

Connaissance des *Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines en élevage de ruminants laitiers

RAYNAUD S. (1), GANET S. (2), MICHEL V. (3), BRUGERE H. (4), AUVRAY F. (4), BERGONIER D. (5), FORRAY L. (6), BRASSEUR F., BOURREAU P. (7), ROUSSEL P. (1), BAILLY C. (8), LE BARILLEC K. (9), CHAUCHEYRAS-DURAND F. (10), PICANT P. (11), SERGENTET D. (2).

(1) Institut de l'Élevage, Agrapole, 23, rue Jean Baldassini, 69364 LYON CEDEX 07

(2) VetAgro Sup, LMAP-LNR STEC, UMR5557-BPOE, 1, avenue Bourgelat, 69280 MARCY L'ETOILE

(3) ACTALIA, 419 route des Champs Laitiers, 74801 LA ROCHE SUR FORON

(4) IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, 23 chemin des Capelles, 31076 TOULOUSE Cedex 3

(5) IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, 23 chemin des Capelles, 31076 TOULOUSE Cedex 3

(6) Laiteries H. Triballat, route de Malvette, 18220 RIANNS

(7) AGRIAL, 4, rue des Roquemonts, CS 35051, 14000 CAEN

(8) Confédération Générale de Roquefort, 36 Avenue de la République, 12103 MILLAU

(9) CNIEL, 42, rue de Châteaudun, 75009 PARIS

(10) LALLEMAND, équipe de recherche détachée, Université Clermont-Auvergne, UMR 454 MEDIS, 63000 Clermont-Ferrand

(11) GDS du Calvados, 14 Rue Alexander Fleming, B.P107, 14204 HEROUVILLE SAINT CLAIR

RESUME

Des études de cas ont été conduites dans 12 élevages caprins, 3 élevages ovins et 3 élevages bovins ayant livré de façon récurrente du lait contaminé par des souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines potentiellement hautement pathogènes (STECHP). Peu de connaissances étant disponibles sur les STECHP chez les chèvres, un nombre supérieur d'élevages caprins a été suivi. Des prélèvements portant sur le lait et l'environnement ont été répétés durant une période de suivi d'un an ; ils ont permis d'isoler des souches appartenant à 4 des 5 sérotypes faisant l'objet de mesures de gestion en France.

Ces souches ont été caractérisées puis comparées par électrophorèse en champs pulsés (un élevage caprin et un ovin), confirmant l'origine fécale de la contamination et la circulation des souches par l'intermédiaire de la litière et de la peau des mamelles. La contamination du lait de tank est très intermittente, même si sur une période donnée la même souche semble responsable d'une contamination persistante du lait.

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in French dairy herds

RAYNAUD S. (1), SERGENTET D., GANET S. (2), MICHEL V. (3), BRUGERE H. (4), AUVRAY F. (4), BERGONIER D. (5), FORRAY L. (6), BRASSEUR F., BOURREAU P. (7), ROUSSEL P. (1), BAILLY C. (8), LE BARILLEC K. (9), CHAUCHEYRAS-DURAND F. (10), PICANT P. (11)

(1) Institut de l'Élevage, Agrapole, 23, rue Jean Baldassini, 69364 LYON CEDEX 07

SUMMARY

Case studies were conducted in 12 dairy goat farms, 3 dairy ewe farms and 3 dairy cattle farms whose milk was contaminated several times by potentially highly pathogenic shiga-toxin producing *E. coli* (HPSTEC). More goat dairy farms were studied because of the low knowledge level in this species.

Repeated environment and milk samples were performed for one year. Isolates belonging to 4 out of 5 potentially highly pathogenic strains groups were obtained (according to the French definition).

These strains were characterized and compared through Pulse-Field Gel Electrophoresis analyses (one goat and one ewe farm). These data confirmed the faecal origin of the strains and their circulation through bedding and udder skin. Milk contamination is very intermittent, even though the same strain may be isolated for a longer period in some herds.

INTRODUCTION

Parmi les souches d'*Escherichia coli* produisant des Shiga-Toxines (STEC pour Shigatoxinogenic *E. coli*), certaines peuvent être responsables de maladies sévères chez l'Homme (Nataro et Kaper, 1998). Les ruminants sont l'un des principaux réservoirs de ces bactéries qui peuvent contaminer le lait et les produits laitiers. Dans ce contexte, une étude a été conduite avec l'objectif d'acquérir des connaissances sur la circulation des STEC en fermes laitières et d'accompagner les éleveurs dans la maîtrise des contaminations du lait par des STEC hautement pathogènes (STEHP). Les souches STEHP, encore appelées *Escherichia coli* entérohémorragiques ou EHEC (pour Enterohemorrhagic *Escherichia coli*), prises en compte dans l'étude appartiennent aux 5 sérotypes les plus fréquemment impliqués dans les infections humaines et possèdent les facteurs de virulence *stx* et *eae* (avis de l'Anses du 18/05/2017). Sont aussi considérées dans cette étude les souches *E. coli* « attachantes et effaçantes » (AEEC) appartenant à ces 5 sérotypes, souches *eae* positives mais *stx* négatives, isolées dans un bouillon d'enrichissement dans lequel un gène *stx* a été détecté.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. ETUDES DE CAS

Des études de cas ont été menées dans 12 élevages caprins, 3 élevages ovins et 3 élevages bovins ayant livré de façon récurrente du lait contaminé par des souches STEHP et/ou AEEC (une souche isolée dans le lait de tank au moins deux fois durant un intervalle d'un mois). Ces élevages ont été suivis durant 1 an avec des prélèvements répétés sur le lait cru (tank) et l'environnement de la ferme. Les prélèvements d'environnement suivants ont été réalisés dans les fermes : mélanges de fèces prélevés au sol, eau dans les abreuvoirs, surface de litière par pédichiffonnettes imbibées de tryptone sel (100 pas), mamelles par chiffonnage de la mamelle entière avec des chiffonnettes stériles imbibées d'eau distillée, lait UHT ayant circulé dans la machine à traire, filtre de lactoduc de la machine à traire prélevé après la traite. Peu de connaissances étant disponibles sur les STEHP en élevages caprins, un plus grand nombre de suivis a été mis en œuvre dans ces élevages.

1.2. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES SOUCHES

Préalablement à l'enrichissement, chaque échantillon de lait a été lactofermenté en présence de présure durant 24h à 37°C. Pour l'ensemble des différents prélèvements, les gènes *stx*, *eae* et les gènes marqueurs des 5 sérogroupes d'intérêt ont été recherchés par PCR en temps réel dans les bouillons d'enrichissement des différents échantillons. Les souches STEHP ou AEEC isolées à partir des bouillons d'enrichissement « positifs » (*stx* +, variant *eae* +, gène marqueur de séro groupe associé +) ont été caractérisées (sérotipe, gènes *stx 1 et/ou 2* et variant du gène *eae*). La persistance des souches, leur diversité et leur circulation intra- et inter-élevage(s) ont été étudiées par électrophorèse en champs pulsés (PFGE). Certaines entreprises partenaires du programme de recherche ont effectué dans les élevages suivis des analyses de lait à chaque collecte sur toute une période de lactation (méthodes internes).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. POURCENTAGE DE SOUCHES STEHP ET AEEC DANS LES ELEVAGES

Le pourcentage de souches STEHP et AEEC isolées varie en fonction du type de prélèvement (Tableau 1). Les STEHP sont isolées le plus fréquemment des filtres des machines à traire et de la surface des litières. Les STEHP et AEEC sont retrouvées plus fréquemment à partir des pédichiffonnettes que des fèces des animaux. Ces résultats sont en accord avec une publication belge (Cobbaut *et al.*, 2009). Ce type de prélèvement paraît particulièrement bien adapté aux litières de petits ruminants où la consistance sèche des fèces et la petite taille des crottes rendent le prélèvement plus représentatif d'un nombre élevé d'animaux et donc de la présence de souches pathogènes dans l'élevage. Les prélèvements d'eau et de la machine à traire ne semblent pas pertinents en élevage caprin pour évaluer la circulation des STEHP et la pression de contamination. Les données ne sont pas assez nombreuses pour conclure sur les prélèvements réalisés en fermes bovines et ovines. Pour le suivi des élevages ayant livré du lait contaminé, le prélèvement du filtre de la machine à traire (filtre du lactoduc de transfert), quand il existe, permet plus souvent de détecter des STEHP ou AEEC que le lait lui-même (Tableau 2). Ce résultat n'est pas spécifique de ces bactéries (Raynaud *et al.*, 2015).

	Absence dans le filtre MAT	Présence dans le filtre MAT
Absence dans le lait	41	8
Présence dans le lait	-	1

Tableau 2 Correspondance lait/filtre machine à traire (MAT) le même jour (souches STEHP ou AEEC isolées dans les 18 fermes étudiées).

Les résultats présentés ici ne correspondent pas à des prévalences car ils ont été obtenus chez des éleveurs volontaires pour l'étude, et ce dans quelques zones géographiques seulement. Les principales souches STEHP et AEEC isolées dans le lait appartiennent aux sérotypes O26:H11 et O103:H2 (Tableau 3). Le lait d'une même ferme peut être contaminé par plusieurs sérotypes différents, concomitamment ou, le plus souvent, à des périodes différentes.

Parmi les souches isolées dans le lait ou dans l'environnement des exploitations (résultats non présentés ici), seules les souches *E. coli* O157:H7, présentaient le gène *stx2*, le plus souvent associé au risque de Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) chez l'enfant (Feng *et al.*, 2018),

Sérotipe	Facteurs de virulence des souches
O26:H11	32 souches <i>stx1</i> , <i>eae</i> / 17 souches <i>stx-</i> , <i>eae</i>
O103:H2	25 souches <i>stx1</i> , <i>eae</i> / 2 souches <i>stx-</i> , <i>eae</i>
O157:H7	10 souches <i>stx2</i> , <i>eae</i>
O145:H28	1 souche <i>stx-</i> , <i>eae</i>

Tableau 3 Caractéristiques des souches isolées du lait de tank (732 échantillons analysés provenant de 18 fermes ayant livré du lait contaminé).

Origine ou nature des prélèvements	Mélange de fèces	Pédichiffonnettes litière	Chiffonnettes mamelle	Machine à traire (lait UHT)	Eau d'abreuvoir	Filtre machine à traire	Lait de tank
Nombre de prélèvements	200	164	181	15	16	103	77
Taux d'isolement de STECHP	8%	13%	9%	0%	0%	17%	5%
Taux d'isolement d'AEEC	2%	13%	8%	0%	0%	5%	1%

Tableau 1 Taux d'isolement de souches STECHP ou AEEC de mêmes sérotypes dans différents échantillons prélevés dans les fermes étudiées (12 fermes caprines, 3 ovines et 3 bovines, ayant livré du lait contaminé en STECHP ou AEEC).

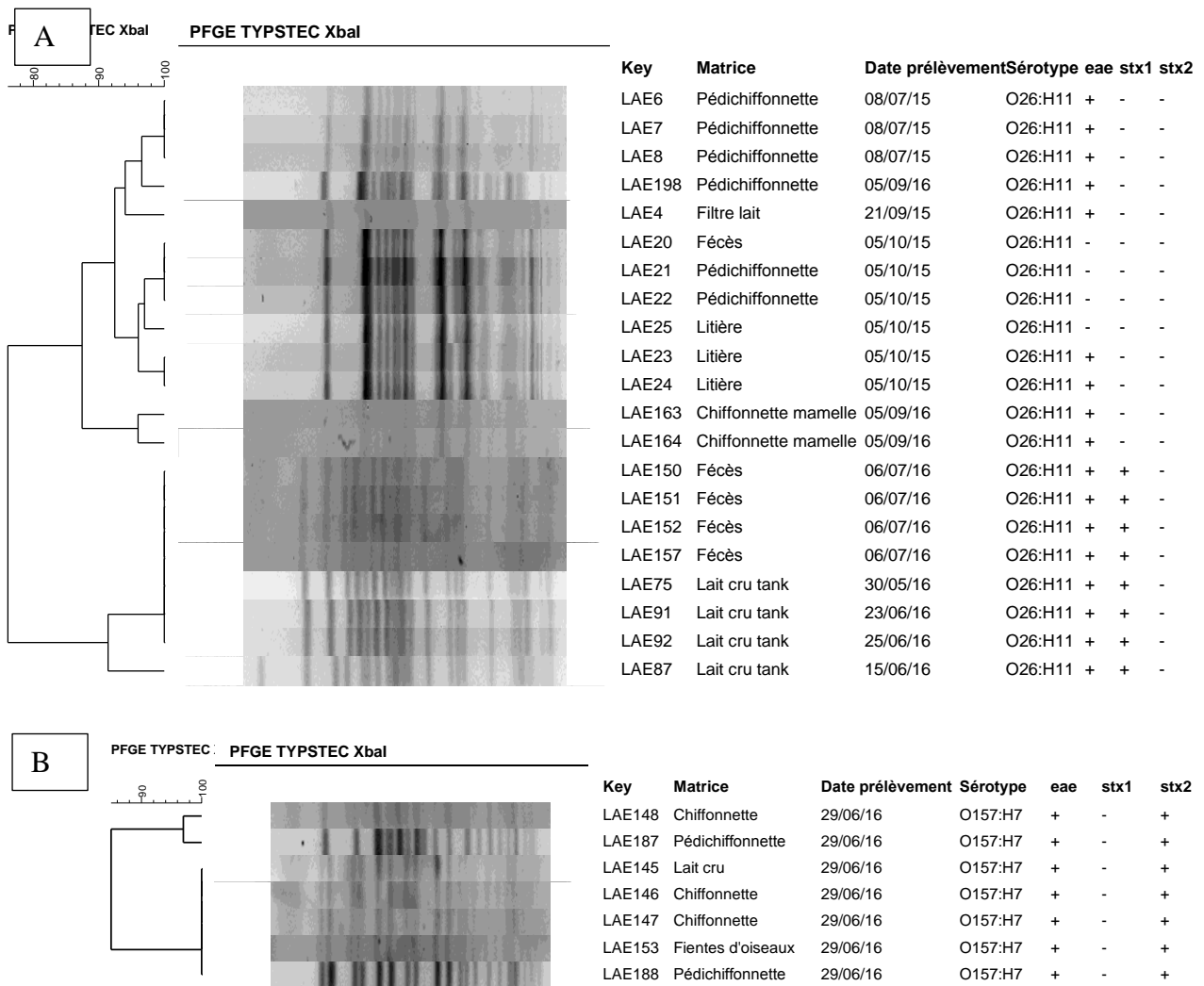


Figure 1 : Profils PFGE (DICE, UPGMA) des 22 souches O26:H11 issues de l'élevage de chèvre C1 (A) et des 7 souches O157:H7 issues de l'élevage de brebis O1 (B) (Opt 1,5%, tol 1,5%).

2.2. ANALYSE DES SOUCHES ISOLEES DANS LES ELEVAGES

La figure 1 présente les résultats des analyses par PFGE des souches *E. coli* O26:H11 isolées dans un élevage caprin (élevage C1) et *E. coli* O157:H7 isolées dans un élevage ovin (élevage O1) au cours d'une année de suivi.

Dans l'élevage caprin, deux épisodes distincts de contamination semblent s'être produits. Pour le premier, en 2015, une souche *E. coli* O26:H11 AEEC a été retrouvée dans la litière, sur les mamelles et dans un filtre à lait de la machine à traire, illustrant ainsi le schéma de contamination décrit en figure 2. Pour le second épisode, la contamination du lait a été très intermittente durant plus d'un mois, et la souche *E. coli*

O26:H11 portant les gènes *eeae* et *stx1* identifiée dans le lait a été aussi retrouvée dans les fèces des animaux.

Dans l'élevage ovin, les données sur un épisode de contamination du lait ont montré que la même souche *E. coli* O157:H7 portant les gènes *stx2* et *eeae* a été retrouvée sur les litières et les mamelles des animaux. Dans cette ferme, des oiseaux semblent associés à la circulation de la souche puisqu'elle a été isolée dans leurs fientes. Il n'est cependant pas possible de savoir si ce sont les oiseaux qui ont introduit la souche *E. coli* O157:H7 dans la ferme ou s'ils ont été contaminés par les brebis porteuses (proposition de schéma de contamination en figure 3).

Ces résultats semblent confirmer l'origine fécale de la contamination du lait et la circulation des souches dans l'élevage (Farrock *et al.*, 2013 ; Alvarez-Suarez *et al.*, 2016).

Le lait livré par la ferme caprine dont les résultats sont présentés en figure 2 a été analysé à chaque collecte toutes les 48 heures durant un an par l'entreprise laitière ; ces résultats confirment le caractère très intermittent de la contamination du lait.

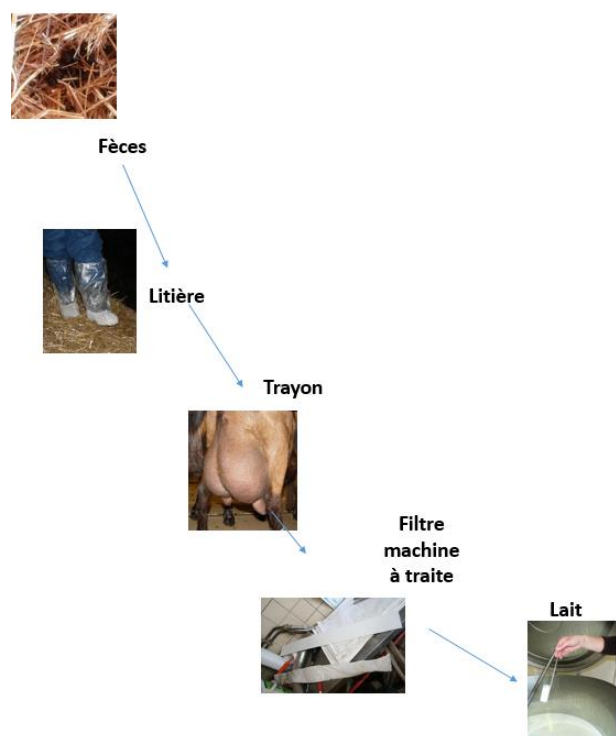


Figure 2 : schéma de circulation possible d'une souche STECHP en ferme caprine.

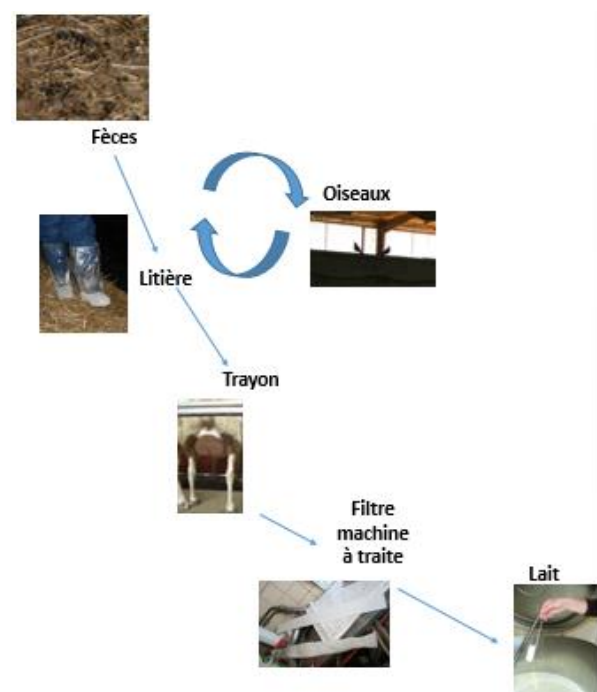


Figure 3 : schéma de circulation possible d'une souche STECHP en ferme ovine.

CONCLUSION

L'étude de cas d'élevages dont le lait a été contaminé de façon récurrente par des STECHP ou AEEC a permis d'acquérir des connaissances sur les matrices ou substrats à partir desquels on retrouve le plus souvent la bactérie ; cela devrait permettre de mieux cibler les prélèvements à réaliser lors des interventions en élevage suite à une contamination du lait. L'utilisation des pédichiffonnettes en élevage de petits ruminants s'est ainsi avérée intéressante pour échantillonner la litière. De façon générale, les STECHP sont le plus souvent retrouvées sur les litières ; la maîtrise de leurs conditions physico-chimiques et de leur évolution représente donc un point clé de la maîtrise des STECHP à la ferme.

La circulation durable d'une souche au sein d'un élevage a aussi été mise en évidence. La contamination du lait paraît être d'origine fécale au vu de la similitude des souches isolées des fèces, des litières et de la peau des mamelles. Ces éléments seront à consolider avec des résultats de recherche de gènes *stx* et *eae* dans des collections de souches d'*Escherichia coli* issues de mammites cliniques ou sub-clinique. Ceux-ci seront disponibles fin 2018 pour les ovins et les bovins. Il n'existe pas de collection de ce type pour les caprins, mais des recherches ponctuelles ont pu être menées dans des élevages livrant du lait aux entreprises partenaires de ce programme de recherche.

Pour les laits des cas étudiés ici, qui ne sont pas forcément représentatifs de l'ensemble des élevages laitiers français, seules les souches *E. coli* O157:H7 possédaient le gène *stx2*.

Des études complémentaires restent à conduire sur les facteurs de risque de contamination du lait par les STECHP.

L'origine digestive des souches permet d'envisager l'évaluation de stratégies de réduction du portage animal par l'utilisation de solutions non antibiotiques à base de microorganismes (souches de bactéries ou levures antagonistes, fractions microbiennes), permettant de limiter la croissance ou la survie des STECHP dans le tractus gastro-intestinal (Chaucheyras-Durand *et al.* 2016). Des premiers résultats obtenus lors de l'étude ont suggéré qu'un complexe à base de levures vivantes, de fractions spécifiques de levures et d'argile permettait de limiter la contamination du lait de chèvre pendant la durée de l'administration. Ces travaux réalisés sur un petit nombre de fermes méritent d'être élargis à d'autres élevages et d'autres filières.

Les auteurs remercient les éleveurs qui ont participé activement à cette étude, ainsi que le laboratoire de Touraine, le LIAL MC et le LILANO pour la réalisation de recherches de STEC. Cette étude a reçu le soutien financier du Ministère de l'Agriculture (FranceAgriMer-CASDAR), du CNIEL, de l'ANICAP et de la CONFEDERATION GENERALE DE ROQUEFORT. La responsabilité du ministère chargé de l'agriculture ne saurait être engagée.

Alvarez-Suarez M.E. et al., 2016. Int J Food Microbiol, 236: 148-154.

Chaucheyras-Durand F., Dunière L., Forano E. 2016. VPC, 32-4-3.

Farrock C. et al., 2013. Int J Food Microbiol, 162: 190-212.

Feng et al., 2018. 10th VTEC international symposium on STEC infections, Florence.

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

Raynaud S. et al., 2005. 3R, 12 : 379-382.

Raynaud S. et al., 2015. Le Point Vétérinaire, 360 : 74-78.