

PLACE DE LA COLIBACILLOSE CHEZ LE JEUNE VEAU ET ANTIBIORÉSISTANCE DANS L'ALLIER (2011-2013)

PART OF COLIBACILLOSIS IN YOUNG CALF SCOURS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN FRANCE (2011 AND 2013)

Par Hélène LACROUTE⁽¹⁾

(Communication présentée le 2 Juin 2016

Manuscrit accept e le 10 Juin 2016)

R ESUM E

Les gastroentérites néonatales sont une cause majeure de pertes économiques en élevage bovin. Nous avons fait un état des lieux de cette pathologie dans l'Allier entre 2011 et 2013 chez des veaux de moins de huit jours. *Escherichia coli*, les rotavirus, coronavirus et *Cryptosporidium* sont recherch es dans les selles. La prévalence des agents pathogènes est supérieure chez les veaux malades, mais d'autres facteurs de risque semblent intervenir. Les niveaux d'antibiorésistance observ es sont inquiétants et sont parfois corr el es à l'utilisation des molécules antimicrobiennes. Des mesures préventives sont indispensables pour réduire, face à ces maladies, le recours aux antibiotiques.

Mots-clés : diarrhée néonatale, *Escherichia coli*, rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium parvum*, facteur de risque, antibiotique, antibiorésistance, veau.

ABSTRACT

Diarrhea in newborn calves is a major cause of economic losses in farms. The aim of this study was to update our knowledge about the prevalence of the major pathogens in the French county of Allier between 2011 and 2013. Feces of 125 diarrheic and 61 healthy less than 8-day-old calves have been sampled. Major pathogens (Escherichia coli, rotavirus, coronavirus and Cryptosporidium) were looked for. Though the various pathogens were isolated more frequently in diarrheic calves, other factors are also prominent. The antimicrobial resistance is worrying and the use of some of antibiotics is associated with increased resistance in E. coli isolated from unhealthy calves. Prevention is a key factor to face newborn calves' diarrhea and to reduce the use of antibiotics.

Key words: diarrhea, *Escherichia coli*, rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium parvum*, risk factor, antibiotic, antimicrobial resistance, bovine, newborn calf, Allier.

INTRODUCTION

Le veau nouveau-né est très exposé aux agents pathogènes présents dans l'environnement ou hébergés par ses cong n es. Des facteurs environnementaux favorisent la survenue de diarrhée/septicémie en augmentant l'exposition ou la sensibilité du veau à ces agents. La lutte contre ces maladies doit porter non seulement sur les agents pathogènes impliqués mais aussi sur ces facteurs favorisants. Il est donc essentiel de les identifier pour mettre en place les mesures curatives et préventives nécessaires.

Escherichia coli reste l'un des principaux agents impliqués dans les diarrhées/septicémies des veaux de moins d'une semaine. Il est parfois porteur de facteurs de virulence comme l'antigène CS31A ou F5, chez respectivement 25,7 % et 7,4 % des veaux malades (Fournier & Naciri, 2007). D'autres agents bactériens (salmonelles...), viraux (rotavirus, coronavirus...) ou parasitaires (*Cryptosporidium*...) sont aussi incriminés, seuls ou en association (Blanchard, 2012). Le traitement antimicrobien est bien souvent insuffisant et la restauration du volume hydrique

(1) Dr. Vétérinaire, 30 Av de l'Europe, 63140 Châtel Guyon
Courriel : helene.lacroute@gmail.com

et des équilibres ioniques est essentielle à la survie du veau malade. Il n'est pas non plus sans conséquence : il augmente le risque de voir émerger des résistances bactériennes qui, transmises aux germes de la flore commensale du tube digestif, la transforment en un réservoir de gènes de résistance. De tels gènes peuvent ensuite être transmis à des bactéries pathogènes contre lesquelles la lutte devient plus difficile, y compris à des bactéries infectant les humains, chez lesquelles peuvent apparaître de nouvelles résistances. On comprend ainsi les risques de développement de l'antibiorésistance, auxquels contribue l'utilisation des antibiotiques chez les animaux, en particulier celle des antibiotiques des dernières générations (céphalosporines de troisième et quatrième générations et fluoroquinolones).

Voulant rester une aide concrète aux vétérinaires praticiens et pour des raisons financières, nous nous sommes concentrés sur les principaux agents impliqués dans les diarrhées/septicémies des veaux de moins de huit jours identifiables en élevage. Le but est également de caractériser les *Escherichia coli* isolés et d'en étudier les profils d'antibiorésistance.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Critères d'inclusion des veaux et prélèvements

Le protocole de l'étude est présenté aux vétérinaires adhérents au Groupement Technique Vétérinaire de l'Allier, instigateur du projet, au cours de son assemblée générale en novembre 2011. Les vétérinaires de dix-sept cabinets répartis sur tout le département ont apporté leur concours.

Les veaux inclus dans l'étude, en 2012 et 2013, sont âgés de moins de huit jours et n'ont pas reçu d'antibiotique. Nous en avons retenu d'un à quatre par élevage, lors des deux saisons de prélèvement (janvier 2012-mai 2012 et octobre 2012-janvier 2013) (**figure 1, tableau 1**). Nous les classons en deux groupes : le lot M (malade) comprend les veaux présentant des signes de diarrhée et/ou de septicémie au moment du prélèvement ; ceux du lot T (témoin), apparemment indemnes, sont en plus choisis dans des élevages qui n'ont pas signalé de diarrhée ou septicémie au cours de la saison de vêlages précédente ni de l'année en cours. L'objectif est d'inclure 140 veaux dans le groupe M et 70 dans le groupe T.

Les prélèvements sont les mêmes, que les veaux appartiennent au groupe M ou T. Les fèces sont prélevées directement dans le rectum ou juste après leur émission. Elles sont récupérées dans des pots étiquetés et conservés entre +2 et +8 °C dans l'attente de leur envoi au laboratoire. Les prélèvements sont adressés, dans les conditions requises, au laboratoire Eurofins - Cœur de France dans les 48 heures, accompagnés chacun d'une feuille de commémoratifs.

Nb de veaux	Nb d'élevages
1 veau	165
2 veaux	8
3 veaux	4
4 veaux	1

Tableau 1 : Nombre (Nb) de veaux prélevés par élevage.

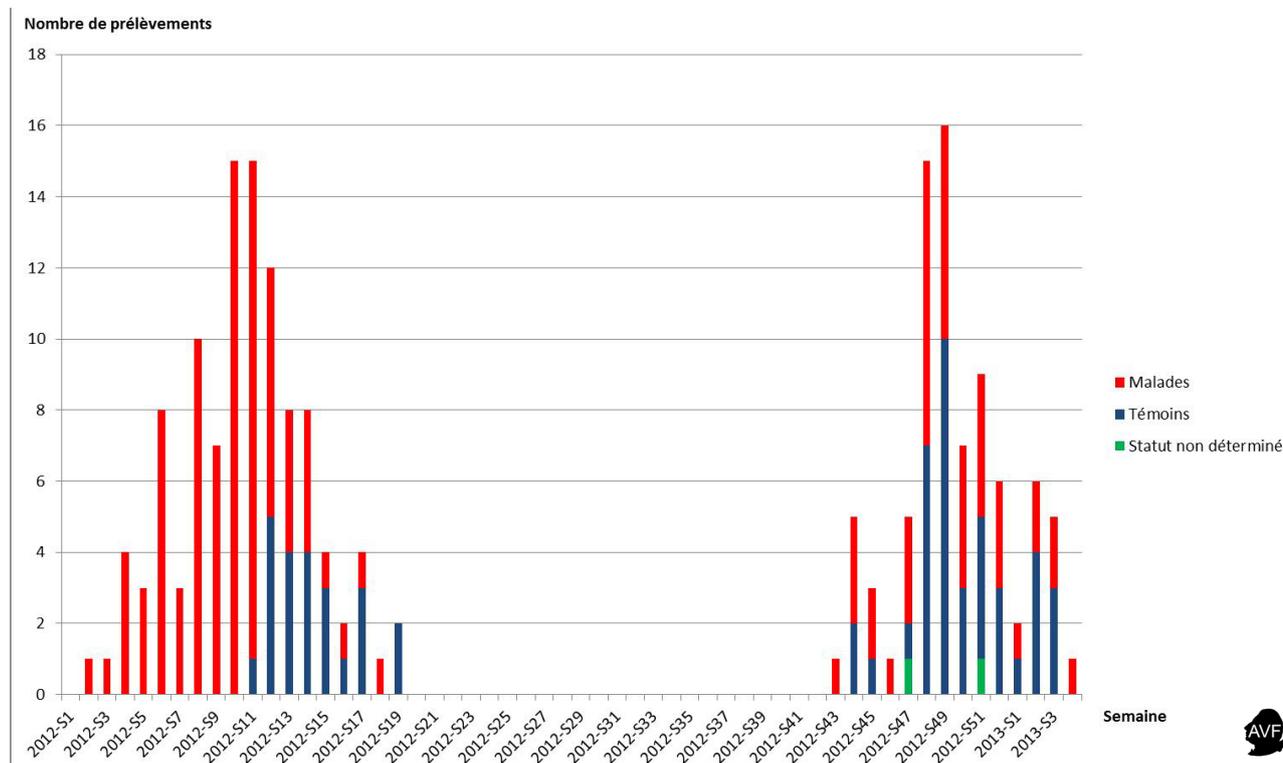


Figure 1 : Nombre de prélèvements réalisés en fonction de la semaine et du statut des veaux.

Méthodes d'analyses

La recherche étiologique concerne les principaux agents identifiables au chevet des veaux malades. De même, les facteurs de virulence recherchés sont ceux disponibles sur le terrain.

Rotavirus et coronavirus

La recherche des antigènes de rotavirus et de coronavirus est réalisée à l'aide de la trousse ELISA Pathasure® Enteritis (Biovet) (<http://www.biovet.ca/data/documents/mono/TRM-507-FR%20Pathasure%20Enteritis%204.pdf>). Les résultats de sensibilité et de spécificité du test par la méthode ELISA sont satisfaisants. En le comparant aux tests de référence, les spécificités sont respectivement de 77 % et 100 % pour les coronavirus et rotavirus (Thorns *et al.* 1992). Le résultat est qualitatif, considéré comme positif ou négatif pour chacun de ces virus (Blanchard, 2012). Toutefois, lorsque la coloration d'un puits est plus soutenue que celle du témoin négatif, mais beaucoup moins que celle du témoin positif, le résultat est considéré comme « positif faible ». Cette notion, bien que subjective, peut aider le vétérinaire dans sa démarche diagnostique. Dans notre analyse statistique, les résultats positifs et positifs faibles sont regroupés.

Cryptosporidium

Les ookystes de *Cryptosporidium* sont identifiés selon la méthode de Naciri (Naciri, 1994), qui permet leur dénombrement semi-quantitatif. Une échelle de scores s'étend de 0 en l'absence d'ookystes, à 5 pour plus de 20 ookystes par champ.

Escherichia coli

Pour dénombrer les *Escherichia coli*, on ensemence des géloses de Drigalski (Bio-Rad®) avec deux dilutions des fèces (10^{-6} et 10^{-8}). Après une incubation de 18 à 24 heures à 37 °C, le nombre de colonies formé est relevé. Pour la suite des opérations, nous nous sommes limités, pour des raisons économiques, à trois souches par veau. Ces souches sont repiquées sur gélose MINCA, puis identifiées par lecture d'une galerie ID 32E® (BioMérieux) par un lecteur MiniAPI® (BioMérieux). Elles sont ensuite typées par séro-agglutination sur lame avec des antisérums dirigés contre les antigènes capsulaire ou les fimbriae F5, F17, F41 et CS31A.

Conformément aux recommandations du CA-SFM (Comité de l'antibiogramme de la Société française de Microbiologie) (CA-SFM, 2013), la sensibilité à seize antibiotiques des souches isolées d'*E. coli* est systématiquement testée (www.sfm-microbiologie.org/). Les modalités sont celles de la méthode de diffusion ou des disques du CA-SFM et la catégorisation clinique en sensible, intermédiaire ou résistant suit celles du CA-SFM-antibiogramme vétérinaire de 2013 (http://www.sfm-microbiologie.org/page/page/showpage/page_id/90.html). La liste des 16 antibiotiques testés est rapportée sur la **figure 2** (les disques sont fournis par Biorad, à l'exception de la cefquinome fournie par Oxoid).

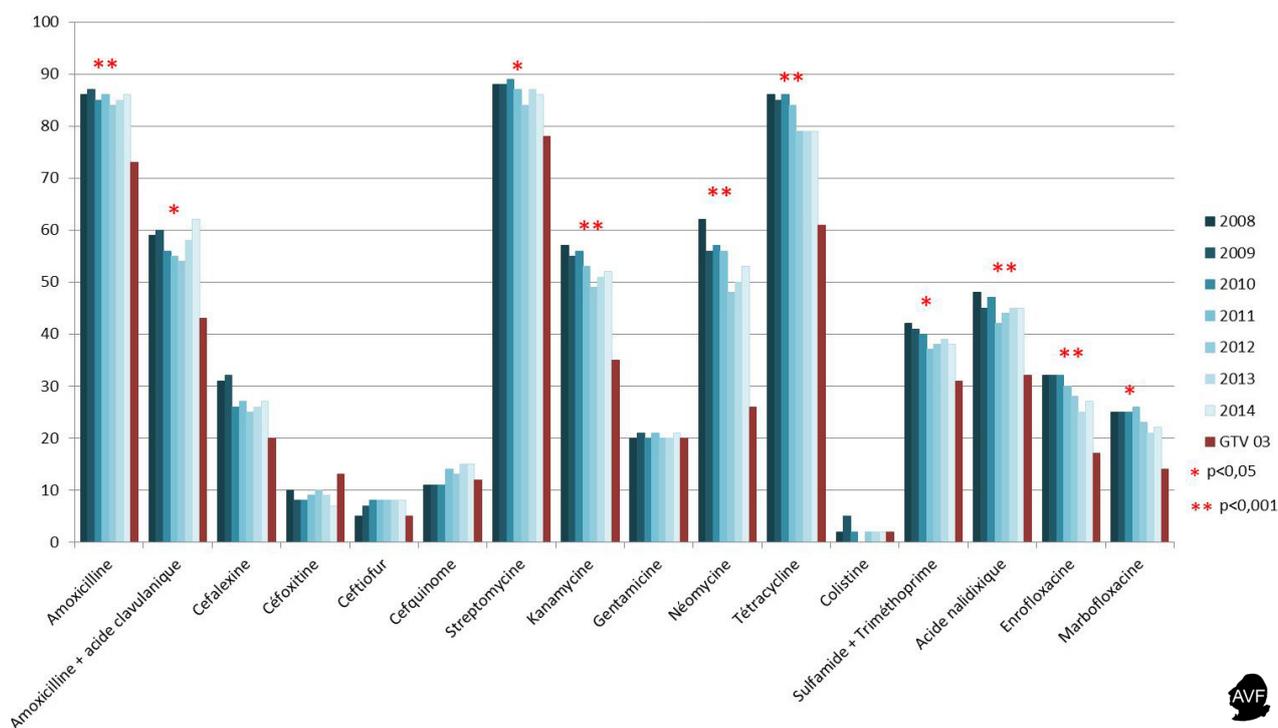


Figure 2 : *E. coli* : taux de résistance (%) chez les veaux M comparés à ceux du Résapath.

Les enquêtes

Afin de compléter cette étude, trois questionnaires ont été rédigés à destination des éleveurs et de leurs vétérinaires. Le but est d'identifier les principaux facteurs de risque rencontrés. Les détails de ces questionnaires (libellé des questions, réponses et leurs pourcentages), trop longs pour être exposés dans cet article, peuvent être retrouvés dans notre thèse (Lacroute, 2014).

Traitements statistiques des résultats

Les informations des fiches de commémoratifs jointes aux prélèvements et les résultats du laboratoire sont répertoriés dans différents classeurs Excel (Microsoft®). Les réponses aux questionnaires sont saisies dans un masque créé sous EpiData® 3.1 (Bruus & Lauritsen, 2008), permettant d'exporter ensuite ces données sous Excel.

Une fois les tableaux de données créés, les tests de Student, du Chi² et de Fischer sont réalisés à l'aide d'un site de statistiques (Collectif, 2013). Le logiciel de statistique EpiInfo® 7.0 (Centers for disease control and prevention, 2013) est également utilisé pour les analyses statistiques plus poussées. Pour des raisons de puissance statistique, l'étude de l'impact de l'exposition aux molécules sur les taux de résistance observés a nécessité de regrouper les molécules par famille. Par exemple, un veau exposé à une ou plusieurs céphalosporines est classé comme « exposé aux céphalosporines ». L'analyse molécule par molécule n'a pas été possible dans notre échantillon trop limité. Les résultats « intermédiaires » des antibiogrammes ont été regroupés avec les résultats « résistants ».

RÉSULTATS

Effectifs de l'étude

Le nombre total de veaux étant fixé à 140 pour le groupe M et 70 pour le groupe T, chaque cabinet vétérinaire s'est engagé à prélever 11 à 12 veaux malades et 5 à 6 veaux témoins. Le contrat est presque rempli avec un total de 190 veaux prélevés, dont 130 malades (M) et 62 témoins (T), soit respectivement 93% et 88 % des objectifs fixés.

		Malades	Témoins	Total	pa
Veaux positifs (%)	Rotavirus	18,4%	3,3%	13,4%	*
	Coronavirus	24,0%	3,3%	17,2%	*
	Cryptosporidium	24,8%	0%	16,7%	**
<i>E. coli</i> (% souches)	CS31A	33,4%	19,6%	28,7%	*
	F5	4,9%	0%	3,2%	*
	F17	3,0%	3,7%	3,2%	-
	F41	0%	0%	0%	-
	F5-F41	2,0%	0%	1,3%	-

Tableau 2 : Prévalence des agents pathogènes et types d'*E. coli* en fonction du statut des veaux.
a probabilité ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$

Des résultats de prélèvements sont exclus de l'analyse statistique pour plusieurs raisons : statut du veau non spécifié (M ou T), âge au moment du prélèvement de fèces n'entrant pas dans les critères d'inclusion (> 8 jours). En définitive, les résultats concernant l'analyse des fèces portent sur les 125 veaux M et les 61 veaux T.

Rotavirus, coronavirus et *Cryptosporidium*

Les prévalences de ces trois agents pathogènes chez les veaux M et T sont données dans le **tableau 2**. Quel que soit l'agent considéré, les différences observées entre les deux groupes sont significatives. Il est à noter qu'aucun veau T n'était porteur d'ookyste de *Cryptosporidium*.

L'étude des questionnaires met en évidence que ces agents sont plus fréquemment rencontrés chez les veaux M lorsque la surface allouée au couple mère-veau ou le paillage est jugé insuffisant par le vétérinaire (respectivement $p = 0,037$ et $p = 0,007$). Un quelconque effet de la vaccination des mères sur le statut des veaux ou sur leur excrétion virale n'a pas été démontré.

Escherichia coli

Prévalences

Tous les prélèvements réalisés au cours des deux années, sauf un, sont au moins porteurs d'une souche d'*E. coli*. Les dénombrements varient d'un prélèvement à un autre, de 1.10^6 à $7,4.10^9$ ufc/g de fèces (unités formant colonie par gramme de fèces), indépendamment du statut du veau. À partir des 186 prélèvements de fèces (125 M et 61 T), nous avons isolé 310 souches dont 203 chez les veaux M et 107 dans le groupe T : la différence du nombre moyen de souches isolées par veau (1,62 vs 1,75) n'est pas significative.

Cent treize des 310 souches portent au moins l'un des facteurs de virulence recherchés (88 souches issues de veaux M et 25, de veaux T). Plus de 75 % des souches présentent le facteur de virulence CS31A. Si l'on ne prend en compte que les souches que nous pouvons typer, les veaux M présentent en moyenne 0,70 souche caractérisée par l'un des quatre facteurs de virulence recherchés, contre 0,41 pour les

veaux T : cette différence est statistiquement significative ($p = 0,0005$) (**tableaux 3 et 4**).

E. coli est isolée seule dans les fèces de 46,4 % des veaux M et de 93,4 % des veaux T ($p = 0,0002$). Elle est associée à un seul des trois autres agents recherchés chez 40,8 % des veaux M et un peu moins de 7 % des veaux T. L'association de trois pathogènes est observée dans les fèces de 11,2 %, de veaux M mais jamais observée dans le lot T. Les quatre pathogènes ne sont identifiés dans les fèces que d'un seul veau, le colibacille étant une souche CS31A et le veau appartenant au groupe M (**tableau 5**).

Antibiorésistance chez les 310 souches isolées de *E. coli*

Taux de résistance à chaque antibiotique et influence du statut de l'animal

Les catégories cliniques intermédiaire et résistante sont comptabilisées sous la seule rubrique résistante.

Indépendamment du statut des veaux, les taux de résistance à un antibiotique, (ou pourcentage de souches résistantes à cet antibiotique) sont très variables d'une molécule à une autre : sur l'ensemble des souches isolées, les valeurs varient d'1 % pour la colistine à 71,2 % pour la streptomycine (**tableau 6**). On retiendra que le taux de résistance à la cefquinone, céphalosporine de quatrième génération, est plus de deux fois supérieur à celui du ceftiofur, céphalosporine de troisième génération. L'utilisation de la streptomycine risque d'aboutir à un échec thérapeutique dans près de trois-quarts des cas. À l'inverse, la gentamicine est encore

E. coli	Malades	Témoins	Total
Souches typables	88	25	113
Souches ne présentant aucun des 4 facteurs recherchés	115	82	197
Total	203	107	310

Tableau 3 : Répartition du nombre de souches d'*E. coli* présentant ou non au moins un des facteurs de virulence en fonction du statut du veau.

Facteurs	Total		Malades		Témoins		p ^a	Significativité
	Nb	%	Nb	%	Nb	%		
CS31A	89	78,8	68	77,3	21	84	0,0103	*
F5	10	8,8	10	11,4	0	0	0,0172	*
F17	10	8,8	6	6,8	4	16	0,7417	-
F41	0	0	0	0	0	0	1	-
F5-F41	4	3,5	4	4,5	0	0	0,3024	-
Total	113		88		25		0,0005	**

Tableau 4 : *E. coli* : distribution des facteurs de virulence en nombre et pourcentage (%) selon le statut du veau.

^a probabilité ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$

assez efficace, avec un taux de résistance de 15 % (et 20 % chez les veaux malades). La résistance aux tétracyclines est importante, avec plus de 60 % des *E. coli*. Au contraire, la colistine est l'antibiotique qui présente le plus faible taux de résistance (inférieur à 1%), avec seulement trois souches résistantes, toutes isolées de veaux malades.

Comme on peut l'observer dans le **tableau 7**, les taux de résistance des souches isolées des veaux M sont presque toujours supérieurs à ceux des souches issues des veaux T, et ce de façon significative pour 9 des 16 molécules testées :

- l'amoxicilline, avec un OR = 1,9741 (IC95% = [1,2097 ; 3,2215], $p = 0,0061$) ;
- l'association amoxicilline + acide clavulanique, avec un OR = 2,4971 (IC95% = [1,4760 ; 4,2245], $p = 0,0005$) ;
- la céfoxitine, avec OR = 2,4972 (IC95% = [0,9946 ; 6,2695], $p = 0,0451$). Cette association n'est toutefois pas extrapolable en dehors de notre échantillon ;
- la cefquinome, avec un OR = 2,7315 (IC95% = [1,0115 ; 7,3764], $p = 0,0401$) ;
- la streptomycine, avec un OR = 2,3764 (IC95% = [1,4342 ; 3,9375], $p = 0,0007$) ;
- la gentamicine, avec OR = 3,4978 (IC95% = [1,5096 ; 8,1050], $p = 0,0022$) ;
- l'acide nalidixique, avec OR = 2,8786 (IC95% = [1,5491 ; 5,3491], $p = 0,0006$) ;
- l'enrofloxacin, avec OR = 3,3801 (IC95% = [1,3717 ; 8,3294], $p = 0,0055$) ;
- la marbofloxacin, avec OR = 2,5932 (IC95% = [1,0360 ; 6,4913], $p = 0,0359$).

Il est particulièrement intéressant de remarquer la très grande différence observée concernant l'acide nalidixique, molécule utilisée pour évaluer le risque d'apparition de résistance aux fluoroquinolones.

Taux de résistance des germes en fonction des cabinets vétérinaires responsables des prélèvements

À quelques exceptions près, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les taux de résistance des germes isolés à partir des prélèvements réalisés par les différents cabinets vétérinaires. Si l'on analyse molécule par molécule les proportions de veaux présentant au moins une souche résistante, les différences entre clientèles ne sont significatives que dans quelques rares cas. Ainsi pour deux cabinets, les pourcentages de veaux ayant une souche ou plus, résistante à au moins une des pénicillines testées, est de 55 % et 59 %, ce qui est inférieur à la moyenne de l'ensemble des cabinets (81 %) (avec respectivement des OR de 0,2514 et 0,2877, des IC95% de [0,0721 ; 0,8759] et [0,1012 ; 0,8181] et des valeurs de p de 0,0361 et 0,0227). Pour un cabinet,

	M	T	Total
Nombre de veaux total	125	61	186
Seuls ou associés	M	T	Total
<i>E. coli</i>	124	61	185
Rotavirus	23	2	25
Coronavirus	30	2	32
Cryptosporidium	30	0	30
Total	207	65	272
1 seul agent	M	T	Total
<i>E. coli</i>	58	57	115
Rotavirus	0	0	0
Coronavirus	0	0	0
Cryptosporidium	1	0	1
Total	59	57	116
2 agents	M	T	Total
<i>E. coli</i> + Rotavirus	14	2	16
<i>E. coli</i> + Coronavirus	18	2	20
<i>E. coli</i> + Cryptosporidium	19	0	19
Rotavirus + Coronavirus	0	0	0
Rotavirus + Cryptosporidium	0	0	0
Coronavirus + Cryptosporidium	0	0	0
Total	51	4	55
3 agents	M	T	Total
<i>E. coli</i> + Rotavirus + Coronavirus	5	0	5
<i>E. coli</i> + Rotavirus + Cryptosporidium	3	0	3
<i>E. coli</i> + Coronavirus + Cryptosporidium	6	0	6
Rotavirus + Coronavirus + Cryptosporidium	0	0	0
Total	14	0	14
4 agents	M	T	Total
<i>E. coli</i> + Rotavirus + Coronavirus + Cryptosporidium	1	0	1
Total	1	0	1

Tableau 5 : Associations d'agents pathogènes et fréquence d'observation dans notre étude selon le statut du veau. (M : malades ; T : témoin)

le taux de résistance aux tétracyclines (40,0 %) est inférieur au taux de résistance calculé pour l'ensemble des cabinets (74 %) (OR = 0,1912, IC95% = [0,0641 ; 0,5701] et $p = 0,0031$). Pour un dernier cabinet, le taux de résistance aux fluoroquinolones (67 %) est par contre supérieur à la valeur globale (39 %) (OR = 3,4688, IC95% = [1,1355 ; 10,5966] et $p = 0,0280$).

Antibiotiques	%	
Amoxicilline	67,4% ^a	
Amoxicilline + acide clavulanique	36,10%	
Céfaloxine	17,30%	
Cefoxitine	10,30%	
Ceftiofur	4,50%	
Cefquinome	9,30%	
Streptomycine	71,20%	
Kanamycine	33,90%	
Gentamicine	15,00%	
^b Néomycine	27,11%	24,31%
Tétracycline	60,10%	
Colistine	1,00% ^a	
Sulfamide + triméthoprim	26,50%	
Acide nalidixique	25,60%	
Enrofloxacin	12,80%	
Marbofloxacin	10,50%	

Tableau 6 : Taux de résistance (%) vis-à-vis de 310 souches d'*E. coli*.

a : en gras, taux supérieur à 50% ; b : pour la néomycine, les taux observés au cours des années 1 (à gauche) et 2 (à droite) étant statistiquement différents, ils n'ont pas pu être regroupés ($p = 0,07$ pour les témoins).

	Malades	Témoins	OR	pa	Significativité
Amoxicilline	72,70%	57,40%	1,97	0,0061	**
Amoxicilline + acide clavulanique	42,90%	23,10%	2,5	0,0005	***
Céfaloxine	19,50%	13,00%		0,2821	-
Cefoxitine	12,80%	5,60%	2,5	0,0451	*
Ceftiofur	4,40%	4,60%		0,9367	-
Cefquinome	11,70%	4,60%	2,73	0,0401	*
Streptomycine	77,60%	59,30%	2,38	0,0007	***
Kanamycine	35,10%	31,50%		0,5177	-
Gentamicine	19,50%	6,50%	3,5	0,0022	***
Néomycine	Année 1	24,40%	33,30%	0,2685	-
	Année 2	29,70%	20,30%	0,1937	-
Tétracycline	61,50%	57,40%		0,4861	-
Colistine	1,50%	0,00%		0,2065	-
Sulfamide + triméthoprim	29,80%	20,40%		0,0737	-
Acide nalidixique	31,10%	13,90%	2,88	0,0006	***
Enrofloxacin	16,60%	5,60%	3,38	0,0055	**
Marbofloxacin	13,20%	5,60%	2,59	0,0359	*

Tableau 7 : *E. coli* : taux de résistance (%) par antibiotique et par statut.

a : probabilité : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,005$

Cependant, nous avons pu observer un taux de résistance supérieur pour certaines molécules chez les veaux M des cabinets utilisant celles-ci. La comparaison des résultats de deux cabinets différents a permis de mettre en évidence des différences de résistance significatives pour certaines molécules comme la cefquinome ou la gentamicine (avec des taux respectifs de 0% et 28% chez les veaux M pour ces deux molécules, $p = 0,017$) (Thiercy *et al.* 2015)

Profils de résistance

Plusieurs profils de résistance caractéristiques ont été observés. Par exemple, 12 souches sont productrices de bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) (résistantes à l'amoxicilline, sensibles ou intermédiaires à la céfoxitine, intermédiaires ou résistantes au ceftiofur et présentant une synergie entre l'amoxicilline-acide clavulanique et le ceftiofur). Lors de la réalisation des antibiogrammes, les disques antibiotiques imprégnés de ces deux molécules sont disposés l'un à côté de l'autre afin d'observer cette synergie. Lorsque c'est le cas, une mention spécifique est portée sur la feuille de résultat. Six de ces douze souches présentent également une résistance à l'ensemble des quinolones et fluoroquinolones testées.

Concernant la famille des aminosides, dont quatre molécules sont testées dans notre étude (streptomycine, kanamycine, gentamicine et néomycine), certains profils particuliers sont plus fréquemment observés. Ainsi 28,1 % des germes isolés ne présentent aucune résistance aux aminosides, mais 11,9 % sont résistants à toutes les molécules testées. Les deux autres profils les plus couramment rencontrés sont une résistance unique à la streptomycine (33,9 % des cas) ou une résistance conjointe à la streptomycine, à la kanamycine et à la néomycine (22,0 % des cas).

Pour ce qui est des résistances aux quinolones et aux fluoroquinolones, les résultats coïncident avec le phénomène de résistance apparaissant par paliers successifs rapportés dans la littérature (Wolfson & Hooper, 1985). Ainsi, des 239 germes sensibles à l'acide nalidixique (73,1 %), aucun ne présente de résistance aux deux fluoroquinolones testées. Parmi les 88 souches résistantes à l'acide nalidixique, 44 (50 %) sont également sensibles à ces deux autres molécules. 7 (8 %) sont intermédiaires à l'enrofloxacin, parmi lesquelles aucune résistance à la marbofloxacin n'est observée. Enfin, les souches résistantes à l'acide nalidixique et à l'enrofloxacin le sont aussi à la marbofloxacin dans 33 des 37 cas observés (89,2 %).

DISCUSSION

Prévalences des agents pathogènes

E. coli est observé chez tous les individus à l'exception d'un veau malade. Ainsi, 99,2 % des malades et 100 % des témoins sont porteurs d'*E. coli*. Herrera-Luna *et al.* (2009) l'isolent par culture bactérienne dans seulement 17 % des fèces des 230 veaux diarrhéiques ou sains testés. Bouquet (2011) observe un résultat intermédiaire, avec 51 % de fèces positifs. Nous ne pensons pas avoir surestimé la prévalence d'excrétion fécale de ce germe. Ayant respecté les conditions de sa culture, nous n'avons pas pris en compte les colonies dont l'aspect n'est pas caractéristique. La présence d'*E. coli* dans la flore digestive naturelle explique sa forte prévalence. Le rôle d'*E. coli* en tant qu'agent pathogène est discutable. Toutefois la présence de facteurs de virulence chez ces

souches est un argument en faveur de cette hypothèse. Sur l'ensemble des souches isolées, on observe respectivement chez les malades et chez les sains 50,8 % et 59,0 % d'*E. coli* de type CS31A, 7,7 % et 0 % de F5, 4,6 % et 10,3 % de F17 et 3,1 % et 0 % de F5-F41. Concernant les souches F5, leur prévalence chez les veaux malades est proche des 9,2 % observés par Bourgoïn (1996). Elle est plus importante que celle rapportée par Blanchard (2012). Naciri *et al.* (1999) observent par contre une prévalence de 0,3 % chez les veaux témoins. Les études portant sur la présence des gènes codant ces facteurs de virulence donnent des prévalences supérieures. Nguyen *et al.* (2011) détectent par PCR la présence des gènes codant les *fimbriae* F5, F17 et F41 chez respectivement 14,9 %, 22,8 % et 7,1 % des souches isolées de veaux diarrhéiques : soit les germes isolés dans cette étude présentent des prévalences supérieures de portage de ces *fimbriae*, soit la présence du gène n'implique pas son expression systématique, les deux hypothèses n'étant pas exclusives l'une de l'autre.

Pour des veaux diarrhéiques d'âge identique (1^{ère} semaine), la prévalence des infections par les rotavirus est plus élevée, de 36,9 % (Bourgoïn, 1996) ou de 27 % (Bouquet, 2011) par rapport aux 18,4 % chez les veaux du groupe M, valeur voisine (21,1 %) de celle rapportée par Herrera-Luna *et al.* (2009) chez des veaux âgés jusqu'à six semaines. La prévalence atteint 26,6 % des veaux malades âgés d'un à 32 jours (Blanchard, 2012) mais on trouve aussi des prévalences inférieures bien que la période d'observation des veaux soit plus longue, jusqu'à six mois (Bejan *et al.* 2008).

Concernant les coronavirus, la littérature rapporte 6,5 à 40 % de veaux malades positifs. Notre résultat est dans la moyenne des prévalences rapportées, avec 24 % de veaux malades positifs. Contrairement à ce que l'on observe pour les rotavirus, les résultats de Bourgoïn (1996) sont bien inférieurs, avec 7,7 % de fèces diarrhéiques positifs. Les témoins sont eux aussi infectés, avec une prévalence de 3,3 %, valeur comprise entre les 0,3 % rapportés par Naciri *et al.* (1999) et les 16,4 % observés par Herrera-Luna *et al.* (2009).

La prévalence de l'infestation par *Cryptosporidium*, de 33,0 % chez les veaux malades est proche de celle rapportée par Bouquet (2011) et Blanchard (2012). Herrera-Luna *et al.* (2009) mettent en évidence une excrétion d'oocystes chez 25,6 % des veaux malades et notent aussi une différence significative avec les veaux témoins. La période prépatente du parasite étant de trois à cinq jours (Peeters *et al.* 1992), l'âge du veau au moment du prélèvement peut influencer sur la prévalence. Dans notre étude, la moyenne d'âge des veaux témoins est significativement inférieure à celle des veaux malades (avec respectivement 3,6 et 4,8 jours au moment du prélèvement, $p = 0,007$). Ainsi, cette moindre prévalence chez les veaux T peut en partie s'expliquer par leur plus jeune âge, certains pouvant être porteurs mais sans encore excréter les oocystes lors du prélèvement, donc faussement négatifs.

Association d'agents pathogènes

Les prévalences observées dans la littérature sont très variables d'une étude à l'autre, puisque de nombreux facteurs interviennent, tel que l'âge ou le statut des veaux (Bourgoin, 1996 ; Bejan *et al.* 2008). Comparée aux résultats de Bourgoin (1996), on retiendra que la prévalence des associations rotavirus-*Cryptosporidium* est plus faible dans notre étude (4,0 % vs 11,5 %). Les autres associations sont retrouvées dans des proportions similaires, par exemple, celle des associations coronavirus-*Cryptosporidium* dans notre étude est de 4,0 % contre 2,9 %.

Bien que l'ensemble de ces agents pathogènes puisse concerner des porteurs sains, il est intéressant de noter que l'association de plusieurs d'entre eux est statistiquement associée au statut du veau malade. Ceci corrobore l'hypothèse d'une association dans la pathogénie des diarrhées, le rôle joué par chacun des agents étant alors difficile à prédire.

De nombreux auteurs mettent en évidence l'intérêt de la vaccination des mères dans la protection des veaux contre ces agents pathogènes (Rabinovitz *et al.* 2012 ; Pravieux *et al.* 2007), mais il n'est pas statistiquement démontré dans notre étude. Cette protection vaccinale passe cependant par la réussite du transfert de l'immunité colostrale. C'est un point critique de la gestion de la période peri-partum chez le veau (Lacroute, 2014). En revanche, nous avons démontré qu'un défaut de la qualité du paillage ou une surface insuffisante allouée au couple mère-veau est plus fréquemment rencontré chez les veaux malades. Le logement et l'hygiène sont des points importants pour maîtriser les gastro-entérites néonatales.

Antibiorésistance chez les colibacilles isolés

Taux de résistance chez les germes isolés de veaux malades

Les taux de résistance aux différents antibiotiques testés sont globalement équivalents ou inférieurs à ceux obtenus par le Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales (Résapath) au niveau national (Chazel *et al.* 2009 ; 2010 ; 2011 ; Jarrige *et al.* 2012 ; 2013 ; 2014 ; 2015). Ces observations sont illustrées par la **figure 2**. Par exemple en ce qui concerne les tétracyclines, le taux de résistance est 25% inférieur à celui rapporté au niveau national. Les résultats concernant le ceftiofur, la gentamicine et la colistine sont par contre très proches, alors que les taux de résistance à la céfoxitine, non disponible en thérapeutique, mais testée afin d'améliorer la détection des souches productrices de BLSE, voire de céphalosporinase, sont supérieurs à ceux rassemblés par le Résapath. Ces différences sont à relativiser du fait de l'âge des animaux suivis jusqu'à plusieurs mois dans les différents rapports du Résapath. Ils n'en restent pas moins inquiétants, en particulier pour ce qui est des céphalosporines de dernière génération et des fluoroquinolones.

Le faible taux de résistance à la colistine ne doit pas masquer l'émergence actuelle, en France et dans de nombreux autres

pays, d'une résistance due à un nouveau mécanisme (gène *mcr-1*) (Webb *et al.* 2016). Cependant l'Agence Européenne du Médicament (EMA) ne recommande pas encore d'inclure la colistine dans la liste des antibiotiques critiques (www.anses.fr/fr/search/site/colistine?iso1=fr&iso2=en).

Différence de résistance en fonction du statut des veaux

Les taux de résistance des germes isolés de veaux malades sont statistiquement supérieurs à ceux des veaux témoins pour plus de la moitié des molécules testées et en particulier, pour certains des antibiotiques critiques comme la cefquinome et les trois quinolones testées. Un constat identique est rapporté par Gunn *et al.* (2003) en Grande Bretagne.

Lien avec l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages

Face à ces différences en fonction des statuts, il est tentant de conclure à l'implication de l'utilisation d'antibiotiques. En effet, dans les élevages présentant de nombreux cas de diarrhée néonatale, on peut supposer que les veaux sont plus souvent exposés à des molécules antibiotiques, à titre curatif ou préventif. Les élevages biologiques, dans lesquels l'usage d'antibiotiques est très limité, présentent des taux de résistance chez les colibacilles isolés de veaux, inférieurs à ceux observés en élevage conventionnel pour de nombreuses molécules, telles que les aminosides, la tétracycline ou encore l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (Sato *et al.* 2005).

Chez les veaux malades, les expositions à cette association et aux céphalosporines sont statistiquement associées à des taux de résistance supérieurs. Bien que difficiles à mettre en évidence en pratique, les mécanismes de sélection des résistances permettent d'expliquer ces observations. Ainsi, l'exposition répétée des flores bactériennes à des antibiotiques confère un avantage sélectif aux germes possédant des gènes de résistance aux molécules en cause. Leur proportion au sein de la population totale a donc tendance à augmenter.

Pour prouver statistiquement l'existence d'une relation causale directe entre l'utilisation des antibiotiques et la résistance observée dans les élevages, de nombreux biais de confusion sont à prendre en compte. En effet, de nombreux paramètres de la conduite d'élevage augmentent le risque d'apparition de l'antibiorésistance. Ainsi, l'usage des antimicrobiens dans un cadre préventif n'aura peut-être pas le même impact que lors d'une utilisation curative. De même, si l'antibiotique peut détruire un grand nombre des bactéries sensibles, le système immunitaire de l'animal malade joue également un rôle important dans la guérison. Ainsi, l'ensemble des éléments influant sur la qualité du transfert d'immunité passive pourraient intervenir.

Il convient donc de rester prudent quant aux conclusions à tirer de ces analyses. Cependant, des molécules critiques étant concernées, il est essentiel d'adapter les pratiques en matière d'antibiothérapie, afin de limiter le développement de ces

résistances. Comme l'ont montré Kaneene *et al.* (2009), la diminution de l'utilisation préventive d'antibiotique s'accompagne d'une réduction de la fréquence des multirésistances. Bien que cet effet ne soit pas durable et que d'autres facteurs interviennent, cette réduction constitue une première mesure indispensable.

CONCLUSION

Les diarrhées néonatales représentent un problème économique majeur pour les élevages, mais également un problème de santé publique vétérinaire. Le vétérinaire devra mettre un point d'honneur à adapter son traitement à chaque cas, puisque l'agent causal peut être bactérien, viral et/ou parasitaire, et que des facteurs favorisant entrent en jeu, comme un défaut d'hygiène des locaux.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Yves Millemann (département des Productions animales et de Santé publique, École nationale vétérinaire d'Alfort), le laboratoire Eurofins – Cœur de France (représenté par le Dr. Philippe Gisbert), le laboratoire Merial (représenté par le Dr. Arnaud Bolon), les Dr. Jean-Yves Thiery, Bertrand Roumegous, Jérôme Chantreau ainsi que l'ensemble des vétérinaires et des éleveurs qui ont participé à notre étude.

BIBLIOGRAPHIE

- Bejan A, Pacurar S, Iovu A, Titilincu A, Cozma V. The frequency of the elimination of *Cryptosporidium* spp., F5 *E. coli*, rotavirus and coronavirus in calves in Central and North West Romania. *Bull USAMV Vet Med.* 2008; 65 (2): 44-48.
- Blanchard PC. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2012; 28: 443-464.
- Bouquet B. Les clostridies sont (aussi) des agents de diarrhée néonatale. *Point Vét.* 2011; 42: 10-1.
- Bourgoïn H. La place de la cryptosporidiose dans les maladies néonatales du veau en Corrèze. *Bull GTV* 1996; 2: 19-41.
- Bruus M & Lauritsen JM. EpiData (3.1). 2008.
- Centers for disease control and prevention. EpiInfo (7.1.3.0). 2013.
- Chazel M, Jouy E, Meunier D, Haenni M, Gay E, Calavas D *et al.* Résapath, réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2008. Maisons-Alfort, France, 2009; 104p.
- Chazel M., Haenni M, Gay E, Calavas D, Madec JY, Jouy E. Résapath, réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2009. Maisons-Alfort, France, 2010; 156p. (www.anses.fr/fr/content/le-r%C3%A9seau-r%C3%A9sapath).
- Chazel M, Jouy E, Haenni M, Gay E, Madec JY. Résapath, réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2010. Maisons-Alfort, France, 2011; 158p. (www.anses.fr/fr/content/le-r%C3%A9seau-r%C3%A9sapath).
- Collectif. BiostaTGV, le site de biostatistiques en ligne [en-ligne]. 2013. Disponible sur : <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>, consulté le 12 10 2013.
- Fournier R & Naciri M. Prévalence des agents de diarrhée chez le jeune veau. *Point Vet.* 2007; 273 (38): 58-63.
- Gunn G, Hall M, Low J. Comparison of antibiotic resistance for *Escherichia coli* populations isolated from groups of diarrhoeic and control calves. *Vet J.* 2003; 165: 172-4.
- Herrera-Luna C, Klein D, Lapan G, Revilla-Fernandez S, Haschek B, Sommerfeld-Stur I, *et al.* Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. *Vet Med - Czech.* 2009; 54 (1): 1-11.
- Jarrige N, Jouy E, Haenni M, Gay E, Madec JY. Résapath, réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2011. Maisons-Alfort, France, 2012; 167p. (www.anses.fr/fr/content/le-r%C3%A9seau-r%C3%A9sapath).
- Jarrige N, Jouy E, Haenni M, Gay E, Madec JY. Résapath, réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales : bilan 2012. Maisons-Alfort, France, 2013; 163p. (www.anses.fr/fr/content/le-r%C3%A9seau-r%C3%A9sapath).
- Jarrige N, Jouy E, Haenni M, Gay E, Madec JY. Résapath, réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales : bilan 2013. Maisons-Alfort, France, 2014; 168p. (www.anses.fr/fr/content/le-r%C3%A9seau-r%C3%A9sapath).
- Kaneene J, Warnick L, Bolin C, Erskine R, May K, Miller R. Changes in multidrug resistance of enteric bacteria following an intervention to reduce antimicrobial resistance in dairy calves. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 4109-12.
- Lacroute H. Résistance aux antibiotiques chez les colibacilles agents de colibacilloses chez le veau : contribution à une étude dans l'Allier entre 2011 et 2013. Thèse de Doctorat vétérinaire, Alfort. Créteil : Université Paris-Est Créteil Val de Marne ; 2014; 184 p.
- Webb HE, Granier SA, Marault M, Millemann Y, den Bakker HC, Nightingale KK, Bugarel M, Ison SA, Scott HM, Loneragan GH. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16(2):144-5
- Naciri M. Cryptosporidiose des ruminants et santé publique. *Point Vét.* 1994; 26: 875-81.
- Naciri M, Lefay M, Mancassola O, Poirier P, Chermette R. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea in suckling and dairy calves in France. 1999; *Vet Parasitol.* 1999; 85: 245-57.

- Nguyen TD, Vo TT, Vu-Khac H. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J Vet Sci.* 2011; 12: 159-64.
- Peeters JE, Villacorta I, Vanopdenbosch E, Vandergheynst D, Naciri M, Ares-Mazas E *et al.* *Cryptosporidium parvum* in calves : kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infections. *Infect Immun.* 1992; 60 (6): 2309-16.
- Pravieux JJ, Poulet H, Charreyre C, Juillard V. Protection of newborn animals through maternal immunization. *J Comp Pathol.* 2007; 137 Suppl.1: S32-4.
- Rabinovitz BC, Gerhardt E, Tironi Farinati C, Abdala A, Galarza R, Vilte DA *et al.* Vaccination of pregnant cows with EspA, EspB, gamma-intimin, and Shiga toxin 2 proteins from *Escherichia coli* O157:H7 induces high levels of specific colostral antibodies that are transferred to newborn calves. *J Dairy Sci.* 2012; 95: 3318-26.
- Sato K, Bartlett PC, Saeed MA. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from dairy farms using organic versus conventional production methods. *J Am Vet Med Assoc.* 2005; 226: 589-94.
- Thiery JY, Lacroute H, Roumegous B, Gisbert P, Bolon A, Milmann Y *et al.* Enquête sur les colibacilloses du veau allaitant en Allier, conséquences pour le praticien. *Bull GTV.* 2015; 78: 59-67.
- Thorns CJ, Bell MM, Chasey D, Chesham J, Roeder PL. Development of monoclonal antibody ELISA for simultaneous detection of bovine coronavirus, rotavirus serogroup A, and *Escherichia coli* K99 antigen in feces of calves. *Am J Vet Res.* 1992; 53 (1): 36-43.
- Wolfson J & Hooper D. The fluoroquinolones : structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 28 (4): 581-6.