

SOURCES ET CARACTERE ENTEROTOXINOGENE DES STAPHYLOCOQUES EN ELEVAGE OVIN LAITIER

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2003
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Patrice, Benoît, Guy ARNAL
Né, le 21 janvier 1974 à RODEZ (Aveyron)

Directeur de thèse : **M. le Docteur Dominique BERGONIER**

JURY

PRESIDENT :
M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEUR :
M. Dominique BERGONIER
M. Xavier BERTHELOT

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

A notre Président de thèse :

Monsieur le Professeur DABERNAT

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Bactériologie - Virologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A notre jury de thèse :

Monsieur BERGONIER

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Service de Pathologie de la reproduction

Que nous tenons à remercier pour la patience dont il a su faire preuve et pour les conseils qu'il nous a fournis tout au long de ce travail.

Monsieur le Professeur BERTHELOT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Service de Pathologie de la reproduction

Qui nous fait l'immense plaisir de participer à notre jury de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de mon plus grand respect et de mon amitié.

A Anne.

A mes parents,
auxquels j'exprime toute mon affection et ma reconnaissance pour leur
soutien durant ces longues études.

A mes grand-mères,
auxquelles j'exprime toute ma tendresse.

A mon frère.

A toute ma famille.

A mes amis.

A Agnès Brouillaud.

A tout le service de la Pathologie de la reproduction.

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

<i><u>1- Les staphylocoques</u></i>	8
<u>11- Classification</u>	8
<u>12- Propriétés – Caractéristiques</u>	8
<i><u>2- Exploration du caractère toxigène des staphylocoques</u></i>	9
<u>21- Isolement des souches à coagulase positive</u>	9
<u>22- Techniques de détection des entérotoxines et des séquences nucléotidiques codant pour leur production</u>	10
<u>221- Caractéristiques des entérotoxines</u>	10
<u>222- Techniques de mise en évidence des entérotoxines</u>	11
<u>Méthodes biologiques</u>	11
<u>Méthodes de détection génomique type PCR (Polymerase Chain Reaction)</u>	11
<u>Méthodes de détections antigéniques</u>	12
<i><u>3- Les toxi-infections alimentaires staphylococciques</u></i>	15
<u>31- Les symptômes</u>	15
<u>32- Importance en France</u>	15
<u>33- Les produits incriminés – Importance des produits laitiers</u>	16
<u>34- Les entérotoxines identifiées</u>	17
<i><u>4- Les sources de staphylocoques en élevage ovin laitier</u></i>	17
<u>41- La source intra-mammaire</u>	17
<u>411- Symptômes</u>	18
<u>412- Etiologie</u>	18
<u>413- Epidémiologie</u>	19
<u>42- La source cutanée</u>	20
<u>43- La source environnementale</u>	22

DONNEES EXPERIMENTALES

<i><u>1- Matériels et méthodes</u></i>	24
<u>11- Sélection des élevages et méthodes de prélèvements</u>	24
<u>111- Sélection des élevages</u>	24
<u>Choix des élevages en 1999</u>	24
<u>Choix des élevages en 2000</u>	25
<u>112- Choix des sites de prélèvements</u>	26
<u>Choix des sites en 1999</u>	26
<u>Choix des sites en 2000</u>	27
<u>113- Sélection des animaux</u>	27
<u>Choix des animaux en 1999</u>	27
<u>Choix des animaux en 2000</u>	27
<u>114- Méthodologie des prélèvements</u>	28

<u>Le prélèvement de lait individuel</u>	28
<u>Le prélèvement du lait de tank</u>	28
<u>Le prélèvement effectué à la surface de la peau des trayons</u>	28
<u>Le prélèvement de l'eau résiduelle des manchons trayeurs</u>	29
<u>Les prélèvements de l'eau résiduelle de la machine à traire</u>	29
<u>Le prélèvement de l'eau de rinçage de la machine à traire</u>	29
<u>Le prélèvement effectué à la surface des mains des trayeurs et des personnes réalisant les prélèvements</u>	29
<u>12-Techniques analytiques</u>	30
<u>121- Isolement, dénombrement des souches de SCP</u>	30
<u>122- Détection et typage des entérotoxines</u>	30
<u>2-Résultats</u>	31
<u>21-Exploration des différentes sources de staphylocoques en élevage</u>	31
<u>211- La source intra-mammaire (année 1)</u>	31
<u>212- La source cutanée (années 1 et 2)</u>	33
<u>213- La source matériel</u>	40
<u>214- Le portage humain</u>	40
<u>22-Exploration du caractère toxigène des souches de staphylocoques isolées</u>	41
<u>221- Toxinogénicité des souches de staphylocoques isolées</u>	41
<u>Toxinogénicité des souches de staphylocoques isolées en 1999</u>	41
<u>Toxinogénicité des souches de staphylocoques isolées en 2000</u>	44
<u>222- Typage des entérotoxines</u>	45
<u>Typage des entérotoxines des souches de staphylocoques isolées en 1999</u>	45
<u>Typage des entérotoxines des souches de staphylocoques isolées en 2000</u>	46

DISCUSSION

<u>1-Discussion sur les méthodes</u>	47
<u>11- Les élevages et les dates de visite</u>	47
<u>12- Les prélèvements</u>	47
<u>13- Les techniques analytiques</u>	48
<u>2-Discussion sur les résultats</u>	49
<u>21- Les dénombrements de SCP</u>	49
<u>22- Le caractère toxigène des souches de SCP isolées</u>	51
<u>23- Le typage des entérotoxines</u>	51

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<u>Tableau 1 : Caractéristiques biochimiques importantes communes à <i>Staphylococcus aureus</i> et à d'autres espèces de staphylocoques (De Buyser, 1996)</u>	9
<u>Tableau 2 : Caractéristiques des différents kits (Brett, 1998 ; Wieneke, 1991)</u>	13
<u>Tableau 3 : Intérêts et limites des différents kits (Brett, 1998; Wieneke, 1991)</u>	14
<u>Tableau 4 : Les différents types de mammites et leurs symptômes</u>	18
<u>Tableau 5 : Caractéristiques des élevages visités en 1999</u>	25
<u>Tableau 6 : Caractéristiques des élevages visités en 2000</u>	26
<u>Tableau 7 : Mammites chroniques et comptage staphylococcique du lait de mélange (année 1)</u>	32
<u>Tableau 8 : Comptages staphylococciques des laits individuels (année 1)</u>	33
<u>Tableau 9 : Comptages staphylococciques des prélèvements sur peau de trayons (année 1)</u>	34
<u>Tableau 10 : Isolement de souches de SCP sur peau de trayons sans lésion (année 1)</u>	35
<u>Tableau 11 : Isolement de souches de SCP sur peau de trayon avec verrues (année 1)</u> ..	36
<u>Tableau 12 : Comptages staphylococciques des prélèvements sur peau de trayon avec lésions (année 1)</u>	37
<u>Tableau 13 : Comptages staphylococciques des prélèvements sur peau de trayon avec lésions (année 2)</u>	38
<u>Tableau 14 : Comptages staphylococciques des prélèvements sur peau de trayon sans lésion (année 2)</u>	38
<u>Tableau 15 : Comptages staphylococciques des prélèvements sur lésions cutanées non mammaires (année 2)</u>	39
<u>Tableau 16 : Comptages staphylococciques du matériel de traite (année 1)</u>	40
<u>Tableau 17 : Comptages staphylococciques des prélèvements réalisés sur les mains (année 2)</u>	41
<u>Tableau 18 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées en élevage, toutes sources confondues (année 1)</u>	42
<u>Tableau 19 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées du matériel de traite (année 1)</u>	42
<u>Tableau 20 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées des laits de mélange (année 1)</u>	43
<u>Tableau 21 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées des laits individuels (année 1)</u>	43
<u>Tableau 22 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées des peaux de trayons (année 1)</u>	43
<u>Tableau 23 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées des peaux de trayons et des lésions cutanées (année 2)</u>	44
<u>Tableau 24 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées des mains (année 2)</u>	44
<u>Tableau 25 : Typage des entérotoxines produites par les souches de SCP isolées des différents sites en élevage (année 1)</u>	45
<u>Tableau 26 : Pourcentage de chaque type d'entérotoxine produit par les souches de SCP entérotoxigènes (année 1)</u>	46
<u>Tableau 27 : Typage des entérotoxines produites par les souches de SCP isolées des différents sites en élevage (année 2)</u>	46

INTRODUCTION

Les récents épisodes sanitaires et médiatiques pouvant menacer la santé des consommateurs (crise de la vache « folle », épisodes de listériose...) ont conduit à une prise de conscience par le grand public des risques engendrés par les aliments. Les industriels ont donc du faire face à une demande accrue de sécurisation des produits alimentaires. Cela s'est traduit par une responsabilisation de tous les agents de la filière agroalimentaire, « de la fourche à la fourchette ».

En conséquence, des directives européennes ont été établies. Ainsi de nouvelles normes, plus précises, ont permis de fixer des seuils de salubrité des aliments afin de diminuer les risques.

Toutes les filières agroalimentaires ont été touchées par ces directives, y compris la filière lait. En effet, le lait est un milieu propice à la multiplication de plusieurs contaminants (salmonelles, listéries, staphylocoques). Un contrôle bactériologique de ce produit est donc nécessaire, en particulier pour les transformations qui utilisent le lait cru.

Or, contrairement à la filière bovine laitière, la contamination du lait de brebis par les staphylocoques et une éventuelle production de toxines demeurent peu étudiées. Ainsi, dans un souci de mise en place de mesures prophylactiques, ce travail s'est attaché à explorer différentes sources de staphylocoques en élevage et à étudier en laboratoire leur potentiel entérotoxigène.

Après avoir rappelé les connaissances actuelles sur les staphylocoques à coagulase positive (SCP) et leur pouvoir toxigène, les conditions de prélèvements en élevage et l'exploration du caractère entérotoxigène des différentes souches de staphylocoques sont présentées. Les résultats obtenus sont ensuite analysés et discutés.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1- Les staphylocoques

11- Classification

Les staphylocoques appartiennent à la famille des *Micrococcaceae* et au genre *Staphylococcus*.

Ce sont des coques, immobiles et non sporulés, réunis en amas, aéro-anaérobies facultatifs, Gram positifs, catalase positifs, oxydase négatifs (De Buyser, 1996).

La classification du genre *Staphylococcus* ne cesse d'évoluer. Ainsi, un grand nombre d'espèces a pu être identifié. Des sous espèces existent également.

Baird-Parker en 1974 a proposé une classification en trois espèces : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus aureus* se distingue des deux autres espèces par la production d'une enzyme, la coagulase, dont l'association avec le « coagulase reacting factor » transforme le fibrinogène du plasma en fibrine.

Le développement des techniques moléculaires (hybridation ADN/ARN) a permis d'affiner cette classification. Cependant, le critère de base reste la production de coagulase.

En 1997, une trentaine d'espèces ont été identifiées (Bourgeois et al., 1996). Trois sont productrices de coagulase. Ce sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Staphylococcus hyicus*. La contamination des aliments reste peu probable pour *Staphylococcus intermedius*. Par contre, l'isolement de *Staphylococcus aureus* chez l'homme et les animaux et l'isolement de *Staphylococcus hyicus* chez de nombreuses espèces animales d'élevage rendent ces souches potentiellement dangereuses en santé animale et en hygiène alimentaire.

12- Propriétés – Caractéristiques

Au sein des staphylocoques à coagulase positive, certaines souches ont la possibilité, sous certaines conditions, de produire des entérotoxines responsables de toxi-infections alimentaires. Cette production suppose en outre la présence en quantité importante de germes dans l'aliment. Un dénombrement supérieur à 10^5 UFC (unité formant colonie) par gramme d'aliment est en fait nécessaire (Chaubeau et al., 1992 ; Brisabois et al., 1997).

Nous allons donc nous intéresser aux conditions de culture des staphylocoques, plus particulièrement à celles de *Staphylococcus aureus* qui est l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les toxi-infections alimentaires staphylococciques (De Buyser et al., 1994 ; Brisabois et al., 1997).

- La température : *Staphylococcus aureus* est un germe mésophile. Il cultive de 6°C à 46°C. La température optimale est de 37°C.

- Le pH : *Staphylococcus aureus* cultive à un pH qui va de 4 à 9,8. Le pH optimal se situe entre 6 et 7.

- La teneur en sel : *Staphylococcus aureus* est un germe halophile qui supporte des taux de sel allant de 7 à 20%.

- L'activité en eau : *Staphylococcus aureus* tolère une activité en eau très réduite ($A_w = 0,83$).

- La concurrence bactérienne : les staphylocoques supportent mal la concurrence avec les lactobacilles acidifiants, les streptocoques et les entérobactéries. La pasteurisation, en réduisant la compétition bactérienne, favorise donc la multiplication des staphylocoques.

2- Exploration du caractère toxigène des staphylocoques

21- Isolement des souches à coagulase positive

Excepté la recherche directe des entérotoxines, aucun test simple ne permet de juger du caractère toxigène des souches de staphylocoques. Or la recherche de ces toxines est longue, coûteuse et encore difficile à réaliser.

Afin de juger de la qualité sanitaire des aliments, on se contente souvent de rechercher des caractères présomptifs de toxinogénèse par culture d'un échantillon d'aliment.

Trois enzymes (coagulase liée, coagulase libre, thermonucléase) sont ainsi intéressantes à mettre en évidence.

La coagulase libre, active en quelques heures, coagule le plasma d'homme ou de lapin autour des colonies de cocci par transformation du fibrinogène en fibrine.

La coagulase liée, ou clumping factor, liée à la paroi des staphylocoques, provoque une agglutination du fibrinogène.

La thermonucléase se recherche sur milieu de Lachica, de couleur bleue. Les souches possédant cette enzyme provoquent l'apparition d'une auréole rosée autour des cocci.

La présence ou l'absence de ces différentes enzymes en fonction de l'espèce de staphylocoques est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Caractéristiques biochimiques importantes communes à *Staphylococcus aureus* et à d'autres espèces de staphylocoques (De Buyser, 1996)

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
Coagulase liée	+(1)	v(2)	-(3)	+	+
Coagulase libre	+	+	v	-	-
Thermonucléase	+	+	+	+	-
Entérotoxines	v	v	-	-	-

(1) + : plus de 90% des souches sont positives.

(2) v : variable

(3) - : plus de 90% des souches sont négatives.

Les staphylocoques produisant des toxines sont donc en général à coagulase libre positive et à thermonucléase positive. Compte tenu de l'existence de souches

non entérotoxigènes à thermonucléase positive et de souches toxigènes dépourvues de coagulase liée, la recherche de la coagulase libre est primordiale.

Ainsi, les milieux couramment utilisés pour l'identification des staphylocoques (milieu de Baird Parker) ont été remplacés par des milieux mettant directement en évidence la coagulase libre (Su et *al.*, 1997 ; Chaubeau et *al.*, 1992).

Un milieu spécifique pour les produits laitiers a été élaboré. C'est le milieu Rabbit Plasma Fibrinogène Agar (RPFA). Ce milieu comprend du fibrinogène de lapin permettant directement de mettre en évidence l'existence de la coagulase libre. Par comparaison avec le milieu de Baird Parker, la suppression du jaune d'œuf diminue le coût et l'identification des colonies à coagulase positive est facilitée. Ces dernières apparaissent plus grises, entourées d'un halo clair.

L'existence de cette coagulase libre n'est qu'un élément présomptif de la production de toxines. Originellement suffisante pour juger de la salubrité des aliments, elle se révèle désormais insuffisante dans la mesure où des études récentes ont montré que des souches de staphylocoques à coagulase négative isolées de laits de mammites de ruminants (Orden et *al.*, 1992) ou de laits de chèvres saines (Vernozy et *al.*, 1994 ; Vernozy et *al.*, 1996) ont la capacité de produire des entérotoxines.

Réglementairement, les directives européennes 92/46 et 94/71 imposent la réalisation de dénombrements de *Staphylococcus aureus* avant la mise sur le marché des produits au lait cru. La note de service DGAI N2001/n°8084 préconise de plus la recherche des entérotoxines lors de tout dépassement du critère M (valeur limite du nombre de bactéries accepté dans les échantillons alimentaires prélevés pour analyse bactériologique), plutôt en début de procédé (période de multiplication maximale).

En pratique, du fait de la lourdeur des techniques, les entérotoxines ne sont pas recherchées systématiquement. Les analyses portent le plus souvent sur le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive dans le produit fini. Cependant, ces dénombrements ne permettent pas de distinguer les souches de *Staphylococcus aureus* entérotoxigènes des autres souches de *Staphylococcus aureus* non entérotoxigènes. De plus, l'affinage des fromages entraîne le plus souvent une réduction de la population staphylococcique. Or si des toxines sont produites en début de procédé, elles peuvent être présentes en fin d'affinage. Ainsi des produits conformes en terme de dénombrements peuvent ainsi présenter un risque lors de la consommation.

Des modifications réglementaires sont envisageables. La recherche et le typage des toxines apparaissent comme indispensables.

22- Techniques de détection des entérotoxines et des séquences nucléotidiques codant pour leur production

221- Caractéristiques des entérotoxines

Ce sont des toxines de nature protéique, ayant un poids moléculaire allant de 27000 à 30000 Daltons. De petite taille, elles peuvent être difficiles à isoler dans la lactosérum.

Extrêmement stables, elles résistent à l'irradiation, aux enzymes protéolytiques et à la chaleur. Alors que les bactéries sont détruites par la

pasteurisation, les entérotoxines ne sont que partiellement inactivées. Une étude réalisée à l'aide de toxines non purifiées à 100ng/mL dans du tampon phosphate a montré qu'elles étaient complètement inactivées après chauffage à 120°C pendant 20 à 40 minutes (Brisabois et *al.*, 1997). Ainsi, si les bactéries peuvent disparaître le long de l'affinage d'un fromage, les entérotoxines peuvent persister.

Onze types d'entérotoxines sont actuellement connues : A, B, C (1,2,3), D, E, G, H, I, J (Balaban et *al.*, 2000). Les plus fréquemment rencontrées sont les types A, B, C (1,2,3), D. Le type A représente à lui seul 75% de toutes les toxi-infections alimentaires staphylococciques.

Une souche de staphylocoques peut produire deux ou trois types d'entérotoxines en même temps (Balaban et *al.*, 2000). La quantité de toxine produite peut être très variable (Bourgeois et *al.*, 1996).

Les conditions de toxinogénèse sont un peu plus restrictives que les conditions de culture des staphylocoques. Elles sont précisées ci-dessous pour *Staphylococcus aureus*.

Conditions de toxinogénèse de *Staphylococcus aureus* :

- Température : 10°C à 45°C (optimum 40°C)
- pH : 5 à 8 (optimum 6,5-7)
- Teneur en sel : 0 à 10% (optimum 0%)
- Aw : 0,86 à 0,99 (optimum 0,99)

La dose émétique minimale pour l'homme varie de 10 microgrammes à moins de 1 microgramme selon la sensibilité individuelle (Bourgeois et *al.*, 1996). Cela implique donc l'utilisation de techniques de mise en évidence très sensibles.

Différentes techniques permettent de mettre en évidence et d'identifier ces entérotoxines.

222- Techniques de mise en évidence des entérotoxines

Différentes techniques peuvent être utilisées :

Méthodes biologiques

Cela consiste à faire absorber à un animal, souvent des primates, des échantillons suspects. Il est aisé de comprendre que ces méthodes ne sont plus d'actualité car elles sont trop chères, trop peu sensibles, coûteuses en temps et peu respectueuses du bien être animal.

Méthodes de détection génomique type PCR (Polymerase Chain Reaction)

Des sondes pour la recherche des séquences nucléotidiques codant pour les entérotoxines de type A, B, C, D, E, H ont été identifiées et synthétisées. Avec ces techniques, la sensibilité et la spécificité ont été améliorées. Cependant, elles ne permettent pas de distinguer les bactéries mortes des bactéries vivantes. D'autre part la présence des séquences nucléotidiques ne nous renseigne pas sur la

production effective de toxines. La technique PCR doit donc être confirmée par une autre méthode.

Méthodes de détections antigéniques

✓ *Les essais d'immunodiffusion.* Lors de la réaction d'immunodiffusion, une ligne de précipitation est obtenue par rencontre des anticorps et des entérotoxines. Ces réactions ont été les premières techniques sérologiques pour la détection des entérotoxines. Cependant, la faible sensibilité (ordre du microgramme), le temps de réalisation assez long, et l'obtention de résultats semi-quantitatifs font que ces techniques sont moins utilisées.

✓ *Les essais radioimmunologiques.* Cette technique résulte de la compétition entre les antigènes des entérotoxines et des épitopes marqués radioactivement lors de la fixation sur des anticorps spécifiques. Cette méthode a permis d'abaisser le seuil de sensibilité à moins de 1 ng/mL. Cependant l'utilisation d'éléments radioactifs rend sa réalisation très contraignante et difficile.

✓ *Les techniques d'agglutination.* On peut ici citer les techniques RPLA (Reverse Phase Latex Agglutination), ELFA (Enzyme Linked Fluoresceine Assay). Ces techniques sont douées d'une bonne sensibilité.

✓ *Les techniques immunoenzymatiques type ELISA* (Enzyme Linked Immunosorbent Sandwich Assay). La méthode ELISA pour la détection d'entérotoxines a été utilisée la première fois par Saunders et Barlett en 1977. Commodes, rapides et sensibles, les techniques immunoenzymatiques sont désormais les plus couramment employées.

Différents types d'ELISA ont été développés : ELISA par compétition, ELISA sandwich. Toutes utilisent un anticorps fixé sur un milieu solide. Le produit à tester est ensuite ajouté et les antigènes correspondants se fixent de façon spécifique. Avec une technique par compétition un deuxième anticorps est ensuite ajouté. Il se fixe alors sur les paratopes des anticorps non pourvus en antigène et la réaction immunoenzymatique qui en découle est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présent. Avec une technique sandwich, un deuxième anticorps est ajouté, il se fixe sur l'antigène et est responsable de la réaction immunoenzymatique.

Les méthodes de type ELISA sandwich sont reconnues comme les meilleures, cependant des résultats faussement positifs peuvent survenir (Notermans et *al.*, 1991). Ces derniers peuvent provenir de la présence dans le milieu de la protéine A produite par certaines espèces de staphylocoques. Si la protéine est présente, elle se fixe sur la partie terminale Fc des anticorps et modifie les résultats. Cette interférence peut être supprimée par l'utilisation de portions Fab des anticorps ou par ajout de sérum de lapin lors de la réaction.

La réalisation de ces techniques, outre les caractéristiques propres (sensibilité, spécificité), repose sur une bonne extraction des entérotoxines présentes dans un aliment. L'extraction se fait à partir d'un broyat de l'aliment dans une solution aqueuse, suivi d'une acidification, une centrifugation, une neutralisation et une ultime centrifugation. La recherche des toxines se fait alors sur la phase aqueuse issue de la deuxième centrifugation.

Afin d'illustrer la difficulté d'extraction des entérotoxines, des études réalisées par l'AFSSA ont montré que le taux de recouvrement d'entérotoxines ajoutées à

différentes matrices alimentaires est variable et partiel, inférieur à 50% dans certains cas. Ce taux est encore plus faible lors de contamination naturelle des aliments.

Compte tenu des difficultés d'extraction et d'un seuil de détection souhaité bas (0,1 ng de toxine par gramme d'aliment), les performances des différents tests présents sur le marché doivent souvent être améliorées par une phase de concentration.

Deux techniques existent :

-La technique de dialyse-concentration. Cette méthode a été développée par le CNEVA. Elle est actuellement la méthode officielle préconisée par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) pour l'extraction-concentration des toxines staphylococciques dans les produits laitiers. A l'issue de la deuxième centrifugation d'extraction, la phase aqueuse est concentrée dans des sacs de dialyse sous l'action de propylène glycol pendant au moins 24 heures. L'extrait concentré est ensuite solubilisé et repris par une solution tampon à pH=7,3.

L'enrichissement est tel que le seuil de détection des toxines dans les aliments est proche du seuil toxique.

-La technique de précipitation à l'acide trichloroacétique. Le surnageant de la deuxième centrifugation d'extraction est traité par de l'acide trichloroacétique puis centrifugé. Le culot est alors repris par du tampon Tris à pH=9. Le pH est ensuite ajusté à 7,5 avec de l'hydroxyde de sodium.

C'est une méthode plus récente qui a été évaluée au laboratoire d'analyses vétérinaires et biologiques du Puy-de-Dôme (Meyrand et al., 2000). Son intérêt réside dans la simplicité et la rapidité (1 heure) de réalisation. Lors de cette étude, la méthode de précipitation à l'acide trichloroacétique a donné 94% de corrélation avec la méthode de dialyse-concentration. Elle a même permis d'abaisser le seuil de détection de la toxine C2 volontairement incorporée dans un fromage. Ainsi, on est passé d'un seuil de détection de 1ng/g pour la méthode officielle à 0,25 ng/g pour la technique de précipitation à l'acide trichloroacétique.

Dans la pratique, différents kits sont présents sur le marché. Ces trousse de détection utilisent des techniques d'agglutination et des techniques ELISA.

Tableau 2 : Caractéristiques des différents kits (Brett, 1998 ; Wieneke, 1991)

Nom	Type	Toxines détectées	Durée	Sensibilité
SET RPLA	RPLA	A-B-C-D	24 h	0,2 ng/mL
SET EIA	EIA	A-B-C-D-E-H	1 nuit plus 7h	0,1 à 1* ng/mL(*SED)
TECRA S.E.V.I.	EIA	A-B-C-D	4 h	1 ng/mL
SET TRANSIA tubes	EIA	A-B-C-D-E	1 h 30 min	0,05 à 0,2 ng/mL
SET TRANSIA plaques				
RIDASCREEN SET	EIA	A-B-C-D-E	2 h 30 min	0,1 ng/mL
SET VIDAS	ELFA	A-B-C-D-E-H	1 h 20 min	0,1 à 1* ng/mL(*SEC)

RPLA : Reverse Phase Latex Agglutination ; ELFA : Enzyme Linked Fluoresceine Assay
EIA : Enzyme Immunosorbent Assay ; SED, SEC : Staphylococcal Enterotoxin D et C.

Tableau 3 : Intérêts et limites des différents kits (Brett, 1998; Wieneke, 1991)

Nom	Avantages	Inconvénients
SET RPLA	Pas d'interférence pour le lait cru Détection spécifique Sensibilité ++	Interprétation difficile Durée longue Pas de détection de SEE Concentration nécessaire
SET EIA	Sensibilité ++++ (sauf SED) Pas de concentration Détection spécifique	Assez difficile d'emploi Faux positifs (+) dans les produits laitiers Durée longue
TECRA S.E.V.I.	Rapide et facile	Sensibilité mauvaise Pas de détection de SEE Faux positifs (+) dans les produits laitiers
SET TRANSIA tubes SET TRANSIA plaques	Sensibilité ++ Rapides et faciles Automatisation possible	Faux positifs (+) dans les produits laitiers Concentration nécessaire
RIDASCREEN SET	Sensibilité ++ Détection spécifique Rapide et facile	Faux positifs (+) dans les produits laitiers Concentration nécessaire
SET VIDAS	Rapide et facile Automate Sensibilité ++ (sauf SEC)	Faux positifs (+++) dans les produits laitiers Concentration nécessaire Automate

SED, SEE, SEC : Staphylococcal Enterotoxin D, E et C.

Aucune de ces trousse de détection ne possède de validation AFNOR. Cependant selon la Direction Générale de l'Alimentation, une distinction est faite entre la méthode officielle et les méthodes de routine.

La méthode officielle préconisée par l' AFSSA comporte une phase de dialyse-concentration suivie de l'utilisation d'un des deux kits TRANSIA. Cette méthode doit être utilisée en particulier lorsqu'un produit laitier est suspecté dans une toxi-infection alimentaire. Elle doit être également utilisée lors de contrôles officiels avec des numérations de *Staphylococcus aureus* supérieures à 10⁴ germes /gr.

Les méthodes de routine comprennent une phase de dialyse-concentration suivie de l'utilisation d'une des trousse suivantes : SET RPLA, SET EIA, RIDASCREEN SET, SET VIDAS, SET TRANSIA. Si des entérotoxines sont détectées et compte tenu de l'existence de faux positifs dans les produits laitiers, une trousse différente de la première doit confirmer le résultat.

Ces méthodes de routine peuvent être utilisées lors d'autocontrôles.

3- Les toxi-infections alimentaires staphylococciques

31- Les symptômes

La toxi-infection alimentaire d'origine staphylococcique, appelée également « maladie des banquets », se caractérise par un temps d'incubation très court. Les symptômes apparaissent en moyenne deux à trois heures après l'ingestion de l'aliment contaminé (Chaubeau et *al.*, 1992).

La symptomatologie est la suivante : nausées, vertiges, céphalées suivis rapidement par des vomissements incoercibles. Si des aliments ont le temps de progresser jusque dans l'intestin grêle, une diarrhée hydrique accompagnée de douleurs intenses est associée aux vomissements.

Après une réhydratation par voie orale, la récupération est bonne et rapide (environ 24 heures). Une hospitalisation peut être nécessaire si des enfants ou des personnes âgées, plus sensibles à une déshydratation, sont touchés. La mortalité est exceptionnelle.

D'un point de vue pathogénique, même si les modalités d'absorption intestinale restent peu connues, le mode d'action des entérotoxines est bien compris.

Les entérotoxines possèdent deux zones fonctionnelles distinctes (Balaban et *al.*, 2000 ; Popoff, 1996).

Une zone est responsable d'une action neurotoxique. Elle entraîne une stimulation des terminaisons du nerf vague présentes au niveau du tube digestif et est responsable de l'effet émétique.

L'autre zone est responsable d'une action immunotoxique. Les toxines jouent le rôle de superantigènes et sont à l'origine d'une cascade de réponses immunitaires.

Contrairement à la réponse immunitaire classique et hautement spécifique, les entérotoxines, en temps que superantigènes, peuvent interagir de façon non spécifique avec un grand nombre de lymphocytes T. L'activation des cellules suppose simplement une reconnaissance des superantigènes par la chaîne beta des T Cell Receptor (TCR) présents sur la membrane des lymphocytes T par et les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes notamment les macrophages. Il s'en suit une libération excessive de cytokines (IL 2, TNF) à l'origine des nausées et des vomissements.

Bien que séparées sur la protéine, ces zones semblent fonctionner en corrélation. Une perte de l'activité superantigène, par exemple lors de mutation génétique, est responsable d'une perte de l'activité entérotoxique.

32- Importance en France

En 1999 et 2000, 1267 foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été recensés conjointement par les services des Directions des Services Vétérinaires et des Directions Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales (Haeghebaert et *al.*, 2002).

L'importance relative de chacun des agents responsables de toxi-infections est la suivante (Haeghebaert et al., 2002) :

- Salmonelles : 63,8%
- Staphylococcus aureus* : 16%
- Clostridium perfringens* : 5,1%
- Histamine : 3,8%
- Bacillus cereus* : 2,8%
- Autres pathogènes indéterminés : 8,5%

Les TIAC à *Staphylococcus aureus* occupent donc le deuxième rang derrière les salmonelles. Ce classement confirme une étude rétrospective de 2947 foyers déclarés de 1988 à 1995 (De Buyser, 1997). On note cependant une légère diminution du nombre de foyers de TIAC à salmonelles au profit d'autres germes tels *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus* (Haeghebert et al., 2002).

Durant les années 1999 et 2000 c'est en fait 85 foyers de TIAC à staphylocoques qui ont été identifiés. Cela représente 1651 personnes malades avec un taux d'hospitalisation de 15,3%. Aucun décès n'a été enregistré (Haeghebert et al., 2002).

68% des TIAC staphylococciques déclarées en 1999 et 2000 sont survenues en restauration collective et 32% sont survenues en foyers familiaux. Les TIAC survenues en restauration collective ont été à l'origine de 84,9% des malades.

Cette différence de pourcentages montre une prédominance de la restauration collective dans le nombre de foyers et par voie de conséquence dans le nombre de personnes malades. Cette inégalité peut en partie s'expliquer par une très bonne déclaration des cas survenus en restauration collective. Ceci est d'autant plus vrai qu'avec un temps d'incubation très court, les personnes sont souvent encore ensemble lors de l'apparition des premiers symptômes. Au contraire, le nombre de foyers familiaux doit être sous estimé. En effet, avec une symptomatologie très impressionnante mais avec une récupération rapide dans la majorité des cas, le recours à la consultation d'un médecin ou à une hospitalisation est faible.

33- Les produits incriminés – Importance des produits laitiers

Les produits incriminés sont très variés. En France, durant les années 1999 et 2000, les aliments incriminés ou suspectés se sont répartis de la façon suivante :

- Lait et produits laitiers : 17,1%
- Œufs et produits à base d'œufs : 5,8%
- Viandes : 11,6%
- Charcuterie : 8%
- Volailles : 5,1%
- Poissons, fruits de mer, coquillages : 5,8%
- Aliments d'origine non animale ou mixte : 20,4%
- Eau de boisson : 0,4%

Cependant, dans un quart des foyers de TIAC staphylococciques survenus au cours de ces deux années, l'aliment responsable n'a pas pu être retrouvé.

Ce classement montre bien l'importance des produits laitiers et des plats ayant nécessité des manipulations dans la survenue de ce type de toxi-infection.

Ainsi, avec près de 5% des produits incriminés ou suspectés dans les foyers de TIAC déclarés en 1999 et 2000, les produits laitiers sont peu concernés. Cependant, les staphylocoques sont, et de loin, le plus souvent mis en cause lorsqu'un produit laitier est suspecté (75% des foyers).

34- Les entérotoxines identifiées

D'un point de vue qualitatif, une étude qui a utilisé 52 échantillons d'aliments incriminés dans des TIAC à staphylocoques de 1986 à 1996 (DeBuyser et *al.*, 1997) a montré que l'entérotoxine A, seule ou associée, était la plus couramment mise en évidence. Ainsi, l'entérotoxine de type A a été détectée dans 70% des échantillons, les entérotoxines de type C et D dans 20% et l'entérotoxine de type B dans 16%.

Si l'on s'intéresse aux 13 échantillons issus de produits laitiers et de lait, 5 ont permis d'isoler l'entérotoxine A, 2 ont permis d'isoler l'entérotoxine B, 2 ont permis d'isoler l'entérotoxine C, 1 a permis d'isoler l'entérotoxine D, 2 ont permis d'isoler les entérotoxines A et C, 1 a permis d'isoler les entérotoxines A à E.

En conclusion, les staphylocoques sont le plus souvent suspectés lorsqu'un produit laitier est incriminé dans un foyer de TIAC (De Buyser et *al.*, 1996). Les procédés de fabrication de différents produits, tels les fromages à pâte molle, peuvent être favorables au développement de *Staphylococcus aureus* (Meyrand et *al.*, 1999). L'utilisation de ferments lactiques performants et de la pasteurisation peuvent permettre un contrôle de la multiplication de ce germe. Cependant différentes appellations d'origine contrôlée utilisent le lait cru et interdisent la pasteurisation. Le lait doit donc être d'une très bonne qualité bactériologique.

Plus que la qualité bactériologique, et compte tenu d'une présence possible d'entérotoxines dans un aliment en l'absence de staphylocoques (Meyrand et *al.*, 1999), la norme bactériologique et réglementaire relative à *Staphylococcus aureus* devrait être remplacée par la recherche des entérotoxines. La maîtrise de la sécurité des produits laitiers à base de lait cru serait ainsi renforcée.

Après avoir présenté les caractéristiques générales des staphylocoques, leurs conditions de toxinogénèse et leur implication dans des toxi-infections alimentaires collectives, une étude des différentes sources en élevage ovin laitier est présentée dans la partie suivante.

4- Les sources de staphylocoques en élevage ovin laitier

41- La source intra-mammaire

Les staphylocoques sont les agents bactériens le plus souvent rencontrés lors de mammites chez les ovins. La mamelle peut donc constituer une source importante de staphylocoques. Une étude approfondie de la pathologie associée à cet organe est donc indispensable.

411- Symptômes

Deux formes caractérisent les mammites en élevage ovin laitier (Bergonier et *al.*, 1997).

→ *Forme clinique :*

Selon les symptômes, la mammite est qualifiée de suraiguë, aiguë ou chronique (Bergonier et *al.*, 1997).

Tableau 4 : Les différents types de mammites et leurs symptômes

Type de mammite	Mammite suraiguë ou gangréneuse	Mammite aiguë	Mammite chronique
Symptômes généraux	Abattement marqué, hyperthermie en début d'évolution	Abattement, hyperthermie (40°C)	Absence
Symptômes locaux	Douleur, chaleur, induration, pis bleu et froid	Douleur (boiterie), rougeur, induration	Déséquilibre du pis, induration nodulaire, Hypertrophie des nœuds lymphatiques
Symptômes fonctionnels	Sécrétion sanieuse avec quelques grumeaux en suspension, peu abondante	Lait plus clair avec de nombreux grumeaux en suspension	Absence de modifications macroscopiques

Dans le rayon de Roquefort, le taux moyen de cas cliniques par lactation se situe aux alentours de 5% (Poncelet, 1994). Cependant, certaines enzooties en particulier à *Staphylococcus aureus* peuvent se traduire par une atteinte d'un plus grand nombre d'individus (jusqu'à 20%).

→ *Forme subclinique :*

Celle-ci se caractérise par une absence de symptômes généraux, locaux et fonctionnels. Seul le California Mastitis Test ou un comptage cellulaire permet de révéler une cellularité anormale dans le lait.

412- Etiologie

Bien que l'étiologie ait été moins étudiée que chez la vache laitière, différentes recherches en élevage ont montré une fréquence des agents pathogènes caractéristique des petits ruminants.

Outre le caractère prédominant des staphylocoques, une dichotomie doit être effectuée selon la forme clinique ou subclinique de la mammite.

Ainsi, la fréquence de mise en évidence des différents germes est la suivante (Bergonier et al., 1999) :

→ *Forme clinique (résultats obtenus sur 174 bactériologies réalisées à l'ENVT) :*

Staphylococcus aureus : 46%

Staphylocoques à coagulase négative : 18,4%

Streptocoques : 14,4%

Entérobactéries : 14,5%

→ *Forme subclinique (résultats d'un programme de recherche européen réalisé sur 6652 prélèvements d'ovins) :*

Staphylocoques à coagulase négative : >80%. Treize espèces ont pu être isolées. Même si la flore bactérienne peut être différente entre les ateliers ovins lait et ovins viande, les espèces les plus couramment rencontrées sont *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus hyicus* (Burriel et al., 1998).

Staphylococcus aureus : <5 %

Streptocoques : <5%

Entérobactéries : <5%

413- Epidémiologie

→ Survenue des mammites au cours d'une campagne

Contrairement aux bovins, le nombre de mammites en peri-partum est très faible. Ceci est sans doute à mettre en relation avec le rôle mineur des entérobactéries dans les mammites.

Par contre, un grand nombre de mammites apparaissent après la mise à la traite. En pratique la mise à la traite est progressive. En effet, une période d'allaitement – traite existe durant les quatre à cinq premières semaines. Au cours de cette période, les brebis passent en salle de traite 1 à 2 fois par jour pour assurer une bonne vidange du pis, mais allaitent également les agneaux. Lors de la vente de ces derniers, les brebis sont traitées deux fois par jour ; la campagne dure en moyenne 8 mois.

Exception faite de contamination par des *Pseudomonas* ou des *Aspergillus*, le nombre de mammites lors du tarissement reste faible.

→ Modalité de transmission

La traite joue un rôle essentiel dans la transmission des germes.

Cette transmission repose sur l'existence :

.de réservoirs primaires : la mamelle infectée, les lésions du trayon, la peau et les muqueuses saines.

.de réservoirs secondaires : le matériel de traite voire les mains des trayeurs.

→ *Persistence*

Comme cela a été précisé précédemment, les staphylocoques jouent un rôle primordial dans les affections mammaires des petits ruminants.

Les mammites à staphylocoques se caractérisent par une incubation brève. Ainsi une forte excrétion staphylococcique, et par voie de conséquence une contamination du lait de tank, existe avant même que les symptômes apparaissent. Elles se caractérisent également par une guérison spontanée rare. Même en cas d'amélioration clinique l'excrétion staphylococcique persiste et l'évolution en mammite chronique avec formation d'abcès (réservoirs de germes) est courante. Cette persistance est d'autant plus importante qu'en pratique les traitements intra-mammaires en lactation sont peu effectués.

La période sèche est alors la période la plus favorable à la guérison. Une auto-guérison peut exister. Ainsi, 45% des brebis présentant une mammite subclinique peuvent guérir spontanément lors du tarissement (Bergonier et *al.*, 1994). Un traitement intra-mammaire au tarissement permet la guérison d'un nombre encore plus élevé de brebis.

Les brebis qui présentent une mammite chronique sont en général inguérissables. Une réforme anticipée est alors souhaitable.

En conclusion, une réforme des brebis présentant une mammite chronique et un traitement au tarissement permettent de diminuer l'excrétion mammaire de staphylocoques en début de lactation suivante.

42- La source cutanée

La peau, les fosses nasales, l'oropharynx des animaux sains sont fréquemment colonisés par les staphylocoques.

Ces germes étant des pathogènes opportunistes, diverses agressions cutanées (traumatiques, hygiéniques) participent au développement de différentes entités pathologiques.

→ La dermatite staphylococcique est couramment rencontrée en élevage bovin et ovin (Scott et *al.*, 1991 ; Gourreau, 1995). Différentes souches de staphylocoques à coagulase positive ont été isolées et rendues responsables de pyodermites.

Les lésions cutanées associées sont plus ou moins profondes et se localisent sur la tête, l'extrémité des membres, sous le ventre et sur la mamelle.

Une atteinte de l'épiderme est responsable d'un impétigo qui se traduit par l'existence de papulopustules entourées d'une auréole inflammatoire. Une fois déprimées et ulcérées, ces lésions laissent place à des croûtes brunâtres. Cet impétigo se rencontre surtout sous le ventre, sur la face interne des cuisses et sur la mamelle. Sur cette dernière, les papulopustules peuvent être nombreuses (plusieurs dizaines) et présentes jusqu'à l'extrémité des trayons.

Une atteinte du derme et de l'hypoderme est responsable de l'apparition de folliculites et de furoncles. Localisées au niveau mammaire à la base des trayons et entre les quartiers, ces lésions plus importantes et plus profondes que les précédentes peuvent être associées à une atteinte de l'état général.

Cette description des lésions ainsi que leur localisation, en particulier au niveau mammaire, traduit bien la possibilité de contamination de l'environnement d'une part, mais également du matériel de traite et par voie de conséquence du lait. Cette source de contamination du lait est d'autant plus importante que cette staphylococcie survient habituellement deux à trois semaines après les mises bas, ce qui correspond en général au début du passage en salle de traite. Une limitation

de l'extension des lésions et de la contagion passe en particulier par la réalisation d'une antiseptie des trayons après la traite.

→ La lymphadénie caséuse ou maladie des abcès est une autre pathologie essentiellement cutanée survenant en élevage ovin.

Deux entités sont décrites :

- La lymphadénie caséuse au sens strict, due à *Corynebacterium pseudotuberculosis* qui atteint les adultes avec une morbidité faible et une allure enzootique.

- La maladie des trois A ou maladie des abcès des Agnelles de l'Aveyron, due à *Staphylococcus aureus var. anaerobius* (Schelcher, 1998).

Compte tenu de l'étiologie, une description plus approfondie de la deuxième entité paraît nécessaire.

D'un point de vue clinique, la maladie des abcès se traduit par une adénite suppurée des nœuds lymphatiques superficiels situés au niveau de la tête, du nœud lymphatique préscapulaire, du nœud lymphatique précrural, des nœuds lymphatiques mammaires et scrotaux. Une adénite viscérale est possible mais est beaucoup plus rare.

En fin d'évolution, les abcès apparaissent tuméfiés. Après fistulisation, un pus épais jaune-verdâtre peut alors s'écouler.

D'un point de vue épidémiologique, il est important de noter que la maladie des abcès touche de jeunes ovins à peau fine en particulier de race Lacaune. Au sein d'un troupeau l'évolution est enzootique voir enzoo-épizootique avec une morbidité importante (70-80%). Une régression spontanée est observée après la première mise-bas.

La transmission se réalise par contact avec des individus malades ou porteurs et par l'intermédiaire du milieu extérieur. En effet, le pus est la matière virulente. La fistulisation des abcès est alors responsable d'une contamination directe d'ovin à ovin, mais provoque également une contamination du matériel d'élevage, en particulier des cornadis.

Au sein d'un élevage, cette entité pathologique favorise donc la présence de staphylocoques sur les animaux malades mais également sur des animaux porteurs sains et dans l'environnement. Etant donné qu'aucune mesure médicale prophylactique réellement efficace n'existe, seules des mesures sanitaires peuvent être instaurées. Cela passe par des débridements d'abcès en dehors de la bergerie, par le contrôle d'une densité d'animaux correcte, par l'utilisation de matériel à usage unique en particulier pour les injections et par une bonne hygiène des locaux.

De plus, différentes affections d'origine traumatique ou infectieuses peuvent être à l'origine de surinfections staphylococciques au niveau de la mamelle.

→ Affections d'origine traumatique à l'origine de surinfections staphylococciques à localisation mammaire:

Les gerçures : elles sont localisées sur les trayons et liées à une humidité excessive des trayons après la traite associée à de brusques changements de température. L'application d'un film protecteur et antiseptique après la traite permet de limiter ce phénomène chez la vache.

Les blessures : elles sont le plus souvent liées à des morsures d'agneaux. L'éruption dentaire débute chez les agneaux à l'âge de deux à trois semaines. Les dents de lait, pointues et coupantes peuvent alors être à l'origine de lésions lors de la têtée.

→ Affections d'origine virale à l'origine de surinfections staphylococciques à localisation mammaire :

Différentes familles de virus peuvent être à l'origine de lésions cutanées. Le parapoxvirus de l'ecthyma contagieux est le plus couramment rencontré en élevage ovin (Rehby, 1994 ; Schelcher, 1994).

Les lésions provoquées par ce virus évoluent sur deux à trois semaines. Après éruption d'une petite plaque érythémateuse, des vésicules sont rapidement discernables. Une fois percées, ces dernières laissent place à des lésions croûteuses. C'est à ce moment-là que les surinfections surviennent.

Différentes formes cliniques existent :

- La forme buccale : elle touche les agneaux de moins de trois mois et se caractérise en début d'évolution par une atteinte cutanée au niveau de la commissure des lèvres. Les lésions cutanées peuvent ensuite s'étendre sur tout le museau et une atteinte de la muqueuse buccale est possible.

- La forme mammaire : elle touche la brebis allaitante. Cela se traduit par l'apparition de lésions cutanées sur la peau de la mamelle et principalement du trayon.

Epidémiologiquement, cette maladie se caractérise par une grande contagion (taux de morbidité= 80-90%) et une forte saisonnalité. En fait, les épidémies surviennent lors des mises-bas et sont favorisées par l'allaitement.

D'un point de vue thérapeutique, l'application d'antiseptiques permet de limiter les surinfections. Une attention particulière doit être portée aux trayons afin de prévenir d'éventuelles mammites.

La prévention de cette maladie passe par l'utilisation d'un vaccin vivant administré aux brebis en fin de gestation.

43- La source environnementale

Ubiquistes, les staphylocoques ont la possibilité de survivre voire de se multiplier sur différents sites. Par voie de conséquence, tout support en contact avec des animaux est susceptible d'abriter des colonies staphylococciques et d'entretenir la circulation de ce germe dans l'élevage.

Ainsi le matériel de traite (en particulier les manchons-trayeurs), le matériel d'élevage, la litière, les aliments, l'eau, l'air, les insectes et les hommes qui manipulent les animaux peuvent être sources de staphylocoques.

Peu d'études ont essayé d'apprécier le véritable rôle de cette source environnementale. Cependant, elle a été incriminée dans plusieurs foyers de toxi-infections alimentaires collectives. On peut ici citer une toxi-infection alimentaire staphylococcique qui a touché vingt personnes en mai 1983 (De Buyser et *al.*, 1985). L'enquête épidémiologique a alors montré que l'aliment en cause était un fromage de brebis au lait cru contaminé par des staphylocoques présents sur les mains du berger. Ce dernier était en fait un porteur sain.

En 1993, toute une série de prélèvements ont été réalisés au sein de 7 élevages bovins lait situés dans l'état de Washington (Roberson et *al.*, 1994). Quatre de ces élevages avaient une prévalence de mammites à staphylocoques coagulase positive supérieure à 10% et 3 présentaient une prévalence inférieure à 3%. Outre les sources mammaires et cutanées, une exploration de la source environnementale a été effectuée. Des prélèvements ont eu lieu au niveau du logement des animaux, des aliments, de l'air, de différents équipements, des personnes en contact avec les

bovins, des insectes et d'autres animaux de la ferme. Même si les résultats confirment le rôle majeur de la source mammaire, il est important de signaler que l'ensemble des sites environnementaux explorés dans cette étude ont permis d'isoler des staphylocoques. Une différence entre les deux catégories d'élevage sélectionnés a même pu être observée. Ainsi 3,1% des prélèvements, hors bovin, des élevages à forte prévalence de mammites à staphylocoques se sont révélés positifs. Dans les élevages à faible prévalence ce pourcentage n'a été que de 1,1%. Ces résultats ont donc montré une relation positive entre le nombre de mammites à staphylocoques et la présence de ce germe dans l'environnement.

La source environnementale ne peut donc pas être ignorée et des études complémentaires doivent confirmer ces conclusions.

DONNEES EXPERIMENTALES

Depuis le 01 janvier 1995, l'application de la directive communautaire 94/71, traduite en droit français par les arrêtés ministériels des 18 et 30 mars 1994, impose un contrôle de la qualité sanitaire des laits crus ou traités thermiquement d'origine ovine et caprine. Cela se traduit notamment par l'existence de seuils concernant *Staphylococcus aureus* dans le lait et les fromages.

Face à ces recommandations communautaires, dans un souci de respect des règles de production et de développement de bonnes pratiques, les industriels assurant la transformation des produits laitiers d'origine ovine et caprine ont souhaité établir les bases épidémiologiques et microbiologiques de plans de contrôle des contaminations staphylococciques du lait matière première.

Cette demande a été d'autant plus importante que les références concernant la filière du lait et des produits laitiers d'origine ovine sont réduites. Des différences majeures avec la filière bovine semblent de plus exister.

Des prélèvements en élevage se sont déroulés sur deux années consécutives (1999 et 2000). La première année a eu pour objectif général d'explorer les sources majeures de staphylocoques à coagulase positive en élevage et d'étudier le caractère entérotoxigène des souches isolées. La deuxième année a eu pour principal objectif de préciser l'importance de la peau des trayons comme source de staphylocoques à coagulase positive et, accessoirement, de rechercher un éventuel portage humain.

1- Matériels et méthodes

11- Sélection des élevages et méthodes de prélèvements

111- Sélection des élevages

Choix des élevages en 1999

Deux séries de prélèvements ont eu lieu en élevage.

La première série s'est déroulée du 9 au 11 février c'est-à-dire approximativement deux mois après le début de la campagne de collecte. Sur la base des résultats obtenus par la laiterie en début de campagne, six élevages ont été visités : trois ont été sélectionnés car ils présentaient des comptages staphylococciques élevés et trois ont été choisis en raison de comptages staphylococciques régulièrement très faibles. Une étude de type cas-témoin a été ainsi réalisée.

Les élevages à comptages staphylococciques élevés étaient les élevages numéros 29, 22 et 41.

Les élevages à comptages staphylococciques régulièrement faibles étaient les élevages numéros 28, 32 et 2.

La deuxième série de prélèvements a eu lieu du 30 mars au 01 avril c'est-à-dire en milieu de campagne laitière. Dans la mesure du possible, il a été décidé de retourner dans les élevages précédemment cités.

Seul l'élevage numéro 28 n'a pas pu être revisité. Il a été remplacé par l'élevage numéro 35 qui présentait passagèrement des comptages staphylococciques élevés.

Les caractéristiques des élevages visités sont présentées dans le tableau n°5. Elles proviennent de l'enquête réalisée lors de la première visite.

Tableau 5 : Caractéristiques des élevages visités en 1999

Elevage	Nombre de brebis à la traite	Nombre de mammites cliniques lors du début de campagne	Lésions sur trayons lors du début de campagne	Traitement au tarissement	Vaccination contre l'ecthyma
<i>Elevages à comptages staphylococciques élevés</i>					
29	300	22 (12 gangréneuses)	env. 50 brebis avec boutons	Oui (systématique)	Non
22	380	15	env. 15 brebis avec boutons	Oui (systématique)	Oui
41	580	10 (1 gangréneuse)	env.30 brebis avec boutons	Oui (systématique)	Non
35	388	10 (4 gangréneuses)	env. 10 brebis avec ecthyma	Oui (systématique)	Non
<i>Elevages à comptages staphylococciques faibles</i>					
32	350	3	env. 10 brebis avec boutons	Oui (systématique)	Oui
2	331	9 (5 gangréneuses)	Absence	Oui (systématique)	Non
28	77	0	Absence	Oui (systématique)	Oui

Choix des élevages en 2000

Neuf élevages ont été sélectionnés. Des élevages à niveaux de contamination en SCP élevés, par rapport à la moyenne de la laiterie, et conduits par des éleveurs motivés et réceptifs ont été choisis. 3 élevages par jour ont été visités, du 31 janvier au 2 février. Une seule série de prélèvements a été réalisée.

Les élevages choisis étaient les élevages n°1, 12, 15, 18, 19, 31, 34, 35, 37. L'ensemble de ces élevages utilisaient la traite mécanique.

Tableau 6 : Caractéristiques des élevages visités en 2000

Elevage	Nombre de brebis à la traite	Nombre de mammites cliniques lors début de campagne	Lésions sur trayons lors début de campagne	Traitement au tarissement	Vaccination contre l'ecthyma
1	355	20	env. 35 brebis avec ecthyma env. 12 brebis avec croûtes	Oui (systématique)	
12	310	8 (1 gangréneuse)	10 brebis avec morsures 1 brebis avec boutons	Oui (90% du troupeau)	Non
15	320	10 (2 gangréneuses)	env. 100 brebis avec boutons et croûtes	Oui (systématique)	Oui
31	395	9 (9 gangréneuses)	30 brebis avec boutons	Oui (systématique)	Non
18	395	2 (0 gangréneuse)	3 brebis avec ecthyma 3 brebis avec croûtes	Oui (systématique)	Oui
34	370	7 (0 gangréneuse)	5 antenaises avec croûtes	Non	Oui

112- Choix des sites de prélèvements

Choix des sites en 1999

Trois sources de staphylocoques à coagulase positive ont été explorées.

✓ La source intra-mammaire. Lors de la traite, des laits individuels ont été prélevés sur des demi-mamelles. L'excrétion staphylococcique mammaire suppose l'existence d'une mammite. Cette dernière peut présenter différentes formes cliniques précisées au paragraphe 41 de la première partie de ce document.

L'excrétion peut donc s'exprimer par la mesure du nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) par mL des laits individuels et des laits de mélange.

✓ La source cutanée. La contamination de la peau des trayons a été explorée par la réalisation d'écouvillons.

✓ La source matériel. Différents sites de la machine à traire ont été explorés. Des prélèvements d'eau résiduelle ont ainsi été réalisés au niveau des manchons trayeurs, de la canne du tank et du bocal de réception, après un rinçage de la machine à traire.

De plus, un échantillon du lait de tank a été prélevé à l'issue de la traite lors de chaque visite. En général, le lait des deux dernières traites était présent dans le tank. Ce dernier prélèvement permet de connaître, le jour des visites, le niveau de contamination des laits mis en oeuvre.

Choix des sites en 2000

Compte-tenu des résultats obtenus la première année, deux sources de staphylocoques à coagulase positive ont été explorées.

✓ La source cutanée. Deux sites de prélèvements ont été choisis : des écouvillonnages ont été réalisés sur la peau des trayons et/ou sur des lésions purulentes éventuellement présentes sur le pis ou au niveau de l'aine. En effet, l'extension du site de prélèvement cutané des trayons vers des zones mammaires plus larges présentant des lésions fortement évocatrices de pyodermites staphylococciques devait permettre d'isoler un nombre plus important de souches, en vue de l'étude de la toxinogénicité.

✓ Le portage humain. Des écouvillons ont été réalisés sur les mains des personnes réalisant les prélèvements avant et après les manipulations et sur les mains des éleveurs à l'issue de la traite, s'ils acceptaient.

✓ La source matériel. Des prélèvements d'eau résiduelle des faisceaux trayeurs, d'eau résiduelle de la canne du tank, d'eau de rinçage de la machine à traire ont été réalisés dans les élevages visités l'après-midi (pour avoir une multiplication microbienne).

113- Sélection des animaux

Choix des animaux en 1999

Afin d'explorer la source intra-mammaire de staphylocoques à coagulase positive, les prélèvements individuels de lait ont été réalisés sur des brebis présentant des symptômes de mammites. En priorité ont été prélevés les animaux présentant des signes de mammites cliniques (atteinte de l'état général, pis chaud, modification du lait). A défaut, le reste des prélèvements a été effectué sur des animaux présentant des symptômes de mammites subaiguës ou chroniques, c'est-à-dire un déséquilibre du pis ou la présence de nodules associés à un California Mastitis Test positif.

L'objectif de 5% de prélèvements individuels de lait par élevage et à chaque visite avait été fixé. En pratique, le nombre de brebis à mammites présentes le jour des visites a été en général inférieur.

Afin d'explorer la source cutanée, la moitié des écouvillons a été réalisée sur des peaux de trayons sains. L'autre moitié a été réalisée sur des peaux de trayons présentant des lésions si possible évocatrices de la participation de SCP comme agent d'infection ou de surinfections (papulopustules, croûtes, blessures), ou à défaut sur d'autres types de lésions (verruques, éversion du sphincter).

Au total, 7% des brebis ont été prélevées par élevage et à chaque visite.

Choix des animaux en 2000

Afin d'explorer la source cutanée, une trentaine d'écouvillons a été réalisée par élevage.

La moitié des prélèvements a été réalisée sur des peaux de trayons sains.

L'autre moitié a été effectuée sur des trayons avec lésions évoquant la participation de souches de SCP (papulopustules, croûtes, morsures, blessures) et sur des lésions purulentes présentes sur le pis et au niveau de l'aîne.

114- Méthodologie des prélèvements

Le prélèvement de lait individuel

Il a toujours été effectué par deux personnes, une pour désinfecter le traxon et extraire le lait, l'autre pour le recueillir dans un tube stérile.

Le prélèvement s'est déroulé de la façon suivante :

① Lavage et désinfection à l'alcool à 70° des mains de la personne qui manipule les tubes stériles.

② Préparation, par le manipulateur, d'une compresse imbibée d'alcool à 70°.

③ La personne chargée d'extraire le lait saisit le traxon de la main gauche. A l'aide de la compresse précédemment préparée, qu'elle tient dans la main droite, un nettoyage de l'extrémité du traxon est effectué pendant 20 secondes. A la fin du nettoyage une élimination des premiers jets est effectuée puis un pincement de l'extrémité du traxon à travers la compresse est réalisé. La main gauche assure alors la traite. Le lait est alors sous légère pression dans la citerne et le canal du traxon.

④ Le manipulateur approche alors le tube stérile, le tient incliné à 45° et l'ouvre au dernier moment à 15 cm du sphincter du traxon.

⑤ La compression de l'extrémité du traxon est interrompue par le deuxième opérateur. Un jet de lait est dirigé vers le tube stérile. Quand le lait arrête de couler, le tube stérile est immédiatement refermé. Il est ensuite identifié.

⑥ Le prélèvement est ensuite conservé sous couvert d'un froid positif, dans une glacière.

Le prélèvement du lait de tank

Deux personnes sont nécessaires au prélèvement. Un nettoyage et une désinfection à l'alcool à 70° des mains des deux opérateurs ont été réalisés.

Le prélèvement s'est déroulé, après action des pales rotatives, de la façon suivante :

① Disposition d'une poire en caoutchouc à l'extrémité d'une pipette stérile graduée de 20 mL, par un des deux opérateurs.

② Aspiration de 10 mL de lait dans le tank.

③ Réception des 10 mL de lait dans un pot stérile ouvert au dernier moment par le deuxième opérateur. Dès que le lait a fini de s'écouler, le pot est refermé.

④ Renouvellement des étapes ② et ③ deux fois. Le lait est à chaque fois prélevé dans un endroit différent du tank. Au total 30 mL sont donc prélevés.

Le prélèvement effectué à la surface de la peau des trayons

Celui-ci a été réalisé à l'aide d'écouvillons stériles préalablement imbibés par 2 mL de soluté physiologique. Deux personnes ont été nécessaires.

Sur un trayon présentant une lésion, un écouvillonnage appuyé et ciblé sur la zone lésée a été réalisé. Dans le cas contraire, le prélèvement s'est déroulé de la façon suivante :

① Pincement de l'extrémité du trayon par la main gauche d'un des deux opérateurs qui le tire vers le bas.

② Le deuxième opérateur approche le tube contenant l'écouvillon. Avec sa main droite le premier opérateur saisit l'écouvillon et l'applique sur la peau du trayon.

③ A l'aide d'un premier côté de l'écouvillon, un mouvement de va et vient est effectué sur la face caudale du trayon (10 allers-retours). A l'aide du deuxième côté de l'écouvillon, un mouvement de va et vient est ensuite réalisé sur la face crâniale du trayon (10 allers-retours). Une fois terminé, l'écouvillon est replacé dans son tube plastique.

Le prélèvement de l'eau résiduelle des manchons trayeurs

Dans la mesure du possible ce prélèvement a été effectué plusieurs heures après le précédent nettoyage. Il a été réalisé à partir de l'eau restante dans les manchons trayeurs entre deux traites. Afin d'obtenir cette eau, une ouverture des griffes a été nécessaire. L'eau a été recueillie dans un flacon stérile. Dans la mesure du possible, plusieurs manchons trayeurs ont été prélevés (1 griffe sur 2), les eaux des différentes griffes étant mélangées.

Un écouvillonnage des manchons trayeurs a, en même temps été réalisé.

Les prélèvements de l'eau résiduelle de la machine à traire

Ils ont été effectués au niveau de la canne du tank et du bocal de réception. L'eau résiduelle a été recueillie par gravité dans 2 pots stériles (1 pour chaque site de prélèvement) après dévissage de la canalisation du lait.

Le prélèvement de l'eau de rinçage de la machine à traire

Il a été effectué au niveau de la canne du tank après passage d'une eau de rinçage dans la machine à traire. Ce rinçage a toujours été effectué avant le début d'une traite. L'eau a été recueillie par gravité dans un pot stérile.

Le prélèvement effectué à la surface des mains des trayeurs et des personnes réalisant les prélèvements

Il a été réalisé à l'aide d'écouvillons préalablement imbibés par 2 mL de sérum physiologique.

Si la visite a eu lieu en début de traite :

.un écouvillon est appliqué sur les mains préalablement lavées et désinfectées (alcool à 70°) des personnes chargées de réaliser les prélèvements avant de toucher les animaux.

un écouvillon est appliqué sur les mains des personnes chargées de réaliser les prélèvements quand ces derniers sont terminés.

.un écouvillon est appliqué sur les mains du trayeur en début et à la fin de la traite.

Si la visite a eu lieu en dehors de la traite :

.un écouvillon est appliqué sur les mains préalablement lavées et désinfectées (alcool à 70°) des personnes chargées de réaliser les prélèvements avant de toucher les animaux.

.un écouvillon est appliqué sur les mains des personnes chargées de réaliser les prélèvements quand ces derniers sont terminés.

.un écouvillon est appliqué sur les mains de l'éleveur après manipulation des animaux pour la réalisation des prélèvements.

12-Techniques analytiques

121- Isolement, dénombrement des souches de SCP

Sous couvert du froid, les prélèvements réalisés en élevage ont été quotidiennement acheminés à Toulouse.

Selon le site de prélèvement, des dilutions décimales ont été réalisées. Ces dilutions préalablement définies ont permis d'obtenir un dénombrement facilement réalisable. Il a été convenu qu'une dilution correcte permettait de dénombrer entre 10 et 300 colonies par boîte de Pétri. Un ensemencement sur milieu RPFA (Oxoid ajusté à pH=7,5 ou Biokar) a été effectué.

Après une incubation de 24 heures, un dénombrement des colonies de staphylocoques à coagulase positive a été réalisé. Ce dénombrement s'est fait sur la foi d'une présence d'un halo opaque autour des colonies. Afin de vérifier la sélectivité et l'électivité du milieu RPFA vis à vis des SCP des tests (coagulase en tubes, coloration de gram et catalase) ont été réalisés.

122- Détection et typage des entérotoxines

Une détection et une caractérisation des toxines produites ont ensuite été réalisées sur des cultures pures de staphylocoques à coagulase positive issues des géloses précédentes. Ces souches ont été cultivées en cocktails. Un cocktail est défini comme un ensemble de cinq colonies repiquées à partir d'une même primo-culture issue d'un prélèvement donné.

Afin d'améliorer la sensibilité des kits, une étape de dialyse-concentration des entérotoxines par la méthode du sac à dialyse (méthode LCHA) a été effectuée pour chaque cocktail.

Cinq souches par boîte de Pétri ont été prélevées et ont subi une phase de dialyse-concentration (méthode LCHA).

La détection des entérotoxines a été ensuite réalisée au moyen de deux kits commerciaux utilisant des techniques immunoenzymatiques. Le kit TRANSIA-Plaque (Diffchamb) basé sur réaction ELISA double sandwich a permis une détection globale en première intention. Si cette dernière s'est révélée positive elle a été complétée par le kit SET-RPLA (Oxoid) basé sur une réaction d'agglutination.

2-Résultats

21-Exploration des différentes sources de staphylocoques en élevage

211- La source intra-mammaire (année 1)

Suite aux deux séries de prélèvements réalisées en 1999, plusieurs résultats ont été acquis :

Le comptage staphylococcique moyen des laits de mélange s'est élevé à 125 UFC/mL. Même si les comptages staphylococciques des laits de mélange ont été plus bas dans les élevages à Comptages Staphylococciques Faibles (CSF), la différence avec les élevages à Comptages Staphylococciques Elevés (CSE) a été modeste.

Les paramètres témoins d'infections chroniques d'étiologie non vérifiée dans les troupeaux (tableau 7) n'ont pas permis de montrer des différences entre les deux catégories d'élevages. Ainsi, le pourcentage de brebis à «nodules » et à pis déséquilibré a pu être plus élevé dans certains élevages à CSE que dans des élevages à CSF.

De plus, aucune relation entre ces paramètres et le nombre d'UFC/mL du lait de mélange n' a pu être mise en évidence.

Tableau 7 : Mammites chroniques et comptage staphylococcique du lait de mélange (année 1)

Numéros d'élevage et de visite	Nombre de brebis	Pourcentage de brebis à "nodules"	Pourcentage de brebis à pis déséquilibré	UFC/mL du lait de mélange
<i>Elevages à comptages staphylococciques élevés</i>				
29				
Visite 1	300	7,3	33	190
Visite 2	300		19,3	600
22				
Visite 1	360	7,2	20,3	10
Visite 2	380		9,2	0
41				
Visite 1	516	10,3	22,1	440
Visite 2	580		13,2	150
35				
Visite 1	388		9,5	30
			Moyenne 1	202,8
			Ecart type 1	232,7
<i>Elevages à comptages staphylococciques faibles</i>				
32				
Visite 1	320	11,6	12,8	0
Visite 2	350		11,4	0
2				
Visite 1	325	11,1	16,6	20
Visite 2	331		13,8	60
28				
Visite 1	77	15,6	27,3	0
			Moyenne 2	16
			Ecart type 2	26,0
			Moyenne générale	125
			Ecart type général	197,6

Le nombre de brebis présentant des symptômes de mammites aiguës, subaiguës et chroniques cliniques lors des deux séries de visites a été 4,5 fois plus élevé dans les élevages à CSE (tableau 8).

Les laits individuels avec isolement de colonies de staphylocoques à coagulase positive sont provenus en totalité d'élevages à CSE (tableau 8).

Parmi les prélèvements ayant permis d'isoler des staphylocoques à coagulase positive, le nombre d'UFC moyen/mL a été supérieur à $1,0 \times 10^5$ (tableau 8).

Tableau 8 : Comptages staphylococciques des laits individuels (année 1)

Numéros d'élevage et de visite	Nombre de brebis	Nombre de prélèvements	Nombre de prélèvements avec SCP	Pourcentage de prélèvements avec SCP	UFC moyen/mL
<i>Elevages à comptages staphylococciques élevés</i>					
29					
Visite 1	300	8	1	12,50%	$1,1 \times 10^4$
Visite 2	300	16	9	56%	$>1,9 \times 10^5$
22					
Visite 1	360	6	4	67%	$>1,7 \times 10^5$
Visite 2	380	8	2	25%	$1,6 \times 10^5$
41					
Visite 1	516	11	4	36%	$>1,5 \times 10^5$
Visite 2	580	11	3	23%	$2,0 \times 10^4$
35					
Visite 1	388	9	2	22%	$1,0 \times 10^4$
	Moyenne 1	9,8	3,5	36,2%	$>1,0 \times 10^5$
	Ecart type 1	3,2	2,6		
<i>Elevages à comptages staphylococciques faibles</i>					
32					
Visite 1	320	0	0	0%	0
Visité 2	350	0	0	0%	0
2					
Visite 1	325	6	0	0%	0
Visite 2	331	8	0	0%	0
28					
Visite 1	77	1	0	0%	0
	Moyenne 2	3	0	0%	0
	Ecart type 2	3,7	0		
	Moyenne générale	7	2,0		$>5,9 \times 10^4$
	Ecart type général	4,8	2,6		

212- La source cutanée (années 1 et 2)

Les résultats obtenus en 1999 ont été les suivants :

Sur 384 prélèvements réalisés, 46 ont permis d'isoler des colonies de staphylocoques à coagulase positive (tableau 9).

Trente cinq de ces prélèvements proviennent d'élevages à CSE, ce qui représente 13,7% des prélèvements réalisés dans cette catégorie d'élevages (tableau 9).

Onze de ces prélèvements proviennent d'élevages à CSF, ce qui représente 9% des prélèvements réalisés dans cette catégorie d'élevages (tableau 9).

Tableau 9 : Comptages staphylococciques des prélèvements sur peau de trayons (année 1)

Numéros d'élevage et de visite	Nombre de brebis	Nombre de prélèvements	Nombre de prélèvements avec SCP	Pourcentage de prélèvements avec SCP	UFC moyen/mL
<i>Elevages à comptages staphylococciques élevés</i>					
29					
Visite 1	300	24	3	12,50%	2
Visite 2	300	30	6	20%	$>1,6 \times 10^3$
22					
Visite 1	360	27	3	11%	$>1,9 \times 10^2$
Visite 2	380	38	2	5%	$>1,9 \times 10^3$
41					
Visite 1	516	40	8	20%	$>2,0 \times 10^3$
Visite 2	580	58	7	12%	$>1,2 \times 10^3$
35					
Visite 1	388	38	6	16%	$>1,0 \times 10^2$
	Moyenne 1	36,4	5,0	13,70%	$>1,0 \times 10^3$
	Ecart type 1	11,3	2,3		
<i>Elevages à comptages staphylococciques faibles</i>					
32					
Visite 1	320	24	1	4%	11
Visité 2	350	37	2	5%	$>1,6 \times 10^3$
2					
Visite 1	325	24	4	17%	$>1,9 \times 10^3$
Visite 2	331	35	3	9%	$>1,0 \times 10^3$
28					
Visite 1	77	9	1	11%	28
	Moyenne 2	25,8	2,2	9%	$>0,9 \times 10^3$
	Ecart type 2	11,1	1,3		
	Total général	384	46	29,7%	$>1,1 \times 10^4$
	Moyenne générale	32	3,8		$>9,6 \times 10^2$
	Ecart type général	12,0	2,3		

Cent quinze de ces 384 prélèvements ont été réalisés sur des trayons sans lésion (80 dans les élevages à CSE et 35 dans les élevages à CSF). Sept ont permis d'isoler des colonies de staphylocoques à coagulase positive. Cela a représenté 6,1% des prélèvements (tableau 10).

Tableau 10 : Isolement de souches de SCP sur peau de trayons sans lésion (année 1)

Numéro d'élevage et de visite	Nombre total de trayons prélevés	Nombre de trayons sans lésions prélevés	Nombre de prélèvements avec SCP	Pourcentage de prélèvements avec SCP
<i>Elevages à comptages staphylococciques élevés</i>				
29				
Visite 2	30	15	1	6,6%
22				
Visite 2	38	19	0	0%
41				
Visite 2	58	29	2	6,9%
35				
Visite 1	38	17	2	11,8%
	Moyenne 1	20,0	1,2	6,3%
	Ecart type 1	6,2	0,9	
<i>Elevages à comptages staphylococciques faibles</i>				
32				
Visite 2	37	18	0	0%
2				
Visite 2	35	17	2	11,7%
28				
	Moyenne 2	17,5	1	5,7%
	Ecart type 2	0,7	1,4	
	Moyenne générale	19,1	1,1	6,1%
	Ecart type général	5,0	0,9	

Trente trois de ces 384 prélèvements ont été réalisés sur des trayons avec verrues. L'ensemble de cette catégorie de prélèvements a été effectué dans les élevages à CSE. Deux ont permis d'isoler des colonies de staphylocoques à coagulase positive. Cela représente 6,1% des prélèvements (tableau 11).

Tableau 11 : Isolement de souches de SCP sur peau de trayon avec verrues (année 1)

Numéros d'élevage et de visite	Nombre total de trayons prélevés	Nombre de trayons avec verrues prélevés	Nombre de prélèvements avec SCP	Pourcentage de prélèvements avec SCP
<i>Elevages à comptages staphylococciques élevés</i>				
29				
Visite 2	30	2	0	0%
22				
Visite 2	38	10	0	0%
41				
Visite 2	58	19	1	5,2%
35				
Visite 1	38	2	1	50,0%
	Moyenne 1	8,2	0,5	6,1%
	Ecart type 1	8,1	0,5	
<i>Elevages à comptages staphylococciques faibles</i>				
32				
Visite 2	37	0	0	0%
2				
Visite 2	35	0	0	0%
	Moyenne 2	0	0	0%
	Ecart type 2	0	0	
	Moyenne générale	5,5	0,3	6,1%
	Ecart type général	7,5	0,5	

Quatre vingt huit de ces 384 prélèvements ont été réalisés sur des trayons présentant des lésions (51 dans les élevages à CSE et 37 dans les élevages à CSF). Dix sept ont permis d'isoler des colonies de staphylocoques à coagulase positive. Cela représente 19,3% des prélèvements (tableau 12). Le pourcentage relatif de trayons avec lésions ayant permis d'isoler des colonies de staphylocoques à coagulase positive a été trois fois plus important dans les élevages à CSE que dans les élevages à CSF.

Le comptage staphylococcique moyen des trayons présentant des lésions s'est élevé à plus de $1,7 \times 10^3$ UFC/mL (tableau 12).

Tableau 12 : Comptages staphylococciques des prélèvements sur peau de trayon avec lésions (année 1)

Numéros d'élevage et de visite	Nombre total de trayons prélevés	Nombre de trayons avec lésions prélevés	Nombre de prélèvements avec SCP	Pourcentage de prélèvements avec SCP	UFC moyen/mL
<i>Elevages à comptages staphylococciques élevés</i>					
29					
Visite 2	30	13	5	38,5%	$2,0 \times 10^3$
22					
Visite 2	38	9	2	22%	$>1,9 \times 10^3$
41					
Visite 2	58	10	4	40%	$>1,8 \times 10^3$
35					
Visite 1	38	19	3	15,8%	$0,17 \times 10^3$
	Moyenne 1	12,7	3,5	27,4%	$>1,4 \times 10^3$
	Ecart type 1	4,5	1,2		
<i>Elevages à comptages staphylococciques faibles</i>					
32					
Visite 2	37	19	2	10,5%	$>1,6 \times 10^3$
2					
Visite 2	35	18	1	5,5%	$>3,0 \times 10^3$
	Moyenne 2	18,5	1,5	8,1%	$>2,3 \times 10^3$
	Ecart type 2	0,71	0,71		
	Moyenne générale	14,6	2,8	19,3%	$>1,7 \times 10^3$
	Ecart type général	4,5	1,4		

Les résultats obtenus en 2000 ont été les suivants :

Sur 94 trayons avec lésions prélevés, près de 60% ont permis d'isoler des colonies de staphylocoques à coagulase positive (tableau 13).

Tableau 13 : Comptages staphylococciques des prélèvements sur peau de trayon avec lésions (année 2)

Numéro d'élevage	Nombre total de trayons prélevés	Nombre de trayons avec lésions prélevés	Nombre de prélèvements avec SCP	Pourcentage de prélèvements avec SCP	UFC moyen/mL
19	24	9	6	6,6%	$>8,5 \times 10^3$
35	22	7	2	28,6%	$>5,0 \times 10^3$
37	23	8	8	100%	$>1,0 \times 10^4$
1	30	15	8	53,3%	$>8,8 \times 10^3$
12	27	12	6	50%	$>2,8 \times 10^3$
15	31	16	10	62,5%	$>9,1 \times 10^3$
31	28	13	5	38,5%	$>8,0 \times 10^3$
18	20	5	4	80%	$>9,3 \times 10^3$
34	24	9	6	66,7%	$>5,0 \times 10^3$
	Moyenne	10,4	6,1	58,5%	$>7,3 \times 10^3$
	Ecart type	3,7	2,3		

Sur 135 trayons sans lésion prélevés, moins de 15% ont permis d'isoler des colonies de staphylocoques à coagulase positive (tableau 14).

Le comptage staphylococcique moyen des trayons avec lésions a été de plus de $7,3 \times 10^3$ UFC/mL. Il a été de plus $1,7 \times 10^3$ UFC/mL pour les trayons sans lésions (tableau 14).

Tableau 14 : Comptages staphylococciques des prélèvements sur peau de trayon sans lésion (année 2)

Numéro d'élevage	Nombre total de trayons prélevés	Nombre de trayons avec lésions prélevés	Nombre de prélèvements avec SCP	Pourcentage de prélèvements avec SCP	UFC moyen/mL
19	24	15	5	33,3%	$>2,0 \times 10^3$
35	22	15	0	0%	0
37	23	15	1	6,6%	50
1	30	15	2	13,3%	$4,8 \times 10^2$
12	27	15	5	33,3%	12
15	31	15	3	20%	$>3,4 \times 10^3$
31	28	15	0	0%	0
18	20	15	1	6,6%	$>1,0 \times 10^4$
34	24	15	3	20%	13
	Moyenne	15,0	2,2	14,8%	$>1,7 \times 10^3$
	Ecart type	0	1,9		

Sur 33 prélèvements réalisés sur lésions cutanées non mammaires, 7 ont permis d'isoler des colonies de staphylocoques à coagulase positive. Cela représente un peu plus de 20% des prélèvements (tableau 15).

Le comptage staphylococcique moyen de ces lésions cutanées a été de plus de $1,2 \times 10^3$ UFC/mL (tableau 15).

Tableau 15 : Comptages staphylococciques des prélèvements sur lésions cutanées non mammaires (année 2)

Numéro d'élevage	Nombre total de prélèvements	Nombre de prélèvements avec SCP	Pourcentage de prélèvements avec SCP	UFC moyen/mL
19	4	2	50%	$>8,2 \times 10^2$
35	7	0	0%	0
37	7	2	28,5%	35
1	0	0	0%	0
12	4	2	50%	$>1,0 \times 10^4$
15	0	0	0%	0
31	6	0	0%	0
18	1	0	0%	0
34	4	1	25%	380
Moyenne	3,6	0,7	21,2%	$>1,2 \times 10^3$
Ecart type	2,7	0,9		

213- La source matériel

Trente prélèvements ont été réalisés dans 7 élevages différents. 13% de ces prélèvements ont permis d'isoler des colonies de staphylocoques à coagulase positive (tableau 16).

Le comptage staphylococcique moyen de ce type de prélèvement s'est élevé à 46 UFC/mL (tableau 16).

Tableau 16 : Comptages staphylococciques du matériel de traite (année 1)

Numéros d'élevage et de visite	Nombre de prélèvements	Nombre de prélèvements avec SCP	Pourcentage de prélèvements avec SCP	UFC moyen/mL
<i>Elevages à comptages staphylococciques élevés</i>				
29				
Visite 1	3	0	0%	0
Visite 2	3	0	0%	0
22				
Visite 1	3	2	66,6%	44
Visite 2	3	0	0%	0
41				
Visite 1	2	0	0%	0
Visite 2	3	0	0%	0
35				
Visite 1	3	0	0%	0
Moyenne1	2,8	0,2	10,0%	6,2
Ecart type 1	0,3	0,7		16,6
<i>Elevages à comptages staphylococciques faibles</i>				
32				
Visite 1	2	0	0%	0
Visité 2	2	1	50%	1
2				
Visite 1	2	1	50%	1
Visite 2	3	0	0%	0
28				
Visite 1	1	0	0%	0
Moyenne 2	2	0,4	20%	0,4
Ecart type 2	0,7	0,5		0,55
Moyenne générale	2,5	0,3	13,3%	3,8
Ecart type général	0,6	0,6		12,6

214- Le portage humain

Celui-ci a été exploré par la réalisation de prélèvements sur les mains des éleveurs et des opérateurs.

Dix huit prélèvements ont été réalisés dans 6 élevages différents. 27,8% de ces prélèvements ont permis d'isoler des colonies de staphylocoques à coagulase

positive. A chaque fois, l'isolement ne s'est produit qu'après manipulation des animaux (tableau 17).

Le comptage staphylococcique moyen de ce type de prélèvement s'est élevé à 125 UFC/mL (tableau 17).

Tableau 17 : Comptages staphylococciques des prélèvements réalisés sur les mains (année 2)

Numéro d'élevage	Nombre total de prélèvements	Nombre de prélèvements avec SCP	Pourcentage de prélèvements avec SCP	UFC moyen/mL
19	0	0	0%	0
35	0	0	0%	0
37	0	0	0%	0
1	4	0	0%	0
12	3	1 (intervenant après prélèvements)	33,3%	20
15	3	1 (éleveur)	33,3%	10
31	3	2 (éleveur et intervenant après prélèvements)	66,6%	85
18	2	1	50%	10
34	3	0	0%	0
Moyenne	3,0	0,8	27,8%	20,8
Ecart type	0,6	2,9		32,3

22-Exploration du caractère toxigène des souches de staphylocoques isolées

221- Toxinogénicité des souches de staphylocoques isolées

Toxinogénicité des souches de staphylocoques isolées en 1999

Sur 355 souches de staphylocoques à coagulase positive isolées en 1999, 247 se sont révélées toxigènes soit près de 70% (tableau 18).

Comme l'ont montré les résultats précédents, les élevages à CSE ont permis d'isoler 6 fois plus de colonies de staphylocoques à coagulase positive (298 contre 57).

Par contre, il est important de noter que :

- dans un élevage à CSE, 65% des colonies de SCP ont été toxigènes (tableau 18).
- dans un élevage à CSF, 93% des colonies de SCP ont été toxigènes (tableau 18).

Tableau 18 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées en élevage, toutes sources confondues (année 1)

Numéro de visite	Nombre de souches de SCP isolées	Nombre de souches de SCP entérotoxigènes	Pourcentage de souches de SCP entérotoxigènes
<i>Elevages à comptages staphylococciques élevés</i>			
Visite 1	124	55	44,4%
Visite 2	174	139	79,9%
Total 1	298	194	65,1%
<i>Elevages à comptages staphylococciques faibles</i>			
Visite 1	38	35	92,1%
Visite 2	19	18	94,7%
Total 2	57	53	93%
Total général	355	247	69,6%

Si l'on s'intéresse au caractère toxigène des souches de staphylocoques à coagulase positive, plusieurs remarques peuvent être faites :

20% des souches isolées du matériel de traite ont été entérotoxigènes (tableau 19). Le niveau de contamination est cependant resté très faible.

Les deux tiers des souches de staphylocoques à coagulase positive isolées des laits de mélange ont été entérotoxigènes (tableau 20).

Les laits individuels ont permis d'isoler en pourcentage moins de souches de staphylocoques à coagulase positive entérotoxigènes que les prélèvements réalisés sur les peaux de trayons (tableaux 21 et 22). Ce résultat peut apparaître comme surprenant, dans la mesure où les prélèvements de lait ont été réalisés uniquement sur des mamelles infectées alors que la moitié des trayons prélevés ne présentaient aucune lésion.

Quel que soit le site de prélèvement (matériel de traite, laits individuels, laits de mélange, peaux de trayons) plus de colonies de SCP entérotoxigènes ont été isolées dans les élevages à CSF (tableaux 19 à 22).

Tableau 19 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées du matériel de traite (année 1)

Numéro de visite	Nombre de souches de SCP isolées	Nombre de souches de SCP entérotoxigènes	Pourcentage de souches de SCP entérotoxigènes
<i>Elevages à comptage staphylococciques élevés</i>			
Visite 1	7	0	0%
Visite 2	1	1	100%
Total 1	8	1	12,5%
<i>Elevages à comptage staphylococciques faibles</i>			
Visite 1	1	1	100%
Visite 2	1	0	0%
Total 2	2	1	50%
Total général	10	2	20%

Tableau 20 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées des laits de mélange (année 1)

Numéro de visite	Nombre de souches de SCP isolées	Nombre de souches de SCP entérotoxigènes	Pourcentage de souches de SCP entérotoxigènes
<i>Elevages à comptage staphylococciques élevés</i>			
Visite 1	11	6	54,5%
Visite 2	14	9	64,3%
Total 1	25	15	60%
<i>Elevages à comptage staphylococciques faibles</i>			
Visite 1	2	2	100%
Visite 2	3	3	100%
Total 2	5	5	100%
Total général	30	20	66,6%

Tableau 21 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées des laits individuels (année 1)

Numéro de visite	Nombre de souches de SCP isolées	Nombre de souches de SCP entérotoxigènes	Pourcentage de souches de SCP entérotoxigènes
<i>Elevages à comptage staphylococciques élevés</i>			
Visite 1	45	20	44,4%
Visite 2	77	57	74%
Total 1	122	77	63,1%
<i>Elevages à comptage staphylococciques faibles</i>			
Visite 1	0	0	0%
Visite 2	0	0	0%
Total 2	0	0	0%
Total général	122	77	63,1%

Tableau 22 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées des peaux de trayons (année 1)

Numéro de visite	Nombre de souches de SCP isolées	Nombre de souches de SCP entérotoxigènes	Pourcentage de souches de SCP entérotoxigènes
<i>Elevages à comptage staphylococciques élevés</i>			
Visite 1	61	29	47,5%
Visite 2	82	72	87,8%
Total 1	143	101	70,6%
<i>Elevages à comptage staphylococciques faibles</i>			
Visite 1	35	32	91,4%
Visite 2	15	15	100%
Total 2	50	47	94%
Total général	193	148	76,7%

Toxinogénicité des souches de staphylocoques isolées en 2000

Sur 334 souches de staphylocoques à coagulase positive isolées des peaux de trayons et des lésions du pis, plus de 15% se sont révélées être toxigènes (tableau 23). Ce résultat apparaît comme très faible mais est très largement sous estimé. En effet, un des objectifs de la deuxième année était d'isoler des souches de SCP produisant des toxines autres que le type C. Ainsi quand un cocktail permettait de détecter seulement de l'entérotoxine de type C, le caractère toxigène de chaque souche n'a pas été étudié individuellement.

Avec la même imprécision que précédemment, 50% des souches de SCP isolées des mains des éleveurs et des personnes ayant réalisé les prélèvements se sont révélées entérotoxigènes (tableau 24).

Tableau 23 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées des peaux de trayons et des lésions cutanées (année 2)

	Nombre de souches de SCP isolées	Nombre de souches de SCP entérotoxigènes	Pourcentage de souches de SCP entérotoxigènes
19	59	>6	>10,2%
35	11	>3	>27,3%
37	34	>7	>20,6%
1	50	>7	>14%
12	38	>9	>23,7%
15	57	>6	>10,5%
31	25	>2	>8%
18	20	>4	>20%
34	40	>7	>17,5%
Total général	334	>51	>15,3%

Tableau 24 : Caractère toxigène des souches de SCP isolées des mains (année 2)

	Nombre de souches de SCP isolées	Nombre de souches de SCP entérotoxigènes	Pourcentage de souches de SCP entérotoxigènes
19	0	0	0%
35	0	0	0%
37	0	0	0%
1	0	0	0%
12	1	<1	<100%
15	1	<1	<100%
31	7	>2	>28,6%
18	1	1	<100%
34	0	0	0%
Total général	10	5	50%

Après avoir étudié le pouvoir toxigène des souches de staphylocoques isolées au cours de ces deux années, il est désormais très intéressant de connaître de façon qualitative les entérotoxines et d'étudier d'éventuelles variations en fonction de leurs origines.

222- Typage des entérotoxines

Typage des entérotoxines des souches de staphylocoques isolées en 1999

Globalement :

- 90,2% de souches de staphylocoques ont produit de l'entérotoxine C
- 3,3% de souches de staphylocoques ont produit de l'entérotoxine A
- 6,5% de souches de staphylocoques ont produit des entérotoxines A, B, C, D.

Il paraît important de noter que d'importantes variations peuvent survenir en fonction de la source d'isolement des staphylocoques (tableaux 25 et 26).

Ainsi :

- 100% des toxines isolées des laits individuels sont de type C.
- 100% des toxines isolées du matériel de traite sont de type C.
- 86,6% des toxines isolées des peaux de trayons sont de type C. Le reste étant représenté par des toxines de type A (4,5%) et A, B, C, D (8,9%).

Tableau 25 : Typage des entérotoxines produites par les souches de SCP isolées des différents sites en élevage (année 1)

Site de prélèvements	Typage des entérotoxines		Total
	<i>Elevage à contamination staphylococcique élevée</i>	<i>Elevages à contamination staphylococcique faible</i>	
Laits individuels	20 entérotoxines C	3 entérotoxines C	23 entérotoxines C
Peaux de trayons	21 entérotoxines C 3 entérotoxines A 4 entérotoxines A,B,C,D	37 entérotoxines C 2 entérotoxines A,B,C,D	58 entérotoxines C 3 entérotoxines A 6 entérotoxines A,B,C,D
Matériel de traite	1 entérotoxine C	1 entérotoxine C	2 entérotoxines C

Tableau 26 : Pourcentage de chaque type d'entérotoxine produit par les souches de SCP entérotoxigènes (année 1)

Site de prélèvements	Typage des entérotoxines	Pourcentage des différents types d'entérotoxines
Laits individuels	23 entérotoxines C	100% entérotoxines C
Peaux de trayons	58 entérotoxines C 3 entérotoxines A 6 entérotoxines A,B,C,D	86,6% entérotoxines C 4,5% entérotoxines A 8,9% entérotoxines A,B,C,D
Matériel de traite	2 entérotoxines C	100% entérotoxines C

Typage des entérotoxines des souches de staphylocoques isolées en 2000

Globalement :

- 96,4% de souches de staphylocoques ont produit de l'entérotoxine C
- 3,6% de souches de staphylocoques ont produit des entérotoxines A, B, C, D.

Il paraît important de noter que d'importantes variations peuvent survenir en fonction de la source d'isolement des staphylocoques (tableau 27).

Ainsi :

- 100% des toxines isolées des mains sont de type C.
- 96,1% des toxines isolées des peaux de trayons sont de type C. Le reste étant représenté par des toxines de type A, B, C, D (3,9%).

Tableau 27 : Typage des entérotoxines produites par les souches de SCP isolées des différents sites en élevage (année 2)

Site de prélèvements	Typage des entérotoxines	Pourcentage des différents types d'entérotoxines
Peaux de trayons et lésions cutanées	49 entérotoxines C 2 entérotoxines A,B,C,D	96,1% entérotoxines C 3,9% entérotoxines A,B,C,D
Mains	5 entérotoxines C	100% entérotoxines C

DISCUSSION

1-Discussion sur les méthodes

11- Les élevages et les dates de visite

✓ Afin de comparer les différents cas, 3 élevages à CSE et 3 élevages à CSF ont été sélectionnés en 1999. Cette distinction n'a été possible que grâce à l'utilisation de comptages staphylococciques quotidiens réalisés par la laiterie. Ces comptages ne sont en général pas effectués par les laiteries, la constitution des deux catégories d'élevage étant alors impossible. Pour des problèmes personnels, un des éleveurs à CSF n'a pas souhaité nous recevoir lors de la seconde visite. Compte tenu des résultats obtenus lors de la première visite, nous avons préféré le remplacer par un élevage à CSE, en particulier pour mieux explorer la source cutanée. La deuxième année nous a permis de réaliser des prélèvements dans plus d'élevages. Ainsi, nous sommes passés d'une étude plutôt de type longitudinal en 1999 à une étude plutôt de type transversal en 2000.

✓ Au cours des deux années de prélèvements, les premières visites ont eu lieu à partir de février. Ces visites peuvent paraître un peu tardives par rapport à l'agnelage. En effet, à l'époque, les mises bas pour les multipares avaient lieu fin novembre avec un début de livraison du lait fin décembre. Une intervention plus précoce aurait sans doute permis de mieux explorer la source cutanée dans la mesure où les lésions de dermatite staphylococcique et les blessures sur les trayons sont plus nombreuses juste après l'agnelage. Elle aurait également permis de mieux explorer la source mammaire dans la mesure où le nombre de mammites est plus important au cours des deux mois qui suivent la mise-bas. En intervenant plus tardivement, la majorité des brebis ayant présenté une mammite aiguë était déjà réformée et les lésions staphylococciques qui auraient permis d'isoler des colonies de SCP étaient cicatrisées.

12- Les prélèvements

✓ Avant d'intervenir en élevages, différents protocoles de réalisation des prélèvements ont été expérimentés et standardisés. Afin d'améliorer la répétabilité, les prélèvements n'ont été réalisés que par un nombre limité de personnes.

✓ Les prélèvements de laits individuels ont été réalisés sur symptômes cliniques. Compte tenu du faible taux de mammites en élevage ovin lait (<5%) et afin de multiplier les prélèvements pour obtenir des résultats interprétables, nous avons été obligés de tester des brebis à mammites déjà traitées et surtout à mammites plutôt chroniques (pis déséquilibrés, induration mammaire). En conséquence, le nombre de prélèvements à SCP issus de cette source est sous-estimé. Les brebis traitées ont pu être contaminées par une souche de SCP, mais suite à l'utilisation d'antibiotiques, l'excrétion mammaire a pu être stoppée. De plus, les mammites

chroniques sont en majorité provoquées par des staphylocoques à coagulase négative (Bergonier et *al.*, 1997).

✓ Afin d'explorer la source cutanée, la moitié des prélèvements réalisés sur peau de trayons a été effectuée sur des trayons avec lésions et l'autre moitié sur des trayons sans lésion. L'importance de la présence d'une lésion pour l'isolement de SCP a donc pu être étudiée. Une attention particulière a été portée sur le type de lésions. Les lésions évocatrices de primo-infections staphylococciques (papulo-pustules, furoncles) ont été différenciées de celles qui ne l'étaient pas (verruques, blessures).

✓ Afin d'explorer le portage humain, au cours de la deuxième année, des prélèvements ont été réalisés à la demande de la laiterie sur les mains de personnes manipulant les animaux. La réalisation non systématique et l'intervention en élevages à des heures différentes par rapport à la traite ne nous ont permis que d'obtenir des résultats préliminaires d'un élevage à l'autre. De plus, le nombre de prélèvements explorant cette source est très faible.

✓ La source environnementale n'a pas été explorée. Différents travaux (Roberson et *al.*, 1994) ont déjà montré la présence de staphylocoques dans tout ce qui entoure les animaux (aliments, insectes, matériel d'élevage). Cependant, la réalisation pratique de ce type de prélèvements et l'interprétation des résultats nous ont paru difficiles.

13- Les techniques analytiques

✓ Le milieu RPFA étant le milieu de référence pour les produits au lait cru (Reynaud et *al.*, 1997), l'ensemble des ensemencements a été réalisé sur ce type de milieu. Par comparaison avec le milieu de Baird Parker, la sensibilité et la spécificité des résultats sont améliorées. Ainsi, il y a eu beaucoup moins de faux positifs liés aux staphylocoques à coagulase négative. Dans quelques cas douteux, des galeries API ont quand même été réalisées.

✓ Concernant les dénombrements plusieurs remarques doivent être faites. Un nombre insuffisant de dilutions a conduit à une imprécision des résultats. D'autre part, le dénombrement des colonies de SCP sur les peaux de trayons n'est que relatif (deux millilitres de sérum physiologique ont été arbitrairement utilisés). Il permet cependant une comparaison des résultats d'une brebis à l'autre ou d'un élevage à l'autre.

✓ Afin d'explorer le caractère entérotoxigène des souches de SCP isolées, une phase de dialyse-concentration a été réalisée. Pour des raisons techniques (disponibilité du matériel, expérience des personnes réalisant la manipulation), la dialyse-concentration a été préférée à la technique de précipitation à l'acide trichloroacétique. De plus, cette technique fait partie de la méthode officielle de détection des entérotoxines staphylococcique préconisée par la DGAI (Note de service DGAI SDHA N°97 N°8097). La sensibilité des kits utilisés a donc été améliorée.

✓ Deux kits ont été utilisés successivement. Le kit TRANSIA a permis de détecter un maximum de prélèvements avec entérotoxines. En effet, il détecte globalement la présence des entérotoxines A, B, C, et E (du fait des réactions croisées avec l'entérotoxine A). Le kit RPLA a permis de confirmer les résultats obtenus avec le premier kit et de typer distinctement la présence des entérotoxines A, B, C ou D.

La technique TRANSIA a été choisie car elle a une bonne sensibilité et qu'elle fait partie de la méthode officielle décrite par la DGAI. Le test est rapide et facile à exécuter malgré une étape de lavage importante pour éliminer toute trace de réactifs dans les cupules. Elle est cependant caractérisée par une fréquence de faux positifs élevée. Cependant, c'est celle qui présente le moins d'interférences possibles avec les enzymes de la matrice laitière.

Le test RPLA a été choisi car il possède une bonne sensibilité. Son interprétation, qui peut être délicate, n'est réalisable que 24 heures après des manipulations parfois délicates.

Le fait d'utiliser successivement les deux kits a permis de limiter les inconvénients des deux tests.

Compte tenu de l'utilisation exclusive de ces deux méthodes, une sous-estimation du nombre de souches de SCP toxigènes a existé. En effet, les entérotoxines autres que de type A, B, C, D ou E n'ont pas été détectées.

2-Discussion sur les résultats

21- Les dénombrements de SCP

✓ Les prélèvements de laits de tank

Ce type de prélèvement ne nous a apporté que très peu d'informations. Aucune différence n'est apparue entre les élevages à CSF et les élevages à CSE. En fait, l'excrétion de staphylocoques est très irrégulière. Un prélèvement ponctuel n'est pas représentatif, une série de prélèvements quotidiens successifs est préférable.

✓ Les prélèvements de laits individuels

Plusieurs informations paraissent intéressantes à retenir.

Le nombre de brebis présentant des mammites cliniques dans les élevages à CSE est plus important que dans les élevages à CSF.

Le pourcentage de prélèvements ayant permis d'isoler des souches de SCP approche 30%. Ce résultat est très inférieur au résultat obtenu par Orden en 1997 (Orden et al., 1997). Dans son étude, sur 160 prélèvements de mammites à staphylocoques, 78% ont permis d'isoler des souches de SCP. Cette différence s'explique aisément par le fait que l'on a réalisé des prélèvements sur mammites cliniques déjà traitées et sur des mammites chroniques.

Quand une souche de SCP est isolée d'un lait de mammite, le dénombrement est en moyenne supérieur à 10^5 . L'excrétion mammaire peut donc être responsable d'une augmentation brutale, importante et transitoire du comptage staphylococcique du lait de mélange. Cela permet d'expliquer les fortes variations de dénombrements staphylococciques dans les élevages déclarant de nombreuses mammites. Ce dernier résultat permet de justifier la nécessité d'une détection précoce des mammites. Cependant, en élevages ovin lait, la taille des troupeaux et la rapidité de traite ne sont pas compatibles avec la réalisation systématique de tests de type CMT.

Par contre, compte tenu de la durée importante de l'excrétion staphylococcique, la réforme précoce des brebis à mammite est souhaitable.

✓ Les prélèvements de peaux de trayons

Les prélèvements réalisés sur les peaux de trayons nous ont fourni plusieurs informations. Le portage cutané de staphylocoques suppose, en général, la présence de lésions sur les trayons. Ainsi, au cours de la première année de prélèvements, seuls 6% des trayons sans lésion ont permis d'isoler des souches de SCP, alors que ce pourcentage est de 19% pour les trayons avec lésions. Ces résultats ont été confirmés par les prélèvements effectués en 2000. En effet, au cours de cette deuxième année de prélèvements, 60% des peaux de trayons prélevés ont permis d'isoler des souches de SCP s'il présentaient des lésions, alors que le pourcentage n'a été que de 15% si les trayons étaient sains.

Quand une souche de SCP est isolée d'un prélèvement de peau de trayon, le dénombrement est en moyenne supérieur à 10^4 et systématiquement inférieur à 10^5 .

Ces derniers résultats nous montrent que la source cutanée peut participer à l'élévation des comptages staphylococciques du lait de mélange. Ceci est d'autant plus vrai que le nombre de trayons avec lésions est élevé. Son importance est donc augmentée en début de campagne de traite, période propice aux lésions sur les trayons et caractérisée par un chargement important en bergerie. Ces résultats justifient donc l'utilisation de produits antiseptiques, en post-trempe ou en pulvérisation (Fox et al., 1997). Ils peuvent également justifier l'utilisation de vaccins ou d'autovaccins dans la prévention des lésions sur les mamelles.

De plus cette dernière source participe de façon indirecte à l'excrétion mammaire dans la mesure où elle peut être à l'origine de mammites.

En conclusion, la source intra-mammaire est responsable d'une contamination en SCP massive et transitoire si les brebis sont réformées rapidement. Dans le cas contraire, une persistance de l'excrétion staphylococcique existe, même en cas d'amélioration clinique. La source cutanée est responsable d'une contamination plus réduite mais plus durable de type « bruit de fond ». Les conditions d'ambiance, en particulier responsable d'une humidité sur les trayons, jouent un rôle important sur la multiplication cutanée des staphylocoques.

✓ Le matériel

Les prélèvements réalisés nous ont permis, dans les conditions des élevages de l'étude, d'exclure le matériel comme source majeure de contamination des laits de mélange.

Ces résultats proviennent d'un bon nettoyage de la machine à traire (alternance de produits acide et alcalin chlorés) et d'un renouvellement annuel des manchons trayeurs.

✓ Le portage humain

Malgré le nombre restreint de prélèvements et la difficulté d'interprétation des résultats obtenus, nous avons confirmé que l'homme peut être porteur sain de staphylocoques. Ceci est d'autant plus vrai après la manipulation d'animaux. Cependant les comptages de staphylocoques obtenus ne laissent envisager qu'un rôle mineur de cette source dans la contamination du lait de tank.

22- Le caractère toxigène des souches de SCP isolées

70% des souches de SCP se sont révélées toxigènes.

63% des souches de SCP isolées des laits individuels ont été toxigènes. Ce résultat vient confirmer les 61% de souches entérotoxigènes isolées par Hajek à partir de 83 souches de *Staphylococcus aureus* provenant de laits de mammites ovines (Hajek, 1978). Il s'oppose une fois de plus aux résultats obtenus lors de prélèvements de laits de bovins et de chèvres (Orden *et al.*, 1992). Dans une étude réalisée en 1993, Kenny a montré que seulement 28,6% de 262 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de laits de bovins étaient entérotoxigènes (Kenny *et al.*, 1993). Matsunaga a montré que sur 88 souches de staphylocoques isolées de laits de bovins, 34,5% étaient entérotoxigènes (Matsunaga *et al.*, 1993).

Globalement, plus de souches de SCP ont été isolées dans les élevages à CSE. Par contre, la proportion de souches entérotoxigènes est plus grande dans les élevages à CSF. Une compétition bactérienne importante dans les élevages à CSE pourrait expliquer ce résultat.

Les souches de SCP isolées des laits individuels ont été moins toxigènes que celles isolées des peaux de trayons.

Ces différents résultats confirment bien une forte particularité ovine en particulier par rapport aux bovins.

23- Le typage des entérotoxines

L'ensemble des souches de SCP entérotoxigènes isolées des laits individuels et du matériel ne produit que de l'entérotoxine C. Ces résultats confirment l'étude de Orden, où la majorité des toxines typées produites par des souches de SCP étaient de même type (Orden *et al.*, 1997). Ils confirment également l'étude réalisée par Guitierrez montrant que 67% de 71 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de lait de mammites produisaient des toxines de type C, 1,4% produisaient des toxines de type D et 5,6% produisaient des toxines de type A (Guitierrez *et al.*, 1982). Ces résultats s'opposent par contre à ceux obtenus par Bautista en 1988. Sur 124 souches de staphylocoques, seulement 21% produisaient des toxines de type C, 35% produisaient des toxines de type A, 34% produisaient des toxines de type D, 6% produisaient des toxines de type B (Bautista *et al.*, 1988). Ils s'opposent également à ceux obtenus sur des prélèvements de lait de bovins. Ainsi, sur 146 souches de *Staphylococcus aureus* isolées par Adesiyun, seulement 13% ont produit des entérotoxines de type C (Adesiyun *et al.*, 1998).

Les souches de SCP entérotoxigènes isolées des peaux de trayons peuvent par contre produire plusieurs types d'entérotoxines (C,D,A). Ceci est d'autant plus important à signaler que les entérotoxines les plus couramment détectées lors de toxi-infection alimentaire collective sont de type A et D.

CONCLUSION

En élevage ovin lait, les principales sources de staphylocoques sont représentées par les mammites et la peau des trayons. Les mammites sont responsables d'une augmentation brutale et massive du comptage staphylococcique du lait de tank. Les peaux de trayons sont responsables d'une contamination plus réduite mais plus durable.

En comparaison avec des études concernant les élevages bovins, un plus fort pourcentage de souches de SCP ovines se révèlent entérotoxigènes. Une différence notable apparaît également dans les types d'entérotoxines. En effet, l'entérotoxine C est la plus fréquemment produite quelque soit la source du prélèvement. Cependant, des entérotoxines de type A et D ont pu être détectées à partir de prélèvements réalisés sur des peaux de trayons. La présence de ces souches dans le lait est plus problématique dans la mesure où les deux types d'entérotoxines les plus couramment détectés lors de TIAC sont les types A et D. Néanmoins, l'existence de ces souches de staphylocoques dans la matière première n'entraîne pas obligatoirement la présence de ces dernières dans le produit fini. En effet, les procédés de fabrication et les concurrences microbiologiques limitent la toxigenèse.

Dans le contexte actuel où le risque alimentaire ne doit pas exister, la connaissance d'un danger potentiel doit obligatoirement conduire au « principe de précaution ». Ainsi, une limitation de la contamination du lait par les staphylocoques en élevage et une bonne maîtrise des conditions physico-chimiques et des compétitions microbiennes, en particulier dans les premiers jours de la transformation sont nécessaires. En élevage, cela passe par une antisepsie des trayons après la traite, une détection rapide des mammites avec une réforme anticipée et une bonne ambiance des bâtiments. En cours de transformation, cela passe par une bonne maîtrise technologique, tout particulièrement de l'étape d'acidification, et la réalisation d'autocontrôles réguliers.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADESIYUN, A.A., WEBB, L.A., ROMAIN, H.T.- Prevalence and Characteristic of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bulk and Composite Milk and Cattle Handlers.- J Food Protection, 1998, 61, 5, 629-632.

BALABAN, N., RASOOLY, A.- Staphylococcal enterotoxins.- Int J Food Microbiol, 2000, 61, 1-10.

BAUTISTA, L., GAYA, P., MEDINA, M. et al.- A Quantitative Study of Enterotoxin Production by Sheep Milk Staphylococci.- Appl and Env Microbiology, 1988 Feb, 54, 2, 566-569.

BERGONIER, D., BERTHELOT, X.. - Cours de pathologie de la reproduction.- 1999.

BERGONIER, D., BLANC, M.C., FLEURY, B., LAGRIFFOUL, G., BARILLET, F., BERTHELOT, X.- Les mammites des ovins et des caprins laitiers : étiologie, épidémiologie, contrôle.- Rencontre Recherches Ruminants, 1997, 4, 251-260.

BERGONIER, D., LONGO, F., LAGRIFFOUL, G. et al.- In Rubino R. (Editor), Somatic cells and milk of Small Ruminants. Wageningen Pers, Pays Bas, 1996, 53-59.

BERGONIER, D., VAN DE WIELE, A., ARRANZ, J.M. et al.- In Rubino R. (Editor), Somatic cells and milk of Small Ruminants. Wageningen Pers, Pays Bas, 1996, 41-47.

BOURGEOIS, C.M., MESCLE, J.F., ZUCCA, J.- Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité alimentaire et de la qualité des aliments.- In : Lavoisier TEC & DOC (Ed), Microbiologie Alimentaire, 1996, 106-119.

BRETT, M.M.- Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits.- J Applied Microbiology Symposium Supplement, 1998, 84, 110S-118S.

BRISABOIS, A., LAFARGE, V., BROUILLAUD, A., DE BUYSER, M.L., COLLETTE, C., GARIN – BASTUJI, B., THOREL, M.F.- Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe.- Rev. Sci. Tech., Off. Int. Epiz., 1997, 16, 2, 452-471.

BURRIEL, A.R.- Isolation of coagulase-negative staphylococci from the milk and environment of sheep.- J Dairy Research, 1998, 65, 139-142.

CHAUBEAU – DUFFOUR, C.- Toxi-infections alimentaires d'origine staphylococcique.- Le Point Vétérinaire, 1992, 24, 148, 33-40.

DE BUYSER, M.L.- Les staphylocoques coagulase-positifs.- In : Lavoisier (Ed), Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, chapitre 6, 1996, 305-312.

DE BUYSER, M.L., JANIN, F., DILASSER, F.- Contamination of Ewe Cheese with *Staphylococcus aureus*: Study of an Outbreak of Food Poisoning.- In: JELJASZEWICZ, J. (Ed), The Staphylococci, Zbl Bakt Suppl.14Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1985.

DE BUYSER, M.L., LAPEYRE, C.- Mammites à staphylocoques et sécurité alimentaire.- Le Point Vétérinaire, 1994, 26, numéro spécial « Ruminants et santé publique », 79-82.

DE BUYSER, M.,L., LAPEYRE, C., DILASSER, F.- Le point sur les TIAC à staphylocoques : foyers déclarés et résultats de l'analyse d'aliments suspects.- Coll. Soc. Microbiol./Alim., Vol 11, 1997, 7-16.

FOX, L.K.- Colonization by *Staphylococcus aureus* on chapped teat skin: effect of iodine and chlorhexidine postmilking disinfectants.- J Dairy Sci, 1992 Jan, 75, 1, 66-71.

GOURREAU, J.M.- Les staphylococcies.- In France Agricole (Editeur), Accidents et maladies du trayon, 1995, 135.

GUERIN – FAUBLEE, V., BRUN, Y.- La résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques d'origine animale.- Revue Méd Vét, 1999, 150, 4, 299-312.

GUITIERREZ, L.M., MENES, I., GARCIA, M.L. et al.- Characterization and Enterotoxigenicity of Staphylococci Isolated from Mastitic Ovine Milk in Spain.- J Food Protection, 1982 Dec, 45, 14, 1282-1286.

HAEGHEBAERT, S., LE QUERREC, F., GALLAY, A. et al.- Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000.- BEH, 2002 Juin, 23, 105-109.

HAJEK, V.- Identification of enterotoxigenic staphylococci from sheep and sheep cheese.- Appl Environ Microbiol, 1978 Feb, 35, 2, 264-268.

KENNY, K., REISER, R.F., BASTIDA – CORCUERA, F.D. et al.- Production of enterotoxins and shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *staphylococcus aureus*.- J Clin Microbiol, 1993 Mar, 31, 3, 706-707.

MATSUNAGA, T., KAMATA, S., KAKIICHI, N. et al.- Characteristics of *staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis.- J Vet Med Sci, 1993 Apr, 55, 2, 297-300.

MEYRAND A., ATRACHE V., BAVAI C. et al.- Evaluation of an alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy products.- 1999 Jan, 28, 6, 411-415.

MEYRAND, A., FOLIO, P., GIRAUDON, N. et al.- Comparaison d'une nouvelle technique d'extraction-concentration des entérotoxines staphylococciques par rapport à la méthode de référence dans les produits laitiers.- Revue Méd Vet, 2000, 151, 3, 205-211.

NOTERMANS, S., WERNARS, K. - Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins.- Int J Food Microbiol, 1991, 91-102.

ORDEN, J.A., CID, D., BLANCO, M.E. et al.- Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin – one production by staphylococci isolated from mastitis in sheep.- APMIS, 1992 Feb, 100, 2, 132-134.

ORDEN, J.A., GOYACHE, J., HERNANDEZ, J. et al.- Production of staphylococcal enterotoxins and TSST – 1 by coagulase negative staphylococci isolated from ruminant mastitis.- Zentralbl Veterinarmed, 1992 Mar, 39, 2, 144-148.

ORDEN, J.A., GOYACHE, J., HERNANDEZ, J. et al.- Detection of enterotoxins and TSST – 1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and Immunoblot.- J Appl Bacteriol, 1992 Jun, 72, 6, 486-489.

PONCELET, J.L.- Les mammites ovines.- Bulletin des GTV, 1994, 111-114.

POPPOFF, M.R.- Entérotoxines bactériennes : structure, mode d'action et approche vaccinale.- Revue Médecine Vétérinaire, 1996, 147, 6, 425-438.

REHBY, L.- Les maladies de la peau et de la laine.- Bulletin des GTV, 1994, 3, 197-208.

REYNAUD, A., GIRAUDON, N., DUGOUR, L. et al.- Comparaison de deux milieux de culture pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (SCP) et mise en évidence de l'entérotoxine H dans quatre fromages français contaminés par des SCP.- Revue Méd Vét , 1997, 148, 8-9, 705-712.

ROBERSON, J.R., FOX, L.K., HANCOCK, D. et al.- Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms.- J Dairy Sci, 1994, 77, 3354-3364.

SCHELCHER, F.- Cours de pathologie ovine.- 1998.

SCOTT, D.W., GOURREAU J.M.- La folliculite et la furonculose staphylococciques des bovins.- Le Point Vétérinaire, 1991, 23, 138, 407-410.

SU, Y.C., LEE WONG, A.C.- Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins.- Journal of Food Protection, 1997, 60, 2, 195-202.

VERNOZY, C., MAZUY, C., LAPEYRE, C. et al.- Etude des souches de staphylocoques à coagulase négative (S.C.N.) isolées de fromages de chèvre en région Rhône-Alpes : identification, antibiotypie et entérotoxigenicité.- Revue Méd Vet, 1994, 145, 2, 107-113.

VERNOZY – ROZAND, C., MAZUY, C., PREVOST, G. et al.- Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese.- *Int J Food Microbiol* 1996 Jul, 30, 3, 271-280.

WIENEKE, A.A.- Comparison of four kits for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning.- *Int J Food Microbiol*, 1991, 14, 305-312.