



HAL
open science

Apport de l'épidémiologie moléculaire pour l'amélioration de la maîtrise des infections mammaires à *Streptococcus uberis* des vaches laitières

Philippe Roussel, Florence Gilbert, Loïc Fulbert, Ivanne Leperlier,
Jean-François Labbé, Marylise Le Guenic, Francis Serieys, Nathalie Bareille

► To cite this version:

Philippe Roussel, Florence Gilbert, Loïc Fulbert, Ivanne Leperlier, Jean-François Labbé, et al.. Apport de l'épidémiologie moléculaire pour l'amélioration de la maîtrise des infections mammaires à *Streptococcus uberis* des vaches laitières. *Innovations Agronomiques*, 2016, 49, pp.189-201. 10.15454/1.4622779876777085E12 . hal-01594718

HAL Id: hal-01594718

<https://hal.science/hal-01594718>

Submitted on 26 Sep 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

Apport de l'épidémiologie moléculaire pour l'amélioration de la maîtrise des infections mammaires à *Streptococcus uberis* des vaches laitières

Roussel P.¹, Gilbert F.², Fulbert L.³, Leperlier 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.roussel@idele.fr

² INRA UMR Infectiologie et Santé Publique, 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, épidémiologie et analyse de risque en santé animale, CS 40706, 44307 Nantes

⁹ INRA, UMR1300 BioEpAR, 44307 Nantes

Correspondance : philippe.roussel@idele.fr

Résumé

Ce travail avait pour objectif d'évaluer la capacité d'une méthode de typage moléculaire pour décrire la dynamique des infections à *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*) dans les troupeaux et plus précisément pour distinguer les troupeaux selon leur voie majoritaire de transmission des infections. Dans 19 troupeaux de l'Ouest de la France à problèmes récurrents de mammites liées *Str. uberis*, cinq séries de prélèvements aseptiques d'échantillons de lait de quartier ont été effectuées toutes les six semaines, sur toutes les vaches en lactation. Après identification bactériologique de l'espèce, un génotypage des souches de *Str. uberis* a été effectué par la technique MLVA et a permis de préciser que de nombreuses souches de *Str. uberis* étaient présentes dans les élevages (203 souches différentes, soit de 5 à 30 souches par troupeau). Par contre, même si l'approche MLVA est à même de caractériser sans ambiguïté le modèle épidémiologique des infections en élevage (contagieux, environnemental ou mixte), il est inenvisageable, pour des raisons financières, de procéder en routine à ce type d'approche. Une diminution marquée de ce coût, rendue possible par une automatisation d'une ou toute partie de l'analyse, permettrait d'associer cette approche par MLVA aux outils actuellement disponibles pour la réalisation d'un diagnostic des mammites par les intervenants de terrain. Le typage basé sur l'étude de la variabilité de séquence d'un des gènes de virulence que nous avons mis en évidence pourrait également constituer une alternative moins coûteuse.

Mots-clés : Santé animale, vache laitière, mammites, *Streptococcus uberis* épidémiologie moléculaire

Abstract: Contribution of molecular epidemiology to the improvement of control measures against *Streptococcus uberis* bovine mastitis

The aim of this Casdar project was to investigate the diversity of *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*) strains to evaluate the usefulness of genotyping for the control of mastitis. Nineteen bovine herds located in the western part of France were recruited in our program in regard of their recurrent problems with *Str. uberis* mastitis. Milk samples were aseptically collected from each quarter of lactating cows every six weeks for six months. The bacteriological analysis revealed 703 *Str. uberis* isolates corresponding to 365 infected quarters from 242 cows. The MLVA genotyping based on PCR amplification of 8 loci identified 203 strains, i.e. MLVA types, and that numerous strains were present in

herds (from 5 to 30 strains depending on the herd). MLVA is suitable for investigative epidemiology as contagious strains (able to progressively provoke mastitis in different mammary glands) and “environmental” strains (restricted to one quarter) were clearly characterized. However, MLVA analysis of isolates from numerous aseptically collected milk samples would be too expensive for a routine use. During the last months of our project, we identified two virulence genes that display a great sequence variability among *Str. uberis* strains. We showed that, at the herd level, the analysis of one of these genes from *Str. uberis* isolates was efficient to qualify the epidemiological scheme of mastitis (environmental, contagious or both) and could be a cheaper alternative.

Keywords: Animal health, dairy cows, mastitis, *Streptococcus uberis* molecular epidemiology

Introduction

Les infections mammaires en lactation contribuent aujourd'hui encore pour un tiers à l'impact économique des troubles de santé en troupeau bovin laitier et pénalisent le revenu de nombreux éleveurs laitiers. Depuis plus de 30 ans, des plans de maîtrise des mammites sont proposés et appliqués dans les troupeaux. Ces pratiques ont engendré une diminution de la prévalence des mammites dues aux pathogènes à réservoir mammaire tels que *Staphylococcus aureus* et surtout *Streptococcus agalactiae*. Cette évolution favorable est toutefois contrebalancée par une augmentation de la prévalence des mammites dues à *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*) (Leigh, 1999 ; Bidaud et al., 2007 ; Bradley et al, 2007 ; Shum et al, 2009) 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 (Phuektes et al, 2001 ; Zadoks et al, 2003 ; Zadoks, 2007). Le constat est fait que, sans l'utilisation des outils de biologie moléculaire, l'identification des facteurs de risque des infections à *Streptococcus uberis* basées sur l'analyse des données disponibles dans les troupeaux (fréquence des infections, degré de sévérité ...) complétée d'une visite d'élevage est insuffisante pour préciser le réservoir prédominant de la bactérie (mammaire ou environnemental). De ce fait, les actions de maîtrise proposées sont nombreuses, non spécifiques, lourdes à mettre en œuvre et, *in fine*, peu suivies par les éleveurs. Le développement des techniques de biologie moléculaire et le séquençage du génome de *Streptococcus uberis* 0140J entrepris en 2001 (Ward et al, 2009) a ouvert des perspectives d'étude fine de la dynamique des infections intramammaires à *Streptococcus uberis*, l'électrophorèse en champs pulsé puis la MLST (Multiple Loci Sequence Type) sont devenues les techniques de typage les plus couramment utilisées (Douglas et al., 2000 ; Khan et al., 2003 ; Zadoks et al., 2003 ; Zadoks et al, 2005 ; Coffey et al, 2006 ; Pullinger et al, 2007 ; Tomita et al, 2008 ; Abureema et al, 2014).

La réalisation de ce projet Casdar s'est appuyée sur une nouvelle méthode de génotypage de *Streptococcus uberis* (analyse multiple de séquences répétées en tandem et en nombre variable ou Analysis of Multiple Loci VNTR ou MLVA). Cette méthode fiable, discriminante et relativement peu coûteuse mise au point à l'INRA (UMR ISP, Nouzilly) (Gilbert et al, 2006), les premiers résultats obtenus suggérant que cette technique pourrait permettre une caractérisation de l'épidémiologie des infections à *Str. uberis* dans le troupeau et notamment de l'origine principale des bactéries en cause. L'étude visait à confirmer cette aptitude et à fournir de nouveaux outils de diagnostic à coût raisonnable et utilisables par les acteurs de terrain pour proposer des plans de maîtrise plus spécifique. Ce programme a fait l'objet d'un partenariat large et représentatif de l'ensemble des acteurs de la santé animale (l'UMR Oniris INRA BioEpaR de Nantes et l'UMR1282 Infectiologie et Santé Publique (ISP) de l'INRA de Nouzilly, les Groupements Techniques Vétérinaires, les Groupements de Défense, le pôle Herbivores de Bretagne et Filière Blanche).

Ce projet s'est articulé en trois actions:

1. choix des troupeaux, prélèvements de lait, analyses bactériologiques et moléculaires,
2. analyse de la diversité des souches isolées (lien avec l'expression clinique de l'infection, variations des profils de souches selon les troupeaux, évaluation du taux de guérison après traitement antibiotique),
3. recherche d'un outil de diagnostic du modèle épidémiologique utilisable en routine.

1- Choix des troupeaux, prélèvements de lait, analyses bactériologiques et moléculaires

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 *Streptococcus uberis* ont été recrutés. Au total, deux exploitations ont été exclues de l'analyse finale, 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 *Streptococcus 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, deux de race Normande et un avait les deux 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 cinq séries de prélèvements aseptiques et sept troupeaux de seulement quatre 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. 10 078 échantillons étaient stériles (69%) et 1 004 étaient contaminés (7%) (Figure 1).

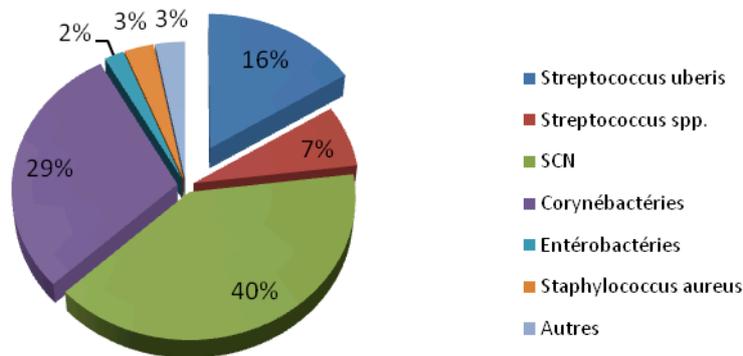


Figure 1 : Fréquence des agents pathogènes identifiés sur les prélèvements effectués lors des collectes de laits de quartiers exhaustives

Ces résultats montrent l'importance des agents pathogènes mineurs dans ces élevages lors de la collecte exhaustive (Figure 1). En effet, les staphylocoques à coagulase négative (40%) et les corynébactéries (29%) représentaient à eux deux 69% des agents pathogènes isolés. Cinq cent quatre-vingt-onze prélèvements étaient positifs à *Streptococcus uberis*, (16% des prélèvements), ce qui en fait l'agent pathogène majeur le plus isolé dans ces troupeaux. La prévalence moyenne de l'infection par *Streptococcus uberis* était de 5,2% des quartiers avec des variations importantes suivant les élevages, de 1,8% à 15,9%. Sur les 996 vaches prélevées lors de cette étude, 242 se sont révélées infectées par *Streptococcus uberis* pour au moins un prélèvement, soit 24% des vaches.

Sur les 226 prélèvements recueillis lors de mammites cliniques, 38 étaient stériles (17%) et quatre contaminés (2%). *Streptococcus 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%) (Figure 2). La proportion relative de *Streptococcus uberis* par troupeau variait de 20% à 85%.

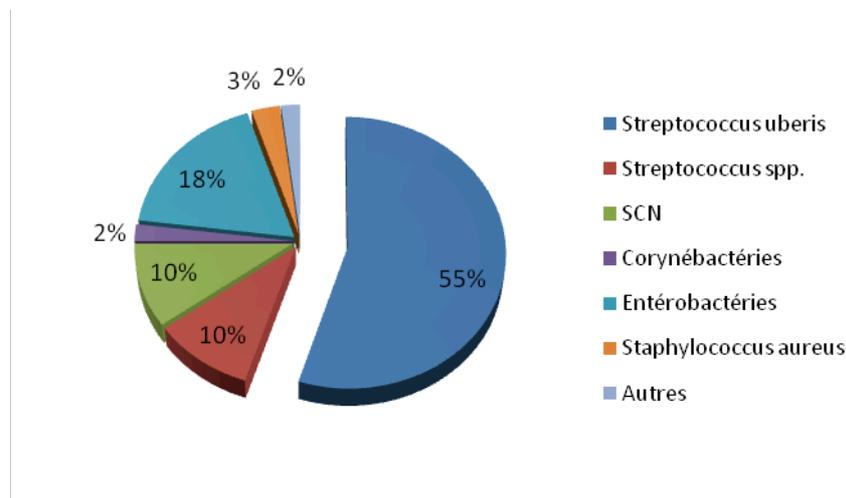


Figure 2 : Fréquence des agents pathogènes isolés dans les laits de mammites cliniques

Une incidence des mammites à *Streptococcus uberis* variable selon les élevages

Au cours de la période d'étude, 280 quartiers ont été infectés par *Streptococcus uberis* à un moment de prélèvement considéré alors qu'ils étaient non infectés au prélèvement précédent, soit 6,5% des quartiers. L'incidence moyenne des infections subcliniques à *Streptococcus uberis* par période entre deux collectes exhaustives était de 2,2%. Elle variait suivant les élevages entre 0,4% et 8,5%. L'incidence sur l'ensemble des élevages pour chaque intervalle entre deux prélèvements a été calculée. Celle-ci variait de 0,7% à 3,7%. Cette incidence totale diminuait au cours de l'étude, pour passer de 3,7% à l'intervalle 1 à 1,9% à l'intervalle 3.

2- Analyse de la diversité des souches isolées

2.1 De nombreuses souches de *Streptococcus uberis* présentes dans les élevages

L'analyse MLVA a fait ressortir, pour la majorité des prélèvements, un unique profil MLVA, c'est-à-dire une souche unique de *Streptococcus uberis* par lait de mammite, malgré l'utilisation de plusieurs dizaines de colonies issues d'un même prélèvement de lait de quartier. Seuls neuf prélèvements sur les 703 positifs pour *Streptococcus uberis* (1,3%) présentaient au moins deux profils MLVA différents. Dans la très grande majorité des cas, un quartier atteint de mammites à *Streptococcus uberis* ne contenait donc qu'une seule souche.

Sur les 703 *Streptococcus uberis* isolés et identifiés (Tableau 1), 199 souches différentes ont été mises en évidence par la technique MLVA. Le nombre de souches différentes intra-élevage était variable (Tableau 1), allant de 3 souches pour 10 isolats de *Streptococcus uberis* dans l'élevage 19 à 31 souches pour 106 isolats dans l'élevage 6. La diversité des souches par élevage variait de 13 souches pour 77 isolats provenant de 33 quartiers infectés durablement (élevage 3) à 12 souches différentes pour 17 isolats provenant de 16 quartiers infectés sur une courte période ou bien de vaches en fin de lactation et tarées pendant notre période d'analyse (élevage 13). Le calcul de la prévalence de quartiers atteints variait de 1,8% (troupeau 19) à pratiquement 16% (troupeau 4).

En règle générale, les souches sont diverses et propres à un élevage donné, ceci n'excluant pas une ressemblance sur le plan génétique.

Tableau 1: Récapitulatif par élevage du nombre de souches différentes de *Streptococcus uberis*.

Elevage	Nombre de prélèvements positifs à <i>Streptococcus uberis</i>	Prévalence (quartiers)	Nb de souches (types MLVA)
Tous	703	0,052	199
2	25	0,03	15
3	77	0,113	13
4	130	0,159	26
5	34	0,046	12
6	106	0,106	31
7	31	0,033	9
8	19	0,041	7
9	32	0,034	9
10	31	0,033	13
11	31	0,034	11
12	22	0,044	13
13	17	0,027	12
14	23	0,042	8
15	41	0,068	12
16	18	0,021	11
17	20	0,027	5
18	36	0,038	9
19	10	0,018	3

2.2 La moitié des nouvelles infections pendant la lactation sont dues à des contagions

Sur l'ensemble des souches, la fréquence relative de chaque souche dans un élevage était en moyenne de 9% avec un écart-type de 10%. Les valeurs étaient comprises entre 0,7% et 70%.

La majorité des souches (73%) avait une fréquence relative faible (<10%). Seules 8% des souches présentaient une fréquence relative supérieure à 20% et représentaient donc plus d'un cinquième des prélèvements positifs pour *Streptococcus uberis* dans l'élevage où elles étaient présentes.

Au cours de cette étude, sur l'ensemble des nouvelles infections (280 quartiers), 139 contagions ont été observées (la souche provoquant la nouvelle infection était déjà présente dans la mamelle d'une congénère), soit la moitié, dont 20% étaient des contagions entre quartiers d'une même vache et 80% entre quartiers de vaches différentes. En période hivernale (période 1 et 2), la part de ces contagions est moins élevée qu'en période printanière (Figure 3).

Selon les troupeaux, la part des contagions pendant la lactation variait de 0 à 73%. Elle est également beaucoup plus marquée en début de lactation : 75% dans les deux premiers mois de lactation versus 53% à partir 3^{ème} mois.

L'étude de la variation de l'indice de diversité en fonction du nombre moyen de contagions par vache représentée par la courbe de tendance linéaire (Figure 4) met en évidence une relation attendue entre ces deux caractères, une baisse de l'indice de diversité étant associée à une augmentation du nombre moyen de contagions par vache.

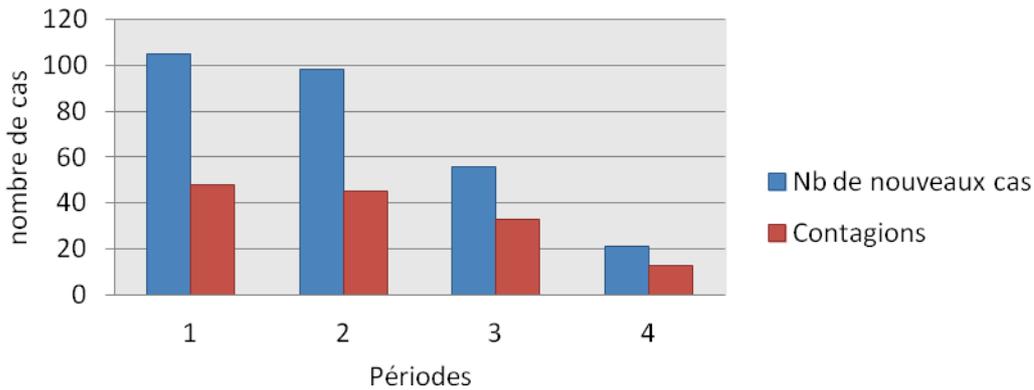


Figure 3 : Nombre de contagions et de nouveaux cas selon la saison

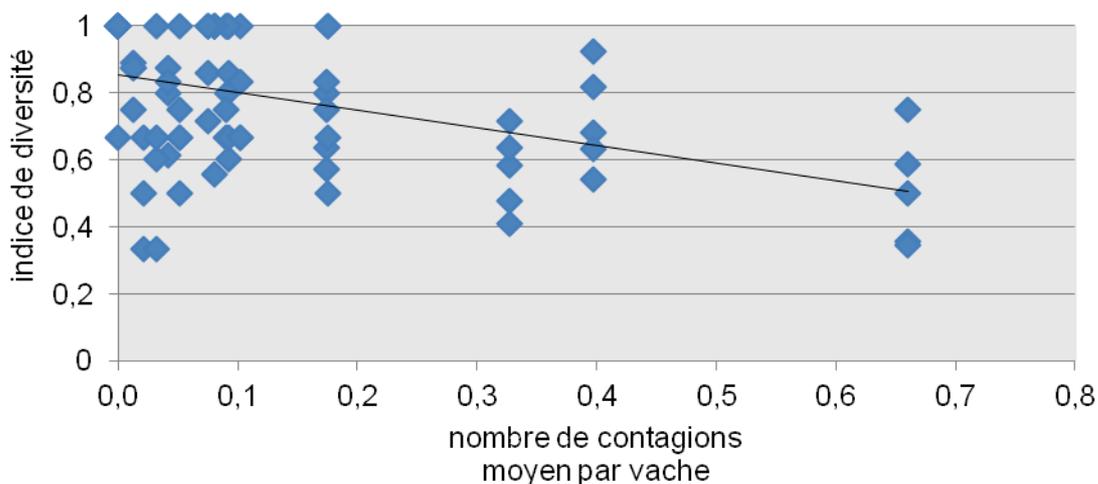


Figure 4 : Indice de diversité des souches de *Streptococcus uberis* en fonction du nombre moyen de contagions par vache par élevage

2.3 Bactérie d'environnement ou contagieuse ?

Malgré l'existence de souches contagieuses (souche provoquant une nouvelle infection et qui était déjà présente dans la mamelle d'une congénère), un nombre important de souches peut exister au niveau d'un troupeau. A partir de 2012, les données issues du génotypage MLVA nous ont permis d'investiguer la diversité des souches de *Streptococcus uberis* et la dynamique des infections à *Streptococcus uberis*, les voies de contaminations prédominantes (environnement ou réservoir mammaire) et l'importance de chacune de ces voies dans les troupeaux.

Au niveau de la population des élevages que l'on a étudiés, il existe deux voies de contaminations des quartiers, environnementale et contagieuse. Nous avons pu estimer que la contagion représentait 50 % environ des nouvelles infections, avec une forte variabilité selon les troupeaux, les saisons (période de l'année). Au niveau de la définition du modèle épidémiologique, ces élevages relevaient du modèle environnemental ou mixte (environnemental avec une proportion de contagion).

2.4 Il est peu probable que certaines souches soient plus virulentes que d'autres

Il semble que certaines souches soient plus adaptées à la mamelle et donc à même de persister mais en règle générale, lorsqu'une souche donnée (un profil MLVA donné) a infecté plusieurs vaches, certaines de ces infections étaient cliniques et d'autres demeuraient subcliniques. L'expression clinique

de la mammites ne repose donc probablement pas sur les seules caractéristiques intrinsèques de la souche de *Streptococcus uberis* mais également sur celles de la vache.

2.5 Un taux de guérison des mammites à *Streptococcus uberis* conforme aux résultats attendus

Durant la période d'étude, 240 mammites cliniques ont été observées et traitées avec des antibiotiques chez 166 vaches. Quarante-vingt-cinq mammites cliniques sur les 240 observées, soit 35% étaient positives pour *Streptococcus uberis* et exploitables, c'est-à-dire que les prélèvements antérieur et postérieur étaient disponibles. A la suite de ces mammites cliniques, 25 quartiers demeuraient positifs à *Streptococcus uberis*, la souche isolée étant identique à celle isolée durant la mammites clinique.

Trente-trois quartiers étaient positifs pour *Streptococcus uberis* au prélèvement précédent l'épisode clinique. Sur ces 33 quartiers, 19 ont présenté une mammites clinique due à la même souche, 5 à une autre souche, 1 à un autre pathogène et 8 dont le pathogène responsable n'a pas pu être mis en évidence.

Les infections à *Streptococcus uberis* sont guéries à 100% après un traitement au tarissement, à 71% lors d'un traitement en lactation et à 53% en l'absence de traitement antibiotique. Il faut noter que le taux de guérison en lactation est différent si l'infection est récente (absence de cette souche lors de la collecte exhaustive d'échantillons) ou si l'infection était présente antérieurement avec respectivement un taux de guérison de 80% et de 57%.

Tableau 2: Nombre et taux de guérison des infections à *Streptococcus uberis* selon le type de traitement

	Sans traitement	Traitement tarissement	Traitement lactation
Nombre	507	9	85
Taux de guérison	47%	100%	71%

Le typage des souches de *Streptococcus uberis* a aussi permis d'investiguer plus précisément la problématique des échecs thérapeutiques constatés dans les troupeaux. Nous montrons que ce ressenti d'échec de traitement est lié aux réinfections des vaches par des souches différentes dans les troupeaux à fort risque d'infections par *Streptococcus uberis*. En effet, le taux de guérison du traitement antibiotique en lactation lors de la détection de mammites cliniques est de 71%. 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 du traitement. Le taux de guérison de 100% au tarissement n'a malheureusement pu être établi que sur un faible nombre de quartiers au cours de l'étude.

3. Conception d'une démarche et des outils associés

3.1 Recherche d'un outil indicateur de présence de *Streptococcus uberis* dans les mamelles et du modèle épidémiologique de ces infections

Afin de développer un outil qui permette de mettre en évidence le réservoir (environnement vs. contagieux) et donc *in fine* de permettre la sélection et l'application de mesures de lutte efficaces contre *Streptococcus uberis*, il est nécessaire de connaître l'importance de la contagion dans un élevage. Le but de cet outil de diagnostic est donc de déterminer l'importance de la contagion de *Streptococcus uberis* dans un élevage en limitant le nombre de prélèvements à réaliser afin de permettre son utilisation en routine.

A partir des résultats obtenus sur les travaux sur la contagion et sur l'indice de diversité des souches, plusieurs scénarios pour obtenir un outil pour mettre en évidence le réservoir principal ont été investigués à partir de :

- deux séries de prélèvements successifs avec analyse de la contagion,
- une seule série de prélèvements avec analyse de la diversité des souches,
- et de deux cas de figure :
 - o sur l'ensemble des vaches,
 - o sur les vaches ayant une concentration en cellules somatiques supérieure à 300 000 cellules/mL de lait au précédent contrôle.

Tableau 3: Récapitulatif par élevage du nombre de souches différentes de *Streptococcus uberis*.

Outil diagnostique	Nb prél	Seuil contagion	de Aire sous la courbe ROC	la Index Youden max	de Seuil fixé	Sensibilité obtenue	Spécificité obtenue
Diversité exhaustif	400	0,50	0,87	0,63	0,6	0,80	0,83
Diversité sélection	82	0,50	0,89	0,78	0,7	1,00	0,78
Contagion exhaustif	784	0,20	0,79	0,54	0,3	1,00	0,54
Contagion sélection	106	0,10	0,81	0,63	0,1	0,63	1,00

Diversité exhaustif : 1 seule série de prélèvements avec analyse de la diversité des souches + Sur l'ensemble des vaches

Diversité sélection : 1 seule série de prélèvements avec analyse de la diversité des souches + Sur vaches > 300 000

Contagion exhaustif : 2 séries de prélèvements successifs avec analyse de la contagion+ Sur l'ensemble des vaches

Contagion sélection : 2 séries de prélèvements successifs avec analyse de la contagion+ Sur vaches > 300 000

Les résultats présentés dans le Tableau 3 montrent que quelque soit le scénario envisagé le nombre d'échantillons de lait de quartiers nécessaires au diagnostic est très important et rend difficile une utilisation en routine. La solution optimum reste une seule série de prélèvements avec analyse de la diversité des souches en ayant sélectionné les vaches ayant une concentration en cellules somatiques supérieure à 300 000 cellules/ml de lait au précédent contrôle de performances. Nous obtenons alors une sensibilité de 100% et une spécificité de 78%, mais le nombre de prélèvements nécessaires sera de plus de 80. Sur un plan économique (aujourd'hui autour de 35 € l'analyse d'un échantillon) et technique (réalisation en ferme) ceci rend cette approche quasi impossible en routine.

3.2 Recherche d'un outil indicateur de présence de *Streptococcus uberis* dans les mamelles et du modèle épidémiologique de ces infections à partir du lait de tank

L'objectif finalisé du projet CASDAR était de définir un indicateur permettant d'appréhender rapidement la présence de *Streptococcus uberis* et son épidémiologie dans un élevage. Le lait de tank s'imposait comme une piste à considérer en premier pour parvenir à cet objectif.

Le géotypage MLVA des colonies isolées du lait de tank est une étape préliminaire pour en évaluer la valeur informative par rapport à l'épidémiologie des mammites à *Streptococcus uberis* dans un élevage. Normalement, dans le lait de tank à 4°C, les bactéries ne peuvent pas se multiplier. On peut donc penser que la contamination provient du lait des vaches dont les quartiers sont atteints de mammites

subcliniques qui les excrètent en grand nombre dans le lait, les laits de mammites cliniques étant normalement écartés. La contamination de la machine à traire (*Streptococcus uberis* présent sur la peau des vaches, sur les manchons trayeurs...) ne devrait pas interférer, un trop faible nombre de bactéries se retrouvant dans le tank (facteur de dilution très important). On peut donc espérer retrouver dans le tank les allèles MLVA des souches de *Streptococcus uberis* génotypées dans chaque élevage, puisqu'elles sont normalement excrétées dans le lait.

Les résultats de typage MLVA réalisés sur le mélange d'isolats bactériens récoltés lors du raclage des colonies obtenues après ensemencement de 130 µl de lait de tank sur gélose au sang ou milieu modifié d'Edward indiquent qu'une diversité moindre est observée dans les tanks collectés en début de projet lors des premiers passages, et aucun *Streptococcus uberis* n'a été détecté dans le tank d'un élevage où le nombre de cas de mammites subcliniques était très faible.

Cependant, pour les laits de tanks des passages ultérieurs, alors que les infections à *Streptococcus uberis* augmentent en nombre, le génotypage n'a pas montré de différences significatives entre les élevages dans lesquels pourtant la diversité des souches était différente. Certaines souches de mammites, excrétées en faible concentration pourraient ne pas être représentées après ensemencement d'un faible aliquote de lait de tank. Etant donné que 130 µl de lait de tank étaient déposés sur le milieu gélosé, seules les souches de *Streptococcus uberis* dont la concentration était relativement élevée (>50 cfu/ml de lait de tank) ont pu être représentées sur la gélose. Par contre, nous avons parfois amplifié, à partir des bactéries contenues dans le lait de tank, des allèles MLVA de *Streptococcus uberis* qui n'étaient pas présents parmi les souches isolées des mamelles des vaches. Ceci pourrait être lié à la chaîne du froid qui n'a pas toujours été optimale lors du transport des échantillons, ce qui a pu permettre le développement de certaines souches provenant de l'environnement tel que la peau des trayons.... La congélation du lait de tank avant son envoi au laboratoire aurait probablement limité le développement de certaines souches initialement présentes à de faibles concentrations. Par ailleurs, bien que le milieu modifié d'Edward limite la croissance bactérienne à certaines espèces, toutes les espèces des genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* peuvent pousser sur ce milieu et le nombre de colonies sur le milieu d'Edward reflète l'hygiène du lait de tank (mammites, qualité de l'hygiène au moment de la traite notamment propreté et efficacité de l'essuyage des mamelles, refroidissement correct du lait dans le tank). Le nombre de colonies est apparu en accord avec la charge bactérienne obtenue sur gélose au sang et très variable selon les laits de tank, d'une dizaine de colonies à plus de 500, de tailles très hétérogènes, rendant la numération des *Streptococcus uberis* impossible. Le recours à une PCR quantitative pourrait être envisagé pour déterminer de façon plus précise le nombre de bactéries *Streptococcus uberis* par ml de lait de tank, mais cette information serait d'un intérêt limité si le nombre de quartiers infectés n'est pas connu, étant donné les fluctuations possibles en terme de quantité de bactéries excrétées dans le lait au cours d'une mammite subclinique.

Les différents allèles obtenus pour chaque TR MLVA des laits de tank prélevés lors des différents passages en élevage sont présentés dans les tableaux de synthèse par élevage des résultats de génotypage MLVA.

Ces différents résultats rendent impossible l'utilisation du lait de tank comme indicateur de présence de *Streptococcus uberis* dans les mamelles et donc du modèle épidémiologique de ces infections.

3.3 Recherche d'un outil pour mettre en évidence le réservoir principal de *Streptococcus uberis* dans un troupeau infecté

En complément, les profils types épidémiologiques majoritaires d'infections de chaque élevage obtenus par MLVA et par la méthode CASDAR ont été comparés, un pourcentage de concordance a été calculé et les raisons de discordances observées ont été recherchées

Sur les 17 élevages étudiés, trois présentaient une fréquence relative en *Staphylococcus aureus* supérieure à 10% (élevages 3, 5 et 13). Un élevage avait une fréquence relative en *Streptococcus uberis* inférieure à 9% (élevage 19). Pour la poursuite du travail, seuls 14 élevages ont donc été sélectionnés.

Le pourcentage de concordance obtenu par comparaison entre les profils épidémiologiques déterminés par la méthode CASDAR et par MLVA était de 50% (Tableau 4). Les profils n'étaient pas concordants pour sept élevages sur les quatorze étudiés. Pour trois d'entre eux (élevages 7, 14 et 16), la méthode CASDAR les classait de profil type environnemental alors qu'ils étaient classés de type mixte par la MLVA. Pour trois autres (élevages 9, 11 et 18), la méthode CASDAR les classait de profil type mixte alors qu'ils étaient classés de type environnemental par la MLVA. Enfin un élevage (élevage 6) était classé de profil type contagieux par la méthode CASDAR alors qu'il était classé de type mixte par la MLVA.

Tableau 4: Adéquation méthode CASDAR Santé/Serotypage

Elevage	2	4	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	18
CASDAR	E	M	C	E	E	M	E	M	E	E	M	E	E	M
MLVA	E-	M0	M0	M0	E+	E0	E0	E0	E-	M-	M+	M-	E-	E+

E : Profil type environnemental ; M : Profil type mixte ; C : profil type contagieux; - : faiblement persistant ; 0 : moyennement persistant ; + : fortement persistant

L'approche MLVA est à même de caractériser sans ambiguïté le modèle épidémiologique des infections en élevage (contagieux, environnemental ou mixte), mais comme nous l'avons vu précédemment, il est inenvisageable, pour des raisons financières, de procéder en routine à des prélèvements aseptiques de lait de quartiers de toutes les vaches ayant une concentration cellulaire indiquant la présence d'une mammite et de typer tous les isolats de *Streptococcus uberis*.

3.4 Etudes complémentaires durant la dernière année du projet

Au cours de ce projet, deux travaux non prévus au départ du programme ont permis de compléter les connaissances acquises au sujet du *Streptococcus uberis*, l'un porte sur le génotypage MLST et l'autre sur l'étude des séquences de 2 gènes de virulence des souches de *Streptococcus uberis*.

3.4.1 Consolidation de nos résultats de typage des souches par MLVA à l'aide de la technique MLST

Afin de conforter nos observations et valider notre méthode MLVA, nous avons, lors des 18 derniers mois, typé 273 isolats par l'approche MLST, une technique reconnue et très couramment utilisée depuis quelques années, notamment dans des études de phylogénie visant à mettre en évidence des parentés génétiques entre les souches et leur évolution. Cette méthode MLST repose sur le séquençage de sept gènes préalablement amplifiés par PCR. Nous avons utilisé la procédure décrite par Coffey et al (2006) qui est relatée sur le site web mis en place pour permettre l'analyse et le partage des données (<http://pubmlst.org/suberis/>). Très brièvement, la procédure consiste à amplifier par PCR avec une enzyme fidèle sept fragments de gènes à partir de l'ADN de *Streptococcus uberis* et d'analyser leur séquence (qui peut varier de quelques bases selon le type en présence) à l'aide de la base de données disponible sur le site web. Un code numérique est attribué à chaque allèle de gène et type de séquences globales. Nos séquences ont été déterminées par un prestataire, Cogenics Beckman Coulter, basé en Angleterre.

Nos 199 types MLVA se sont regroupés en 136 types MLST. Lorsque des isolats appartenait à un même type MLVA, un même type MLST a été mis en évidence. Par contre, des isolats classés dans un

type MLST donné, correspondant donc potentiellement à une même souche, pouvaient être subdivisés en plusieurs types et donc souches selon notre méthode MLVA. A titre d'exemple, le type MLST ST6 (29 de nos isolats) correspond à 11 types MLVA, soit 12 souches. En règle générale, la technique MLST est en accord avec la MLVA à l'échelle d'un élevage donné et en conséquence, elle confirme nos résultats de pourcentage de contagion intra-élevages. La différence dans les deux approches réside dans la notion de souches communes entre plusieurs élevages, la proportion de souches pouvant sévir dans plusieurs élevages étant sensiblement augmentée et donc le niveau de contagion, avec la MLST. Au regard de la facilité de réalisation du typage MLVA et son pouvoir discriminant, supérieur à la MLST, la MLVA semble particulièrement indiquée pour des études épidémiologiques d'intervention.

3.4.2 Mise en évidence de deux gènes de virulence de *Streptococcus uberis* pour lesquels la séquence nucléotidique est variable et à même de distinguer les souches et donc d'envisager d'autres pistes de travail

En cherchant de nouveaux marqueurs TR pour notre schéma, nous avons identifié deux gènes de *Streptococcus uberis* dont la séquence nucléotidique est très variable (longueur et séquence des gènes), variabilité de séquences qui a également été observée par Hossain et al (2015) après séquençage et comparaison du génome de 12 souches de *Streptococcus uberis*. Lors de la dernière année de notre projet, nous avons amplifié et séquencé ces deux gènes pour 270 isolats provenant de tous les élevages et balayant l'ensemble des types MLVA identifiés durant ce projet. Après assemblage et alignement des différentes séquences (avec logiciel commercial Genious mais des logiciels web gratuits peuvent être utilisés), nous avons obtenu 78 types de séquences pour un gène et 102 types pour l'autre. L'étude de la séquence de l'un de ces deux gènes apparaît moins puissante que la MLVA et la MLST pour distinguer les souches puisque ce même panel d'isolats a conduit à 199 types MLVA et 136 types MLST, cependant à l'échelle d'un élevage donné, leur pouvoir discriminant est tout à fait satisfaisant (exemples : dans élevage numéro 4 à modèle mixte et comptant beaucoup de mammites à *Streptococcus uberis*, nous avons en présence 27 souches selon la MLVA, 23 selon la MLST, 17 avec la séquence d'un gène et 18 selon la séquence de l'autre gène. Dans l'élevage 5, 12 MLVA, 10 MLST et 9 selon l'un ou l'autre gène ; enfin dans l'élevage 6, 31 types MLVA, 24 par MLST et 18 ou 17 pour les 2 gènes séquencés) (Tableau 9).

L'analyse de la séquence d'un gène de *Str. uberis* pourrait constituer une alternative intéressante pour déterminer la diversité des souches en présence dans un élevage, au regard de l'évolution favorable en matière de séquençage, tant au niveau disponibilité, puissance qu'au niveau financier.

Conclusion et perspectives

Depuis plusieurs années, on constate une augmentation de la prévalence des mammites dues à *Streptococcus uberis* qui contribue à une augmentation des concentrations cellulaires du lait livré en France et à une hausse de la fréquence des mammites cliniques. Ces bactéries se transmettent aux vaches par contamination par l'environnement mais aussi par contagion à partir d'une autre vache. Cette dualité de la voie de transmission des infections dans des troupeaux fortement infectés complexifie les plans d'action proposés.

L'étude de la diversité des souches de *Streptococcus uberis* et de la dynamique de ces infections par typage MLVA a permis de confirmer qu'il existait bien deux sources d'infection possibles, la contamination par l'environnement et la contagion entre vaches. La première source est systématiquement présente dans les élevages 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 *Streptococcus 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. En matière de

traitements antibiotiques des mammites cliniques en lactation, les résultats collectés lors de notre étude sont conformes aux travaux antérieurs et n'indiquent pas de résistance émergente de la part de *Streptococcus uberis*, même si, dans un élevage, un défaut de guérison suite à des traitements répétés, a été mis en évidence.

La MLVA semble particulièrement indiquée pour des études épidémiologiques d'intervention. En effet, sa simplicité de réalisation et son pouvoir discriminant très élevé (capacité à distinguer les souches), comparés à la MLST, nous conduisent à recommander cette méthode pour toute étude épidémiologique au niveau de l'élevage visant à tracer avec précision la circulation des souches, que ce soit dans le domaine de l'écologie microbienne (niches primaires contenant *Streptococcus uberis* et trajet, mode de circulation jusqu'à la mamelle : eau d'abreuvoir, litières, manchons trayeurs...), diversité des souches au niveau des mamelles infectées, évaluation de traitements divers (médicaux tels que vaccins, antibiotiques, de nettoyage-désinfections tels que produits de trempage...).

L'analyse de la diversité des souches à partir d'un échantillon unique tel que le lait de tank pour déterminer le profil épidémiologique majoritaire des infections à *Streptococcus uberis* dans un élevage (réservoir infectieux environnemental vs. contagion probable au moment de la traite) n'est pas suffisamment informative, le nombre total de souches présentes dans l'élevage pouvant être assez semblable. Par contre, la MLVA permet de définir le profil épidémiologique sans ambiguïté à partir des laits de quartiers infectés. Le typage MLVA des souches de *Streptococcus uberis* isolées des laits de tous ou une partie des quartiers atteints n'est pas envisageable en routine au regard du coût de réalisation des prélèvements et analyses de génotypage. Cependant, cette approche peut être envisagée pour les élevages rencontrant des problèmes récurrents de mammites à *Streptococcus uberis* et en situation critique. Cette approche a d'ailleurs été récemment mise à profit dans le cadre d'un appui technique dans un élevage menacé d'un arrêt de collecte (Gilbert et al., 2015). Mais, le nombre de prélèvements nécessaire pour la réalisation d'un diagnostic épidémiologique et son coût d'environ 35 € par analyse rendent difficile son utilisation en routine. Une diminution marquée de ce coût rendue possible par une automatisation d'une partie ou de toute l'analyse permettrait d'associer cette approche par MLVA aux outils actuellement disponibles pour la réalisation d'un diagnostic mammites par les intervenants de terrain.

Le typage basé sur l'étude de la variabilité de séquence d'un des gènes de virulence que nous avons mis en évidence lors des derniers mois de ce projet pourrait constituer une alternative moins coûteuse et envisageable dans un avenir relativement proche au regard de l'évolution favorable en matière de séquençage, tant au niveau disponibilité, puissance qu'au niveau financier.

Références bibliographiques

- Abureema S, Smooker P, Malmo J, Deighton M, 2014. Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain. *J Dairy Sci.* 97(1), 285-290.
- Bidaud O., Houffschmitt P., Viguerie Y., 2007. Etiologie des mammites bovines en France entre 2005 et 2007. *Journée Bovine Nantaise*, 121-122.
- Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ. 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet Rec.* 160(8), 253-257.
- Coffey TJ, Pullinger GD, Urwin R, Jolley KA, Wilson SM, Maiden MC, Leigh JA, 2006. First insights into the evolution of *Streptococcus uberis*: a multilocus sequence typing scheme that enables investigation of its population biology. *Appl Environ Microbiol.* 72(2), 1420-1428.
- Douglas V.L., Fenwick S.G., Pfeiffer D.U., Williamson N.B., Holmes C.W., 2000. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol.* 75, 27-41.

- Gilbert FB, Fromageau A, Lamoureux J, Poutrel B. Evaluation of tandem repeats for MLVA typing of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. BMC Vet Res. 2006 Nov 17;2, 33.
- Gilbert FB, Poutrel B, Leboeuf F. Mammites à *Streptococcus uberis* : Application du typage par la méthode MLVA pour définir le modèle épidémiologique dans un cas terrain. Journées Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires, mai 2015
- Hogan J.S et al, 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis, National mastitis council.
- Hossain M, Egan SA, Coffey T, Ward PN, Wilson R, Leigh JA, Emes RD, 2015. Virulence related sequences; insights provided by comparative genomics of *Streptococcus uberis* of differing virulence. BMC Genomics 16, 334.
- Khan I.U., Hassan A.A., Abdulmawjood A., Lammler C., Wolter W., Zschock M., 2003. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. J. Vet. Sci., 4, 213-224.
- Leigh J.A., 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis. Vet. J. 157, 225-238.
- Phuektes P, Mansell PD, Dyson RS, Hooper ND, Dick JS, Browning GF, 2001. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. J Clin Microbiol. 39(4), 1460-1466.
- Pullinger G.D., Coffey T.J., Maiden M.C., Leigh J.A., 2007. Multilocus-sequence typing analysis reveals similar populations of *Streptococcus uberis* are responsible for bovine intramammary infections of short and long duration. Vet Microbiol. 119(2-4), 194-204.
- Shum L.W.C., McConnel C.S., Gunn A.A., House J.K., 2009. Environmental mastitis in intensive high-producing dairy herds in New South Wales. Australian Veterinary Journal 87(12), 469–475.
- Tomita T., Meehan B., Wongkattiya N., Malmo J., Pullinger G., Leigh J., Deighton M., 2008. Identification of *Streptococcus uberis* multilocus sequence types highly associated with mastitis. Appl Environ Microbiol. 74(1), 114-124.
- Ward P.N., Holden M.T., Leigh J.A., Lennard N., Bignell A., Barron A., Clark L., Quail M.A., Woodward J., Barrell B.G., Egan S.A., Field T.R., Maskell D., Kehoe M., Dowson C.G., Chanter N., Whatmore A.M., Bentley S.D., Parkhill J., 2009. Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. BMC Genomics 10, 54.
- Zadoks R.N., Gillespie B.E., Barkema H.W., Sampimon O.C., Oliver S.P., Schukken Y.H., 2003. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. Epidemiol. Infect. 130, 335-349.
- Zadoks R.N., Schukken Y.H., Wiedmann M., 2005. Multilocus sequence typing of *Streptococcus uberis* provides sensitive and epidemiologically relevant subtype information and reveals positive selection in the virulence gene pauA. J Clin Microbiol. 43(5), 2407-2417.
- Zadoks R.N., 2007. Sources and epidemiology of *Streptococcus uberis*, with special emphasis on mastitis in dairy cattle. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 2 (030), 15p.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)