

Epidémiologie moléculaire des infections intramammaires à *Streptococcus uberis* dans des troupeaux laitiers français

ROUSSEL Ph. (1), GILBERT F. (2), FULBERT L (3), LEPELIER I. (4), LABBE J.F.(5), LE GUENIC M. (6), SERIEYS F. (7), BAREILLE N.(8,9)

(1) Institut de l'Élevage, UMT Santé des Bovins, Institut de l'Élevage-Oniris-INRA, UMR Gestion de la Santé Animale, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03 – philippe.rousseau@idele.fr

(2) INRA Unité ISP Route de Crotelles - 37380 Nouzilly

(3) GDS de la Mayenne, Technopole de Changé - BP 86113 - 53061 LAVAL cedex 9

(4) GDS Bretagne, 8 Avenue Edgar Degas, 56000 Vannes

(5) GTV Bretagne, GTV Bretagne - BP 20360 - 22106 DINAN CEDEX

(6) Chambre d'agriculture de Bretagne Recherche Appliquée Pôle Herbivores - BP 398 - 56 009 VANNES CEDEX

(7) Filière Blanche, 12 quai Duguay Trouin, 35000 Rennes

(8) LUNAM Université, Oniris, UMR Biologie, Epidémiologie et Analyse de Risque en santé animale, CS 40706, 44307 Nantes

(9) INRA, UMR1300 BioEpAR, 44307 Nantes

RESUME

Cet article a pour objectif de décrire la dynamique des infections à *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*) dans les troupeaux afin d'évaluer la capacité d'une méthode de typage moléculaire à distinguer les troupeaux selon leur voie majoritaire de transmission des infections. Dans 17 troupeaux de l'ouest de la France à problèmes récurrents de mammites liées *Str. uberis*, 5 séries de prélèvements aseptiques d'échantillons de lait de quartier ont été effectuées toutes les 6 semaines, sur toutes les vaches en lactation. Après identification bactériologique, un génotypage des souches de *Str. uberis* a été effectué par la technique MLVA. Sur les 13796 échantillons réalisés, 693 prélèvements étaient positifs à *Str. uberis*. La prévalence moyenne de l'infection était de 5,3% des quartiers avec des variations importantes suivant les troupeaux, de 2,1% à 15,9%. L'analyse MLVA a permis d'identifier 203 souches différentes, soit de 5 à 30 souches par troupeau. Les nouvelles infections sont issues pour 44% de contaminations par l'environnement et de 56% des contagions à partir d'un autre quartier. Selon les troupeaux, la part des contagions variait de 0 à 78%, sans que l'on puisse identifier clairement des pratiques d'élevage à risque. Le taux de guérison spontanée des infections subcliniques en lactation était de 53% alors que celui des traitements antibiotique de mammite clinique était de 71%. Cette étude confirme l'origine mixte des infections à *Str. uberis* et doit conduire à recommander des actions visant à limiter les contaminations par l'environnement et les contagions entre vaches dans les élevages confrontés à ces infections.

Molecular Epidemiology of the *Streptococcus uberis* infections in French dairy herds

ROUSSEL Ph. (1), GILBERT F. (2), FULBERT L (3), LEPELIER I. (4), LABBE J.F.(5), LE GUENIC M. (6), SERIEYS F. (7), BAREILLE N.(8,9)

(1) Institut de l'Élevage, UMT Santé des Bovins, Institut de l'Élevage-Oniris-INRA, UMR Gestion de la Santé Animale, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03 – philippe.rousseau@idele.fr

SUMMARY

The aim of this study was to describe the infection dynamics of *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*) in dairy herds, in order to assess a molecular-based method to determine the transmission routes of *Str. uberis* infections on the herds.

Milk samples were taken aseptically every quarter from every lactating cow in 17 herds in the west of France with an acute *Str. Uberis* mastitis problem. The sampling took place five times with a six-week interval. The samples were analysed for bacteriological identification and the isolated strains were genotyped by MLVA. *Str. uberis* was found in 693 samples out of 13 796. Mean infection prevalence was 5.3%, with significant variations according to the herd, from 2.1% and 15.9%. MLVA allowed identifying 203 strains (from 5 to 30 strains on one herd).

The major source of new infections was contagion from another quarter (56%), followed by environmental transmission (44%). The part of contagious contamination varied between the herds from 0 to 78%, without any link with risk factors. Fifty-three percent of the sub-clinical infections disappeared spontaneously, while 71% of the sub-clinical infections disappeared when they were cured by antibiotics.

This study emphasizes the mixed origin of *Str. uberis* mammary infections and confirms that measures targeting both contagious and environmental sources have to be considered to manage this pathogen in infected herds.

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, on constate une augmentation de la prévalence des mammites dues à *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*) (Leigh, 1999 ; Bidaud et al, 2007) qui contribue à une augmentation des niveaux cellulaires du lait livré en France. Ces bactéries se transmettent aux vaches par contamination par l'environnement mais aussi par contagion à partir d'une autre vache (Zadoks, 2007). Cette dualité de la

voie de transmission des infections dans des troupeaux fortement infectés complexifie les plans d'action proposés. Le développement des techniques de biologie moléculaire ouvre des perspectives d'étude fine de la dynamique des infections intramammaires à *Str. uberis* (Douglas et al, 2000 ; Khan et al., 2003 ; Zadoks et al, 2003). En France, les chercheurs INRA de l'unité ISP ont mis au point une technique de génotypage par MLVA (analyse multiple de loci contenant des séquences répétées en tandem), technique de typage de *Str. uberis* plus facile à mettre en œuvre que les techniques

développées antérieurement (Gilbert et al, 2006). Ils se sont associés à l'UMT Maîtrise de la santé des troupeaux bovins pour mettre en œuvre l'exploration de l'épidémiologie des infections à *Str. uberis* au sein des troupeaux avec cette méthode.

Cet article a pour objectif de décrire la dynamique des infections dans des troupeaux de l'ouest de la France à problèmes récurrents de mammites à *Str. uberis* afin d'évaluer la capacité de la méthode à distinguer les troupeaux selon leur voie majoritaire de transmission des infections.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. SELECTION DES EXPLOITATIONS

Au cours de l'année 2010, dix neuf troupeaux de l'ouest de la France (Bretagne et Pays de la Loire) à problèmes récurrents de mammites à *Str. uberis* ont été recrutés. Ils devaient respecter les critères suivants : fréquence de mammites cliniques supérieure à 50 cas pour 100 vaches par an, concentration en cellules somatiques (CCS) du lait de troupeau supérieure à 250 000 cellules / ml depuis au moins 6 mois et une forte prévalence de *Str. uberis* dans les analyses bactériologiques issus de mammites cliniques et subcliniques.

Entre décembre 2010 et juin 2011, 4 à 5 séries de prélèvements aseptiques d'échantillons de lait de quartier ont été effectuées sur toutes les vaches en lactation par les chargés de suivi (vétérinaires ou conseillers de l'exploitation) à intervalle de 6 semaines. En cas de mammite clinique dans un quartier intervenant entre ces séries de prélèvements, un prélèvement aseptique a été effectué par l'éleveur avant tout traitement antibiotique et conservé à -20°C. Ensuite, le jour de chaque série de prélèvements, les échantillons ont été acheminés par Chronopost sous couvert du froid (à 4°C) à l'INRA de Nouzilly pour analyses bactériologiques et typages moléculaires.

1.2. IDENTIFICATION ET TYPAGE DES *STR. UBERIS*

Dès leur arrivée au laboratoire, les prélèvements de lait ont été ensemencés (50 microlitres) sur gélose au sang de brebis et analysés. L'identification des espèces bactériennes a été effectuée suivant les recommandations du NMC (Laboratory handbook on bovine mastitis, 1999). Les prélèvements ont été considérés comme non interprétables si au moins 3 colonies d'aspect macroscopique différent étaient présentes. Après identification de *Str. uberis*, une dizaine de colonies de chaque isolat a été prélevée sur gélose puis stockée à -20°C dans l'attente du génotypage. La technique MLVA employée permet de différencier les souches de *Str. uberis* en étudiant par PCR 8 régions du chromosome bactérien qui contiennent des séquences répétées en tandems et en nombre variable selon les souches. Chaque souche est ainsi caractérisée par un code numérique, appelé profil MLVA, qui renvoie au nombre de répétitions de chacune des 8 régions génétiques analysées (ex de profil MLVA : 1-2-6-4-3-7-1-2). (Gilbert et al, 2006). Selon les recommandations de Vogler et al (2006), ont été considérées comme phylogénétiquement proches, et non différenciées dans notre étude, deux souches se trouvant dans le même élevage et ayant au plus une modification (insertion ou délétion de 1 ou 2 répétitions) d'une seule séquence répétée en tandems.

1.3. DONNEES COMPLEMENTAIRES

Deux questionnaires ont été remplis par les chargés de suivi. Lors du recrutement, les questions ont porté sur le système de logement, la gestion des traitements des mammites cliniques, les techniques d'hygiène de traite et du bâtiment. Fin 2011, ces informations ont été validées pour la période d'étude et des compléments ont été recueillis concernant les dates des traitements effectués sur les animaux, les pratiques d'élevage lors de la période tarie. Les données du

contrôle laitier (date de vêlage, parité, CCS du lait individuel mensuel) concernant les animaux présents dans les troupeaux étudiés ont été extraits des bases de données nationales sur la période de janvier 2009 à octobre 2011.

1.4. ANALYSES DES DONNEES

La fréquence relative de chaque agent pathogène dans les prélèvements de mammites cliniques et lors des séries de prélèvements a été calculée. La prévalence des infections à *Str. uberis* a été calculée par le rapport entre le nombre de quartiers infectés et le nombre de prélèvements interprétables. Le taux de guérison a été calculé par le rapport entre le nombre de quartiers infectés par une souche d'un type MLVA donné et guéris, sur le nombre de quartiers infectés par cette même souche au prélèvement précédent. Il a été calculé dans différentes situations : après traitement antibiotique au tarissement, après traitement antibiotique en lactation et en l'absence de traitement (guérison spontanée). La comparaison des profils MLVA des souches de *Str. uberis* a permis de distinguer deux types de nouvelles infections (quartier infecté au prélèvement considéré alors qu'il était non infecté au précédent) : (i) celles que l'on considérera issues d'une contagion à partir d'une autre vache : présence dans un quartier d'une vache d'une infection à *Str. uberis* par une souche de profil MLVA défini et précédemment isolée dans un autre quartier de la même vache ou d'une autre vache d'un même troupeau et (ii) celles issues d'une contamination par l'environnement (les autres...). Des facteurs de variation de la proportion de la contamination par l'environnement *versus* celle des contagions à partir d'une autre vache lors d'une infection incidente ont été recherchés. Ainsi, l'influence du stade de lactation des vaches, de leur lieu de vie (bâtiment *versus* pâture), du niveau d'hygiène relatif à la traite et au logement (classification en 3 niveaux selon le niveau de risque défini par expertise), a été explorée à l'aide du test du chi-deux.

2. RESULTATS

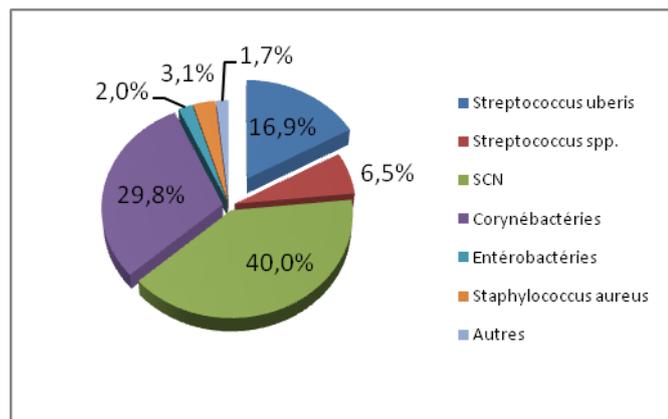
2.1. DESCRIPTION DE L'ECHANTILLON

Deux exploitations ont été exclues de l'analyse, l'une du fait de la présence d'une fréquence d'échantillons non interprétables trop importante (52%) et l'autre du fait d'une prévalence d'infection à *Str. uberis* trop faible (inférieure à 2%). Les 17 troupeaux inclus dans ce travail étaient composés en moyenne de 44 vaches en lactation avec des extrêmes allant de 24 à 60. Quatorze troupeaux étaient de race Prim'Holstein, 2 de race Normande et 1 avait les 2 races. La situation sanitaire vis-à-vis des mammites durant l'étude était la suivante : le pourcentage moyen de vaches à CCS individuel supérieur à 300 000 cell/mL de lait était de 21% avec des valeurs extrêmes allant de 10% à 37%. Le nombre de cas de mammites cliniques pour 100 vaches présentes par an était en moyenne de 99 avec des valeurs allant de 41 à 358. Dix troupeaux ont fait l'objet de 5 séries de prélèvements aseptiques et 7 troupeaux de seulement 4 séries. Au total, 13 570 échantillons ont été réalisés sur 996 vaches, dont 121 n'ont été prélevées qu'une seule fois, 98 deux fois, 209 trois fois, 326 quatre fois et 238 cinq fois.

2.2. BACTERIES IMPLIQUEES DANS LES INFECTIONS

Lors des séries de prélèvement, 9404 échantillons étaient stériles (69%) et 715 étaient ininterprétables (5%). Les bactéries présentes étaient pour la plupart des agents pathogènes mineurs (Figure 1), c'est à dire des staphylocoques à coagulase négative et des corynébactéries. Comme attendu, l'agent pathogène majeur le plus isolé dans ces troupeaux était *Str. uberis* (582 isolats). Sa proportion relative par troupeau variait de 8% à 41%.

Figure 1. Proportion relative des bactéries identifiées lors des séries de prélèvements aseptiques de laits de quartier.



Sur les 226 prélèvements recueillis lors de mammites cliniques, 38 étaient stériles (17%) et 4 contaminés (2%). *Str. uberis* représentait la bactérie la plus fréquemment isolée lors de ces analyses (110 isolats), suivis par les entérobactéries (11%) puis par les staphylocoques à coagulase négative (8%). La proportion relative de *Str. uberis* par troupeau variait de 20% à 85%.

2.3. VARIABILITE DES SOUCHES DE *STR. UBERIS*

Pour la grande majorité des 693 isolats de *Str. uberis* (98,7%), un profil MLVA unique a été identifié, malgré l'isolement d'une dizaine de colonies par échantillon. Ces profils ont pu être regroupés en 203 souches différentes. Le nombre de souches différentes par troupeau variait de 5 à 30. Ainsi, les souches étaient retrouvées en moyenne dans 3,4 isolats de *Str. uberis* (203 souches pour 693 isolats), mais avec là encore une forte variabilité entre troupeaux allant de 1,3 (13 souches sur 17 isolats) à 5,1 (77 souches sur 15 isolats), ce qui suggère des différences de dynamique des infections entre troupeaux.

Tableau 1. Facteurs de variation de la proportion des contagions à partir d'une autre vache et des contaminations par l'environnement, lors d'une nouvelle infection par *Str. uberis*

Variable	Modalité	Nombre de quartiers nouvellement infectés	Proportion de contagion	Proportion de contamination	Test chi2
Stade de lactation des vaches					
	[0 à 60] jours	25	76,0%	24,0%	P = 0,09
] 60-120] jours	30	53,0%	47,0%	
] 120 jours et plus	107	52,3%	47,7%	
Hygiène du logement					
	Limité	158	57,6%	42,4%	P = 0,82
	Moyen	119	55,5%	44,5%	
	Fort	14	50,0%	50,0%	
Hygiène de la traite					
	Très limité	107	60,8%	39,2%	P = 0,25
	Limité	35	62,8%	14,3%	
	Moyen	149	51,7%	48,3%	
Lieux de vie					
	Pâturage	75	61,3%	38,6%	P = 0,72
	Bâtiment	179	55,8%	44,1%	
	Intermédiaire	21	57,1%	42,8%	

3. DISCUSSION

La méthodologie retenue dans cette étude pour décrire la dynamique des infections à *Str. uberis* dans les troupeaux est originale par son envergure en termes de nombre de troupeaux, de vaches laitières et, *in fine*, de quartiers

2.4. PREVALENCE DES INFECTIONS A *STR. UBERIS*

La prévalence moyenne de l'infection par *Str. uberis* était de 5,3% des quartiers avec des variations importantes suivant les élevages, de 2,1% à 15,9%. Sur les 996 vaches prélevées lors de cette étude, 230 (23%) se sont révélées infectées par *Str. uberis* au moins une fois.

2.5. TAUX DE GUERISON DES INFECTIONS

Le taux de guérison des infections subcliniques au tarissement a été de 100% (9 quartiers sur 9 traités) ; le taux de guérison des infections cliniques en lactation a été de 71% (60 sur 85 quartiers traités), avec des différences liées à l'ancienneté des infections. En effet, si l'infection était récente (absence de cette souche au prélèvement antérieur), le taux de guérison atteignait 80% *versus* 57% dans le cas contraire. La guérison spontanée des infections en lactation était de 53%.

2.6. CONTAMINATION PAR L'ENVIRONNEMENT OU CONTAGION ENTRE VACHES ?

Au cours de la période d'étude, 291 quartiers ont été nouvellement infectés par *Str. uberis*. Ces nouvelles infections sont issues pour 44% de contaminations par l'environnement et pour 56% des contagions à partir d'un autre quartier, le plus souvent d'une autre vache (80%). Selon les troupeaux, la part des contagions parmi les nouvelles infections variait de 0 à 78%.

2.7. FACTEURS DE VARIATION DES VOIES DE TRANSMISSION

Aucune relation n'a pu être mise en évidence entre les pratiques d'élevage et les voies de transmission des infections (Tableau 1). Cependant, une tendance à une plus forte proportion de contagion en début de lactation a été mise en évidence.

intégrés, par la mise en place d'un suivi longitudinal et enfin par la technique de typage moléculaire employée.

La technique de typage MLVA se révèle très discriminante pour différencier les souches de *Str. uberis* infectant les mamelles des vaches au sein d'un troupeau. De nombreux profils différents ont, en effet, été identifiés. Ceci tient au fait

que les vaches des troupeaux étudiés se sont contaminées à partir de sources très variables dans leur environnement et que la technique a pu le montrer. Ainsi, la MLVA s'intéresse à des séquences qui subissent des mutations à un taux plus élevé que dans d'autres techniques exploitant les gènes de ménage. Les gènes de ménage, vitaux pour la bactérie et dont l'évolution est très lente, sont mis à profit par la technique MLST (MultiLocus Sequence Typing) pour faire des études phylogénétiques, définir des groupes clonaux au sein d'une espèce bactérienne et suivre leur évolution sur le très long terme. Dans notre étude, les mutations sont fréquentes au point que nous avons dû faire des regroupements de souches phylogénétiquement proches pour éviter de considérer à tort 1 même souche comme 2 souches différentes. La MLST est donc adaptée pour des études épidémiologiques descriptives à des échelles spatiales étroites et temporelles courtes. Cette technique est simple à mettre en œuvre (matériel de PCR classique), peu coûteuse (environ 10 €) et évolutive. Actuellement, la technique repose sur l'analyse de 8 régions génétiques, mais il est possible d'en ajouter pour augmenter encore son pouvoir discriminant. L'idéal consiste à intégrer dans la technique MLVA des motifs répétés relativement stables et d'autres qui mutent plus rapidement. La concordance de la technique MLVA et de la MLST pour typer les souches de *Str. uberis* sera très prochainement étudiée sur les souches de notre étude.

Dans notre échantillon, *Str. uberis* a été responsable d'un nombre élevé de mammites aussi bien cliniques que subcliniques. Ceci provient (i) de nos critères de recrutement qui visaient à s'assurer d'une forte prévalence d'infections à *Str. uberis* lors de l'étude pour en étudier la dynamique, et (ii) du choix de la période d'étude incluant la phase hivernale classiquement reconnue pour augmenter le risque d'infection par des bactéries à réservoir d'environnement. Ces résultats ne représentent donc pas l'étiologie moyenne des mammites dans les troupeaux français. Malgré une prévalence plus élevée, les résultats de fréquence relative de *Str. uberis* parmi les mammites cliniques sont en accord avec d'études effectuées en Europe (Bradley et al., 2007 ; Kalmus et al., 2011).

Les quartiers nouvellement infectés par *Str. uberis* entre les collectes exhaustives d'échantillons correspondant essentiellement à des périodes de lactation l'étaient, en majorité (56%), par des souches déjà présentes dans le troupeau (contagion entre vaches probable) et, pour l'autre partie (44%), par des souches nouvelles (contamination probable par l'environnement). Ces résultats confirment les études antérieures (Khan et al., 2003 ; Zadoks et al., 2003), et soutiennent l'hypothèse que les voies de transmission des infections à *Str. uberis* pendant la lactation peuvent être de deux types. Dans tous les troupeaux, les contaminations de la mamelle par des bactéries provenant directement de l'environnement côtoient des contagions d'un quartier contaminé vers un quartier sain, vraisemblablement au cours de la traite ou, comme le suggèrent Zadoks et al. (2001), indirectement par contact entre un quartier sain et un environnement récemment contaminé, par exemple par des pertes de lait. La proportion de contagion *versus* contamination varie fortement entre élevages avec dans presque tous les cas les 2 types de voies d'infection qui se côtoient. Cependant, les investigations menées sur les pratiques d'élevages n'ont pas permis de montrer de différence, ce qui peut s'expliquer par le fait, que le classement réalisé l'a été sans avoir observé la finesse de réalisation de ces pratiques et que tous les facteurs de risques n'ont pas été analysés.

Le typage des souches de *Str. uberis* a permis d'investiguer la problématique des échecs thérapeutiques constatés dans les troupeaux. Nous montrons que ce ressenti d'échec de traitement est sans doute lié aux réinfections des vaches par des souches différentes dans les troupeaux à fort risque d'infections par *Str. uberis*. En effet, le taux de guérison du traitement antibiotique en lactation lors de la détection de mammites cliniques est de 71% avec une efficacité d'autant plus élevée que l'infection est récente. La précocité de détection et de traitement des infections cliniques et subcliniques de la mamelle est donc confirmée comme étant un élément fondamental de l'efficacité des traitements (Barkema et al., 2006).

4. CONCLUSION

L'étude de la diversité des souches de *Str. uberis* et de la dynamique de ces infections par typage MLVA a permis d'identifier deux sources d'infection possibles, la contamination par l'environnement et la contagion entre vaches. La première source est systématiquement présente dans les élevages et semble être l'origine de l'ensemble des souches de *Str. uberis*. La seconde est extrêmement variable d'un élevage à l'autre, sans que l'on ait pu identifier de pratiques d'élevage expliquant ces différences. En conséquence, dans les élevages confrontés à une prévalence élevée d'infections à *Str. uberis* chez les vaches en lactation, il convient de mettre en œuvre des actions de maîtrise pour prévenir à la fois les contaminations par l'environnement et les contagions entre vaches.

Ce programme a été mené avec la contribution financière du Compte d'Affectation Spéciale « Développement Agricole et Rural ». Nous remercions les éleveurs et les chargés de suivi (GTV Bretagne, FRGTV Pays de la Loire, GDS Bretagne, FRGDS Pays de la Loire, la Chambre d'agriculture de Bretagne) qui ont participé à cette étude pour l'ensemble du travail qu'ils ont accompli ainsi que Jonathan Eudes et Amélie Thirouard.

Barkema H.W., Schukken Y.H., Zadoks R.N., 2006. J. Dairy Sci., 89:1877-1895.

Bidaud O., Houffschitt P., Viguerie Y., 2007. J.B.N., 121-122.

Bradley A.J., Leach K.A., Breen J.E., Green L.E., Green M.J., 2007. Vet. Rec., 160:253-257.

Douglas V.L., Fenwick S.G., Pfeiffer D.U., Williamson N.B., Holmes C.W., 2000. Vet Microbiol., 75:27-41.

Gilbert F.B., Fromageau A., Lamoureaux J., Poutrel B., 2006. BMC vet Res., 2: 33.

Kalmus P., Aasmae B., Karssin A., Orro T., Kask K., 2011. Acta Vet. Scand., 53:4.

Khan I.U., Hassan A.A., Abdulmawjood A., Lammler C., Wolter W., Zschock M., 2003. J. Vet. Sci., 4:213-224.

Laboratory handbook on bovine mastitis, Hogan J.S et al, 1999. National mastitis council

Leigh J.A., 1999. Vet. J., 157:225-238.

Zadoks R.N., Allore H.G., Barkema H.W., Sampimon O.C., Grohn Y.T., Schukken Y.H., 2001. J. Dairy Sci., 84:590-599.

Zadoks R.N., Gillespie B.E., Barkema H.W., Sampimon O.C., Oliver S.P., Schukken Y.H., 2003. Epidemiol. Infect. 130, 335-349.

Zadocks R.N., 2007. . CABI Publishing CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources