

PRÉVALENCE, ORIGINE, CIRCULATION ET PERSISTANCE DES *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC) DANS LES ÉLEVAGES BOVINS FRANÇAIS

S. Raynaud (1), P. Boscher (2), P. Picant (3), B. Mathieu (4), C. Degand (5), B. Poutreil (6), V. Heuchel (1), Y-M. Chatelin (1), C. Vernozy-Rozand (7)

(1) Institut de l'élevage - (2) (3) (5) Groupement de défense sanitaire (Orne, Calvados et Eure)

(4) Syndicat interprofessionnel du Reblochon - (6) INRA Tours Laboratoire de pathologie infectieuse et immunologie
(7) École nationale vétérinaire de Lyon

Cet article a été adapté à partir d'un article publié aux 12^e Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants.

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) peuvent être responsables de pathologies sévères chez l'homme, pouvant être fatales chez les personnes fragiles, en particulier chez les enfants de moins de 15 ans. Depuis le début des années 1980, l'attention sur l'impact de ces bactéries sur la santé publique s'est considérablement accrue, du fait de leur implication dans plusieurs grandes épidémies, notamment aux États-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). Face au manque de connaissances sur cette bactérie et en l'absence de consensus sur la définition de la dangerosité des souches STEC, nous avons choisi de caractériser les STEC de la manière la plus complète possible, en commençant par la recherche du gène *stx* dans les échantillons, puis en isolant les souches STEC et en les caractérisant à la fois sur leur génotype et sur leur sérotype.

Dans ce contexte, les principaux objectifs de cette étude conduite en 2003-2004 ont été 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

Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) est rare en France mais potentiellement grave. Principale cause d'insuffisance rénale aiguë chez les enfants de moins de trois ans, il se manifeste préférentiellement chez les jeunes enfants et les personnes âgées.

Chaque année, entre 70 et 100 enfants atteints sont déclarés à l'Institut de veille sanitaire (InVS). Plus d'un tiers des enfants gardent des lésions rénales nécessitant un suivi médical, un à deux pour cent décède. Ce syndrome est essentiellement lié à la consommation d'aliments contaminés par des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC), consommés crus ou peu cuits. Ce pathogène est hébergé naturellement dans le tube digestif des animaux (et en particulier des ruminants) qui l'excrètent de manière intermittente et entretiennent un cycle avec leur environnement.

Alors que la plupart des cas signalés en France sont sporadiques, l'année 2005 a été marquée par la survenue de deux épidémies. Dans les deux épisodes, le regroupement des cas dans le temps et dans l'espace a conduit à suspecter une source de contamination commune : steak haché dans le premier épisode (18 cas de SHU) et fromages au lait cru dans le deuxième (14 cas de SHU).

Suite à ces épisodes, un plan d'action a été développé afin de renforcer la maîtrise sanitaire à toutes les étapes pertinentes de la filière et de rappeler au consommateur les règles d'hygiène et de consommation permettant de prévenir la transmission de la maladie.

L'article ci-contre a pour objet de présenter les résultats d'une enquête dont les principaux objectifs étaient d'estimer les prévalences du portage animal (bovin) des STEC, de leur excrétion fécale et de la contamination du lait.

de ces souches intra et inter élevage ;

- évaluer 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.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Étude de la prévalence dans les fèces 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.

Étude de la prévalence dans les fèces

La prévalence du portage animal a été évaluée au niveau de l'unité « troupeau ». Deux campagnes de prélèvements de fèces frais sur le sol ont été réalisées à 6 mois d'intervalle de mars 2003 à septembre 2004 dans 115 des 151 élevages étudiés. Le nombre de fèces de vaches ou de veaux prélevés est égal à 10 % du nombre d'animaux présents avec un minimum de 5. Ils ont ensuite été envoyés pour analyse au laboratoire de l'ENV de Lyon.

Étude 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, de juin 2003 à juin 2004, par les chauffeurs des camions de ramassage. Ces deux échantillons ont été conservés et acheminés au froid dans les 24h 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.

Études 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. 4 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 STEC étant encore peu connus et peu recherchés en routine, nous ne disposons pas des informations nécessaires pour conduire une étude épidémiologique de type cas-témoin qui nous aurait permis de conclure de façon plus affirmative sur les facteurs de risque de présence de STEC dans les bouses et le lait. L'approche adoptée ici est par conséquent uniquement exploratoire et descriptive. 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.

Caractérisation 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.

Détection et caractéristique des STEC de l'étude

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*).

Analyses statistiques

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

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

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

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Étude de la prévalence dans les fèces et le lait

Étude 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). À 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*. Seize pour cent 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), une exploitation ayant présenté à la fois des souches du sérogroupe O55 et du sérotype O157:H7 dans des fèces de vaches.

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.

Étude 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 $p<0,0001$).

Les résultats obtenus permettent d'estimer que 55 % de la population pourraient 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*. 3 souches issues de 3 laits de 3 exploitations différentes portent simultanément les 4 gènes de virulence,

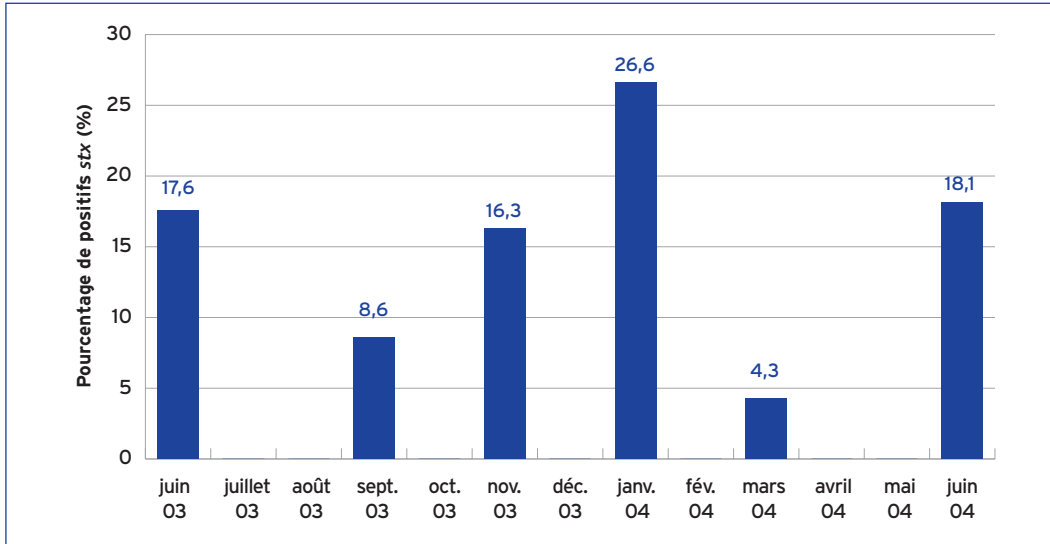


Figure 2 : Évolution de la fréquence des livraisons de laits *stx* positifs par analyse PCR.

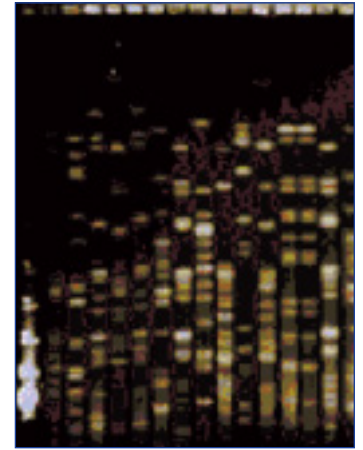


Figure 3 : Électrophorèse en champ pulsé des souches retrouvées dans l'élevage n°53.

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 1 039 fromages au lait cru a permis de ne retrouver aucune souche O157:H7.

Études de cas

50 à 130 échantillons de toutes origines ont été prélevés dans chacune des 13 exploitations étudiées, soit un total de 1 337 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 types d'échantillons 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.

Les pulstypes révèlent aussi 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.

Étude 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 montrent, du point de vue de la santé publique, que les souches les plus souvent rencontrées en pathologie humaine semblent différentes de celles isolées dans les exploitations bovines laitières françaises et notamment dans le lait qu'elles produisent. La seule présence du gène *stx* n'est pas suffisante pour conclure de façon certaine à la dangerosité des souches STEC. En effet, le pouvoir pathogène des STEC est corrélé au nombre de facteurs de virulence et la présence du gène *eae* est considérée comme essentielle. La diversité des profils moléculaires 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 ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et d'ARILAIT RECHERCHES. Nous remercions les entreprises laitières, les Groupements de défense sanitaire, le Syndicat interprofessionnel du Reblochon, le Centre national interprofessionnel de l'Économie Laitière et les éleveurs qui ont participé à cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- 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-Brosseta 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.
- Raynaud S. et al., 2005. 12^e Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, 379-392.
- 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. Éditions TEC&DOC Lavoisier. 135 p.
- Wilson J.B. et al., 1993. Preventive Veterinary Medicine, 16, 159-170.