://hal.science/hal-00902301>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Infection génitale à *Ureaplasma diversum* : enquête chez les bovins en France

D Le Grand ^{1*}, F Poumarat ², JL Martel ²

¹ Service de pathologie du bétail, École nationale vétérinaire,
1, avenue Bourgelat, BP 83, 69280 Marcy-L'Étoile;

² CNEVA, laboratoire de pathologie bovine, 31, avenue Tony-Garnier,
BP 7033, 69342 Lyon cedex 07, France

(Reçu le 7 février 1994; accepté le 6 septembre 1994)

Résumé — Une première étude bactériologique de l'infection à *Ureaplasma diversum* chez les bovins, en France, a été réalisée sur 50 taureaux et 565 vaches laitières. Le taux d'infection était de 74% (37/50) chez le mâle et de 40% (227/565) chez la femelle. Chez cette dernière, il n'y avait pas de relation significative entre l'infection et la présence de lésions de vulvite granuleuse d'une part, et d'autre part entre l'infection et les performances de reproduction. L'identification sérologique des isolats par *membrane filtration dot immunobinding* a montré une prédominance des sérogroupes B et C chez le mâle, et B chez la femelle.

bovin / *Ureaplasma diversum* / vulvite granuleuse / France / membrane filtration dot immunobinding

Summary — **Infectious genital disease by *Ureaplasma diversum*: investigations on bovine in France.** A first bacteriological study of infection by *Ureaplasma diversum* in cattle was performed in France on 50 bulls and 565 dairy cows. *U. diversum* was isolated in 74% (37/50) of the bull semen and 40% (227/565) of the cows. No significant relationship was found in cows between infection and lesions of granular vulvitis, nor between infection and breeding performances. Serological studies of isolates by *membrane filtration dot immunobinding* showed a predominance of the serogroups B and C in males, and serogroup B in females.

bovine / *Ureaplasma diversum* / granular vulvitis / France / dot immunobinding

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

Longtemps confondus avec les virus en raison de leur petite taille et de la difficulté à les cultiver sur milieux inertes, les mycoplasmes sont reconnus aujourd'hui comme les plus petits organismes vivants capables de se multiplier de façon autonome. Depuis 1973, les mycoplasmes sont regroupés en une classe, celle des mollicutes (Krieg et Holt, 1984). Elle représente un certain nombre de familles et d'espèces présentes dans diverses affections, souvent multifactorielles, en tant qu'agents pathogènes initiateurs ou opportunistes.

En pathologie bovine où interviennent déjà de nombreuses espèces du genre *Mycoplasma* (Simecka *et al*, 1992) un second genre semble émerger, révélé par différents travaux de recherche menés au Canada et en Europe. Il s'agit du genre *Ureaplasma* anciennement dénommé T-Mycoplasmes (T = *tiny*) en raison de la petite taille des colonies. Il se distingue principalement du genre *Mycoplasma* par la production d'uréase et l'utilisation de l'urée comme facteur de croissance. Le genre *Ureaplasma* a été isolé chez de nombreuses espèces animales : Bovins, Ovins, Caprins, chiens, chats, Primates, Oiseaux (Koshimizu et Magaribuchi, 1977 ; Taylor-Robinson et Furr, 1973).

Cependant c'est chez l'humain, et à un moindre degré chez les Bovins, qu'il a été le plus étudié, aboutissant à la distinction de 2 espèces : *Ureaplasma urealyticum* chez l'humain (Shepard *et al*, 1974) et *Ureaplasma diversum* chez les Bovins (Howard et Gourlay, 1982). L'espèce *U diversum* compte actuellement 11 sérovars répartis en 3 sérogroupes A, B et C (Howard *et al*, 1978 ; Howard et Gourlay, 1981).

Incriminé en pathologie oculaire (kératoconjonctivites) (Gourlay et Thomas, 1970 ; Howard et Gourlay, 1972) et respiratoire (broncho-pneumonies chez le veau) (Gour-

lay, 1968 ; Livingston, 1972 ; Muenster *et al*, 1979), c'est surtout au niveau de l'appareil génital femelle que les conséquences de l'infection à *U diversum* seraient les plus importantes avec notamment un retentissement sur la fertilité des animaux (mortalité embryonnaire, avortements) (Doig *et al*, 1979 ; Kuhn et Hopkins, 1983 ; Ruhnke *et al*, 1984 ; Thornber, 1982). Cliniquement, *U diversum* est fréquemment associé, chez la femelle, à des salpingites, des endométrites non spécifiques et des lésions de vulvite granuleuse caractéristiques (Doig, 1981 ; Doig *et al*, 1979 ; Kuhn et Hopkins, 1983 ; Thornber, 1982 ; Ruhnke et Miller, 1990 ; Ruhnke *et al*, 1978). Seules les lésions vulvaires et vaginales décrites après guérison complète de l'exanthème coïtal provoqué par le virus de la rhino-trachéite-infectieuse bovine (Kokles, 1970) pourraient prêter à confusion. Ces manifestations cliniques ont été reproduites expérimentalement (Doig *et al*, 1980a,b ; Ruhnke *et al*, 1984).

Chez le mâle, la symptomatologie est généralement inexistante et la fertilité ne semble pas affectée (Doig, 1981 ; Fish *et al*, 1985 ; Kuhn et Hopkins, 1983 ; Yokoki *et al*, 1985).

Peu d'informations sont actuellement disponibles concernant l'épidémiologie et le pouvoir pathogène d'*U diversum*. On sait cependant qu'il existe des souches plus ou moins virulentes (Campbell *et al*, 1988 ; Howard *et al*, 1973), mais actuellement le seul moyen permettant d'estimer cette virulence est fondé sur l'aptitude des souches d'*U diversum* à provoquer une mammite expérimentale chez la vache (Howard *et al*, 1973).

À ce jour, la fréquence et les conséquences pathologiques de l'infection à *U diversum* sont méconnues en France. Des travaux menés en 1992 au laboratoire de pathologie bovine du CNEVA (Lyon) ont permis de mettre au point des méthodes d'isolement et d'identification sérologique par *membrane filtration dot immunobinding* (Poumarat *et al*, 1991). Suite à ces travaux pré-

liminaires, une enquête a été réalisée sur des vaches laitières et des taureaux, dans le but d'étudier la fréquence et les conséquences pathologiques et zootechniques de l'infection à *U diversum* en France.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux

Deux populations de Bovins ont été constituées parmi 20 troupeaux de vaches laitières de race Française Frisonne Pie-Noire croisée Holstein et de race Montbéliarde (effectif moyen de 28 Bovins par troupeau) :

– la population 1, regroupant 10 troupeaux (320 animaux) dans lesquels le syndrome de vulvite granuleuse se manifestait sous une forme aiguë, justifiant l'intervention du vétérinaire;

– la population 2, regroupant 10 troupeaux (245 animaux) parmi lesquels le syndrome de vulvite granuleuse semblait subclinique, voire inexistant. Afin d'évaluer l'incidence de l'infection à *U diversum* sur les performances de reproduction, 18 de ces troupeaux ont fait l'objet d'un suivi de fertilité. Les 2 paramètres les plus usités pour évaluer ces performances sont : le taux de fertilité (pourcentage de réussite en première insémination) et le taux de fécondité (représenté par le pourcentage d'animaux ayant un intervalle vêlage-insémination fécondante (V.I.F) supérieur à 110 j). Dans ce contexte de production laitière, les performances de reproduction d'un troupeau étaient considérées comme optimales lorsque le taux de fertilité obtenu était supérieur à 60% et que moins de 15% des animaux avaient un V.I.F supérieur à 110 j. Ces normes ont été fixées par rapport aux valeurs moyennes de fertilité et de fécondité obtenues dans les départements concernés par notre étude.

Chez le mâle, la recherche d'uréaplasmes a été réalisée sur un échantillon de 50 spermatozoïdes issus de taureaux réformés.

Prélèvements

Des écouvillonnages de la fosse clitoridienne ont été réalisés sur les femelles adultes et les

génisses en première insémination, indépendamment de leur cycle génital.

Ces prélèvements ont été effectués en hiver où l'incidence de l'infection à *U diversum* semble supérieure selon Doig *et al* (1979). Parallèlement chaque animal a fait l'objet d'un contrôle sérologique de la rhino-trachéite infectieuse bovine-vulvo-vaginite pustuleuse (RIB-VVP) par la méthode d'hémagglutination passive (Dannacher *et al*, 1979).

Les échantillons de sperme, non traités aux antibiotiques, ont été utilisés non dilués.

Le pourcentage de prélèvements positifs nous a permis d'établir le taux d'infection des populations mâle et femelles.

Souches de référence d'*U diversum* et souches isolées

Les souches de référence : A 417, représentative du séro-groupe A (Gourlay et Thomas, 1970) ; D 48 et T 74 (proposées par Howard *et al*, 1978) représentatives des séro-groupes B et C respectivement, nous ont été fournies par le docteur HL Ruhnke (Laboratoire des services vétérinaires, ministère de l'Agriculture, Ontario, Canada).

Les souches isolées sur le terrain n'ont pas été clonées avant identification sérologique. En effet l'expérience acquise avec le genre *Mycoplasma* montre que les prélèvements sont souvent constitués d'un mélange de différentes espèces à vitesse de croissance inégale. Aussi un clonage immédiat aurait-il pour conséquence de privilégier la récupération des souches à croissance rapide, masquant ainsi la présence d'éventuelles associations.

Production de sérums hyperimmuns anti-*U diversum*

Préparation de l'antigène pour inoculation

Pour chaque souche de référence, 2 l de culture en phase exponentielle de croissance ont été obtenus par repiquages quotidiens. Un contrôle final de la densité en micro-organismes a été réalisé par la méthode de dénombrement de Mac-

Crady (Bourdon et Marchal, 1973) adaptée en micro-plaques (Poumarat et Martel, 1989) avec 5 cupules par dilution.

Ces 2 l de culture ont été centrifugés à 12 000 g et le culot obtenu a été lavé 2 fois en Tampon Phosphate 0,05 M de pH 7,4 (PBS). Le culot final fut repris dans du PBS pour obtenir une concentration finale équivalente à 10⁹ uréaplasmes/ml.

Immunisation des lapins

Les sérums hyperimmuns anti-sérogroupe A, B et C ont été obtenus par inoculation de lapins indemnes d'organismes pathogènes spécifiques (IOPS) (Élevage scientifique des Dombes-Romans, Ain, France). Ce statut IOPS était indispensable pour obtenir la meilleure spécificité antigénique car on ignorait si le lapin pouvait être porteur ou non d'uréaplasmes. Le protocole d'immunisation des lapins IOPS était identique à celui mis en œuvre pour le genre *Mycoplasma* (Poumarat *et al*, 1991).

Milieu de culture

L'isolement des uréaplasmes nécessitait l'utilisation de milieux de culture spécifiques, particulièrement pour l'espèce *U diversum* (Shepard, 1983). Cet isolement s'est effectué sur milieu liquide et solide.

Milieu liquide

Nous avons utilisé le milieu décrit par Taylor-Robinson *et al* (1968) mais sans acétate de thalium et modifié comme suit.

Ce milieu liquide renfermait 20 g/l de Bacto PPLQ broth (DIFCO); 20 ml/l de Rouge de Phénol (PASTEUR) à 1%; 200 ml de sérum de cheval non chauffé (BIO-LAB); 100 ml/l d'extrait frais de levure à pH 6,0; 10 ml/l d'urée (MERCK) à 10%; 2 g/l d'Amoxicilline (BEECHAM); 700 ml/l d'eau bi-distillée (GIBCO). Le pH a ensuite été ajusté à 6,0 (avec de l'HCl 10 N) avant adjonction de 40 ml/l de solution tampon Hanks Balanced Salt Solution (HBSS x 10-GIBCO). Le milieu ainsi obtenu a été passé sur membrane filtrante (MILLIPORE) de porosité 0,22 µm puis conservé à -20°C.

Milieu solide

Le milieu solide était constitué d'une première partie représentant 70% du volume final. Cette partie était composée de 12 g/l d'Agar Noble (DIFCO); 20 g/l de Bacto PPLQ broth (DIFCO); 20 ml/l de Rouge de Phénol (Pasteur) à 1%; 700 ml/l d'eau bi-distillée (GIBCO). Le pH a été ajusté à 6,0 avant stérilisation à 120°C pendant 20 min. La seconde partie, qui représentait 20% du milieu final, comprenait 200 ml/l de sérum de cheval non chauffé (BIO-LAB); 100 ml/l d'extrait frais de levure à pH 6,0; 10 ml/l d'urée (MERCK) à 10%; 2 g/l d'Amoxicilline (BEECHAM); 5 ml/l de sulfate de manganèse (MERCK) à 3% et 10 ml/l de L-cystéine (MERCK) à 0,9%. Ce supplément a été ajusté à pH 6,0 (avec de l'HCl 10 N) avant adjonction de 40 ml/l de solution tampon HBSS puis filtré sur membrane (MILLIPORE) de porosité 0,22 µm.

Techniques d'isolement

Avant prélèvement, les écouvillons ont été imbibés de milieu de culture et stockés à 4°C.

Après écouvillonnage, le transport des prélèvements a été réalisé sous couvert du froid (4°C) et l'ensemencement effectué dans la journée.

Le milieu liquide était inoculé avec l'écouvillon entier ou le sperme pur, puis l'on procédait à 6 dilutions au 1/10. Les tubes étaient ensuite placés à 37°C en aérobiose et observés quotidiennement pendant 7 j.

La présence d'uréaplasmes se manifestait par un changement de couleur de l'indicateur coloré qui passait du jaune (à pH 6,0) au rouge (à pH 8,5) suite à l'alcalinisation du milieu. La phase exponentielle de croissance en milieu liquide se situe entre pH 7,0 et pH 7,8 (Taylor-Robinson *et al*, 1968), ce qui correspond à une coloration rose du bouillon de culture. L'ensemencement en milieu solide était effectué à ce stade.

Les géloses ont été ensemencées en gouttes posées de 5 µl et incubées à 37°C sous atmosphère constituée de 5% de CO₂ et 95% d'N₂. La lecture fut également quotidienne pendant 7 j. La présence d'uréaplasmes était confirmée par l'observation de petites colonies typiques, colorées en noir suite à la précipitation de MnO₂, lui

même issu de l'interaction du MnCl avec l'ammoniac libéré par hydrolyse de l'urée.

a été utilisé pour établir une éventuelle relation entre l'infection et les troubles de la reproduction.

Conservation des souches

Toutes les souches ont été conservées lyophilisées ou congelées en bouillon à -80°C .

Identification sérologique des souches par dot immunobinding sur membrane de filtration (MF dot)

Cette technique est actuellement utilisée pour l'identification sérologique des mycoplasmes (Poumarat *et al*, 1991).

Il s'agit d'une technique immunoenzymatique, sur membrane, mettant en évidence les antigènes externes des mycoplasmes. Les micro-organismes sont fixés simplement par aspiration sur une membrane (MILLIPORE) de faible affinité pour les protéines et de porosité $0,22\ \mu\text{m}$. Cette méthode par filtration permet d'obtenir une sensibilité et une spécificité supérieure par rapport au dot immunobinding classique (Kotani et Garrity, 1985).

Son application à l'identification sérologique des souches d'*U diversum* a nécessité l'utilisation de membranes filtrantes de porosité $0,1\ \mu\text{m}$ en raison de la petite taille de ces mollicutes.

Les différents sérogroupes sont ensuite identifiés par réaction immunoenzymatique à l'aide des sérums hyperimmuns préparés sur lapin IOPS (décrits précédemment).

Traitement statistique

Le test de comparaison de 2 pourcentages (Schwartz, 1975) a été appliqué d'une part à la comparaison des taux d'infection des 2 populations et d'autre part à la comparaison de leur pourcentage de lésions de vulvite granuleuse. Le test de χ^2 (Schwartz, 1975) a été utilisé pour la recherche d'une corrélation entre l'existence des lésions de vulvite granuleuse et la présence d'uréaplasmes. Le seuil de signification était $P < 0,05$. Le test de comparaison de moyennes sur petits effectifs (test *t* de student) (Schwartz, 1975)

RÉSULTATS

Observations cliniques, taux d'infection et performances de reproduction

Aucun symptôme n'a été observé sur les taureaux réformés.

Chez la femelle, après un examen clinique individuel des animaux, il est apparu que 25% des animaux (80/320) de la population 1 présentaient des lésions caractéristiques de vulvite granuleuse : granulomes inflammatoires recouvrant les faces latérales de la vulve, associés ou non à une inflammation de la muqueuse vulvaire. Dans la population 2, 17% des vaches (42/245) présentaient ces lésions de granulation, limitées cependant à la fosse clitoridienne et sans réaction inflammatoire de la muqueuse vulvaire.

Le taux d'infection global des mâles, par *U diversum*, était de 74% (37/50).

Chez la femelle, les taux d'infection des populations 1 et 2 étaient respectivement de 38% (122/320) et de 43% (105/245).

Le test de comparaison de 2 pourcentages nous a permis de constater que la différence entre la fréquence des lésions de vulvite granuleuse de la population 1 et de la population 2 était statistiquement significative ($P < 0,05$). Ce qui n'était pas le cas pour leur taux d'infection.

Sur le plan individuel, aucune corrélation n'a été montrée entre la présence de lésions de vulvite granuleuse et l'isolement d'uréaplasmes.

Au niveau du troupeau, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence, ni entre taux d'infection et taux de fertilité ($t = 0,47$,

Tableau I. Relation entre le taux d'infection (%) par *Ureaplasma diversum* et les taux de fertilité et de fécondité dans 20 troupeaux de Bovins classés selon leurs performances de reproduction.

Exploitation	Taux d'infection des troupeaux ayant:			
	un taux de fertilité ^a		un taux de fécondité ^b	
	<i>anormal</i> (<i>< 60%</i>)	<i>normal</i> (<i>> 60%</i>)	<i>normal</i> (<i>< 15%</i>)	<i>anormal</i> (<i>> 15%</i>)
<i>Population 1</i>				
1	NE ^c	NE ^c	NE ^c	NE ^c
2	35	35
3	67	67
4	52	52
5	...	50	...	50
6	27	27
7	20	20
8	...	41	...	41
9	37	37
10	61	61
<i>Population 2</i>				
11	34	...	34	...
12	38	38
13	...	48	48	...
14	30	30
15	90	90
16	NE ^c	NE ^c	NE ^c	NE ^c
17	...	40	...	40
18	48
19	...	30	30	...
20	61	61

^a Le taux de fertilité correspond au pourcentage de réussite en première insémination ; ^b le taux de fécondité représente le % d'animaux ayant un intervalle vêlage-insémination fécondante (VIF) supérieur à 110 j; ^c non évalué.

ddl = 16), ni entre taux d'infection et taux de fécondité ($t = 0,80$, *ddl* = 15) (tableau I).

Identification sérologique des isolats

Les souches de référence n'ont manifesté aucune réaction croisée entre elles.

Les isollements réalisés sur le sperme pur ont montré une majorité de souches intermédiaires entre 2 ou 3 sérogroupes.

Cependant, parmi ces souches, 50% manifestaient une plus forte réaction avec le séro-groupe B et 50% avec le séro-groupe C (tableau II).

Chez la femelle, on a observé 60% de réactions croisées entre les sérogroupes A et B et 1% seulement entre les sérogroupes A, B et C. Mais sur l'ensemble des isolats le type B était largement dominant : 37% de souches étaient de type B pur et 60% manifestaient une plus forte réaction avec le séro-groupe B (tableau II).

Tableau II. Identification sérologique, par *dot immunobinding* sur membrane de filtration, des souches d'*Ureaplasma diversum* isolées et répartition des sérogroupes A, B, et C selon le sexe.

	Sérogroupes		
	A	B	C
<i>Nombre de mâles</i>			
12	±	+	-
12	±	±	+
1	-	+	-
<i>Nombre de femelles</i>			
1	+	-	-
62	-	+	-
99	±	+	-
2	±	±	+

Réaction : + positive ; ± faiblement positive ; - négative, par comparaison avec le témoin représenté par les 3 souches de référence A 417, D 48, T 74.

Le séro groupe C, fréquemment isolé chez le mâle (48%), était peu représenté chez la femelle (1%). Les souches de type A pur étaient également peu fréquentes (1%) (tableau II).

Sérologie rhino-trachéite infectieuse bovine

Sur l'ensemble des 2 populations, seulement 8% des animaux étaient séropositifs.

DISCUSSION

Suite aux nombreuses études cliniques (Doig *et al*, 1979 ; Doig, 1981 ; Ruhnke *et al*, 1978 ; Ruhnke et Miller, 1990) et expérimentales (Doig *et al*, 1980 a, b) réalisées au Canada, il semblerait que l'espèce *U diversum* soit responsable, chez la vache, de troubles de la reproduction associés à

des lésions de vulvite granuleuse. Jusqu'à ce jour aucune recherche bactériologique du genre *Ureaplasma* n'avait été réalisée sur le cheptel bovin français.

Tout comme le genre *Mycoplasma*, ce mollicute présente des exigences culturales particulières. Aussi une attention particulière doit-elle être portée à la qualité du milieu de culture et de ses composants tout autant qu'à sa composition (Howard *et al*, 1978 ; Krieg et Holt, 1984). La qualité du sérum de cheval (non chauffé) et le pH final du milieu (pH 6,0 ± 0,1) doivent être contrôlés.

L'identification sérologique des souches de référence par MF dot ne fait apparaître aucune réaction croisée. Ces résultats confirment la spécificité de cette technique appliquée à l'identification sérologique des souches d'*U diversum* isolées sur le terrain. Elle est en outre rapide (3 h) et reproductible.

Chez la femelle, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation significative entre la présence des lésions de vulvite granuleuse et la présence d'uréaplasmes, contrairement aux observations des auteurs canadiens (Ruhnke *et al*, 1978 ; Doig *et al*, 1979 ; Mulira *et al*, 1992) démontrant un taux d'isolement sur animaux sains inférieur à celui des individus présentant des lésions de granulation. La vulvite granuleuse ne serait donc pas, dans le cadre de notre étude, caractéristique de l'infection à *U diversum*.

Nous sommes donc peut-être en présence de souches dont le pouvoir pathogène diffère de celui des souches isolées au Canada.

Seulement 8% des animaux étaient séropositifs vis-à-vis du virus de la rhino-trachéite infectieuse bovine. Aussi il est peu probable que ce virus soit l'agent étiologique primaire des lésions de vulvite granuleuse observées sur l'ensemble de notre échantillon. La même observation a été faite par Doig *et al* (1979).

Parmi les 50 échantillons de sperme pur issus de taureaux cliniquement sains, 37 (74%) étaient porteurs d'uréaplasmes. Doig (1981) signale, en Europe et au Canada, des taux d'infection allant de 24 à 84% chez des animaux sains. De tels résultats laissent supposer l'existence d'un portage sain chez le taureau. Yokoki *et al* (1985) considèrent même que l'espèce *U diversum* pourrait être un composant habituel de la microflore prépucciale.

Dans le cas de notre étude, le séro-groupe C n'était prédominant que chez le mâle, comme l'avait observé Truscott (1983). Contrairement à ces résultats, Mulira *et al* (1992) l'ont mis en évidence sur 43% des souches isolées chez la femelle. Bien que les méthodes d'identification sérologique de ces études soient différentes, il semblerait donc que la répartition de ces différents séro-groupe puisse varier selon les régions.

Par MF dot nous avons obtenu 66% de réactions croisées (125 sur 189) sur l'ensemble des souches isolées chez le mâle et la femelle. Avec le test à l'immunoperoxydase (IP) (Truscott, 1983) et par immunofluorescence indirecte (IFI) (Mulira *et al*, 1992), les pourcentages de réactions croisées obtenues par ces auteurs étaient respectivement de 8,2% (Truscott, 1983) et 7,5% (Mulira *et al*, 1992). Cette importante divergence s'explique soit par la présence d'un mélange de sérogroupes, soit par l'existence de souches sauvages à caractère antigénique intermédiaire par rapport aux souches de référence. Cette seconde hypothèse est sans doute la plus probable. D'une part en raison de la sensibilité supérieure du MF dot par rapport aux techniques classiques d'IFI et d'IP (Poumarat *et al*, 1992). En effet, ces dernières ne détectent que les antigènes membranaires majeurs et par conséquent ne permettent pas de révéler d'éventuelles variations antigéniques secondaires. D'autre part, l'espèce *U diversum* étant sérologiquement très hétérogène, il n'existe pas de sérotypes bien circon-

crits. Seuls des groupes de souches possédant une certaine similitude antigénique ont été décrits (Howard et Gourlay, 1973, 1981; Howard *et al*, 1978). En outre, Howard *et al* (1978) signalent que différentes souches appartenant à ces groupes sérologiques peuvent porter des antigènes communs. Enfin, et plus récemment, les études de Watson *et al* (1990) réalisées sur la structure antigénique de *U urealyticum* montrent l'existence d'antigènes variables s'exprimant différemment au cours des générations successives d'un même clone.

Quoi qu'il en soit, seul le clonage préalable des isolats pourra confirmer cette seconde hypothèse.

Hormis les travaux de Doig *et al* (1979), les conséquences de l'infection à *U diversum* sur les performances de reproduction individuelles et du troupeau ont été rarement abordées.

Dans le cas de notre étude, la conséquence de l'infection à *U diversum* sur la fertilité globale des troupeaux (exprimée par le taux de fertilité et le VIF) n'a pu être appréhendée comme nous le souhaitions, car notre échantillonnage s'est avéré insuffisant *a posteriori*. Toutefois, à partir de ces résultats on peut estimer, statistiquement, qu'il faudrait plus de 100 troupeaux pour mettre en évidence une éventuelle corrélation.

Il conviendrait donc à présent de réorienter notre méthode d'approche en se focalisant sur des élevages pré-sélectionnés (sur la base de critères cliniques et du taux d'infection) dans lesquels les génisses saines ainsi que celles cliniquement atteintes feraient l'objet d'un suivi clinique et zootechnique dans le temps.

Au terme de cette première enquête, il apparaît que l'infection à *U diversum* est fréquente chez les vaches laitières et les taureaux concernés par notre étude.

La sélection de troupeaux, sur la base de l'importance des lésions de vulvite granulueuse, nous a permis de constituer 2

populations de vaches laitières dont les fréquences de lésions sont significativement différentes (respectivement 25% et 17%, $P < 0,05$).

Toutefois il n'a pas été mis en évidence de corrélation directe entre l'infection à *U diversum* et les lésions vulvaires observées, ce qui semble en opposition avec les résultats des équipes canadiennes.

De telles observations laissent supposer que les souches locales pourraient avoir un pouvoir pathogène différent de celles isolées au Canada. Cette hypothèse ne pourra être confirmée que par une reproduction expérimentale comparative.

Les résultats de l'identification sérologique font ressortir, sur notre échantillonnage, une prédominance de souches appartenant au sérotype C chez le mâle et au sérotype B, chez les femelles.

Ces premiers résultats inciteraient à minimiser l'importance des conséquences pathologiques de l'infection à *U diversum* chez les bovins en France, cependant il convient de rester prudent compte tenu de la variabilité du pouvoir pathogène des souches (Campbell *et al*, 1988 ; Howard *et al*, 1973).

REMERCIEMENTS

M B Guérin pour sa collaboration dans le traitement des échantillons de sperme ; Mme M Perrin, chargée de recherches (CNEVA-LPB), pour la réalisation du diagnostic sérologique de la RIB ; N Gauthier, T Caillaux, JL Cloye, M Delacroix, P Pluvinage, et Mme V Pelaez, docteurs vétérinaires de la FEVEC (Rhône et Loire) ; le docteur HL Ruhnke, laboratoire des Services vétérinaires, ministère de l'Agriculture, Ontario, Canada.

RÉFÉRENCES

- Bourdon JL, Marchal N (1973) *Techniques bactériologiques*. Doin, Paris 335 p
- Campbell NL, Verrinder Gibbins AM, Ruhnke HL (1988) A molecular genetic analysis of *Ureaplasma diversum* strains implicated in bovine reproductive urinary and respiratory tract diseases. 7th International Congress of IOM Compendium of Abstracts, 2-9 June 1988, Baden near Vienna, Austria (abstracts of posters, P3)
- Dannacher G, Perrin M, Perrin B (1979) Utilisation d'une technique d'hémagglutination passive pour la détection des anticorps contre le virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse. *Recl Méd Vét Ec Alfort* 155, 633-637
- Doig PA (1981) Bovine genital mycoplasmosis. *Can Vet J* 22, 339-343
- Doig PA, Ruhnke HL, Palmer NC (1980a) Experimental bovine genital ureaplasmosis. I. Granular vulvitis following vulvar inoculation. *Can J Comp Med* 44, 252-258
- Doig PA, Ruhnke HL, Palmer NC (1980b) Experimental bovine genital ureaplasmosis. II. Granular vulvitis, endometritis and salpingitis following uterine inoculation. *Can J Comp Med* 44, 259-266
- Doig PA, Ruhnke HL, Mac Kay AL, Palmer NC (1979) Bovine granular vulvitis associated with ureaplasma infection. *Can Vet J* 20, 89-94
- Fish NA, Rosendal S, Miller RB (1985) The distribution of mycoplasmas and ureaplasmas in the genital tract of normal artificial insemination bulls. *Can Vet J* 26, 13-15
- Gourlay RN (1968) The isolation of T-strains of mycoplasma from pneumonic calf lung. *Res Vet Sci* 9, 376-378
- Gourlay RN, Thomas LH (1970) The experimental production of pneumonia in calves by the endobronchial inoculation of T-mycoplasmas. *J Comp Path* 80, 585-596
- Howard CJ, Gourlay RN (1972) Serology of bovine T-mycoplasmas. *Br Vet J* 128, XXXVII
- Howard CJ, Gourlay RN (1973) Serological comparison of bovine T-mycoplasmas. *J Gen Microbiol* 79, 129-134
- Howard CJ, Gourlay RN (1981) Identification of ureaplasmas from cattle using antisera prepared in gnotobiotic calves. *J Gen Microbiol* 126, 365-369
- Howard CJ, Gourlay RN (1982) Proposal for a second species within the genus *Ureaplasma*, *Ureaplasma diversum* sp nov. *Int J Syst Bacteriol* 32, 446-452
- Howard CJ, Gourlay RN, Brownlie J (1973) The virulence of T-mycoplasmas, isolated from various animal species, assay by intramammary inoculation in cattle. *J Hyg* 71, 163-170
- Howard CJ, Gourlay RN, Collins J (1978) Serological studies with bovine ureaplasmas (T-mycoplasmas). *Int J Syst Bacteriol* 28, 473-477
- Kokles R (1970) La rhino-trachéite infectieuse et l'exanthème coital des Bovins. In : *Traité des maladies à virus*, tome 2, Vigot Frères, Paris, 884-944
- Koshimizu K, Magaribuchi T (1977) Isolation of *Ureaplasma* (T-mycoplasma) from chicken and jungle fowl. *Jap J Vet Sci* 38, 195-199

- Kotani H, Mac Garrity GJ (1985) Rapid and simple identification of mycoplasmas by immunobinding. *J Immunol Methods*, 85, 257-267
- Krieg NR, Holt JG (1984) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, Vol 1, 964 p
- Kuhn MJ, Hopkins SM (1983) A clinical review of bovine ureaplasmosis. *Iowa State Veterinarian* 45, 20-24
- Livingston CW Jr (1972) Isolation of T-strain of mycoplasma from Texas feedlot cattle. *Am J Vet Res* 33, 1925-1929
- Muenster OA, Ose EE, Matsvoka T (1979) The incidence of *Mycoplasma dispar*, *Ureaplasma* and conventional mycoplasma in the pneumonic calf lung. *Can J Comp Med* 43, 392-398
- Mulira GL, Saunders JR, Barth AD (1992) Isolation of *Ureaplasma diversum* and *Mycoplasmas* from genital tracts of beef and dairy cattle in Saskatchewan. *Can Vet J* 33, 46-49
- Poumarat F, Longchambon D, Martel JL (1992) Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within "M mycoides cluster" and within "glucose and arginine-negative cluster" of ruminant mycoplasmas. *Vet Microbiol* 32, 375-390
- Poumarat F, Martel JL (1989) Mise au point et évaluation d'une méthode opacimétrique pour la détermination de l'antibiosensibilité de *Mycoplasma bovis* *in vitro*. *Ann Rech Vét* 20, 135-143
- Poumarat F, Perrin B, Longchambon D (1991) Identification of ruminant *mycoplasmas* by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet Microbiol* 29, 329-338
- Ruhnke HL, Miller RB (1990) Effect of *Ureaplasma diversum* on bovine reproduction: Epidemiological and experimental aspects. IOM Letters-Program and abstracts of the 8th International Congress of the IOM, 8-12 July 1990, Istanbul, Turkey, Vol 1 SC/3, 64
- Ruhnke HL, Doig PA, Mac Kay AL, Gagnon A, Kiersstead M (1978) Isolation of ureaplasma from bovine granular vulvitis. *Can J Comp Med* 42, 151-155
- Ruhnke HL, Palmer NC, Doig PA, Miller RB (1984) Bovine abortion and neo-natal death associated with *Ureaplasma diversum*. *Theriogenology* 21, 295-301
- Schwartz D (1975) *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. Flammarion Médecine Sciences, 3^e édition, 318 p
- Shepard MC (1983) Culture media for ureaplasmas. In: *Methods in Mycoplasmaology-Mycoplasma Characterization*, vol 1 (Razin S, Tully JG, eds), Academic Press, NY, États-Unis, London, Royaume-Uni, 137-146
- Shepard MC, Lunceford CD, Ford DK *et al* (1974) *Ureaplasma urealyticum* gen nov; sp nov proposed nomenclature for the human T (T-strain)-Mycoplasma. *Int J Syst Bacteriol* 24, 160-171
- Simecka JW, Davis JK, Davidson MK, Ross SE, Stadlander CTKH, Cassell GH (1992) Mycoplasma Diseases of Animals. In: *Mycoplasmas-Molecular Biology and Pathogenesis* (J Maniloff, éd), American Society for Microbiology, Washington, DC, États-Unis, 609 p
- Taylor-Robinson D, Furr PN (1973) The distribution of T-mycoplasmas within and among various animal species. *Ann N Y Acad Sci* 225, 108-117
- Taylor-Robinson D, Williams MH, Haig DA (1968) The isolation and comparative biological and physical characteristics of T-mycoplasma of cattle. *J Gen Microbiol* 54, 33-46
- Thornber PM (1982) Ureaplasma association with bovine infertility in south-west Scotland. *Vet Rec* 111, 591
- Truscott RB (1983) Ureaplasma serotypes associated with the bovine urogenital tract. *Can J Comp Med* 47, 471-473
- Watson HL, Blalock DK, Cassell GH (1990) Variable antigens of *Ureaplasma urealyticum* containing both serovar-specific and serovar-cross-reactive epitopes. *Infect Immun* 58, 3679-3688
- Yokoki Y, Hashimoto K, Ogasa A (1985). Effects of *Ureaplasma diversum* on the motility and morphology of bull spermatozoa (en japonais). *Bull Natl Inst Anim Health* 88-7-15