

Prévalence, origine, circulation et persistance des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins français.

S. RAYNAUD (1), C. VERNOZY-ROZAND (2), P. BOSCHER (6), P. PICANT (5), B. MATHIEU (4), C. DEGAND (7), B. POUTREL (3), V. HEUCHEL† (1), Y-M. CHATELIN (1)

(1) Institut de l'Élevage, 149, rue de Bercy, 75595 PARIS CEDEX 12

(2) Ecole Nationale Vétérinaire, BP 83, 1, avenue Bourgelat, 69280 MARCY L'ETOILE

(3) INRA Tours Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie (PII), 37380 NOUZILLY

(4) Syndicat Interprofessionnel du Reblochon, Maison du Reblochon, BP 55, 74230 THONES

(5) Groupement de Défense Sanitaire, 14, rue Alexander Flemming, BP 107, 14204 HEROUVILLE ST CLAIR CEDEX

(6) Groupement de Défense Sanitaire, 76-78 chemin des Maures, BP 138, 610004 ALENCON CEDEX

(7) Groupement de Défense Sanitaire, 2, espace de la Garenne de Melleville, BP 556, 27005 EVREUX CEDEX

RESUME - Parmi les souches d'*Escherichia coli* produisant des Shiga-toxines (STEC), certaines sont responsables de pathologies sévères chez l'homme. Les ruminants sont un des principaux réservoirs naturels de ces bactéries. Cette étude avait pour objectifs d'estimer la prévalence de l'excrétion fécale de STEC et de la présence de STEC dans le lait, identifier l'origine, les modes de circulation intra et inter élevage et la persistance des souches et d'évaluer la fréquence des STEC parmi les souches d'*E.coli* responsables de mammites. La prévalence du portage de STEC dans les fèces et dans le lait a été estimée par la présence du gène *stx* sur un échantillon de 151 troupeaux laitiers, recrutés par sondage aléatoire. Dans l'environnement de 13 troupeaux ayant présenté des fèces et/ou du lait positifs *stx*, des échantillons ont été prélevés à trois reprises sur une large gamme de substrats susceptibles d'être colonisés par les STEC. Les résultats obtenus dans les fèces des bovins des exploitations suivies permettent d'estimer que dans cette zone 92 % des élevages pourraient présenter au moins un bovin porteur fécal du gène *stx*. Deux exploitations seulement présentaient le sérotype O157:H7 dans les fèces des bovins. Le gène *stx* était présent dans le lait de 4,3 à 26,6 % des exploitations selon la série de prélèvement. Cette présence du gène *stx* est épisodique. Très peu de souches STEC ont été isolées dans le lait, traduisant sans doute le fait que les STEC y sont en quantité faible. Les souches STEC les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine semblent peu présentes dans les exploitations laitières françaises, et notamment dans le lait qu'elles produisent. La diversité et la persistance des STEC mises en évidence lors des études de cas rendent difficile la maîtrise des risques STEC dans les élevages bovins laitiers. La contamination fécale est vraisemblablement la voie majeure de contamination du lait car aucune des 123 souches *E. coli* étudiées, issues de mammites cliniques provenant de toute la France, n'était porteuse du gène *stx*. Les études de cas ne permettent pas de dégager de l'analyse des priorités vis-à-vis des mesures préventives susceptibles d'être recommandées aux éleveurs. Cependant dans les exploitations dont l'environnement est contaminé, on peut recommander de mettre en œuvre de manière systématique et rigoureuse des mesures classiques d'hygiène visant à limiter la dissémination des bactéries dans les étables, sur les mamelles et lors de la traite pour prévenir la contamination ponctuelle du lait.

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) prevalence, origin, circulation and persistence in French dairy herds.

S. RAYNAUD (1), C. VERNOZY-ROZAND (2), P. BOSCHER (6), P. PICANT (5), B. MATHIEU (4), C. DEGAND (7), B. POUTREL (3), V. HEUCHEL† (1), Y-M. CHATELIN (1)

(1) Institut de l'Élevage, 149, rue de Bercy, 75595 PARIS CEDEX 12

SUMMARY - Some STEC strains are responsible for severe human diseases. Ruminants are considered as the main natural reservoir of these bacteria. The aims of this study were to estimate the faecal excretion prevalence of STEC and the prevalence of STEC in milk, to achieve a better understanding of the origin, circulation and persistence of the STEC strains in and between the herds and to evaluate the frequency of STEC among *E. coli* mastitis. The prevalence of STEC in faeces and in milk was estimated by the presence of the *stx* gene in 151 dairy herds randomly chosen in a plain area. The environment of 13 dairy farms whose cattle faeces or milk carried the *stx* gene was sampled three times (individual studies). The results of the faeces study allowed us to estimate that 92 % of the herds could have at least one bovine carrying the *stx* gene. O157:H7 was found in the faeces on only two farms. The *stx* gene was found in 4.3 to 26.6 % of the milk samples according to the milk sample series. Only a few strains were isolated in the milk. This suggests that the STEC level in milk is low. The most dangerous strains for human health did not seem to be present to a great extent in French dairy herds and, in particular, in the milk they produce. Individual studies showed a great diversity and persistence of the STEC strains : the STEC risks can be difficult to manage in dairy farms. Faecal contamination seems to be the main way of contamination of milk because none of the 123 *E. coli* strains studied, coming from clinical mastitis from all over France, carried the *stx* gene. No priority can be given to the farmer to prevent the contamination of milk. However, in the farms whose environment is contaminated, classic hygiene recommendations must be carefully and systematically applied to limit the spray of bacteria in the stables, on the udders and during milking to prevent any punctual contamination of milk.

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* producteurs de *Shiga-toxines* (STEC) peuvent être responsables de pathologies sévères chez l'homme, jusqu'à être fatales chez les personnes fragiles. Depuis le début des années 1980, l'attention sur l'impact de ces bactéries sur la santé publique s'est considérablement accrue, du fait qu'elles ont été impliquées dans plusieurs grandes épidémies, notamment aux Etats Unis, au Canada, au Royaume Uni et au Japon (Nataro et Kaper, 1998). Parmi les souches isolées lors des différentes épidémies répertoriées (ou lors de cas sporadiques en France), le sérotype O157:H7 est dominant et a été le plus étudié (Vernozy-Rozand et Montet, 2001), mais d'autres sérogroupes sont également impliqués avec une incidence variable selon les pays (AFSSA, 2003). Sur le plan génétique, au-delà du gène *stx* codant les *Shiga-toxines*, la plupart des souches rencontrées en pathologie humaine possèdent aussi des gènes codant d'autres facteurs de virulence dont la combinaison augmenterait le risque et la sévérité des infections (Boerlin *et al.*, 1999).

On considère que les bovins constituent un des principaux réservoirs naturels des STEC et de fait, les toxi-infections alimentaires collectives provoquées par ces bactéries ont très souvent été associées à la consommation de viande hachée de bœuf insuffisamment cuite. Le lait et les produits laitiers apparaissent moins impliqués, mais plusieurs épidémies dues à leur consommation ont cependant été décrites dans le monde depuis 1983 (AFSSA, 2003).

Dans ce contexte, les principaux objectifs de cette étude sont les suivants :

- Estimer la prévalence du portage animal et de l'excrétion fécale de STEC à travers la présence du gène *stx*.
- Estimer la prévalence de la contamination du lait au niveau d'une collecte laitière et l'incidence de cette contamination au niveau des exploitations pendant une campagne.
- Identifier les principaux substrats colonisés par les STEC dans les exploitations laitières, et les modes de circulation de ces souches intra et inter élevage.
- Evaluer la fréquence des STEC parmi les souches d'*E.coli* responsables de mammites.

La réalisation de ces objectifs doit permettre d'aider à la définition de mesures adaptées pour la prévention de la contamination du lait à la production et pour la surveillance de la collecte par les entreprises fabriquant des produits au lait cru.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. ETUDE DE LA PREVALENCE DANS LES FECES ET LE LAIT

151 exploitations ont été tirées au sort en Normandie dans une population de 407 élevages, typique d'une collecte de lait cru dans une région de plaine.

1.1.1. Etude de la prévalence dans les fèces

La prévalence du portage animal a été évaluée au niveau de l'unité "troupeau". Des prélèvements de fèces fraîches sur le sol ont été réalisés 2 fois à 6 mois d'intervalle dans 115 des 151 élevages étudiés. Le nombre de fèces de vaches ou de veaux prélevé est égal à 10 % du nombre d'animaux présents avec un minimum de 5. Elles ont ensuite été envoyées pour analyse au laboratoire de l'ENV de Lyon.

1.1.2. Etude de la prévalence dans le lait

Dans chacune de ces 151 exploitations, deux échantillons de lait de tank ont été prélevés de manière aseptique tous les deux mois pendant un an par les chauffeurs des camions de

ramassage. Ces deux échantillons ont été conservés et acheminés au froid dans les 24 h en vue de leur analyse : recherche et caractérisation des STEC au laboratoire de l'ENV de Lyon et dénombrement d'*E. coli* au laboratoire interprofessionnel de Basse-Normandie.

1.2. ETUDES DE CAS

9 exploitations ont été recrutées suite à la mise en évidence du gène *stx* ou d'un sérotype particulier dans les fèces et/ou le lait lors de la première partie de l'étude en Normandie. Quatre autres exploitations, situées en Rhône Alpes, ont été recrutées en s'appuyant sur les données épidémiologiques disponibles avant l'étude. Ces 13 exploitations ont fait l'objet d'une étude de cas afin d'identifier les sources et les modes de circulation des souches STEC. Les principaux substrats considérés comme à risque d'après la bibliographie ont fait l'objet de prélèvements répétés lors de 3 visites successives à 1 à 2 mois d'intervalle. Une enquête sur les caractéristiques de l'exploitation et les pratiques de l'éleveur, comprenant l'assistance à une traite a été menée dans chacune de ces 13 exploitations.

1.3. ETUDE DES SOUCHES *E. COLI* RESPONSABLES DE MAMMITES

La séquence conservée des gènes *stx1* et *stx2* a été recherchée par PCR pour 123 souches issues de mammites à *E. coli* conservées par l'INRA de Tours :

- 41 souches provenant de différentes régions de France et isolées de 1959 à 1998,
- 82 souches provenant d'une étude menée en 2002-2004 dans 20 départements français.

L'ensemble de ces souches provient de prélèvements de lait réalisés de façon aseptique en élevage. La qualité des prélèvements a été vérifiée lors de la phase de culture sur boîte de Pétri.

1.4. METHODES DE LABORATOIRE

Dans chacune des étapes du programme de travail, la présence de STEC dans les différents échantillons prélevés a d'abord été recherchée à l'aide d'une technique PCR permettant de mettre en évidence une séquence conservée des gènes *stx1* et *stx2* codant les *Shiga-toxines*. Après une étape d'hybridation sur colonie, les souches de STEC isolées dans les échantillons ont été sérotypées (sérogroupes O26, O55, O111, O103 et O157:H7) et ont fait l'objet d'une caractérisation génétique : recherche des gènes codant les *shiga-toxines* (*stx1* et *stx2*), le facteur d'attachement et d'effacement (*eae*), l'*entérohémolysine* (*ehx*). Pour l'identification des modes de circulation des souches dans et entre les 13 exploitations enquêtées de façon approfondie, les souches ont été, de plus, typées par électrophorèse en champ pulsé (enzyme de restriction *XbaI*).

1.5. ANALYSES STATISTIQUES

Les données ont été traitées à l'aide des logiciels SPAD version 6.0 et SAS version 8.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. ETUDE DE LA PREVALENCE DANS LES FECES ET LE LAIT

2.1.1. Etude de la prévalence dans les fèces et caractérisation des souches

La séquence conservée des gènes *stx1* et *stx2* a été détectée dans 705 échantillons de fèces (35 % des échantillons prélevés). A partir des résultats obtenus sur notre échantillon, on peut estimer que le portage fécal de STEC établi à travers la présence du gène *stx* peut exister dans 92 % des exploitations d'une collecte de lait cru de plaine

(intervalle de confiance 88-96 % avec un niveau de risque de 5 %). Ces résultats sont en accord avec ceux des différentes études réalisées dans le monde (Wilson *et al.*, 1993 ; Nataro et Kaper, 1998 ; Moreira *et al.*, 2003). Par ailleurs notre étude a confirmé le caractère intermittent de l'excrétion fécale de STEC, ce qui rend difficile la caractérisation de la situation de l'exploitation en terme d'excrétion fécale.

408 souches ont pu être isolées dans 299 échantillons de fèces sur les 705 positifs *stx* par PCR (taux de recouvrement de 42 %). 50 % de celles-ci portaient *stx1*, 74 % *stx2* et 25 % *stx1* et *stx2* simultanément. 40 % portaient le gène *eae* et 85 % le gène *ehx*. 16 % des souches retrouvées dans les échantillons fécaux de 31 exploitations (27 % des 115 exploitations) présentaient simultanément les 4 gènes, ce qui suggère un pouvoir pathogène de ces souches. Seules 18 souches provenant de 12 échantillons appartenaient à l'un des sérogroupes recherchés, ce qui correspond à 9 élevages sur les 115 étudiés (tableau 1).

Tableau 1 : fréquence de contamination des fèces par les différents sérogroupes de *E. coli* STEC recherchés

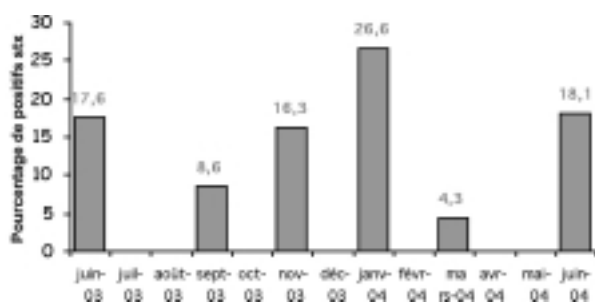
Séro groupe	Nombre d'exploitations
O26	6 (fèces veaux)
O55	1 (fèces vaches)
O103	0
O111	1 (fèces vaches)
O157:H7	2 (fèces vaches et veaux)

S'agissant du sérotype O157:H7, considéré comme le plus impliqué en pathologie humaine, la présente étude permet de supposer que les exploitations laitières françaises sont peu concernées : seules 2 exploitations sur les 115 suivies avaient des animaux qui portaient ce sérotype (1,7 %) dans leurs fèces. Toutes les souches O157 portaient l'antigène H7. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Meyer-Broseta *et al.*, (2001) au travers d'une synthèse d'études conduites dans différents pays : de 0 à 3 % des cheptels européens étudiés peuvent être estimés concernés à un moment donné par *E. coli* O157.

2.1.1. Etude de la prévalence dans le lait et caractérisation des souches

Dans les 151 troupeaux, 788 échantillons de lait ont été analysés. 119 ont été détectés *stx* positifs (15 % des échantillons) par PCR. La fréquence mensuelle des exploitations livrant un lait *stx* positif a varié entre 4,3 et 26,6 % au cours de la campagne de collecte étudiée (figure 2). Un test du Khi-2 de répartition au risque $\alpha=5$ % montre un effet significatif du mois de prélèvement sur la présence du gène *stx* dans le lait ($\chi^2=33,61$ et $p<0,0001$).

Figure 2 : évolution de la fréquence des livraisons de laits *stx* positifs par analyse PCR



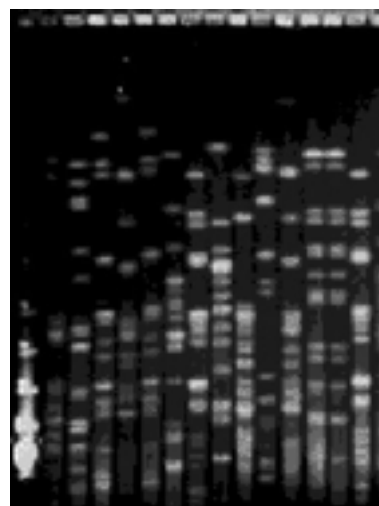
Les résultats obtenus permettent d'estimer que 55 % de la population pourrait présenter un lait positif *stx* au moins une

fois dans une année (intervalle de confiance 49-62 % avec un niveau de risque de 5 %). La présence de gène *stx* dans 15 % des échantillons de lait concorde avec celle obtenue en 1999 dans une étude française (Fach *et al.*, 2001). La présence du gène *stx* a un caractère épisodique : 55 exploitations n'ont présenté qu'une fois un lait dans lequel le gène *stx* a été détecté et aucune n'en a présenté plus de 3 fois sur 6. Ce caractère épisodique est sans doute à mettre en relation avec l'intermittence de l'excrétion fécale et l'existence de mesures d'hygiène préventives, auxquelles sont particulièrement attentives ces exploitations livrant du lait pour la fabrication de produits au lait cru. Il semble qu'un seul prélèvement de lait ne permette pas non plus de caractériser la situation à plus long terme du lait de l'exploitation. Seulement 28 souches ont été isolées dans 20 laits de 19 exploitations différentes parmi les 119 laits positifs en *stx* (taux de recouvrement de 17 %) par PCR. Les profils de virulence retrouvés sont variés : 39 % des souches ont *stx1*, 82 % ont *stx2* et 29 % *stx1* et *stx2*. 15 % des souches portent le gène *eae* et 90 % le gène *ehx*. Trois souches issues de 3 laits de 3 exploitations différentes portent simultanément les 4 gènes de virulence, ce qui concerne donc 2 % des 151 exploitations étudiées. Aucun des sérogroupes recherchés n'a été trouvé dans le lait. De manière similaire, un plan de surveillance des fromages mené, en France, par la DGAL en 2000-2001 sur 1039 fromages au lait cru n'a permis de retrouver aucune souche O157:H7.

2.2. ETUDES DE CAS

50 à 130 échantillons de toutes origines ont été prélevés dans chacune des 13 exploitations étudiées, soit un total de 1337 échantillons. Le nombre d'échantillons présentant le gène *stx* dans une exploitation varie entre 8 et 50 % des échantillons prélevés ; parmi ceux-ci le taux de recouvrement fluctue de 4 à 67 %. Les résultats montrent une grande diversité des substrats contaminés, la présence du gène *stx* étant observée le plus souvent dans les fèces des veaux et des vaches. On retrouve aussi de nombreux positifs *stx* sur des prélèvements qui restituent un "historique" de contamination (chiffonnage des murs, barres, mamelles entières, fumiers et lisiers). Les électrophorèses en champ pulsé montrent une très grande diversité des souches retrouvées sur le même élevage, laissant par là-même supposer la multiplicité des sources d'introduction des bactéries dans l'élevage. La figure 3 illustre cette diversité.

Figure 3 : électrophorèse en champ pulsé des souches retrouvées dans l'élevage n°53



Ces analyses révèlent une persistance longue des souches dans l'environnement pouvant atteindre un an dans des fèces de bovins. Par ailleurs les substrats suivants ont été mis en cause dans la circulation des STEC dans les 13 exploitations étudiées de manière approfondie : l'eau de mare ou d'abreuvoir, les fèces des vaches et des veaux, les chiffonnages de barres métalliques, murs, trayons et mamelles. En revanche, aucun lien de clonalité n'a pu être observé entre les souches issues d'élevages différents, même situés sur la même commune. La bibliographie confirme la plupart de nos observations et propose différentes hypothèses pour les interpréter (Duffy *et al.*, 2003 ; Shere *et al.*, 1998 ; Cobbold et Desmarchelier, 2001).

L'observation du pourcentage et du type d'échantillons positifs ainsi que du taux de recouvrement des souches permet de caractériser la dissémination des bactéries dans l'exploitation. La comparaison des caractéristiques et des pratiques mises en œuvre dans chacune de ces exploitations permet de dégager des facteurs de risque potentiels. Le taux de substrats positifs *stx* semble lié aux caractéristiques d'hygiène générale de l'exploitation (paillage, propreté des vaches...). Ces observations sont confirmées par différents auteurs ayant montré le rôle de mauvaises conditions de logement dans la circulation des bactéries (Cobbold et Desmarchelier, 2002). L'analyse des positivités en *stx* des laits suggère l'importance tant des mesures d'hygiène au sens large, que de la pression de contamination de l'environnement des exploitations. Ces résultats soulignent la nécessité d'intervenir sur toutes les étapes de la chaîne de contamination, et en particulier au niveau de la propreté des étables et des animaux.

2.3. ETUDE DES SOUCHES *E. COLI* RESPONSABLES DE MAMMITES

Aucune des 123 souches qui ont été analysées n'est porteuse de la séquence conservée des gènes *stx1* et *stx2* codant les *shiga-toxines*. Les résultats de notre étude ne montrent pas l'existence d'une excrétion mammaire. Cependant celle-ci ne peut pas être complètement écartée (Stephan et Khun, 1999 ; Lira *et al.*, 2004) et mériterait d'être étudiée sur un échantillon plus large.

CONCLUSION

Malgré une forte présence du gène *stx* dans les fèces, et dans une moindre mesure dans certains laits, ces résultats sont rassurants du point de vue de la santé publique pour la filière bovine laitière car les souches les plus souvent rencontrées

en pathologie humaine semblent peu présentes dans les exploitations laitières françaises et notamment dans le lait qu'elles produisent. La diversité des STEC rend difficile leur maîtrise au sein des élevages bovins laitiers. De plus, la biologie de ces bactéries présente encore de nombreuses inconnues et les méthodes d'analyse permettant de les détecter et de les quantifier en routine ne sont pas encore au point. D'après nos résultats, la contamination fécale indirecte est vraisemblablement la voie majeure de contamination du lait. Cette étude exploratoire n'a pas permis de dégager de l'analyse des priorités vis-à-vis des mesures préventives à recommander aux éleveurs. Cependant, dans les exploitations dont l'environnement est contaminé, on peut considérer que c'est l'ensemble des mesures d'hygiène permettant d'éviter la dissémination des bactéries dans les étables, sur les mamelles et lors de la traite qui devront être systématiquement et rigoureusement appliquées pour prévenir la contamination accidentelle du lait.

Cette étude a été conduite dans le cadre du programme Aliment Qualité Sécurité 2002, avec le soutien du MENESR et d'ARILAIT RECHERCHES. Nous remercions les entreprises laitières, les GDS, le SIR, le CNIEL et les éleveurs qui ont participé à cette étude.

AFSSA, 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de *Shiga-toxines* (STEC). 220 pages.

Boerlin P. et al., 1999. *Cell. Mol. Life Sci.*, 56, 735-741

Cobbold R. et Desmarchelier P., 2001. *Vet. Microbiol.*, 79, 323-335.

Cobbold R. et Desmarchelier P., 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(8), 4148-4152

Duffy G. et al., 2003. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 94s-103s

Fach P. et al., 2001. *J. Appl. Microbiol.*, 90 (5), 809-818

Lira W.M. et al., 2004. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 861-866

Meyer-Broseta S. et al., 2001. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 203, 347-361

Moreira C.N. et al., 2003. *Vet. Microbiol.*, 93, 179-183

Nataro J.P. et Kaper J.B., 1998. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11, 142-201

Shere J.A. et al., 1998. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1390-1399

Stephan R. et Kuhn K., 1999. *Zentralbl. Veterinarmed -B.*, 46(6), 423-427

Vernozy-Rozand C. et Montet M.P., 2001. *Escherichia coli* O157:H7. Editions TEC&DOC Lavoisier. 135 p.

Wilson J.B. et al., 1993. *Preventive Veterinary Medicine*, 16, 159-170