

Origines, diagnostic et moyens de maîtrise de la contamination du lait de vache par les salmonelles

V. HEUCHEL (1), J. MARLY (2), N. MEFFE (3)

(1) Institut de l'Élevage, 149 rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12

(2) INRA Centre de Tours, Laboratoire de Pathologie Infectieuse et d'Immunologie, 37380 Nouzilly

(3) Institut de l'Élevage, Le Rheu, Monvoisin, BP 67, 35652 Le Rheu Cedex

avec la collaboration de J.L. MENARD (Institut de l'Élevage, Angers), L. PLASSOT (Institut de l'Élevage, Caen)

RESUME - Les facteurs de risque de la contamination du lait de vache à la production ont été recherchés à travers une enquête épidémiologique de type « cas - témoin », réalisée dans 80 élevages. Parallèlement, des prélèvements de lait effectués sur les animaux dans les élevages « cas » ont permis d'étudier les modalités de l'excrétion mammaire de salmonelles, et de développer une technique immunologique de dépistage des vaches potentiellement excrétrices. Les résultats de ces travaux montrent que :

- Les principales sources de salmonelles au sein des élevages sont les déjections des bovins, et que le portage et l'excrétion fécale de ces bactéries ne sont pas systématiquement liés à des antécédents de salmonellose cliniques dans les troupeaux.

- Dans un élevage donné, même exposé au risque du fait de la présence de salmonelles dans l'environnement, l'occurrence de la contamination du lait est généralement faible (de l'ordre de une à deux fois/an).

- Dans les exploitations dont l'environnement est contaminé, c'est l'ensemble des mesures d'hygiène permettant d'éviter la dissémination des salmonelles dans les étables, sur les mamelles, et lors de la traite, qui doivent être systématiquement et rigoureusement appliquées pour prévenir la contamination du lait.

- La prévalence de l'excrétion mammaire de salmonelles, observée sur un échantillon de 29 élevages ayant livré un lait contaminé, est de l'ordre de 0,6 %. L'utilisation de techniques sérologiques (ELISA) est envisageable pour le diagnostic présomptif des vaches excrétrices.

Origins, diagnosis and control of contamination of cow's milk by *Salmonella* in dairy farms

V. HEUCHEL (1), J. MARLY (2), N. MEFFE (3)

(1) Institut de l'Élevage, 149 rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12

SUMMARY - Risk factors associated with contamination of cow's milk by *Salmonella* in dairy farms were searched by a case-control study involving 80 dairy herds. At the same time, samples milk performed on the cases herd's cows allowed to study mammary excretion of *Salmonella*, and to adapt an ELISA technic for detection of udder excreting cows. The results of this work show that :

- Main source of *Salmonella* in dairy herds are cattle faeces. Carriage and faecal excretion of *Salmonella* are not systematically associated with past clinical salmonellosis in herds.

- In the dairy farms, even exposed by environment contamination, occurrence of milk contamination is generally not frequent (about 1 or 2 times by year).

- In dairy farms with contaminated environment, all hygienic practices avoiding *Salmonella* spreading in the barns, on the udders and during milking, must be stictly applied to prevent milk contamination.

- Prevalence of mammary excretion, observed in 29 dairy farms delivering contaminated milk, is about 0.6%.

- Mammary excretion can be detected using an ELISA technique.

INTRODUCTION

Les salmonelles sont une des premières causes des infections d'origine alimentaire dans les pays industrialisés. Ces infections surviennent sous la forme de cas sporadiques ou de toxico-infections alimentaires collectives (TIAC), mais peuvent aussi donner lieu à des épidémies communautaires d'ampleur régionale, nationale, voire internationale. En France, entre 1988 et 1997, elles sont responsables de près de 50 % des TIAC déclarées. Souvent provoquées par la consommation d'ovo-produits, de volailles ou de produits carnés contaminés, elles sont aussi associées, quoique plus rarement (1,8 % de l'ensemble des TIAC à salmonelles), à la consommation de produits laitiers, notamment au lait cru (De Buyser *et al.*, 2001). Entre 1990 et 1997, on a enregistré cinq grandes épidémies de salmonelloses humaines associées à la consommation de fromages au lait cru. Pour cette filière de production, en l'absence de pasteurisation, et en complément des plans de contrôle systématiquement mis en oeuvre par les entreprises de collecte et de transformation, la maîtrise de la qualité sanitaire des produits repose en grande partie sur la prévention des risques de contamination du lait à la ferme. Afin de développer pour les producteurs des moyens de maîtrise adaptés et efficaces, un programme de recherche a été conduit entre 1997 et 1999 par l'Institut de l'Élevage, en partenariat avec l'INRA, l'ENV Alfort, des entreprises laitières, des organisations professionnelles agricoles, un Groupement Technique Vétérinaire et la société Henkel - Ecolab. Ses principaux objectifs étaient les suivants :

- identifier et évaluer les principaux facteurs de risque de la contamination du lait de vache par les salmonelles, et préciser les vecteurs et les voies de diffusion de cette contamination dans les exploitations,
- étudier les modalités de l'excrétion mammaire de salmonelles, et développer une technique immunologique de dépistage des vaches excrétrices,

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. RECHERCHE DES FACTEURS DE RISQUE

La recherche des facteurs de risque de contamination du lait a été réalisée à travers une enquête épidémiologique de type cas - témoin sur un échantillon de 80 élevages, recrutés dans une population d'environ 1000 exploitations des régions Basse Normandie et Lorraine à partir des résultats des plans de surveillance du lait collecté par les entreprises associées au programme. Un élevage était considéré comme « cas » et entré dans l'étude dès lors qu'il présentait un résultat de contrôle du lait positif en salmonelles. Pour chaque « cas », un élevage « témoin » était recruté par sondage aléatoire dans la population de ceux n'ayant jamais livré de lait contaminé par les salmonelles, puis appariement à l'élevage « cas » sur les critères « niveau moyen de production laitière du troupeau », « type de bâtiment d'élevage », et « type de stockage des déjections animales (fumier ou lisier) ». Dans les 15 jours suivant leur recrutement, une enquête était réalisée dans chacun des élevages sur les facteurs potentiels de risque de contamination du lait. Parallèlement, des prélèvements ont été effectués à deux reprises dans les effluents et dans l'eau utilisée (abreuvement des animaux, nettoyage des équipements laitiers et des mamelles), afin d'évaluer et de caractériser la présence de salmonelles dans l'environnement des exploitations (recherche et dénombrement des bactéries, sérotypage des souches isolées, et caractérisation moléculaire d'une partie d'entre elles). Enfin, dans une quinzaine de troupeaux des élevages « cas » totalisant environ 450 vaches, deux à trois séries de prélèvements de fèces ont été effectués à 15 jours d'intervalle sur les animaux en production.

Les résultats issus de ces enquêtes et de ces prélèvements ont été analysés à l'aide d'un modèle logistique sur données appariées.

1.2. EXCRÉTION MAMMAIRE ET ÉVALUATION D'UNE TECHNIQUE ELISA POUR LE DÉPISTAGE DES VACHES EXCRÉTRICES

Dans 29 élevages « cas », des prélèvements de lait ont été effectués sur l'ensemble des animaux en vue de la recherche de salmonelles et du dosage des anticorps anti-salmonelles à partir d'une technique ELISA mise au point par l'INRA, et dérivant de celles développées aux USA (Smith *et al.*, 1989) et au Danemark (Hoorfar *et al.*, 1995). Cette technique a d'abord été adaptée aux conditions des élevages français, puis, à partir de résultats portant sur l'ensemble des laits prélevés, ses critères de validité interne vis à vis du diagnostic présomptif de l'excrétion mammaire ont été évalués par rapport au diagnostic bactériologique, considéré comme la méthode de référence. Par ailleurs, deux vaches confirmées excrétrices ont été suivies en station expérimentale, dans un bâtiment isolé de niveau de protection 2. Les modalités de l'excrétion mammaire (intensité, persistance dans le temps) ont été étudiées à partir de la recherche et du dénombrement de salmonelles sur des prélèvements aseptiques effectués régulièrement pendant plusieurs semaines sur les laits de chaque quartier, ainsi que sur le lait de mélange des 4 quartiers. À l'issue de ce suivi, les vaches ont été abattues et autopsiées, et les salmonelles ont été recherchées dans les organes (mamelle, ganglions rétro-mammaires, rate, foie, reins, ganglions iliaques et mésentériques).

2. PRINCIPAUX RESULTATS

2.1 FACTEURS DE RISQUE

La fréquence moyenne de la contamination par les salmonelles du lait collecté dans les 40 élevages « cas », observée pendant 15 mois à raison de deux contrôles par mois en moyenne par élevage, a été de 9,4 % soit 2,6 contrôles positifs par élevage pendant la période considérée. Seulement trois élevages ont présenté plus de cinq contrôles positifs pendant cette période. Les résultats de recherche de salmonelles dans l'environnement des exploitations montrent que les déjections des bovins constituent la principale source : sur les deux séries de prélèvements réalisées dans les effluents (lisiers ou fumiers) de chaque exploitation, un résultat positif a été observé au moins une fois chez 26 élevages « cas » (soit 65 %) ; cette contamination était beaucoup moins fréquente chez les élevages « témoins » (15 %). Dans les élevages « cas » où des prélèvements ont été réalisés directement sur les animaux, près de 25% des vaches en moyenne excrétaient des salmonelles dans leurs fèces, la proportion d'animaux excréteurs par troupeau variant entre 0 et 98 %. Par ailleurs, l'eau utilisée soit pour l'abreuvement des vaches, soit pour les opérations d'hygiène lors de la traite, était parfois contaminée par les salmonelles chez les élevages « cas », alors que cela n'a pas été observé chez les « témoins » (tableau 1).

Tableau 1
Fréquence de la contamination en salmonelles dans l'environnement des élevages (%)

Prélèvements	Cas	Témoins
Eau à l'origine	2,5	0,0
Eau d'abreuvement	12,5	0,0
Eau des lavettes*	16,7	0,0
Eau résiduelle après lavage machine à traire	0,0	0,0
Lisiers ou fumiers	65,0	15,0

* : % rapportés aux 30 élevages utilisant cette technique de préparation des trayons.

Tableau 2
Variables associées à l'occurrence de la contamination du lait

Variable	cas ^(*) (n=40)	témoins ^(*) (n=40)	OR ¹	P ²
% de vaches atteintes de mammité les 2 derniers mois	9.2 %	5.6 %	1.10	0.02
% de vaches atteintes de diarrhée les 2 derniers mois	10.2 %	1.2 %	1.14	0.018
Suspicion salmonellose les 2 derniers mois	7	0	-	0.008
Suspicion salmonellose pendant l'année écoulée	12	2	6	0.008
Cas de salmonellose pendant l'année écoulée	7	1	7	0.034
% de vaches mortes les 2 derniers mois	1.4 %	0.3%	1.46	0.049
Proximité atelier de taurillons	8	3	-	0.025
Contamination des lisiers ou des fumiers de bovins	26	9	6.67	0.001
% cultures fourragères dans la SFP	38.4 %	30.5 %	1.05	0.01
Epandage fumier bovins sur cultures fourragères	35	25	11	0.004
Epandage lisier ou fumier sur cultures fourragères	39	32	-	0.008
Utilisation continue de l'étable	21	9	4	0.007
Litières humides	14	7	3.33	0.05
Note moyenne de propreté des vaches	2.94	2.48	1.95	0.025
Contamination de l'eau d'abreuvement	5	0	-	0.025
Abreuvoirs collectifs (bac)	38	32	7	0.034
Distribution de tourteaux	39	34	-	0.025
Contamination de l'eau des lavettes	4	0	-	0.045
Absence de désinfection des lavettes	9	1	-	0.005
% trayons blessés	1.1	0.4	2.76	0.02
Quantité d'eau utilisée pour le nettoyage de la machine à traire (L/poste)	21	16	1.3	0.02

(*) variables quantitatives : moyennes du groupe
variables qualitatives : nombre d'élevages exposés
¹ Odds ratio ; ² Probabilité de l'absence d'association

Parmi l'ensemble des variables enregistrées par enquête dans les exploitations, celles significativement associées à l'occurrence de la contamination du lait de tank par les salmonelles sont présentées dans le tableau 2.

La contamination des lisiers ou des fumiers de bovins par les salmonelles, augmente de près de 7 fois le risque de contamination du lait. En ce qui concerne les résultats sanitaires, ce sont principalement les antécédents de salmonellose clinique dans les troupeaux, ou les symptômes salmonelliques (diarrhées), qui ressortent de l'analyse. Toutefois, on n'a pas observé de différence significative entre les deux groupes sur les taux d'avortements moyens par troupeau (1.6 % pendant l'année écoulée pour le groupe « cas », contre 1.7 % pour le groupe « témoin »), ni sur les pathologies touchant les veaux, en particulier les diarrhées, bien que leurs taux moyen pendant les deux mois précédant l'enquête aient été plus élevés chez les élevages « cas » que chez les « témoins » (10.4 % vs 4.3 %). Sur les conditions d'hygiène dans les étables, les seules variables ressortant nettement de l'analyse sont l'absence de vide sanitaire pendant la campagne et l'humidité des litières. En ce qui concerne l'hygiène de la traite, le risque de contamination du lait apparaît clairement lié à la contamination de l'eau servant aux opérations de nettoyage des trayons, et à l'absence de désinfection entre les traites des lavettes utilisées pour ces opérations. La contamination par les salmonelles de

l'eau d'abreuvement, bien que rarement observée dans cette étude, est significativement associée au risque de contamination du lait. Le fait que la présence d'abreuvoirs collectifs, ou au contraire l'absence d'abreuvoirs individuels, le sont également montre que ce critère apparaît en tant que révélateur de la contamination de l'environnement des exploitations. Enfin, l'analyse n'a fait ressortir que peu de variables relatives à la nature ou aux conditions de l'alimentation des vaches laitières.

2.2 EXCRÉTION MAMMAIRE

Après différentes étapes de mise au point, aboutissant à l'utilisation comme antigènes soit de la souche de salmonelle issue de l'exploitation, tuée par la chaleur, soit d'un mélange de LPS de *S. typhimurium* et de *S. enteritidis*, la technique ELISA a été appliquée à l'identification d'animaux potentiellement excréteurs au sein de 29 troupeaux différents, afin d'établir les seuils de détection les plus sensibles. Dans chacun de ces troupeaux, les titres sériques des laits de toutes les vaches en production ont été mesurés, et on a considéré comme potentiellement excréteurs les animaux présentant des titres très supérieurs à ceux des autres. Sur les 1280 vaches prélevées, respectivement 225 et 42 ont été détectées sur la base de seuils de positivité correspondant à une densité optique (DO) supérieure soit à 0,2, soit à 0,5 nanomètres. L'excrétion mammaire de salmonelles a finalement été confirmée bactériologiquement pour 7 des animaux ainsi détectés. Les critères de validité interne de la technique vis à vis du diagnostic présomptif de l'excrétion mammaire de salmonelles ont été calculés à partir de ces résultats, et sont présentés en fonction du seuil de détection considéré dans le tableau 3.

Dans cette étude, sur un échantillon d'élevages ayant livré un lait contaminé, la prévalence de l'excrétion mammaire de salmonelles est donc de 0.55 % (7/1280) et on observe un animal excréteur dans 24 % (7/29) des troupeaux.

Tableau 3
Critères de validité interne du test Elisa (en %) pour le diagnostic présomptif de l'excrétion mammaire de salmonelles

Seuil de détection	DO > 0.2	DO > 0.5
Sensibilité	100	100
Spécificité	82.9	96.7
Valeur prédictive positive	3.1	14.3
Valeur prédictive négative	100	100
Efficience	82.9	96.7

Les deux vaches excrétrices suivies en station, provenant de deux exploitations différentes, ont excrété pendant toute la période d'observation, mais de façon très différente : la première très irrégulièrement et un faible nombre de salmonelles, parfois détectables seulement dans un millilitre de lait, et la seconde régulièrement et en quantité très importante (plus de 500 bactérie/ml en moyenne). Dans les deux cas, un seul quartier était infecté.

Les numérations cellulaires de la première vache sont restées modérées, y compris dans le quartier excréteur. En revanche, celles de la seconde, ont été constamment très élevées dans le quartier excréteur, et près de trois fois supérieures à celles des trois autres quartiers, en l'absence toutefois de mammité clinique. De plus, pour cet animal, le traitement au tarissement n'a pas eu d'effet sur l'excrétion de salmonelles, qui a pu être observée dans le colostrum à la reprise de la lactation. A l'issue du suivi les deux animaux ont été abattus et autopsiés, et se sont révélés porteurs de salmonelles dans le seul quartier excréteur de salmonelles et dans les ganglions rétro-mammaires correspondant.

3. DISCUSSION - CONCLUSION

Les principaux facteurs de risque identifiés dans cette étude (ainsi que les résultats de sérotypage et de caractérisation moléculaire des souches de salmonelles isolées dans les élevages, non présentés ici) suggèrent que les vecteurs de la propagation des salmonelles aboutissant à la contamination du lait, en dehors de l'excrétion mammaire, s'enchaînent selon le

schéma général suivant : excrétion fécale de salmonelles par les bovins - dissémination des bactéries dans l'environnement, directement via la contamination des litières, du sol des locaux de traite, de l'eau des abreuvoirs, ou indirectement via l'épandage des lisiers ou des fumiers - contamination de la peau des mamelles, des équipements de traite ou de l'eau utilisée pour le nettoyage des trayons - passage des salmonelles dans le lait lors de la traite. Les résultats de ces travaux confirment que les principales sources de salmonelles au sein des élevages laitiers sont les déjections des bovins, et que le portage et l'excrétion fécale de ces bactéries ne sont pas systématiquement liés à des antécédents de salmonellose clinique dans les troupeaux. Dans une étude réalisée au début des années 90 en Bretagne, des pourcentages d'animaux excréteurs similaires, de l'ordre de 7 à 9 % par troupeau, avaient été observés dans des élevages avec ou sans antécédents salmonelliques connus (Morisse *et al.*, 1992).

Pour un élevage donné, même s'il est exposé au risque du fait de la présence de salmonelles dans l'environnement, l'occurrence de la contamination du lait reste généralement faible (de l'ordre de une à deux fois /an). Cependant, il faut considérer que c'est l'ensemble des mesures d'hygiène permettant d'éviter la dissémination des salmonelles dans les étables, sur les mamelles, et lors de la traite, qui doivent être systématiquement et rigoureusement appliquées pour prévenir la contamination accidentelle du lait. En effet, les résultats de l'enquête montrent que les conditions générales d'hygiène chez les élevages « cas » étaient loin d'être médiocres, et que la contamination du lait était donc probablement due à un défaut ponctuel de vigilance, plutôt qu'à des pratiques routinières incorrectes. D'autre part, les risques sont d'autant plus importants que la quantité de salmonelles excrétées dans les fèces, ou présentes dans l'environnement des exploitations, est élevée.

L'excrétion mammaire de salmonelles est peu fréquente, mais n'est pas pour autant une source exceptionnelle de contamination du lait collecté. Dans les troupeaux sans pathologie salmonellique, il semble qu'elle ne touche qu'une très faible proportion de l'ensemble du cheptel (dans cette étude, au plus une vache par troupeau). Mais elle peut être quantitativement très

importante, persister plusieurs mois, voire plusieurs années (Marly *et al.*, 1997) et entraîner une contamination significative du lait du troupeau, malgré la dilution. L'origine de cette excrétion reste à préciser. Dans les élevages d'où elles provenaient, le départ des deux vaches excrétrices a permis la production d'un lait de mélange indemne de salmonelles. Cela pose la question du dépistage de tels animaux, dont l'excrétion peut être intermittente et persister durablement. La technique de diagnostic bactériologique classiquement employée est lourde, du fait de l'obligation de réaliser des prélèvements aseptiques de laits de quartier, et coûteuse. De plus, sa fiabilité est limitée par l'absence éventuelle d'excrétion le jour des prélèvements. Une alternative au diagnostic bactériologique pourrait être l'utilisation de techniques sérologiques type ELISA. Dans cette perspective, les résultats obtenus dans cette étude sont encourageants : appliquée à des fins de dépistage avec les règles de décision établies sur l'échantillon d'élevages étudiés, l'utilisation de la technique mise au point aurait permis d'éviter plus de 90% des examens bactériologiques.

Remerciements

Cette étude a été conduite avec le soutien financier de l'enveloppe Recherche de l'Association de Coordination Technique Agricole (A.C.T.A.), du ministère de l'agriculture et de la pêche (MAP), et du ministère de la recherche (MER). Les auteurs remercient les éleveurs qui ont permis l'obtention des données traitées dans cette étude, ainsi que tous les agents qui ont collecté ces données dans les exploitations.

De Buyser M.L., Dufour B., Maire M., Lafarge V., 2001. *Int. Journ. of food microbiology*, 67, 1-17

Hoorfar J., Feld N.C., Schirmer A.L., Bitsch V., Lind P. 1995. *Can. J. Vet. Res.*, 59,142

Marly J., Ménard J.L., Lebrize P., 1997. Actes du symposium international «*Salmonella* et salmonelloses». Ploufragan, France. 20 au 22 mai 1997. p 393.

Morisse J.P., Cotte J.P., Argente G. et Daniel I., 1992. *Ann. Méd. Vét.* 136, 403-409.

Smith B.P., Oliver D.G., Singh P., 1989. *Am. J. Vet. Res.*, 50.