FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

Nouveaux cas d'infections par *Prototheca zopfii* chez la vache laitière en Belgique

SWINNE D.* , MOUBAMBA D.* , LAGNEAU P.E.** , GEERTS S.*

* Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold, Département de Recherches Cliniques : Mycologie, Nationalestraat, 155, 2000 Antwerpen, Belgique.

**Fédération du Hainaut de Lutte contre les Maladies du Bétail, drève du Prophète, 2, 7000 Mons, Belgique

Correspondance: Prof. Danielle Swinne,
Tel.: 32(0)3/247.63.38
Fax: 32(0)3/216.14.31
E-mail: dswinne@itg.be

RESUME : Nous avons enquêté dans des fermes dans lesquelles des cas de mammites à *Prototheca sp.* ont été signalés : 651 échantillons (lait et matières fécales de vaches laitières, échantillons de l'environnement) ont été prélevés dans cinq fermes. Quatre avaient des antécédents de mammites à *Prototheca sp.*, la cinquième, sans antécédents, a servi de ferme contrôle.

Les isolements ont été effectués sur un milieu sélectif, les échantillons de lait ayant subi préalablement un traitement d'enrichissement.

L'identification des souches a été réalisée sur base de critères biochimiques. *Prototheca zopfii* a été isolé à partir de 22 échantillons de lait sur un total de 479. Vingt d'entre eux provenaient d'une même ferme. Les 20 échantillons de déjections prélevés dans cette ferme étaient également positifs. Le manque d'hygiène constitue très probablement un des facteurs essentiels permettant la multiplication de l'algue au sein des exploitations laitières.

Le peu d'efficacité des traitements fait que la prévention reste l'approche la plus rentable contre ce type de mammite.

INTRODUCTION

Les *Prototheca* sont des algues unicellulaires apparentées aux chlorelles mais ne faisant pas de photosynthèse (Arnold et Ahearn, 1972). Macroscopiquement, sur milieux gélosés, les colonies sont blanches, crémeuses. Elles ressemblent à celles des levures avec lesquelles elles sont fréquemment confondues.

Néanmoins, ces organismes ne bourgeonnent pas. Leur noyau subit un nombre irrégulier de divisions mitotiques immédiatement suivies d'un morcellement du cytoplasme et de la formation d'éléments individuels appelés "endospores". Suite à la pression exercée par ces endospores, la paroi de la cellule-mère va se rompre et la libération des endospores va se faire de manière passive. Les

Prototheca sp. sont polymorphes et de tailles variables. Les cellules peuvent être ovales, rondes, cylindriques ou réniformes. Les dimensions cellulaires varient selon les espèces. En ce qui concerne ces dernières, nous ne retiendrons comme espèces valides que trois d'entre elles, reprises par Pore (1985) : *Prototheca zopfii*, *Prototheca wickerhamii* et *Prototheca stagnora*. Cette dernière espèce ne pousse pas à 37°C et n'est pas, à l'inverse des deux premières, potentiellement pathogène. *P. zopfii* peut atteindre à maturité une taille de 30µm. Cet organisme est très polymorphe, ce qui lui a valu d'avoir divers noms : *P. chlorelloïdes*, *P. ciferrii*, *P. crieana*, *P. filamenta*, *P. hydrocarbonea*, *P. kriegeri*, *P. pastoriensis*, *P. portoricensis*, *P. salmonis*,

P. segbwema, *P. trispora*, *P. tropicalis* et *P. ubrizsyi*. *P. wickerhamii* ne possède quant à lui aucun synonyme. C'est une espèce plus petite dont les cellules-mères ne dépassent pas 13µm à maturité. *P. zopfii* est l'agent principal de la protothécose animale, alors que 95 % des cas humains qui se manifestent par des atteintes cutanées, articulaires ou systémiques sont provoqués par *P. wickerhamii*. La protothécose est observée chez de nombreux animaux en particulier chez le chien (Hollingsworth, 2000) et chez le bétail (Lagneau, 1996 ; Janosi *et al.*, 2001). Chez ce dernier, c'est la mammite qui s'avère être la manifestation prédominante, bien que la forme disséminée, c'est-à-dire avec atteinte des organes profonds, puisse s'y rencontrer (Taniyama *et al.*, 1994).

La protothécose est une affection cosmopolite, le plus souvent sporadique. Néanmoins, dans certaines circonstances, l'affection revêt un caractère épidémique entraînant, en l'absence de traitement efficace, l'abattage des animaux atteints (Frank *et al.*, 1969; Lagneau, 1996). En fait, il a été prouvé que *Prototheca sp.* peut être présent dans le lait sans qu'il n'y ait de signe pathologique (Pore *et al.*, 1987), ce qui suggère que le déclenchement de l'infection pourrait être lié à l'intervention de facteurs favorisants.

C'est en 1993, que les premiers cas de mammites bovines à *Prototheca sp.* ont été signalés dans la province du Hainaut (Lagneau, 1993). Il s'agissait de 3 cas de mammites aiguës dues à un organisme qu'à l'Institut de Médecine tropicale d'Anvers, nous avons identifié comme appartenant à l'espèce *Prototheca zopfii*. D'autres cas vinrent s'ajouter à ceux-là, ce qui nous a poussé à entreprendre une série d'enquêtes visant à essayer de déterminer quelles pouvaient être les sources de contamination. Le travail a consisté à isoler des souches de *Prototheca sp.* à partir d'échantillons de laits de vache ainsi qu'à partir de leurs déjections dans des fermes déclarées positives au cours des contrôles de routine. Les sources de contaminations ont été évaluées en effectuant des prélèvements de l'environnement dans les étables et autres endroits fréquentés par le bétail.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Un total de 651 échantillons comprenant des échantillons de lait et de matières fécales des vaches laitières ainsi que des échantillons prélevés dans leur entourage ont été examinés. Tous ont été stockés à 4°C entre le moment du prélèvement et leur ensementement. Parmi les 13 exploitations laitières où *Prototheca sp.* avait déjà été isolé lors de contrôles de routine (Lagneau, 1993), quatre (F1-F2-F3-F4) dont les exploitants ont accepté de nous accueillir, ont été visitées. Une cinquième ferme (Ft) dans laquelle *Prototheca sp.* n'avait jamais été isolé, a été choisie au hasard comme ferme témoin.

Echantillons de lait : 479 échantillons de lait ont été prélevés (manuellement après désinfection de l'extrémité du trayon à l'alcool) à raison de un par

Tableau I : Isolement de *Prototheca zopfii* à partir d'échantillons de lait

Fermes	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	Dénombrement des colonies
Ft	95	0	
F1	192	1	confluent
F2	80	1	confluent
F3	38	0	
F4	74	20	17 confluent 1 X 80 CFU/ml 1 X 120 CFU/ml 1 X 300 CFU/ml
Total	479	22	

CFU = colonie formant unité ; confluent = colonies indénombrables

Tableau II : Isolement de *Prototheca zopfii* à partir d'échantillons de matières fécales

Fermes	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	Dénombrement des colonies
Ft	24	0	
F1	48	5	2 X 25 CFU/ml 1 X 175 CFU/ml 1 X 150 CFU/ml 1 X 125 CFU/ml
F3	11	3	3 confluent
F4	20	20	20 confluent
Total	103	28	

CFU = colonie formant unité ; confluent = colonies indénombrables

Tableau III : Isolement de *Prototheca zopfii* à partir d'échantillons prélevés dans l'environnement de la ferme F1

Origines	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	Dénombrement des colonies
abreuvoirs	6	1	1 X 1200 CFU/ml
eaux d'égout	5	2	1 confluent 1 X 120 CFU/ml
mangeoires	2	0	
réserve d'aliments	1	0	
litière	1	0	
terre	12	8	4 confluent 2 X 5000 CFU/gr 2 X 50 CFU/gr
fumier	5	4	2 confluent 1 X 1000 CFU/gr 1 X 450 CFU/gr
Total	32	15	

CFU = colonie formant unité ; confluent = colonies indénombrables

Tableau IV : Isolement de *Prototheca zopfii* à partir d'échantillons prélevés dans l'environnement de la ferme F4

Origines	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	Dénombrement des colonies
abreuvoirs	7	4	4 confluent
eau ruisseau	9	1	1 X 1800 CFU/ml
mangeoires	4	3	3 confluent
litière	6	2	1 X 500 CFU/ml 1 X 150 CFU/ml
terre	4	4	4 confluent
fumier	5	5	5 confluent
déjections de chien	2	2	2 confluent
Total	37	21	

CFU = colonie formant unité ; confluent = colonies indénombrables

quartier chez 124 vaches, 17 quartiers étant taris. La répartition du nombre de prélèvements par ferme est reprise dans le tableau I.

Echantillons de matières fécales : les déjections de 103 des 124 vaches ont été examinées. Nous n'avons pas eu l'autorisation de prélever des échantillons de selles dans la ferme F2. La répartition du nombre de prélèvements par ferme est reprise dans le tableau II.

En fonction des résultats obtenus pour les laits et les déjections, nous avons choisi 2 fermes (F1 et F4) dans lesquelles, nous avons effectué des contrôles dans l'environnement.

Echantillons issus de l'environnement : 69 échantillons ont été prélevés soit 32 dans la ferme F1 et 37 dans la ferme F4. La répartition du nombre de prélèvements par type d'échantillon est détaillée dans les tableaux III et IV.

Enrichissement du lait : 5 ml de chaque échantillon sont additionnés à 1 ml d'un milieu favorisant l'enrichissement des échantillons de lait en *Prototheca*, le " PEM " (*Prototheca Enrichment Medium*) (Pore, 1987) contenu dans un tube à essai. Le mélange est incubé à 30°C pendant 4 jours.

Mise en culture des échantillons de lait après enrichissement et des échantillons liquides prélevés dans l'environnement : l'ensemencement (0,1ml) s'effectue sur milieu " PIM " (*Prototheca Isolation Medium*) (Pore, 1973) coulé en boîte de Petri. L'incubation est de 5 jours à 30°C.

Mise en culture des échantillons de matières fécales et des échantillons solides prélevés dans l'environnement :

2 g de matériel sont mis en suspension et homogénéisés dans 5 ml d'eau distillée. On en prélève 0,1 ml qui estensemencé sur le milieu " PIM " coulé en boîte de Petri. L'incubation est de 5 jours à 30°C.

Isolement et identification des *Prototheca* : les colonies sont si possible dénombrées. A défaut, lorsque la surface gélosée est recouverte d'un tapis de colonies, le résultat est noté " confluent ". Un examen microscopique a permis de différencier les *Prototheca* des levures, macroscopiquement fort similaires. En effet, les colonies de *Prototheca* ainsi que celles de la plupart des levures sont de

consistance crémeuse et de couleur blanchâtre. Les souches ont été purifiées et identifiées selon la technique de Pore (1985), cette dernière reposant sur la capacité à assimiler le tréhalose, caractère propre à *P. wickerhami* et sur la capacité à assimiler le propanol, caractère propre à *P. zopfii*. Ces deux espèces poussent en outre à 37°C, ce qui permet de les différencier de *P. stagnora*.

RÉSULTATS

Les résultats sont mentionnés dans les tableaux I, II, III et IV. Les tableaux I et II donnent le nombre d'échantillons de lait et de matières fécales prélevés dans chacune des fermes, le nombre d'échantillons positifs et les résultats du dénombrement des colonies. Aucun échantillon de la ferme témoin (Ft) n'est positif.

En ce qui concerne les laits, un échantillon sur 192 est positif dans la ferme F1, un échantillon sur 80 est positif dans la ferme F2, aucun échantillon sur 38 n'est positif dans la ferme F3 et 20 échantillons sur 74 sont positifs dans la ferme F4. En ce qui concerne les échantillons de matières fécales, 5 échantillons sur 48 sont positifs dans la ferme F1, 3 échantillons sur 11 sont positifs dans la ferme F3 et 20 échantillons sur 20 sont positifs dans la ferme F4. Les échantillons positifs le sont le plus souvent de manière confluyente tant pour les laits que pour les matières fécales.

Les tableaux III et IV donnent le nombre d'échantillons prélevés dans l'environnement, le nombre d'échantillons positifs et les résultats du dénombrement des colonies pour les fermes F1 et F4. Dans la ferme F1 sont positifs, un abreuvoir sur 6, 2 échantillons d'eau d'égouts sur 5, 8 échantillons de terre sur 12 et 4 échantillons de fumier sur 5. Dans cette ferme, les mangeoires et réserves d'aliments, ainsi que la litière sont négatives. Dans la ferme F4 sont positifs, 4 abreuvoirs sur 7, un échantillon d'eau du ruisseau sur 9, 3 mangeoires sur 4, 2 échantillons de litière sur 6, 4 échantillons de terre sur 4, 5 échantillons de fumier sur 5 et les 2 échantillons de déjections de chien. Dans cette dernière ferme, tous les types d'échantillons prélevés dans l'environnement sont positifs, très souvent de manière confluyente. Tous les isolats appartiennent à l'espèce *P. zopfii*.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'écologie des *Prototheca* a entre autres été étudiée par Pore et collaborateurs (1983) qui signalent que ces algues vivent sur les plantes et les arbres et se retrouvent donc plus fréquemment en milieu rural. Les animaux vont les ingérer et elles vont se retrouver dans leurs déjections qui seront à l'origine d'une nouvelle dissémination de l'algue. Selon Huerre et collaborateurs (1993), le portage est dans ce cas chronique, les éventuelles mammites souvent subcliniques (Abarca *et al.*, 2001), les animaux étant essentiellement des disséminateurs d'un écosystème à un autre. Par analogie avec ce que l'on sait au sujet des protothécoses humaines qui sont des infections opportunistes, les auteurs estiment que le développement de cas de protothécose chez l'animal fait suite à l'apparition de facteurs favorisants tels des blessures constituant des portes d'entrée, l'administration d'antibiotiques antibactériens ou antifongiques réduisant la compétition avec d'autres microorganismes ou encore l'administration de substances diminuant les mécanismes de défense de l'organisme, etc.

En ce qui concerne nos résultats, il y a très nettement un lien entre la positivité des déjections et celles des laits. L'abondance de *Prototheca zopfii* retrouvés dans les laits plaide en faveur d'une contamination de la mamelle à partir des déjections, suivie d'une multiplication de l'algue in situ, toute contamination des échantillons de lait au moment de leur prélèvement étant improbable étant donné que ce dernier a été effectué à la main après désinfection du trayon et que les échantillons ont ensuite été conservés à 4°C jusqu'au moment de leur ensemencement.

Les échantillons collectés dans l'environnement de la ferme F1 montrent que l'algue se retrouve en abondance dans le fumier, dans les échantillons de terre ainsi que dans l'eau des égouts. Les mangeoires, les réserves d'aliments pour bétail et la litière sont négatifs. Un seul échantillon d'eau d'abreuvoir est positif, sans doute contaminé par des matières fécales.

Dans la dernière ferme F4, où 20 sur 74 échantillons de lait et tous les échantillons de matières fécales sont positifs, on constate une importante

contamination du fumier, du sol mais aussi des mangeoires, de la litière. Les colonies isolées par ml d'eau en culture sur boîte de Pétri à partir des abreuvoirs sont cette fois indénombrables. Dans cette ferme, l'algue est aussi isolée en abondance à partir de déjections de chien qui est selon la littérature (Schultze *et al.*, 1998 ; Hollingsworth, 2000) parmi les animaux les plus fréquemment atteints de protothécose. Dans ce cas-ci, le chien ne présentait aucun signe clinique. Des enquêtes similaires à la nôtre, effectuées par divers auteurs (Anderson *et al.*, 1988 ; Da Costa *et al.*, 1996 ; Costa *et al.*, 1997) aboutissent à la conclusion que les *P. zopfii* sont des organismes vivant dans l'environnement de la ferme, s'y multipliant dans certains biotopes tels le fumier qui constituent des sources de contamination pour l'animal. Et si selon ces auteurs, les *Prototheca* ne sont pas des organismes excessivement virulents, ils peuvent néanmoins menacer la santé du bétail en présence de facteurs favorisants tels le manque d'hygiène marqué par la présence au sein de l'exploitation laitière de dépôts de matières organiques et d'eaux stagnantes facilitant le maintien, la multiplication et la dispersion de l'algue. Il s'agit d'un facteur favo-

risant que nous avons retrouvé dans la ferme F4 dans laquelle *Prototheca zopfii* se retrouve de manière constante dans tous les échantillons récoltés dans l'environnement, dans tous les échantillons de déjections de vaches laitières et dans 25 % des échantillons de lait.

En conclusion, il importe d'informer le milieu agricole d'une recrudescence des cas de mammites à *Prototheca sp.* au cours de ces dernières années non seulement en Belgique mais aussi dans d'autres pays d'Europe (Abarca *et al.*, 2001) et d'attirer son attention sur le fait que la faible efficacité des traitements (Kirk, 1991) rend la prévention, dont la prise de mesures d'hygiène, reste le moyen de lutte le plus rentable.

New cases of *Prototheca zopfii* infections in dairy cows in Belgium

SUMMARY

We investigated dairy farms where mastitis cases due to *Prototheca sp.* were reported :

651 samples (milk and faecal samples of the dairy cows, environmental samples) were collected from five dairy farms : four with a history of *Prototheca sp.* mastitis and one without as control.

The isolations were performed on a selective medium, the milk samples being first submitted to a concentration technique.

The identification of the strains was performed according to biochemical criteria. *Prototheca zopfii* was isolated from 22 out of 479 milk samples. Twenty positive samples came from a single farm.

The 20 faecal samples collected in this dairy farm were also positive. The lack of hygiene probably constitutes one of the crucial factors allowing the multiplication of the alga in dairy farms. As the available drugs have a low efficacy, prevention appears to be the best way to prevent this type of mastitis.

BIBLIOGRAPHIE

- ABARCA M.L., RUANO L., TORRE E., CABANES F.J. Subclinical bovine mastitis by *Prototheca zopfii* in Spain. *J. Mycol. Med.*, 2001, **11**, 159-160.
- ANDERSON K.L., WALKER R.L. Sources of *Prototheca spp* in a dairy herd environment. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1988, **193**, 553-556.
- ARNOLD P., AHEARN D.G. The systematics of the genus *Prototheca* with a description of a new species *Prototheca filamenta*. *Mycologia*, 1972, **64**, 265-275.
- COSTA E.O., MELVILLE P.A., RIBEIRO A.R., WATANABE E.T., PAROLARI M.C. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. *Mycopathologia*, 1997, **137**, 33-36.
- DA COSTA E.O., RIBEIRO A.R., WATANABE E.T., PARDO R.B., SILVA J.B., SANCHES R.B. An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca* species and *Nocardia* species on a farm in Sao Paulo, Brazil. *Vet. Res. Commun.*, 1996, **20**, 237-241.
- FRANK N., FERGUSON L.C., CROSS R.F., REDMAN D.R. *Prototheca*, a cause of bovine mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, 1969, **30**, 1785-1794.
- HOLLINGSWORTH S.R. Canine protothecosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 2000, **30**, 1091-1101.
- HUERRE M., RAVISSE P., SOLOMON H., AVE P., BRIQUELET N., MAURIN S., WUSCHER N. Protothécoses humaines et environnement. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1993, **86**, 484-488.
- JANOSI S., RATZ F., SZIGETI G., KULCSAR M., KERENYI J., LAUKO T., KATONA F., HUSZENICZA G. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *Vet. Q.*, 2001, **23**, 58-61.
- KIRK J.H. Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases. *Agri-Practice*, 1991, **12**, 15-20.
- LAGNEAU P.E. Premiers cas de mammite bovine à *Prototheca*. *Elev. Santé*, 1993, **52**, 5-6.
- LAGNEAU P.E. First isolation of *Prototheca zopfii* in bovine mastitis in Belgium. *J. Mycol. Méd.*, 1996, **6**, 145-148.
- PORE R.S. Selective medium for the isolation of *Prototheca*. *Appl. Microbiol.*, 1973, **26**, 648-649.
- PORE R.S., BARNETT E.A., BARNES W.C., WALKER J.D. *Prototheca* ecology. *Mycopathologia*, 1983, **81**, 49-62.
- PORE R.S. *Prototheca* taxonomy. *Mycopathologia*, 1985, **90**, 129-139.
- PORE R.S. Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen in milk. *Vet. Microbiol.*, 1987, **15**, 315-323.
- SCHULTZE A.E., RING R.D., MORGAN R.V., PATTON C.S. Clinical, cytologic and histopathologic manifestations of protothecosis in two dogs. *Vet. Ophthalmol.*, 1998, **1**, 239-243.
- TANIYAMA H., OKAMOTO F., KUROSAWA T., FURUOKA H., KAJI Y., OKADA H., MATSUKAWA K. Disseminated protothecosis caused by *Prototheca zopfii* in a cow. *Vet. Pathol.*, 1994, **31**, 123-125.