

# Comparaison du taux cellulaire et de la sensibilité antimicrobienne des germes responsables de mammite subclinique bovine entre les filières conventionnelle et biologique

BOUTET P.<sup>1\*</sup>, DETILLEUX J.<sup>2</sup>, MOTKIN M.<sup>1</sup>, DELIEGE M.<sup>1</sup>, PIRAUX E.<sup>3</sup>, DEPINOIS A.<sup>4</sup>,  
DEBLIQUY P.<sup>5</sup>, MAINIL J.<sup>6</sup>, CZAPLICKI G.<sup>4</sup>, LEKEUX P.<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Département des Sciences fonctionnelles, Physiologie  
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, Bât. B42, B-4000 Liège, Belgique
- <sup>2</sup> Département des Productions animales, Génétique quantitative  
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, Bât. B43, B-4000 Liège, Belgique
- <sup>3</sup> Comité du Lait  
Route de Herve 104, B-4651 Battice, Belgique
- <sup>4</sup> Association Régionale de Santé et d'Identification Animales  
Avenue A. Deponthière 40, B-4431 Loncin, Belgique
- <sup>5</sup> Association Régionale de Santé et d'Identification Animales  
Drève du Prophète 2, B-7000 Mons, Belgique
- <sup>6</sup> Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Bactériologie  
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, Bât. B43, B-4000 Liège, Belgique

Projet subventionné par la DGA – Direction de la Recherche du Ministère de la Région Wallonne

\* Correspondance : Tél : 32(0)4/366.40.30 ; Fax : 32(0)4/366.29.35 ; e-mail : philippe.boutet@ulg.ac.be

## RESUME

La mammite subclinique est une pathologie de première importance chez la vache laitière. L'élévation persistante du taux cellulaire qui en résulte engendre d'énormes pertes économiques pour toute la filière laitière. L'objectif de cette étude était de comparer les filières conventionnelle et biologique afin de déterminer les conséquences que des pratiques d'élevage différentes peuvent avoir sur les taux cellulaires ainsi que sur la fréquence des germes isolés et leur sensibilité aux antibiotiques. Quatre exploitations laitières conventionnelles et 4 biologiques avec des taux cellulaires de lait de tank  $>300 \times 10^3$  cellules/ml ont été sélectionnées, parmi lesquelles 47 et 44 vaches respectivement ont été investiguées. Chaque quartier a été prélevé 3 fois à 15 jours d'intervalle pour les analyses cellulaires, bactériologiques et de sensibilité aux antibiotiques. Quelle que soit la filière, les germes majeurs rencontrés étaient par ordre d'importance *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus dysgalactiae* et leur impact sur le taux cellulaire était très important. Les staphylocoques coagulase négative étaient les germes mineurs les plus fréquents et avaient un impact sur le taux cellulaire non négligeable. La sensibilité moyenne aux antibiotiques testés *in vitro* était significativement plus élevée en filière biologique pour les trois germes majeurs les plus fréquemment rencontrés. Cette étude suggère que l'usage moins abondant des antimicrobiens dans les exploitations biologiques sélectionnées pourrait expliquer, du moins en partie, les moindres taux d'antibiorésistance retrouvés.

## INTRODUCTION

L'inflammation de la glande mammaire ou mammite, et plus particulièrement la mammite subclinique, est considérée comme une des pathologies les plus importantes et coûteuses affectant le secteur laitier. Le taux de cellules somatiques (TCS) des quartiers infectés est augmenté plus ou moins for-

tement selon le type de germe, l'animal et l'intensité de l'infection. Une corrélation négative entre la production laitière et le TCS a été démontrée (Fetrow *et al.*, 1988). D'une part, les neutrophiles endommagent l'épithélium mammaire lors de leur migration et d'autre part, l'inflammation engendre une réaction locale qui perturbe le

fonctionnement des acini. Il en résulte une diminution significative de la production laitière (Kehrli et Shuster, 1994). De plus, il a été démontré que la présence d'un haut TCS perturbe à elle seule la fabrication et la qualité des produits laitiers fermentés (Klei *et al.*, 1998) ainsi que la conservation du lait pasteurisé (Ma *et al.*, 2000). Le

recours aux antibiotiques représente encore à l'heure actuelle le moyen de lutte le plus utilisé, notamment lors de la pratique du tarissement via l'administration de tubes d'antibiotiques à longue durée d'action. Or, pour traiter avec succès les infections intramammaires et augmenter l'efficacité de l'antibiothérapie, il est important de mieux connaître la prévalence et le profil d'antibiorésistance des principaux germes isolés de la glande mammaire. Cependant, le manque de temps et les considérations financières empêchent très souvent les praticiens de réaliser les tests nécessaires. Les choix thérapeutiques se font donc habituellement de façon empirique et sont basés essentiellement sur des informations antérieures. Dès lors, il apparaît primordial de périodiquement identifier les pathogènes mammaires et les changements de leurs profils d'antibiorésistance.

L'agriculture biologique, dont la philosophie est avant tout préventive, se réalise selon une réglementation stricte respectant un cahier de charges bien précis. Elle propose, par exemple, de réduire fortement l'utilisation des antimicrobiens. Les médicaments antibactériens sont souvent indispensables dans la pratique de la médecine vétérinaire mais leur efficacité peut être sérieusement compromise par le développement de résistance. Actuellement, les inquiétudes sur l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire rurale et le développement de résistance sont nombreuses et préoccupantes. En effet, ces résistances n'impliquent pas seulement une inefficacité de la thérapeutique chez l'animal traité. Vu la contagion possible d'autres animaux par des germes devenus résistants et la possibilité du transfert des facteurs de résistance d'une souche bactérienne à une autre, la résistance aux antibiotiques peut aussi aboutir à limiter l'efficacité des traitements chez d'autres individus, voire à l'homme. L'usage inapproprié des antibiotiques en médecine vétérinaire rurale pourrait en effet être responsable de la création de réservoirs de bactéries résistantes transmissibles à l'homme via son alimentation.

Ainsi, si l'utilisation des antibiotiques représente une pression sélective majeure encourageant le développement de résistance, réduire leur usage reviendrait alors à diminuer l'apparition de résistance. Cependant, l'usage des antibiotiques lors de la période

tarissement reste un moyen important de contrôle de la mammite bovine. Bien que l'impact d'un tel traitement sur le taux de guérison des mammites subcliniques et particulièrement celles dues au *Staphylococcus aureus* soit faible (Gruet *et al.*, 2001), l'utilisation des antibiotiques lors de la période sèche permet de baisser significativement le taux des nouvelles infections intramammaires survenant durant cette période dans les fermes à hauts taux de cellulaires (Berry et Hillerton, 2002).

L'objectif de cette étude était de comparer la fréquence et le profil d'antibiorésistance des germes intramammaires isolés d'exploitations conventionnelles et biologiques à taux cellulaires élevés, afin de déterminer les conséquences que des pratiques d'élevage différentes peuvent avoir sur les germes isolés et le taux cellulaire de l'exploitation.

## MATERIEL ET METHODES

### Exploitations et animaux

L'étude a été réalisée de mars à juin 2003. Huit exploitations bovines laitières, 4 conventionnelles et 4 certifiées biologiques depuis au moins 5 ans, avec des taux cellulaires de lait de tank  $>300 \times 10^3$  cellules/ml ont été sélectionnées. Parmi ces exploitations, 47 vaches de la filière conventionnelle et 44 de la filière biologique ont été investiguées. Le nombre d'animaux prélevés dans chacune des exploitations conventionnelles était respectivement de 10, 10, 12 et 15 vaches, soit des effectifs équivalents à 21%, 19%, 22% et 38% des animaux présents dans les 4 fermes. En filière biologique, le nombre de vaches investiguées était de 14, 9, 10 et 11, soit 21,2%, 36%, 16,7% et 23,4% des animaux présents dans les troupeaux respectifs. L'historique cellulaire mensuel des animaux sélectionnés était  $>400 \times 10^3$  cellules/ml au moins 3 fois au cours de la lactation en cours. Aucun épisode de mammite clinique n'a été observé durant une période de un mois précédant l'étude. Les glandes mammaires n'ont présenté aucun symptôme clinique tout au long de l'étude et le lait était d'aspect normal. Aucun animal n'a été traité durant une période d'au moins 3 semaines précédant l'étude et aucun traitement n'a été administré durant l'étude. Chaque quartier a été prélevé 3 fois à 15 jours d'intervalle pour les analyses cellulaires

et bactériologiques. Un bilan sanitaire général des exploitations, tel que densité de bétail, hygiène, appareil de traite, technique de traite, politique de tarissement, a été effectué et chaque exploitant questionné sur son attitude thérapeutique face aux mammites cliniques et aux hauts cellulaires.

### Collection des échantillons et comptage cellulaire

Les échantillons prélevés quartier par quartier étaient collectés juste avant la traite du matin, après avoir éliminé les premiers jets, selon les procédures recommandées par le *National Mastitis Council* (1999). Les extrémités des trayons étaient vigoureusement désinfectées avec une solution d'alcool à 70%. Approximativement 10ml de lait étaient collectés dans un tube stérile, directement réfrigéré et apporté à l'Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (ARSIA, Mons, Belgique) pour l'analyse bactériologique et l'antibiogramme. Un autre échantillon de 50ml était prélevé afin de réaliser le comptage de cellules somatiques total (Comité du lait, Battice, Belgique) à l'aide d'un compteur Fossomatic (Foss Electric, Hillerød, Danemark).

### Analyse bactériologique et test de sensibilité

Approximativement 2,5µl de chaque échantillon ont été étalés respectivement sur une gélose au sang (5%) et sur un milieu sélectif contenant du cristal violet et des sels de thallium (milieu Edwards). Les géloses étaient alors incubées à 37°C pendant 24 à 48h en atmosphère CO<sub>2</sub> (10%). Les *Staphylococci* peuvent présenter différents types d'hémolyse : une hémolyse (complète), une hémolyse (présence d'un halo opaque autour des colonies) et certaines souches ne possèdent pas d'hémolyse. Différents tests simples sont effectués pour étudier la pathogénicité de ces souches : le *clumping factor* ou coagulase libre liée et la recherche de désoxyribonucléase. Concernant la mise en évidence des *Streptococci*, la présence d'esculine dans le milieu sélectif permet la différenciation entre les *Streptococci agalactiae / dysgalactiae* (esculine négative) et les *Streptococci uberis / faecalis* (esculine positive). D'autres tests sont également disponibles pour une approche précise de l'espèce :

le test de Camp, la fermentation du tréhalose, le milieu bile-esculine, le test NaCl et enfin les tests d'agglutination rapide permettant une détermination du groupe des streptocoques selon la classification de Lancefield. L'identification des bactéries est réalisée à l'aide des techniques conventionnelles utilisées en bactériologie (Rosco Diagnostica A/S, 2004). L'identification de certaines bactéries nécessite une méthode prête à l'emploi (galeries API, BioMérieux, Bruxelles, Belgique).

Parmi l'ensemble des prélèvements, respectivement 33 et 30 échantillons se sont avérés contaminés et donc ininterprétables pour les filières conventionnelle et biologique, soit un taux respectif de 6% et de 5,8%. Comme un échantillon négatif ne signifie pas absence d'infection, et parce que *Staphylococcus aureus* est un germe dont la phase est intracellulaire et cyclique (Sears *et al.*, 1990), trois échantillons espacés de 15 jours ont été prélevés.

A partir des différents isolats de chaque prélèvement, la sensibilité d'une souche prélevée de façon aléatoire était testée vis-à-vis d'une sélection de 21 antibiotiques couramment utilisés en médecine vétérinaire. Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés selon la méthode de Kirby-Bauer, méthode de diffusion de disques d'antibiotiques en milieu gélosé (Milieu Mueller-Hinton, biorad, Nazareth Eke, Belgique) inoculé avec une suspension standardisée (Inoclic ND) de germes recueillis en culture pure et fraîche de moins de 24h. Au total, le laboratoire dispose de quatre ensembles de 7 antibiotiques : le premier est spécifique des germes GRAM+, le deuxième des germes GRAM- et les deux derniers sont constitués par des antibiotiques à activité dirigée contre les GRAM+ et les GRAM-. Les interprétations ont été réalisées selon les recommandations du *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).

### Analyses statistiques

Une régression logistique a été utilisée pour identifier les paramètres influençant significativement la probabilité d'avoir un prélèvement positif, pour un pathogène majeur, mineur, ou une association de germes. Les taux cellulaires ont été exprimés selon la moyenne arithmétique des valeurs correspondant à chaque prélèvement.

Pour les comparaisons statistiques de sensibilités aux antibiotiques, les résultats ont été divisés en deux catégories : « sensible » et « résistant ». La catégorie « résistant » comprenait les isolats dont les diamètres étaient soit « résistant », soit « intermédiaire ». Une analyse de Chi-carré a été utilisée pour déterminer l'association entre le mode d'utilisation des antibiotiques (conventionnel ou biologique) et la proportion de germes sensibles ou résistants pour chaque antibiotique testé. Un test exact de Fisher a été appliqué lorsque les espérances étaient inférieures à cinq dans la table de contingence 2x2.

## RESULTATS

### Pratiques d'élevage, données d'exploitations et bilan cellulaire

En filière conventionnelle, trois exploitations sur quatre ne possédaient pas de salle de traite. La traite s'effectuait directement en stabulation à logette. La méthode de traite variait : deux éleveurs ne préparaient pas le pis, un passait juste un papier sec sur les trayons et le dernier les lavait et les essuyait avec du papier. Tous utilisaient un produit de post-trempe. Seul un producteur signalait effectuer un contrôle annuel de son installation de traite. L'attitude face aux mammites cliniques aiguës se résumait par l'utilisation systématique de tubes d'antibiotiques instillés dans la glande mammaire, suivis d'une injection systémique si aucune amélioration n'est observée le lendemain (3 exploitations), voire d'une association tube-injection directement (1 exploitation). Concernant la problématique des taux cellulaires élevés, tous avaient recours à l'administration de tubes intramammaires d'antibiotiques lors du tarissement ou à la réforme. Les substances antibiotiques les plus fréquemment utilisées pour traiter une mammite ou une autre pathologie étaient : (1) les  $\beta$ -lactames (4 exploitations) tels que pénicilline et cloxacilline (pénicillines), ampicilline (aminopénicillines), céfalexine, céfécétrile, cefquinome, ceftiofur, céfopérazone (céphalosporines) ; (2) les macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS) (2 exploitations) tels que la spiramycine, la tylosine et la lincomycine ; (3) le florfenicol (2 exploitations).

En filière biologique, trois producteurs possédaient une salle de traite et le quatrième trayait directement en stabulation à logette. La préparation du pis s'effectuait à l'aide d'un chiffon

ou d'un papier sec ; un seul producteur lavait et essuyait les trayons. Tous utilisaient un produit de post-trempe, comme c'était le cas dans les quatre fermes conventionnelles. Deux exploitants reconnaissaient effectuer un contrôle annuel de leur installation de traite. L'attitude face aux mammites cliniques aiguës se résumait par l'utilisation de chlorure de magnésium dans l'eau de boisson et la vidange 2 fois/jour de la mamelle. Le chlorure de magnésium aurait la propriété d'augmenter le pouvoir phagocytaire des leucocytes (Barbaud, sans date). Si les symptômes ne s'amélioraient pas après 24-48h, deux éleveurs recouraient alors à un traitement antibiotique se composant de tubes intramammaires associés ou non à un traitement systémique. Un des éleveurs réformait sans utiliser d'antibiotique. Concernant la problématique des taux cellulaires élevés, un des éleveurs utilisait des antibiotiques lors du tarissement pour les animaux dont le TCS dépassait  $300 \times 10^3$  cellules/ml. Les autres utilisaient le lait pour les veaux puis réformaient. Les substances antibiotiques les plus fréquemment utilisées pour traiter une mammite ou une autre pathologie étaient représentées par la famille des  $\beta$ -lactames tels que pénicilline, cloxacilline, ampicilline, céfalone, céfalexine, cefquinome (3 exploitations).

Le tableau I reprend l'ensemble des paramètres généraux des vaches sélectionnées (âge, parité, mois de lactation, taux cellulaire moyen), ainsi qu'une classification selon la moyenne cellulaire des 3 prélèvements réalisés. Les paramètres concernant les vaches investiguées n'étaient pas significativement différents entre les deux filières. En filière conventionnelle, la moyenne cellulaire de l'ensemble des animaux était légèrement inférieure ( $904 \times 10^3$  cellules/ml) à la filière biologique ( $1032 \times 10^3$  cellules/ml) et la majorité des vaches a présenté un TCS moyen compris entre 400 et  $999 \times 10^3$  cellules/ml. En filière biologique, près de un animal sur deux a montré un TCS moyen  $>1000 \times 10^3$  cellules/ml. Le TCS moyen des quartiers dont l'analyse bactériologique s'est révélée négative pour l'ensemble des 3 prélèvements était presque 2 fois supérieur en filière biologique ( $914 \times 10^3$  contre  $554 \times 10^3$  cellules/ml en filière conventionnelle). Plus d'un tiers de ces quartiers négatifs présentait un taux cellulaire  $>400 \times 10^3$  cellules/ml quelle que soit la filière considérée (tableau I).

**Tableau I** - Nombre, paramètres généraux et classification cellulaire des animaux sélectionnés et des quartiers investigués dans les filières conventionnelle et biologique

| Paramètres                                    | Conventionnelle |      | Biologique  |      |
|---|-----------------|------|-------------|------|
|   | Nb              | %    | Nb          | %    |
| Nombre total de vaches en lactation           | 195             | 100  | 198         | 100  |
| Nombre de vaches investiguées                 | 47              | 24,1 | 44          | 22,2 |
| Age : moyenne ± DS (mois)                     | 73,7 ± 18,5     | -    | 76,3 ± 22,9 | -    |
| Parité : moyenne ± DS (année)                 | 3,4 ± 1,4       | -    | 3,8 ± 1,8   | -    |
| Stade de lactation : moyenne ± DS (mois)      | 6,3 ± 2,5       | -    | 5,3 ± 2,6   | -    |
| Taux cellulaire moyen (x 10 <sup>3</sup> /ml) | 904             | -    | 1032        | -    |
| Vaches < 200 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml      | 7               | 14,9 | 6           | 13,6 |
| 200 – 399 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml         | 9               | 19,1 | 6           | 13,6 |
| 400 – 999 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml         | 23              | 48,9 | 11          | 25,0 |
| > 1000 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml            | 8               | 17,0 | 21          | 47,7 |
| Nombre de quartiers investigués               | 183             | 100  | 170         | 100  |
| Quartiers < 200 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml   | 65              | 35,5 | 62          | 36,5 |
| 200 – 399 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml         | 40              | 21,9 | 20          | 11,8 |
| 400 – 999 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml         | 35              | 19,1 | 35          | 20,6 |
| > 1000 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml            | 43              | 23,5 | 53          | 31,2 |
| Quartiers négatifs pour les 3 prélèvements    | 47              | 25,7 | 71          | 41,8 |
| Taux cellulaire moyen (x 10 <sup>3</sup> /ml) | 554             | -    | 914         | -    |
| < 200 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml             | 20              | 42,6 | 30          | 42,3 |
| 200 – 399 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml         | 11              | 23,4 | 10          | 14,1 |
| 400 – 999 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml         | 8               | 17,0 | 14          | 19,7 |
| > 1000 x 10 <sup>3</sup> cell. /ml            | 8               | 17,0 | 17          | 23,9 |

### Germes et incidence sur le taux cellulaire

Le tableau II montre pour chaque filière le nombre et le pourcentage de germes majeurs, mineurs ou associations de germes isolés lors de chaque analyse bactériologique. La fréquence de chaque catégorie est ainsi exprimée sur l'ensemble des germes isolés au cours des 3 prélèvements. Le nombre total de germes isolés au cours des différents prélèvements était significativement plus élevé en filière conventionnelle qu'en filière biologique. Pour cette dernière, la fréquence d'échantillons positifs pour un germe majeur

était significativement plus importante qu'en filière conventionnelle. La fréquence des échantillons positifs pour un germe mineur était similaire dans les deux filières (48% en conventionnelle et 41,2% en bio). Par ailleurs, les associations de germes, c'est-à-dire la présence de 2 germes différents dans un même prélèvement, étaient rares voire inexistantes dans les deux filières investiguées. Quelle que soit la filière considérée, certaines exploitations ont montré une fréquence plus élevée de germes majeurs que de germes mineurs et la situation inverse s'est observée également (données non montrées). Ceci démontre clairement que le profil

bactériologique varie fortement d'une ferme à l'autre.

Ces résultats peuvent se décomposer par genre et espèce bactériens, renseignant dès lors sur la fréquence de chaque germe isolé. Le tableau III présente le nombre et le pourcentage des différents germes isolés par rapport aux échantillons positifs sur l'ensemble des 3 prélèvements, ainsi que leur impact sur le taux cellulaire. *Streptococcus uberis* était le pathogène majeur le plus fréquemment isolé dans les deux filières. En filière biologique, sa fréquence relative était significativement plus élevée (P=0,01) que pour le con-

**Tableau II** - Nombre et pourcentage d'échantillons positifs pour un germe majeur, mineur ou une association de deux germes lors de chaque prélèvement dans les filières conventionnelle et biologique

| Prélèvement     | Filière conventionnelle |    |    |       |      | Filière biologique |    |    |       |      | Différence significative |
|-----------------|-------------------------|----|----|-------|------|--------------------|----|----|-------|------|--------------------------|
|                 | 1                       | 2  | 3  | Total | %    | 1                  | 2  | 3  | Total | %    |                          |
| Type de germe   | Nb                      | Nb | Nb | Total | %    | Nb                 | Nb | Nb | Total | %    |                          |
| 1 majeur        | 23                      | 29 | 24 | 76    | 44,4 | 23                 | 17 | 28 | 68    | 57,1 | P < 0,05 <sup>(1)</sup>  |
| 1 mineur        | 31                      | 25 | 26 | 82    | 48,0 | 11                 | 21 | 17 | 49    | 41,2 |                          |
| 2 majeurs       | 0                       | 3  | 1  | 4     | 2,3  | 0                  | 0  | 0  | 0     | 0    |                          |
| 1 maj. + 1 min. | 1                       | 1  | 5  | 7     | 4,1  | 0                  | 0  | 2  | 2     | 1,7  |                          |
| 2 mineurs       | 0                       | 0  | 2  | 2     | 1,2  | 0                  | 0  | 0  | 0     | 0    |                          |
| Total germes    | 55                      | 58 | 58 | 171   | 100  | 34                 | 38 | 47 | 119   | 100  | P < 0,01 <sup>(2)</sup>  |

<sup>(1)</sup> Compare le pourcentage d'échantillons positifs.

<sup>(2)</sup> Compare le nombre total de germes isolés au cours des différents prélèvements.

**Tableau III** - Nombre et pourcentage des différents germes isolés par rapport aux prélèvements positifs sur l'ensemble des 3 prélèvements et leur impact sur le taux cellulaire dans les filières conventionnelle et biologique

| Paramètres                              | Conventionnel |                  |                             | Biologique |                  |                             | Différence significative |
|---|---------------|------------------|-----------------------------|------------|------------------|-----------------------------|--------------------------|
|   | Nb            | % <sup>(1)</sup> | TCS<br>x10 <sup>3</sup> /ml | Nb         | % <sup>(1)</sup> | TCS<br>x10 <sup>3</sup> /ml |                          |
| Prélèvements interprétables             | 516           | -                | 909                         | 486        | -                | 1065                        |                          |
| Prélèvements négatifs                   | 345           | -                | 752                         | 367        | -                | 1008                        |                          |
| Prélèvements positifs                   | 171           | 100              | 1221                        | 119        | 100              | 1236                        | P < 0,01 <sup>(2)</sup>  |
| <b>Germes majeurs</b>                   |               |                  |                             |            |                  |                             |                          |
| <i>Streptococcus uberis</i>             | 31            | 18,1             | 1626                        | 37         | 31,1             | 1003                        | P = 0,01 <sup>(3)</sup>  |
| <i>Staphylococcus aureus</i>            | 27            | 15,8             | 1365                        | 19         | 16,0             | 1586                        |                          |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i>       | 15            | 8,8              | 786                         | 11         | 9,2              | 1453                        |                          |
| <i>Escherichia coli</i>                 | 3             | 1,8              | 77                          | 1          | 0,8              | 137                         |                          |
| <b>Germes mineurs</b>                   |               |                  |                             |            |                  |                             |                          |
| Staphylocoques coagulase négative (SCN) | 42            | 24,6             | 404                         | 40         | 33,6             | 989                         |                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                  | 1             | 0,6              | 211                         | 0          | 0                | -                           |                          |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>         | 3             | 1,8              | 1395                        | 0          | 0                | -                           |                          |
| <i>Strepto. faecalis</i>                | 8             | 4,7              | 510                         | 4          | 3,4              | 683                         |                          |
| <i>Aerococcus viridans</i>              | 27            | 15,8             | 240                         | 5          | 4,2              | 1000                        | P < 0,05 <sup>(3)</sup>  |
| <i>Streptococcus sp.</i>                | 1             | 0,6              | 625                         | 0          | 0                | -                           |                          |
| <b>Associations de germes</b>           |               |                  |                             |            |                  |                             |                          |
| <i>S. uberis</i> + <i>S. aureus</i>     | 3             | 1,8              | 1968                        | 0          | 0                | -                           |                          |
| <i>S. uberis</i> + <i>E. coli</i>       | 1             | 0,6              | 512                         | 0          | 0                | -                           |                          |
| <i>S. uberis</i> + SCN                  | 2             | 1,2              | 124                         | 2          | 1,7              | 696                         |                          |
| <i>E. coli</i> + <i>S. faecalis</i>     | 1             | 0,6              | 77                          | 0          | 0                | -                           |                          |
| <i>E. coli</i> + <i>A. viridans</i>     | 4             | 2,3              | 78                          | 0          | 0                | -                           |                          |
| SCN + <i>S. faecalis</i>                | 1             | 0,6              | 10                          | 0          | 0                | -                           |                          |
| SCN + <i>A. viridans</i>                | 1             | 0,6              | 137                         | 0          | 0                | -                           |                          |

TCS, taux de cellules somatiques.

<sup>(1)</sup> Pourcentage exprimé par rapport aux prélèvements dont l'analyse bactériologique était positive.

<sup>(2)</sup> Compare le nombre total de germes isolés au cours des différents prélèvements.

<sup>(3)</sup> Compare le pourcentage d'échantillons positifs pour ce germe.

ventionnel (31,1% contre 18,1%). Les fréquences des autres germes majeurs étaient similaires dans les deux filières. *Staphylococcus aureus* était le second germe majeur le plus fréquemment isolé dans les deux filières (16%) suivi de *Streptococcus dysgalactiae* (9%). Le TCS dépassait le million de cellules/ml de lait pour la plupart des germes majeurs isolés (tableau III). Concernant les germes mineurs, les plus fréquemment isolés étaient les staphylocoques coagulase négative (SCN). La fréquence de ces germes ne diffère pas significativement entre les deux filières (tableau III). Le TCS moyen était de 404x10<sup>3</sup>cellules/ml en filière conventionnelle et de 989x10<sup>3</sup>cellules/ml en filière biologique (tableau III).

### Résistance des principaux germes pathogènes aux antibiotiques testés

Le tableau IV compare les valeurs de sensibilité et résistance aux antibiotiques testés pour les quatre germes le plus souvent rencontrés dans nos échantillons, à savoir *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* et les SCN. Que ce soit

en filière conventionnelle ou biologique, *Streptococcus uberis* était le germe présentant, en moyenne, le plus grand taux de résistance aux différents antibiotiques. Les résistances les plus importantes ont été observées pour la cloxacilline et la novobiocine (famille des  $\beta$ -lactames) ainsi que pour la kanamycine et la gentamicine (famille des aminosides). Aucune résistance n'a été constatée pour l'ampicilline et l'amoxicilline (famille des  $\beta$ -lactames, aminopénicillines) et le taux de résistance à la céfalexine, céphalosporine de 1<sup>re</sup> génération, était nul, contrairement à celui des céphalosporines de 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> générations. En filière conventionnelle, *Streptococcus uberis* a présenté des taux de résistance plus élevés qu'en filière biologique pour les macrolides tels que l'érythromycine (P=0,014), la spiramycine (P=0,044) ou la tylosine, ainsi que pour la lincomycine (P=0,005) (tableau IV).

*Staphylococcus aureus* était le germe présentant le moins de résistance en filière biologique, puisque seules deux substances ont présenté un taux de résistance de 20% (pénicilline et ampicilline). En production conventionnelle, le taux de résistance le plus important a

été observé pour la pénicilline (87,5%) et cette différence est significative (P=0,03) par rapport à la filière biologique. La résistance aux aminopénicillines était supérieure à celle rencontrée pour *Streptococcus uberis* (tableau IV). Une sensibilité maximale a été observée avec les céphalosporines de toute génération, le florfenicol, l'enrofloxacin et, *a contrario* de *Streptococcus uberis*, avec les aminosides (gentamicine et kanamycine).

Dans les deux filières, *Streptococcus dysgalactiae* a présenté une sensibilité maximale pour la pénicilline et les aminopénicillines, les céphalosporines, le florfenicol et la pirlmycine. Les résistances les plus importantes se sont rencontrées avec la novobiocine, la kanamycine, la tétracycline et la lincomycine. En filière conventionnelle, *Streptococcus dysgalactiae* a présenté un taux de résistance à la cloxacilline (12,5%) et la gentamicine (37,5%) plus élevé qu'en filière biologique mais cette différence n'est pas significative.

Les SCN ont présenté très peu de résistance à la plupart des antibiotiques testés, que ce soit en filière conventionnelle ou biologique. Le taux de

**Tableau VI - Comparaison entre les filières conventionnelle et biologique des résultats de sensibilité et résistance des principaux germes isolés à 21 antibiotiques**

| Germe         | Streptococcus uberis |            |       |             |            |       | Staphylococcus aureus |            |          |            |           |             | Streptococcus dysgalactiae |           |             |            |           |   | Staphylococcus coagulase négative |           |             |            |           |   |
|---------------|----------------------|------------|-------|-------------|------------|-------|-----------------------|------------|----------|------------|-----------|-------------|----------------------------|-----------|-------------|------------|-----------|---|-----------------------------------|-----------|-------------|------------|-----------|---|
|               | Conventionnel        |            |       | Biologique  |            |       | Conventionnel         |            |          | Biologique |           |             | Conventionnel              |           |             | Biologique |           |   | Conventionnel                     |           |             | Biologique |           |   |
|               | Sensible             | Résistant  | %     | Sensible    | Résistant  | %     | Sensible              | Résistant  | %        | Sensible   | Résistant | %           | Sensible                   | Résistant | %           | Sensible   | Résistant | % | Sensible                          | Résistant | %           | Sensible   | Résistant | % |
| Pénicilline   | 11 (100%)            | 0          | 0     | 8 (88,9%)   | 1 (11,1%)  | 11,1% | 1 (12,5%)             | 7 (87,5%)  | 4 (80%)  | 1 (20%)    | *         | 5 (100%)    | 0                          | 0         | 8 (100%)    | 0          | 0         | 0 | 9 (81,8%)                         | 2 (18,2%) | 4 (44,4%)   | 5 (55,6%)  |           |   |
| Cloxaciline   | 6 (54,5%)            | 5 (45,5%)  | 44,4% | 5 (55,6%)   | 4 (44,4%)  | 44,4% | 7 (87,5%)             | 1 (12,5%)  | 5 (100%) | 0          | 0         | 5 (100%)    | 0                          | 0         | 7 (87,5%)   | 1 (12,5%)  | 0         | 0 | 11 (100%)                         | 0         | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Novobiocine   | 8 (72,7%)            | 3 (27,3%)  | 44,4% | 5 (55,6%)   | 4 (44,4%)  | 44,4% | 7 (87,5%)             | 1 (12,5%)  | 5 (100%) | 0          | 0         | 3 (60%)     | 2 (40%)                    | 0         | 6 (75%)     | 2 (25%)    | 0         | 0 | 10 (90,9%)                        | 1 (9,1%)  | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Ampicilline   | 11 (100%)            | 0          | 0     | 9 (100%)    | 0          | 0     | 2 (25%)               | 6 (75%)    | 4 (80%)  | 1 (20%)    | 0         | 5 (100%)    | 0                          | 0         | 8 (100%)    | 0          | 0         | 0 | 10 (90,9%)                        | 1 (9,1%)  | 8 (88,9%)   | 1 (11,1%)  |           |   |
| Amoxicilline  | 7 (100%)             | 0          | 0     | 9 (100%)    | 0          | 0     | 5 (62,5%)             | 3 (37,5%)  | 5 (100%) | 0          | 0         | 5 (100%)    | 0                          | 0         | 6 (100%)    | 0          | 0         | 0 | 10 (90,9%)                        | 1 (9,1%)  | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Cefalexine    | 6 (100%)             | 0          | 0     | 9 (100%)    | 0          | 0     | 3 (100%)              | 0          | 5 (100%) | 0          | 0         | 5 (100%)    | 0                          | 0         | 6 (100%)    | 0          | 0         | 0 | 4 (100%)                          | 0         | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Cefquinome    | 8 (72,7%)            | 3 (27,3%)  | 27,3% | 8 (100%)    | 0          | 0     | 7 (100%)              | 0          | 4 (100%) | 0          | 0         | 8 (100%)    | 0                          | 0         | 8 (100%)    | 0          | 0         | 0 | 11 (100%)                         | 0         | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Ceftidur      | 7 (70%)              | 3 (30%)    | 30%   | 9 (100%)    | 0          | 0     | 4 (100%)              | 0          | 5 (100%) | 0          | 0         | 8 (100%)    | 0                          | 0         | 8 (100%)    | 0          | 0         | 0 | 6 (100%)                          | 0         | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Céfopérazone  | 7 (70%)              | 3 (30%)    | 30%   | 6 (100%)    | 0          | 0     | 5 (100%)              | 0          | 3 (100%) | 0          | 0         | 3 (100%)    | 0                          | 0         | 5 (100%)    | 0          | 0         | 0 | 9 (100%)                          | 0         | 7 (100%)    | 0          |           |   |
| Kanamycine    | 5 (45,4%)            | 6 (54,6%)  | 54,6% | 5 (55,6%)   | 4 (44,4%)  | 44,4% | 8 (100%)              | 0          | 5 (100%) | 0          | 0         | 3 (37,5%)   | 5 (62,5%)                  | 0         | 3 (37,5%)   | 5 (62,5%)  | 0         | 0 | 11 (100%)                         | 0         | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Gentamicine   | 5 (45,4%)            | 6 (54,6%)  | 54,6% | 5 (55,6%)   | 4 (44,4%)  | 44,4% | 8 (100%)              | 0          | 5 (100%) | 0          | 0         | 5 (62,5%)   | 3 (37,5%)                  | 0         | 5 (62,5%)   | 3 (37,5%)  | 0         | 0 | 11 (100%)                         | 0         | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Flortécol     | 6 (100%)             | 0          | 0     | 9 (100%)    | 0          | 0     | 4 (100%)              | 0          | 5 (100%) | 0          | 0         | 6 (100%)    | 0                          | 0         | 6 (100%)    | 0          | 0         | 0 | 5 (100%)                          | 0         | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Doxycycline   | 9 (90%)              | 1 (10%)    | 10%   | 9 (100%)    | 0          | 0     | 7 (100%)              | 0          | 4 (100%) | 0          | 0         | 6 (85,7%)   | 1 (14,3%)                  | 0         | 6 (85,7%)   | 1 (14,3%)  | 0         | 0 | 11 (100%)                         | 0         | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Tétracycline  | 10 (90,9%)           | 1 (9,1%)   | 9,1%  | 9 (100%)    | 0          | 0     | 7 (87,5%)             | 1 (12,5%)  | 5 (100%) | 0          | 0         | 5 (62,5%)   | 3 (37,5%)                  | 0         | 5 (62,5%)   | 3 (37,5%)  | 0         | 0 | 10 (90,9%)                        | 1 (9,1%)  | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Erythromycine | 5 (45,4%)            | 6 (54,6%)  | 54,6% | 9 (100%)    | 0          | 0     | * 7 (87,5%)           | 1 (12,5%)  | 5 (100%) | 0          | 0         | 4 (50%)     | 4 (50%)                    | 0         | 4 (50%)     | 4 (50%)    | 0         | 0 | 10 (90,9%)                        | 1 (9,1%)  | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Spiramycine   | 6 (54,6%)            | 5 (45,4%)  | 45,4% | 8 (100%)    | 0          | 0     | * 7 (87,5%)           | 1 (12,5%)  | 5 (100%) | 0          | 0         | 5 (62,5%)   | 3 (37,5%)                  | 0         | 5 (62,5%)   | 3 (37,5%)  | 0         | 0 | 10 (90,9%)                        | 1 (9,1%)  | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Tylosine      | 6 (54,6%)            | 5 (45,4%)  | 45,4% | 8 (88,9%)   | 1 (11,1%)  | 11,1% | 7 (87,5%)             | 1 (12,5%)  | 5 (100%) | 0          | 0         | 5 (62,5%)   | 3 (37,5%)                  | 0         | 5 (62,5%)   | 3 (37,5%)  | 0         | 0 | 10 (90,9%)                        | 1 (9,1%)  | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Prilymicine   | 5 (100%)             | 0          | 0     | 8 (88,9%)   | 1 (11,1%)  | 11,1% | 3 (100%)              | 0          | 4 (100%) | 0          | 0         | 4 (100%)    | 0                          | 0         | 5 (100%)    | 0          | 0         | 0 | 5 (100%)                          | 0         | 7 (87,5%)   | 1 (12,5%)  |           |   |
| Lincomycine   | 4 (36,4%)            | 7 (63,6%)  | 63,6% | 9 (100%)    | 0          | 0     | ** 6 (75%)            | 2 (25%)    | 5 (100%) | 0          | 0         | 5 (62,5%)   | 3 (37,5%)                  | 0         | 5 (62,5%)   | 3 (37,5%)  | 0         | 0 | 10 (90,9%)                        | 1 (9,1%)  | 7 (77,8%)   | 2 (22,2%)  |           |   |
| Triméthoprime | 7 (63,6%)            | 4 (36,4%)  | 36,4% | 8 (88,9%)   | 1 (11,1%)  | 11,1% | 8 (100%)              | 0          | 5 (100%) | 0          | 0         | 7 (87,5%)   | 1 (12,5%)                  | 0         | 7 (87,5%)   | 1 (12,5%)  | 0         | 0 | 11 (100%)                         | 0         | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Enrofloxacin  | 10 (90,9%)           | 1 (9,1%)   | 9,1%  | 9 (100%)    | 0          | 0     | 8 (100%)              | 0          | 5 (100%) | 0          | 0         | 8 (100%)    | 0                          | 0         | 8 (100%)    | 0          | 0         | 0 | 11 (100%)                         | 0         | 9 (100%)    | 0          |           |   |
| Moyenne       | 149 (71,6%)          | 59 (28,4%) | 28,4% | 164 (89,1%) | 20 (10,9%) | 10,9% | 121 (83,4%)           | 24 (16,6%) | 98 (98%) | 2 (2%)     | ***       | 126 (81,3%) | 29 (18,7%)                 | 0         | 126 (81,3%) | 29 (18,7%) | 0         | 0 | 195 (95,1%)                       | 10 (4,9%) | 177 (85,2%) | 9 (4,8%)   |           |   |

\*Valeurs des colonnes précédentes significativement différentes pour  $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  et \*\*\* $P < 0,001$ .

résistance à la pénicilline s'est montré le plus élevé.

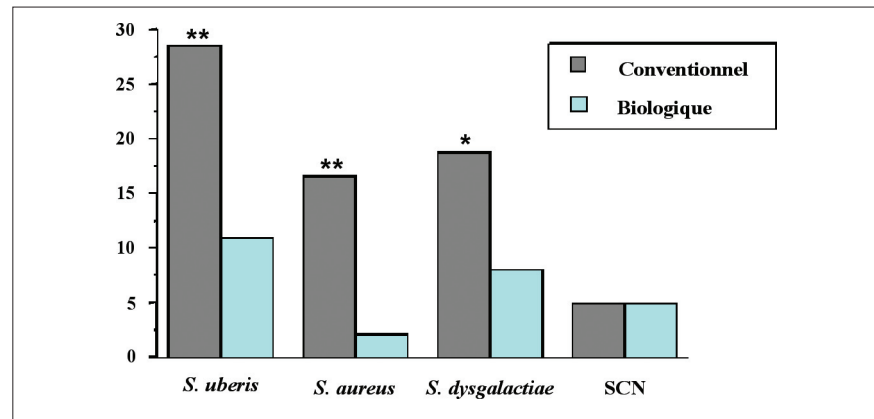
La figure 1 illustre le taux moyen de résistance des principaux germes rencontrés dans les exploitations investiguées aux 21 antibiotiques testés *in vitro*. Ce taux de résistance moyen a été significativement plus élevé en filière conventionnelle pour les trois germes majeurs rencontrés le plus fréquemment dans les exploitations échantillonnées.

## DISCUSSION

Cette étude comparative entre les filières conventionnelle et biologique renseigne de la fréquence et du profil d'antibiorésistance des germes potentiellement responsables de mammites subcliniques et cliniques. A l'heure actuelle, très peu d'études consacrées au secteur laitier ont comparé ces deux filières et évalué les conséquences de leurs pratiques de management différentes. Or, avant d'entreprendre un programme de lutte efficace contre la problématique cellulaire et ses conséquences sur la qualité des produits laitiers et sous-produits dérivés, il est primordial de mieux connaître la prévalence des germes rencontrés, leur virulence, indirectement reflétée par leur impact sur le taux cellulaire et la réponse inflammatoire qu'ils suscitent, ainsi que leur profil de résistance à différents antibiotiques.

Sur l'ensemble des prélèvements effectués parmi les animaux sélectionnés sur base de leurs TCS mensuels  $>400 \times 10^3$  cellules/ml, la moyenne cellulaire avoisinait le million de cellules/ml de lait, que ce soit en filière conventionnelle ou biologique. La moyenne cellulaire des quartiers dont le résultat bactériologique s'est révélé négatif pour les 3 prélèvements était largement au-dessus du seuil des  $200 \times 10^3$  cellules/ml, avec un taux  $>900 \times 10^3$  en filière biologique. Ce résultat est surprenant sachant que la littérature scientifique s'accorde à fixer à  $200 \times 10^3$  cellules/ml le seuil tolérable pour un quartier exempt d'infection (Paape *et al.*, 1991 ; Harmon, 1994 ; Kehrlé et Shuster, 1994 ; Schepers *et al.*, 1997). De plus, le statut infectieux de la glande mammaire est le plus important des facteurs affectant le taux cellulaire (Schepers *et al.*, 1997). La première hypothèse pouvant expliquer cette observation repose sur la possibilité que ces quartiers présentent en réalité une infection dont l'origine n'est pas bactérienne. D'autres microorga-

**Figure 1** : Résistance moyenne des principaux germes isolés aux différents antibiotiques testés. SCN, *Staphylococcus coagulase négative*.



\*Significativement différent de la filière biologique pour  $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ .

nismes tels que les levures, les champignons, ou encore les algues (*Prototheca spp.*) peuvent en effet être responsables d'infection de la glande mammaire. Une autre explication repose sur le pouvoir qu'ont certains germes, comme le *Staphylococcus aureus*, de pénétrer et survivre dans les cellules épithéliales mammaires et les macrophages (Hebert *et al.*, 2000 ; Kerro Dego *et al.*, 2002). Il devient dès lors plus difficile de les isoler en culture. Cependant, sachant que 3 prélèvements ont été réalisés sur chaque quartier, la probabilité de ne pas isoler un tel germe diminue (Sears *et al.*, 1990). Une troisième hypothèse expliquant le TCS élevé retrouvé dans les quartiers négatifs aux 3 analyses bactériologiques peut être liée au pouvoir phagocytaire des nombreux polymorphonucléaires neutrophiles présents dans ces quartiers. Le neutrophile est en effet le principal type cellulaire que l'on retrouve dans une glande mammaire atteinte de mammite clinique ou subclinique (Burvenich *et al.*, 1994 ; Boutet *et al.*, 2003 ; Paape *et al.*, 2003). Il se peut également que l'analyse bactériologique ne soit pas assez sensible et que par conséquent, certains des quartiers négatifs soient en réalité infectés. Un ensemencement trop faible de lait –  $2,5 \mu\text{l}$  au lieu de  $25 \mu\text{l}$ , par exemple – pourrait expliquer une sensibilité trop faible de l'analyse bactérienne. Cependant, sur le terrain, l'intérêt de l'analyse bactériologique se situe à l'échelle du troupeau et cette sensibilité individuelle, quand bien même trop faible, devient alors largement satisfaisante à cette échelle. Finalement, il peut encore s'agir d'une combinaison de ces différentes hypothèses.

Que ce soit en filière conventionnelle ou biologique, les germes majeurs rencontrés dans les différentes exploitations ont été par ordre d'importance

*Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus dysgalactiae* dont l'impact sur le TCS était important. Aucune souche de *Streptococcus agalactiae* n'a été isolée dans cette étude. Cette observation rejoint celles rapportées par d'autres études étrangères (Myllys *et al.*, 1994 ; Busato *et al.*, 2000 ; Guerin-Faubleé *et al.*, 2002). L'usage d'un produit de post-trempage pourrait en être la raison. Par ailleurs, *Streptococcus uberis*, reconnu comme germe d'environnement responsable de mammite clinique aiguë (Bramley, 1984), semble jouer un rôle prépondérant également dans la mammite subclinique où les germes contagieux occupent une place de première importance. Ceci a également été démontré dans une étude de Zadoks et collaborateurs (2003). Quant aux germes mineurs, ils ont été le plus représentés par la famille des SCN dont la contribution sur le TCS, bien que secondaire comparée aux pathogènes majeurs, n'était pas négligeable. Ces résultats sont en accord avec une étude menée par Rainard et collaborateurs (1990). Si les germes isolés dans cette étude étaient globalement similaires quelle que soit la filière envisagée, les profils bactériologiques rencontrés dans chacune des exploitations diffèrentaient largement d'une à l'autre.

Le développement de résistance antimicrobienne dépend de la présence de gènes codant pour une résistance et la pression sélective engendrée par l'utilisation des antibiotiques influence l'expression ou l'acquisition d'un phénotype de résistance. D'ailleurs, une relation étroite existe entre le taux de développement de résistance et les quantités d'antibiotiques utilisées (Lopez-Lozano *et al.*, 2000). La mammite représente une des causes les plus fréquentes d'utilisation des antimicrobiens en exploitation

laitière. La mammite clinique aiguë est quasi systématiquement traitée aux antibiotiques puisque le lait, visuellement anormal, ne peut de toute façon pas être commercialisé pour la consommation à ce moment. Le traitement des mammites subcliniques, diagnostiquées le plus souvent grâce au comptage des cellules somatiques dans le lait, est une pratique fréquemment recommandée via l'usage de tubes intramammaires administrés lors du tarissement. Dans cette étude, en filière conventionnelle, tous les éleveurs avaient recours aux antibiotiques lors de mammite clinique et lors de la période du tarissement. Dans les exploitations certifiées biologiques, l'utilisation des antimicrobiens étant normalement limitée aux seuls cas où des soins sont indispensables pour épargner des souffrances à l'animal, les éleveurs n'avaient recours à ces substances qu'en cas de mammite clinique persistante. Un seul éleveur utilisait des tubes intramammaires lors du tarissement pour les animaux présentant un TCS moyen  $>300 \times 10^3$  cellules/ml. Ces pratiques de management concordent avec celles évoquées dans une étude récente (Zwald *et al.*, 2004).

La méthode de diffusion des disques pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques, bien que largement utilisée et financièrement attractive, présente des limites. Elle est principalement utilisée dans un but qualitatif, distinguant les isolats en catégories « sensible, intermédiaire ou résistant », *a contrario* de la méthode de la concentration minimale inhibitrice qui elle est quantitative. Cette méthode est donc limitée pour détecter les changements subtils de sensibilité aux antibiotiques.

La plupart des isolats testés ici ont exprimé une sensibilité importante aux antibiotiques. Cette observation est en accord avec des études antérieures (De Oliveira *et al.*, 2000 ; Erskine *et al.*, 2002). Cependant, le taux moyen de résistance aux antibiotiques testés a été significativement plus élevé en filière conventionnelle pour les trois germes majeurs rencontrés le plus fréquemment dans les exploitations échantillonnées. A ce jour, très peu d'études scientifiques ont comparé les profils d'antibiorésistance de germes isolés de glandes mammaires bovines entre les filières conventionnelle et biologique. Toutefois, une étude récente a montré que les souches de *Staphylococcus aureus* isolées d'exploitations certifiées biologiques étaient significativement plus sensibles aux antibiotiques que les souches provenant d'exploitations con-

ventionnelles (Tikofsky *et al.*, 2003), ce qui concorde avec nos résultats. A notre connaissance, aucune étude comparative similaire n'a été réalisée avec des souches de *Streptococcus uberis* et de *Streptococcus dysgalactiae*.

*Streptococcus uberis* a montré un taux de résistance significativement plus important en filière conventionnelle pour l'érythromycine, la spiramycine et la lincomycine. De même, les souches de *Streptococcus dysgalactiae* isolées de fermes conventionnelles ont montré un taux de résistance à ces antibiotiques plus important qu'en filière biologique, bien que ce taux n'était pas significativement différent. Ces trois antibiotiques sont des membres de la famille des macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS) et jouent un rôle prépondérant en thérapeutique bovine. L'enquête réalisée dans cette étude a révélé que cette famille d'antibiotiques était utilisée dans deux exploitations de la filière conventionnelle. Les antibiotiques de la famille des MLS inhibent la synthèse protéique ribosomiale. Le phénotype le plus connu de résistance aux macrolides et lincosamides chez les coques GRAM+ résulte de la méthylation de l'ARN ribosomal 23S, dont la conséquence est la diminution de la liaison des MLS (Roberts, 2002). Des résistances aux macrolides et lincosamides ont été décrites chez différentes espèces de streptocoques isolées de glandes mammaires bovines (Dutta et Devriese, 1982 ; Roberts et Brown, 1994). Récemment, une étude française a rapporté un taux élevé de résistance à ces substances pour des souches de *Streptococcus uberis* isolées de cas de mammites cliniques (Guerin-Faubleee *et al.*, 2002).

*Staphylococcus aureus* a présenté un taux de résistance significativement plus important pour la pénicilline en filière conventionnelle. Les  $\beta$ -lactames, tels que les pénicillines et les céphalosporines, font parties des antibiotiques les plus largement utilisés pour le traitement des mammites. Dans cette étude, leur usage a été rapporté par les quatre exploitants de la filière conventionnelle contre deux en filière biologique. Les  $\beta$ -lactames agissent par inhibition de la synthèse des peptidoglycans de la paroi bactérienne en se liant à une protéine spécifique, appelée PBP pour *penicillin-binding-protein*. Les mécanismes de résistance envers cette famille d'antibiotiques comprennent la production de  $\beta$ -lactamases, enzymes responsables de l'hydrolyse des  $\beta$ -lactames, ou encore la

modification des PBPs (Hawkey, 2000). Les résistances dues aux gènes codant pour l'altération des PBPs et les  $\beta$ -lactamases peuvent être chromosomiques ou plasmidiques. Elles peuvent se transférer horizontalement et sont potentiellement engendrées par l'utilisation d'antibiotiques (Kruse et Sorum, 1994 ; Vesterholm-Nielsen *et al.*, 1999). Une étude comparative entre les filières conventionnelle et biologique a montré que les souches de *Staphylococcus aureus* isolées d'exploitations certifiées biologiques étaient significativement plus sensibles à la pénicilline, l'ampicilline, et la tétracycline (Tikofsky *et al.*, 2003). Dans la présente étude, *Staphylococcus aureus* a également montré un taux de résistance aux aminopénicillines (ampicilline et amoxycilline) plus faible dans les exploitations biologiques, bien que la différence n'était pas significative.

Considérant l'ensemble des présents résultats et ceux des études antérieures, il ressort de cette étude qu'il peut être suggéré que la pression sélective engendrée par l'usage plus abondant des antibiotiques dans les exploitations conventionnelles pourrait expliquer, du moins en partie, les taux d'antibiorésistance supérieurs retrouvés pour les trois germes majeurs les plus fréquemment isolés. Cependant, vu le faible nombre d'exploitations échantillonnées, une étude à plus large échelle ne peut être qu'encouragée afin de confirmer ou infirmer les résultats présentés ici. L'identification génotypique des souches de bactéries isolées devrait permettre d'élucider si les différences de sensibilité sont dues aux différences qu'il peut exister entre les souches rencontrées au sein d'une même ferme ou si des souches identiques sont capables de présenter différentes sensibilités.

## CONCLUSION

Cette étude comparative entre les filières conventionnelle et biologique nous renseigne sur la fréquence des germes potentiellement responsables de mammites, ainsi que leur impact sur les taux cellulaires. Elle nous indique que les germes rencontrés et leur contribution sur les taux cellulaires étaient globalement similaires dans les deux filières. Les isolats avaient une bonne sensibilité à la plupart des antibiotiques testés. Cependant, les trois germes majeurs rencontrés le plus fréquemment dans les exploitations échantillonnées présentaient une sensibilité moyenne aux antibiotiques significativement plus élevée en filière biologique



qu'en filière conventionnelle.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions la Direction Générale de l'Agriculture du Ministère de la Région Wallonne, et tout particulièrement les Drs E. Teller et J. Flaba de la Direction de la Recherche, pour le suivi scientifique et le financement de cette étude. Nous remercions aussi M. Leblond et I. Sbaï pour leur excellente assistance technique. Nous sommes également reconnaissants envers les exploitants pour le temps qu'ils nous ont consacré et les animaux mis à notre disposition. Philippe Boutet est boursier de recherche du « Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture » (FRIA, Belgique).

## ABSTRACT

### **A comparison of somatic cell count and antimicrobial susceptibility of subclinical mastitis pathogens in organic and conventional dairy herds**

Bovine subclinical mastitis is the most important disease affecting dairy cows. The fluctuating increase in somatic cell count (SCC) that occurs causes major economic losses in dairy industry. This comparative study between conventional and organic dairy herds was conducted in the aim to better characterize which consequences might have different management practices on SCC but also on the frequency of pathogens isolated and their antimicrobial susceptibility. Four conventional and four organic herds, with bulk milk SCC  $>300 \times 10^3$  cells/ml were selected, in which respectively 47 and 44 cows were investigated. Each quarter was sampled 3 times at 15 days interval for SCC, microbiological analysis and antimicrobial susceptibility. In both herd categories, major

pathogens isolated were by order of importance *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus dysgalactiae* with a great impact on SCC. *Coagulase negative staphylococci* were the most frequent minor germs and had a moderated but real impact on SCC. In certified organic dairy farms, the three most frequently isolated major pathogens were significantly more susceptible to antimicrobials in vitro. This study suggests that the limited use of antibiotics in organic dairy herds could explain, at least in part, the lower resistance obtained from analysed isolates.

---

## BIBLIOGRAPHIE

- BARBAUD M. Le magnésium protecteur. [en ligne] (sans date) Adresse URL : <http://www.biorespect.com/lesnews.asp?ID=4&NEWSID=91> Consulté le 12/05/2005
- BERRY E.A., HILLERTON J.E. The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, 2002, **1**, 112-121.
- BOUTET P., BUREAU F., DEGAND G., LEKEUX P. Imbalance between lipoxin A4 and leukotriene B4 in chronic mastitis-affected cows. *J. Dairy Sci.*, 2003, **11**, 3430-3439.
- BRAMLEY A.J. *Streptococcus uberis* udder infection--a major barrier to reducing mastitis incidence. *Br. Vet. J.*, 1984, **4**, 328-335.
- BURVENICH C., PAAPE M.J., HILL A.W., GUIDRY A.J., MILLER R.H., HEYNEMAN R., KREMER W.D., BRAND A. Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. *Vet. Q.*, 1994, **1**, 45-50.
- BUSATO A., TRACHSEL P., SCHALLIBAUM M., BLUM J.W. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Prev. Vet. Med.*, 2000, **44**, 205-220.
- DE OLIVEIRA A.P., WATTS J.L., SALMON S.A., AARESTRUP F.M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.*, 2000, **4**, 855-862.
- DUTTA G.N., DEVRIESE L.A. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics and degradation of lincosamide antibiotics in streptococci from bovine mastitis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1982, **5**, 403-408.
- ERSKINE R.J., WALKER R.D., BOLIN C.A., BARTLETT P.C., WHITE D.G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J. Dairy Sci.*, 2002, **5**, 1111-1118.
- FETROW J., ANDERSON K., SEXTON S. Herd composite somatic cell counts: average linear score and weighted average somatic cell count score and milk production. *J. Dairy Sci.*, 1988, **71**, 257-260.
- GRUET P., MAINCENT P., BERTHELOT X., KALTSATOS V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **3**, 245-259.
- GUERIN-FAUBLEE V., TARDY F., BOUVERON C., CARRET G. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2002, **3**, 219-226.
- HARMON R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, 1994, **7**, 2103-2112.
- HAWKEY P.M. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Intensive Care Med.*, 2000, **26**, Suppl 1:S9-13.
- HEBERT A., SAYASITH K., SENECHAL S., DUBREUIL P., LAGACE J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, **1**, 57-62.
- KEHRLI M.E. JR, SHUSTER D.E. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 619-627.

- KERRO DEGO O., VAN DIJK J.E., NEDERBRAGT H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet Q.*, 2002, **4**, 181-198.
- KLEI L., YUN J., SAPRU A., LYNCH J., BARBANO D., SEARS P., GALTON D. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. *J. Dairy Sci.*, 1998, **81**, 1205-1213.
- KRUSE H., SORUM H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **11**, 4015-4021.
- LOPEZ-LOZANO J.M., MONNET D.L., YAGUE A., BURGOS A., GONZALO N., CAMPILLOS P., SAEZ M. Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: a time series analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, **14**, 21-31.
- MA Y., RYAN C., BARBANO D.M., GALTON D.M., RUDAN M.A., BOOR K.J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.*, 2000, **83**, 264-274.
- MYLLYS V., HONKANEN-BUZALSKI T., HUOVINEN P., SANDHOLM M., NURMI E. Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs. *Acta Vet. Scand.*, 1994, **35**, 363-369.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 7th Ed. Approved Standard: M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, 2000.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis, revised edition. National mastitis council: Madison, 1999, 222 p.
- PAAPE M.J., BANNERMAN D.D., ZHAO X., LEE J.W. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.*, 2003, **5**, 597-627.
- PAAPE M.J., GUIDRY A.J., JAIN N.C., MILLER R.H. Leukocyte defense mechanisms in the udder. In: Burvenich C., Vandeputte-Van Messom G., Hill A.W. (Eds), *New insights into the pathogenesis of mastitis*. Simoens P.: Gent, 1991, 95-109.
- RAINARD P., DUCCELLIEZ M., POUTREL B. The contribution of mammary infections by coagulase-negative staphylococci to the herd bulk milk somatic cell count. *Vet. Res. Commun.*, 1990, **3**, 193-198.
- ROBERTS M.C. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Mol. Biotechnol.*, 2002, **3**, 261-283.
- ROBERTS M.C., BROWN M.B. Macrolide-lincosamide resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland. *Vet. Microbiol.*, 1994, **3-4**, 253-261.
- ROSCO DIAGNOSTICA A/S. Neo-sensitabs, susceptibility testing, User's guide, 17<sup>th</sup> Ed. Rosco: Taastrup, 2004, 121 p.
- SCHEPERS A.J., LAM T.J., SCHUKKEN Y.H., WILMINK J.B., HANEKAMP W.J. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J. Dairy Sci.*, 1997, **8**, 1833-1840.
- SEARS P.M., SMITH B.S., ENGLISH P.B., HERER P.S., GONZALEZ R.N. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, 1990, **73**, 2785-2789.
- TIKOFSKY L.L., BARLOW J.W., SANTISTEBAN C., SCHUKKEN Y.H. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. *Microb. Drug Resist.*, 2003, **9** : Suppl 1, S39-S45.
- VESTERHOLM-NIELSEN M., OLHOM LARSEN M., ELMERDAHL OLSEN J., MOLLER AARESTRUP F. Occurrence of the bla<sub>Z</sub> gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. *Acta Vet. Scand.*, 1999, **3**, 279-286.
- ZADOKS R.N., GILLESPIE B.E., BARKEMA H.W., SAMPIMON O.C., OLIVER S.P., SCHUKKEN Y.H. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol. Infect.*, 2003, **2**, 335-349.
- ZWALD A.G., RUEGG P.L., KANEENE J.B., WARNICK L.D., WELLS S.J., FOSSLER C., HALBERT L.W. Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 191-201.