

E. Camus¹ | **Le diagnostic de la cowdriose à partir**
 N. Barré¹ | **d'écrasement de cerveau**

CAMUS (E.), BARRÉ (N.). Le diagnostic de la cowdriose à partir d'écrasement de cerveau. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1988, 41 (3) : 247-252.

L'article décrit les aspects pratiques du diagnostic de la cowdriose à partir de prélèvements de cerveau. Les seules difficultés dans le diagnostic microscopique de la cowdriose sont dues à la confusion possible entre les colonies de *Cowdria ruminantium* et d'autres corpuscules : des photos sont jointes pour montrer les différents aspects morphologiques de *Cowdria* et pour guider l'observateur débutant. Une technique de diagnostic rapide grâce à une coloration avec l'acridine orange est décrite. *Mots clés* : Cowdriose - Diagnostic microscopique - *Cowdria ruminantium* - Aspects morphologiques - Acridine orange.

INTRODUCTION

Si la cowdriose demeure encore souvent ignorée ou méconnue dans de nombreux pays africains, c'est en grande partie parce que le seul diagnostic de certitude repose sur l'examen microscopique de capillaires cérébraux, qui suppose :

1. Un prélèvement de matière cérébrale, écrasé puis coloré après fixation, ce qui paraît, à tort, difficile à réaliser.
2. Un examen microscopique parfois long et troublant, où le moindre corpuscule prend l'aspect d'une *Cowdria* pour un observateur non averti.

C'est la raison pour laquelle ROUSSELOT (5) a pu dire à propos de la cowdriose en Afrique : « elle existe partout où il existe un homme de laboratoire habitué à en assurer le diagnostic microscopique. Si un tel homme de laboratoire se déplace, la maladie se déplace avec lui. Elle apparaît mystérieusement à son point d'affectation après avoir disparu du lieu de son affectation précédente ».

Et en Guadeloupe, où la maladie existe vraisemblablement depuis 1828, date d'introduction du vecteur, il a fallu attendre 150 ans avant qu'un prélèvement de cerveau de chèvre soit envoyé à l'IEMVT, Maisons-Alfort, et la cowdriose enfin diagnostiquée (4).

1. IEMVT, Mission Antilles-Guyane, BP 1232, 97184 Pointe-à-Pitre Cedex.

Reçu le 29.12.87, accepté le 27.01.88.

Après un bref rappel des techniques de prélèvement, d'écrasement et de coloration de cerveau, seront décrits, à l'aide de photos, les principaux aspects microscopiques de *Cowdria ruminantium* dans le cerveau et les corpuscules avec lesquels ils ne doivent pas être confondus, ce que ne montraient pas les présentations illustrées de COWDRY (3) et CILLI et CORAZZI (2).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La majorité des écrasements de cerveau décrits dans ce travail proviennent de chèvres Créoles mortes de cowdriose naturelle ou expérimentale en Guadeloupe. Cependant les méthodes de diagnostic et les aspects morphologiques sont identiques pour les bovins et ovins, et quelle que soit la région (Fig. 1).

Prélèvement de cerveau

L'ouverture du crâne est inutile ; il suffit, selon la technique décrite par SCHREUDER (6) de sectionner la tête en avant de la première vertèbre cervicale, d'introduire une curette (environ 15 cm de longueur pour un petit ruminant, 20 cm pour un bovin) face vers le bas, par le trou occipital, de l'enfoncer entre le cerveau et le crâne jusqu'à venir buter contre le crâne, de la tourner d'un demi-tour et de la retirer en ramenant un morceau de cerveau.

Des essais ont montré (1) que les colonies sont encore visibles 48 heures après la mort dans un cerveau maintenu à température ambiante, et jusqu'à 34 jours pour un cerveau au réfrigérateur.

Écrasement de cerveau

Un fragment de matière grise superficielle de la grosseur d'une tête d'allumette est déposé sur le bord d'une lame de verre, écrasé par une autre lame et les deux lames sont étirées en sens inverse tout en maintenant la pression (7).



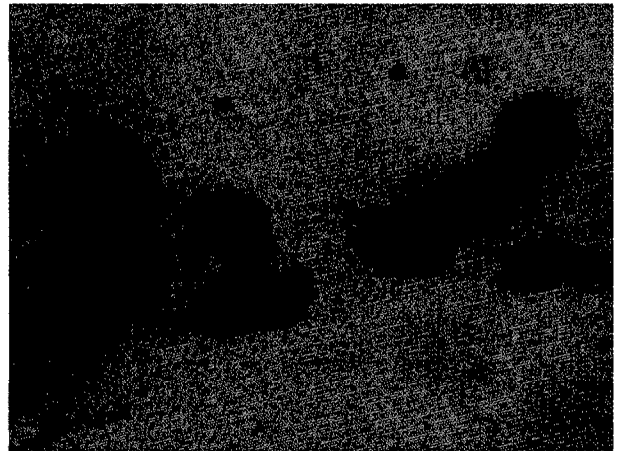
1



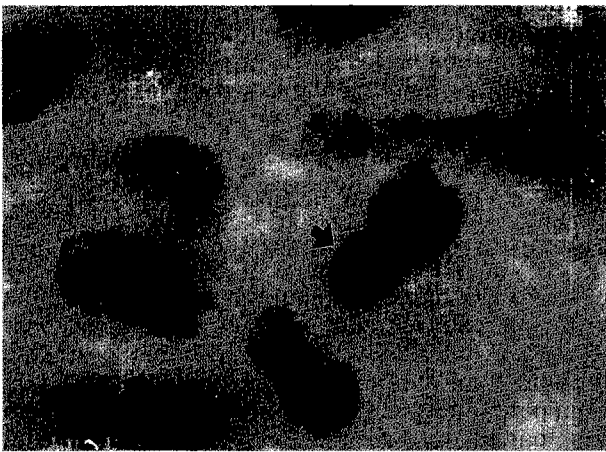
2



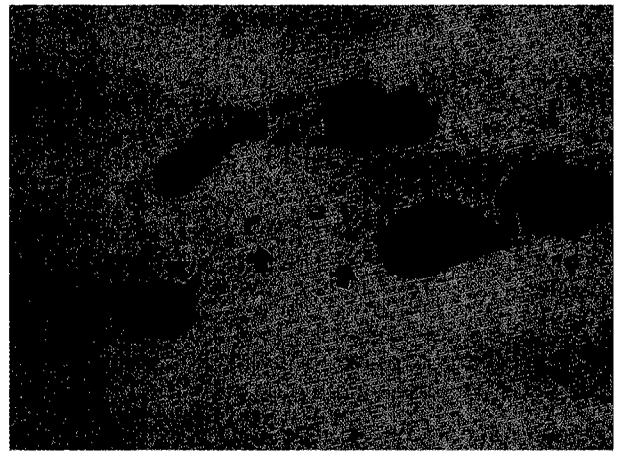
3



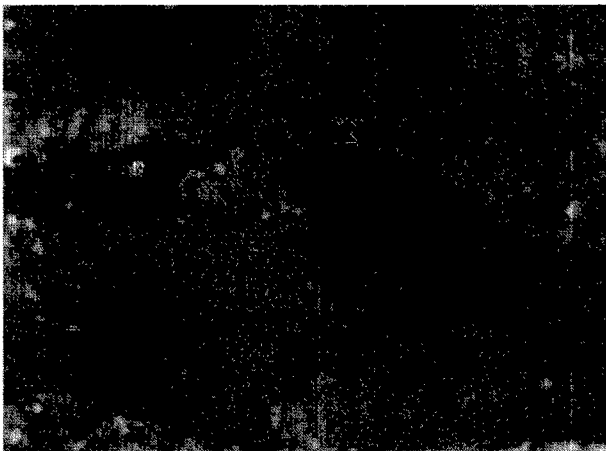
4



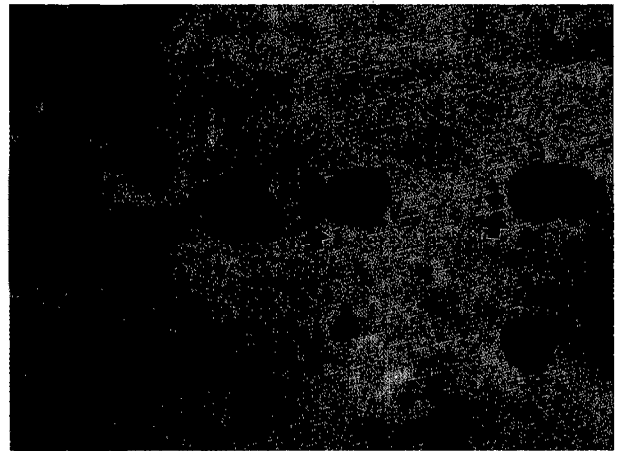
5



6



7



8

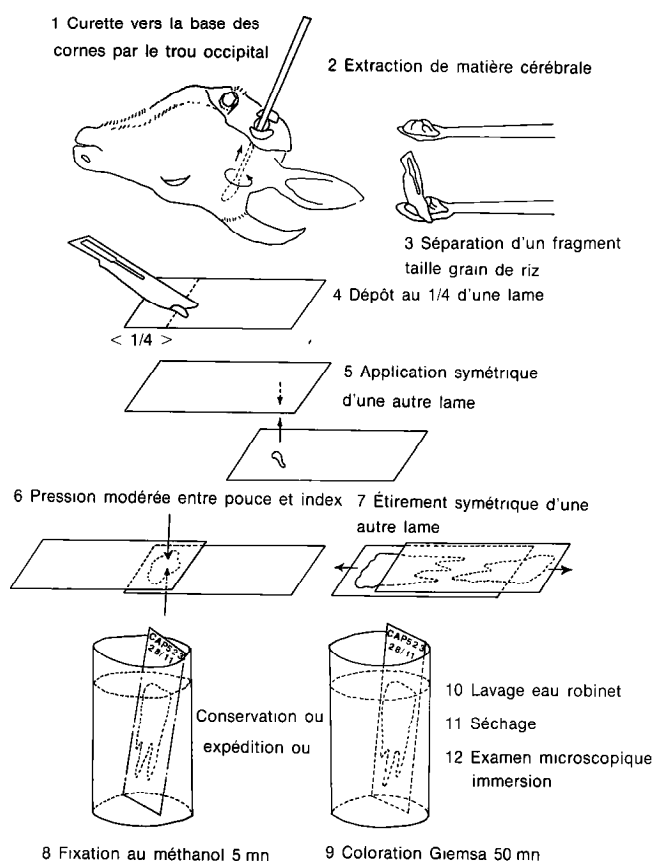


Fig. 1 : Les étapes du diagnostic post mortem de la cowdriose. 1 = curette vers la base des cornes par le trou occipital. 2 = extraction de matière cérébrale. 3 = séparation d'un fragment de la taille d'un grain de riz. 4 = dépôt au 1/4 d'une lame. 5 = application symétrique d'une autre lame. 6 = pression modérée entre pouce et index. 7 = étirement des 2 lames en sens inverse et séchage. 8 = fixation au méthanol. 9 = conservation ou expédition ou 9', coloration au Giemsa 50'. 10 = lavage à l'eau du robinet. 11 = séchage. 12 = examen microscopique-immersion.

Fixation et coloration

Une fois séchées, les lames sont fixées dans du méthanol pendant 5 minutes, puis colorées pendant 50 minutes dans un Giemsa à 5 p. 100 préparé *extemporanément* avec un tampon (Sørensen : 2,5418 g de KH_2PO_4 et 8,5507 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pour 5 litres d'eau distillée ; ajuster à pH 7,2).

Après la coloration, un lavage des lames à l'eau courante pendant 15 minutes (UILENBERG, non publié, 1982 cité en 1983) permet d'améliorer le contraste entre les noyaux des cellules endothéliales et les colonies de *Cowdria*.

Examen microscopique

Les lames sont examinées au microscope, avec des oculaires de 10 ×, un objectif de 10 × pour repérer les capillaires cérébraux puis un objectif de 50 × à immersion pour rechercher les colonies de *Cowdria* dans le cytoplasme des cellules endothéliales des capillaires.

Acridine orange

Une technique de coloration plus rapide que le Giemsa consiste, une fois les lames fixées, à les recouvrir d'acridine orange (colorant des acides nucléiques) pendant deux minutes, à les laver quelques secondes à l'eau courante, à les recouvrir d'une lamelle (avec de la glycérine tamponnée) puis à les examiner avec un microscope à immunofluorescence (objectif 50 × à immersion).

Microphotographie

Les photographies présentées ont été réalisées avec un matériel WILD manuel : binoculaire avec un tube photographique, boîtier reflex 24 × 36 classique et bague d'adaptation. Un meilleur résultat est obtenu avec un bon objectif 100 × à immersion qu'avec un objectif 50 ×.

Pellicules photographiques : diapositives lumière du jour 100 ou 200 ASA

Vitesse : de 1/8 à 1/30 seconde, déclencheur à distance

Condenseur : 3/4 fermé (important pour la netteté)

Lumière : maximum d'intensité de l'éclairage du microscope

Ouverture : 8, réglée par la vitesse et la lumière

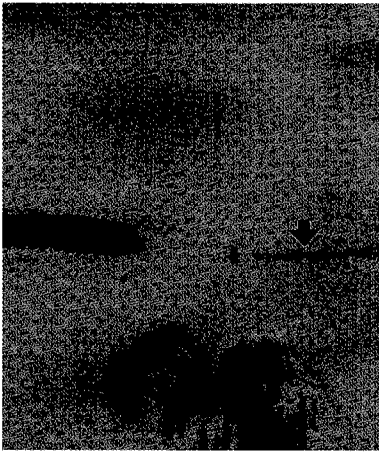
La mise au point effectuée en observant la lame par les oculaires est contrôlée dans le viseur de l'appareil photographique.

RÉSULTATS

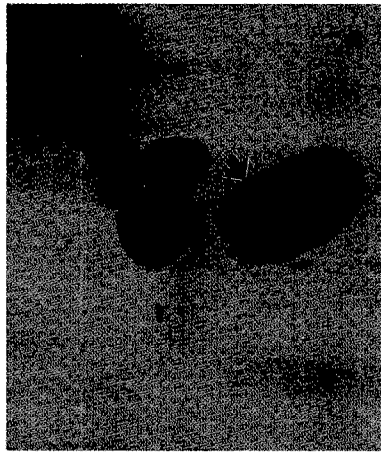
Les photos (grossissement 1 000 × pour toutes sauf la photo 1 grossie 100 ×) présentent divers aspects morphologiques de *C. ruminantium* ainsi que certains éléments dont elle doit être distinguée.

Photo 1 : capillaires cérébraux caractérisés par l'alignement des noyaux de cellules endothéliales.

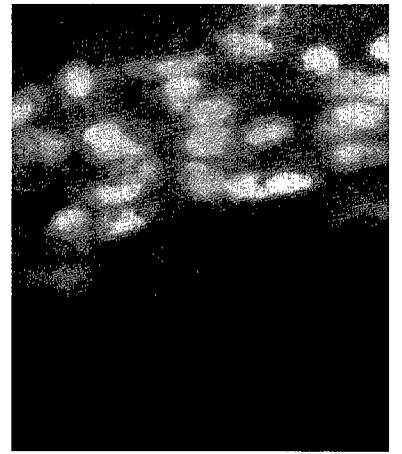
E. Camus, N. Barré



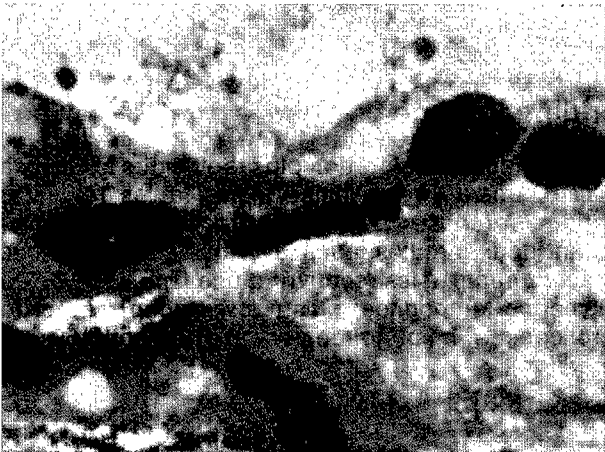
9



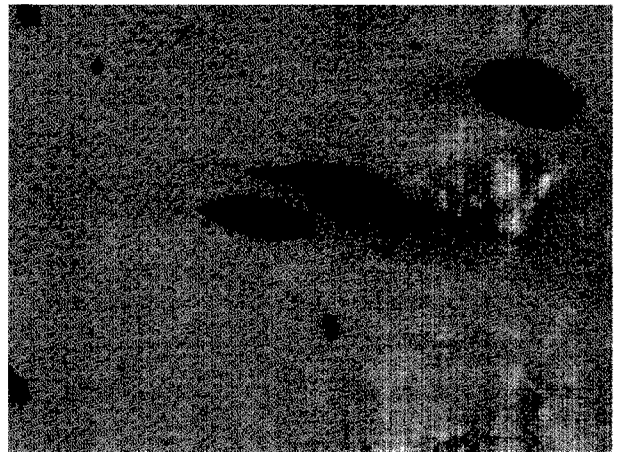
10



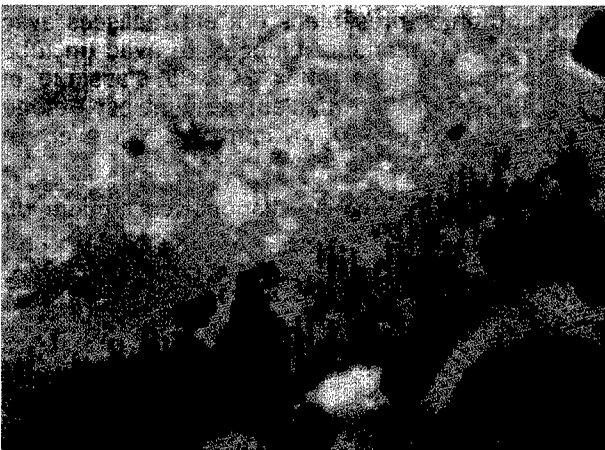
10 bis



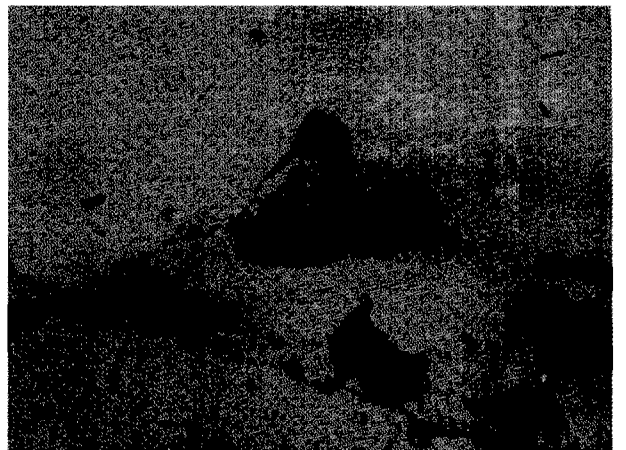
11



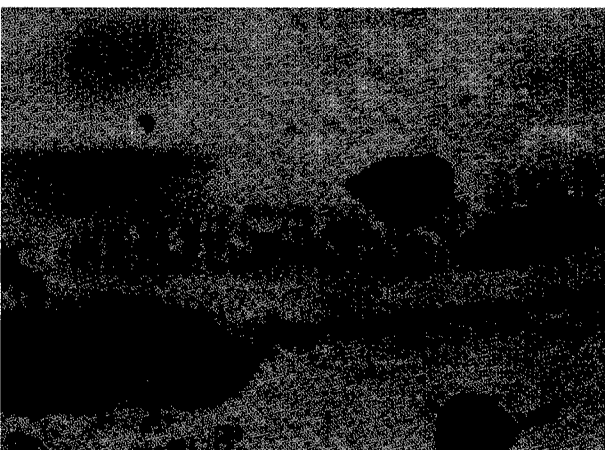
12



13



14



15



16

Colonies de *C. ruminantium*

Elles sont classées par la taille des colonies (volumineuse, moyenne, petite), par l'aspect de la colonie (dense ou diffuse), par la morphologie des éléments (granules, anneau, fer à cheval), par la position vis-à-vis du noyau (éloignée ou recouvrant le noyau).

Photo 2 : volumineuse colonie de corps élémentaires de petite taille et peu teintés, contre le noyau d'une cellule endothéliale.

Photo 3 : colonie de taille moyenne diffuse, à corps élémentaires plus volumineux et contrastés.

Photo 4 : très petite colonie à petits éléments ; le contraste de teinte avec le noyau est caractéristique.

Photo 5 : colonie dense typique ; le contraste de couleur avec le noyau est encore plus prononcé que sur la photo 4.

Photo 6 : colonie très dispersée, à petits éléments clairs mais bien identifiés. La dispersion semble aller de pair avec la diminution du contraste.

Photo 7 : petite colonie formée de quelques anneaux volumineux.

Photo 8 : éléments volumineux et sombres peu nombreux, en forme de granules, d'anneaux et de fer à cheval.

Photo 9 : colonie éloignée d'un noyau (peu fréquent).

Photo 10 : colonie de forme et de coloration typiques recouvrant un noyau (peu fréquent).

Photo 10 bis : colonie colorée en orange par l'acridine orange alors que les noyaux des cellules endothéliales apparaissent jaunes.

Éléments à ne pas confondre avec *C. ruminantium*

Photo 11 : corps bleu ; bleu clair à bleu foncé, volumineux, sans structure, vacuolaires, à éléments de taille variable.

Photo 12 : noyau lysé ou écrasé ; couleur rose, aspect compact au centre, diffus à la périphérie, pas de granules nettement identifiables.

Photo 13 : thrombocytes, très fines granulations roses, en petits paquets, sans localisation préférentielle près des noyaux.

Photo 14 : septicémie avec une bactérie qui envahit tous les capillaires (jamais dans la cowdriose) ; forme coccobacillaire très rarement observée dans les *Cowdria*.

Photo 15 : *Babesia bovis* ; corps en lunettes ou en

tréma caractéristiques de la babésiose cérébrale ; parfois la babésiose cérébrale est associée à la cowdriose.

Photo 16 : la dégradation de l'hémoglobine produit des granules, diffus dans les capillaires.

DISCUSSION

Selon cette expérience, les colonies de *Cowdria* sont caractérisées par :

— leur morphologie en granules (0,2 à 0,5 μ), de loin la plus fréquente, parfois en anneaux ou en fer à cheval (1 à 3 μ),

— leur position proche du noyau d'une cellule endothéliale,

— leur couleur mauve violacé (Giemsa), légèrement plus foncée et tirant plus sur le bleu que celle des noyaux (pourpre ou rose) ; les colonies diffuses sont plus pâles que les noyaux.

Pour un laboratoire disposant d'un microscope à immunofluorescence, la technique de coloration à l'acridine orange, outre sa rapidité, permet d'éviter la confusion entre les colonies de *Cowdria* et des thrombocytes ou des corps bleus.

Les colonies sont toujours présentes lorsque l'animal est mort de cowdriose, mais plus ou moins nombreuses (souvent d'autant moins nombreuses que l'évolution a été plus rapide) : dans certains cas il n'a été observé qu'une seule colonie sur deux lames examinées intégralement, dans d'autres cas plus de 50 colonies sur une seule lame. Un examen pendant une demi-heure est nécessaire avant de rejeter la suspicion de cowdriose. Une seule colonie typique (Photos 3, 5, 10) suffit à poser le diagnostic.

CONCLUSION

L'écrasement d'un morceau de cortex cérébral et sa coloration ne présentent pas de difficultés et doivent être réalisés chaque fois qu'un bovidé meurt brutalement ou après avoir manifesté des symptômes nerveux, dans les zones où sévissent des *Amblyomma* africains. L'identification des colonies de *Cowdria* dans les endothéliums cérébraux nécessite la connaissance des divers aspects morphologiques de cette rickettsie et les microphotographies présentées dans cette publication sont destinées à aider les observateurs débutants à réaliser un diagnostic par ailleurs facile à mettre en oeuvre.

E. Camus, N. Barré

CAMUS (E.), BARRÉ (N.). Heartwater diagnosis from brain ecrasement. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1988, 41 (3) : 247-252.

The article describes practical aspects of heartwater diagnosis from brain samples. The difficulties in microscopic heartwater diagnosis are only due to the possible confusion between *Cowdria ruminantium* colonies and other corpuscles: pictures are jointed to show the different morphological aspects of *Cowdria* and to guide the beginner observer. A quick diagnostic technique, using orange acridine staining, is described. *Key words* : Heartwater - Microscopic diagnosis - *Cowdria ruminantium* - Morphological aspects - Orange acridine.

CAMUS (E.), BARRÉ (N.). Diagnóstico de la cowdriosis a partir de muestras de cerebro. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1988, 41 (3) : 247-252.

Se notan los aspectos prácticos del diagnóstico de la cowdriosis a partir de muestras de cerebro. Las dificultades del diagnóstico microscópico de dicha enfermedad son causadas por la confusión posible entre las colonias de *Cowdria ruminantium* y otros germenos: fotografías muestran los diferentes aspectos morfológicos de *Cowdria* y pueden guiar al observador principiante. Se describe una técnica de diagnóstico rápido gracias a una coloración con acridina anaranjada. *Palabras claves* : Cowdriosis - Diagnóstico microscópico - *Cowdria ruminantium* - Morfología - Acridina anaranjada.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARRÉ (N.), CAMUS (E.). Étude épidémiologique de la cowdriose (*Heartwater*) aux Antilles. IEMVT Antilles-Guyane, 1983. 37 p. (Rapport préliminaire 1982).
2. CILLI (V.), CORAZZI (G.). Su alcuni aspetti morfologici di *Cowdria ruminantium*. *Riv. Parassit.*, 1954, 15 (4) : 337-352.
3. COWDRY (E. V.). Studies on the etiology of heartwater. I. Observation of a *Rickettsia*, *Rickettsia ruminantium* (n.sp.) in the tissues of infected animals. *J. exp. Med.*, 1925, 42 : 231-252.
4. PERREAU (P.), MOREL (P. C.), BARRÉ (N.), DURAND (P.). Existence de la cowdriose (*Heartwater*) à *Cowdria ruminantium*, chez les petits ruminants des Antilles françaises (la Guadeloupe) et les Mascareignes (la Réunion et l'île Maurice). *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1980, 33 (1) : 21-22.
5. ROUSSELOT (R.). Notes de parasitologie tropicale. I. Parasites du sang des animaux. Paris, Vigot, 1953. Pp 75-87.
6. SCHREUDER (B. E. C.). A simple technique for the collection of brain samples for the diagnosis of heartwater. *Trop. anim. Hlth Prod.*, 1980, 12 : 25-29.
7. UILENBERG (G.). Heartwater (*Cowdria ruminantium* infection): current status. *Adv. vet. Med.*, 1983, 27 : 427-480.