

Université de Montréal

Développement de sondes à ADN contre les bactéries responsables de la
mammite bovine et étude épidémiologique de la formation de biofilm chez ces
bactéries.

par

Renée Riffon

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Février, 2002

© Renée Riffon, 2002



w
4
U58
2002
v.097

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Développement de sondes à ADN contre les bactéries responsables de la
mammite bovine et étude épidémiologique de la formation de biofilm chez ces
bactéries.

présenté par:

Renée Riffon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Mario Jacques	président-rapporteur
Dre Jacqueline Lagacé	directrice
Dr Marc Drolet	co-directeur
Dr François Coutlée	membre du jury

Mémoire accepté le:



SOMMAIRE

La mammite bovine est une inflammation des glandes mammaires chez les vaches laitières. Elle peut être causée par une blessure mécanique ou par un agent infectieux, le plus souvent bactérien. Nous avons étudié l'aspect diagnostique et épidémiologique de cette inflammation lorsque causée par un agent infectieux bactérien.

L'identification rapide et spécifique des principales espèces de bactéries causant la mammite bovine directement à partir d'échantillons de lait suspect permettrait d'améliorer le diagnostic d'infections mammites par les laboratoires de microbiologie clinique. Une grande variété de tests biochimiques existe pour l'identification efficace de ces bactéries, mais la rapidité et la fidélité de cette identification reste à améliorer. Nous avons développé une méthode par PCR afin d'identifier les agents pathogènes majeurs (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus uberis*) causant la mammite bovine dans des échantillons de lait avec et sans pré-traitement enzymatique. La spécificité des sondes de PCR a été évaluée en utilisant de l'ADN provenant de multiples espèces bactériennes. Quatre oligonucléotides spécifiques pour chacune des 6 espèces pathogènes responsables de la mammite bovine ont été créés, en plus de 4 sondes universelles dirigées envers l'ADN codant pour l'ARNr 16S et 23S. Ces

oligonucléotides ont permis la détection spécifique par PCR de toutes les souches concernées. La méthode de détection avec pré-traitement enzymatique a permis la détection de $3,12 \times 10^2$ UFC/mL de lait alors que la méthode sans pré-traitement enzymatique a permis la détection de $5,0 \times 10^3$ UFC/mL de lait. Notre méthode PCR pour l'identification des agents pathogènes majeurs de la mammite bovine s'avère plus rapide que les méthodes d'identification traditionnelles biochimiques (1 à 2 jours) et permet d'obtenir une identification en moins de 6 heures.

En se basant sur un modèle de *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) pour lequel une corrélation de 100% a été démontrée entre les phénotypes qui forment des biofilms et l'hémagglutination, nous avons utilisé le test d'hémagglutination comme mesure indirecte de la formation de biofilm. Nous avons ainsi déterminé la capacité d'hémagglutination de 139 souches cliniques isolées à partir d'échantillons de lait mammitieux et analysé la susceptibilité (CMI) à la pénicilline G des souches les plus hémagglutinantes. Le but de ces travaux était de mieux caractériser la surface cellulaire et la résistance antibiotique des souches cliniques de la mammite bovine soupçonnées de former un biofilm. Quarante-trois souches sur 139 étaient hémagglutinantes et 12% de ces souches étaient résistantes à la pénicilline G.

Mots-clés: mammite bovine, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus*

parauberis, *Streptococcus uberis*, diagnostic, épidémiologie,
hémagglutination, pénicilline G, PCR.

SUMMARY

Bovine mastitis is an inflammation of the mammary gland in dairy cows. It can be caused by a mechanical wound or an infectious agent, generally bacterial.. We studied the diagnosis and epidemiological aspects of this inflammation when caused by a bacterial infectious agent.

Fast and specific identification of the principal species of bacteria causing bovine mastitis directly from suspect milk samples would make it possible to improve the diagnosis of mastitis infections by the clinical microbiology laboratories. A large variety of biochemical tests exists for the efficient identification of these bacteria, but the speed and the fidelity of this identification still needs improvement. We developed a PCR method in order to identify the major pathogenic agents (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus uberis*) causing bovine mastitis in milk samples with and without enzymatic preprocessing. The specificity of the PCR probes was evaluated by using DNA from multiple bacterial species. Four specific oligonucleotides against each of the six pathogenic species responsible for the bovine mastitis were created, in addition to four universal probes directed towards the rRNA 16S and 23S coding DNA. These oligonucleotides allowed specific detection by PCR of all the strains tested. The method of detection with enzymatic preprocessing allowed the detection of $3,12 \times 10^2$ CFU/mL of

milk whereas the method without enzymatic preprocessing allowed the detection of $5,0 \times 10^3$ CFU/mL of milk. Our PCR method for the identification of the major pathogenic agents of the bovine mastitis proves to be faster than the traditional biochemical tests of identification (1 to 2 days) and makes it possible to obtain an identification in less than 6 hours.

Based on a *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) model for which a correlation of 100% was shown between the biofilm phenotype and hemagglutination. We used the test of hemagglutination to measure indirect formation of biofilm. We thus determined the capacity of hemagglutination of 139 clinical strains isolated from mastitis milk samples and we analyzed susceptibility to penicillin G (MIC: minimal inhibitory concentration) of the strains showing the strongest hemagglutination. The goal of this work was to better characterize cellular surface and the antibiotic resistance of clinical strains of bovine mastitis suspected of biofilm formation. Forty three strains on 139 showed hemagglutination and 12% of these strains were resistant to penicillin G.

Key words: bovine mastitis, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus uberis*, diagnosis, epidemiology, hemagglutination, penicillin G, PCR.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
SUMMARY.....	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ANNEXES.....	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xiii
DÉDICACE.....	xiv
CHAPITRE 1 – REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1.1 Les mammites bovines contagieuses et leur importance.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Développement de la maladie.....	1
1.1.3 Importance économique.....	4
1.1.4 Signification pour la santé publique.....	4
1.2 Les microorganismes causant la mammite bovine.....	6
1.2.1 Bactéries contagieuses.....	6
1.2.2 Bactéries environnementales.....	7
1.2.3 Autres pathogènes communs.....	8
1.2.4 Pathogènes rares.....	8
1.3 La détection et l'identification des agents pathogènes de la mammite bovine.....	9

1.3.1	Méthodes traditionnelles	9
1.3.2	Méthodes moléculaires	9
1.4	Étapes de la pathogénicité bactérienne	15
1.4.1	Adhérence	15
1.4.2	Exemples spécifiques de l'adhérence bactérienne	17
1.5	Phénomène de biofilm	19
1.5.1	Description du biofilm	19
1.5.2	Formation du biofilm	20
1.6	Méthodes pour l'évaluation de l'adhérence aux cellules	24
1.7	Épidémiologie de la mammite bovine	26
1.8	Pénicilline G	28
1.9	Objectifs de la présente étude	29

CHAPITRE 2 – ARTICLE « Development of a Rapid and Sensitive Test for the Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR »

Abstract	32
Introduction	32
Materials and Methods	33
Results	34
Discussion	35
Acknowledgements	36
References	36

CHAPITRE 3 – DISCUSSION ET CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

REMERCIEMENTS

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

Table 1: Oligonucleotide primer sequences used for PCR.....	33
Table 2: Primer conditions during PCR.....	33

ANNEXE 1

Tableau I: Intensité d'héماغglutination et susceptibilité (CMI) de chaque souche clinique testée envers la pénicilline G.....	74
Tableau II: Compilation des résultats concernant les caractéristiques d'héماغglutination et de susceptibilité à la pénicilline G des différentes souches analysées.....	79

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

- Figure 1: Schéma représentant la formation du biofilm.....22
- Figure 2: Schéma représentant le mode d'alimentation du biofilm.....23

CHAPITRE 2

- Figure 1: Demonstration of the specificity of the molecular probes in PCR assay with purified bacterial DNA from different species.....34
- Figure 2: PCR amplification of purified bacterial DNA by using two combinations from four different universal primers.....34
- Figure 3: Sensitivity of the PCR assay in detecting DNA from two different media (milk and TSB) artificially inoculated with *Staphylococcus aureus* 97-6609 with and without a pre-PCR enzymatic lysis step of bacterial cells
.....35

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 – ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE.....	66
A.1 Matériels et méthodes.....	67
A.1.1 Souches bactériennes et conditions de croissance.....	67
A.1.2 Traitement des érythrocytes à l'acide tannique.....	68
A.1.3 Test d'hémagglutination.....	69
A.1.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la pénicilline G.....	70
A.2 Résultats.....	71
A.2.1 Test d'hémagglutination.....	71
A.2.2 Détermination de la susceptibilité des souches bactériennes (CMI) pour la pénicilline G.....	72

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
CMI	concentration minimale inhibitrice
ELISA	« enzyme-linked immunosorbent assay »
kb	kilobases
MB	mammite bovine
mL	millilitres
ng	nanogrammes
PBS	tampon phosphate salin
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PMN	polymorphonucléaire
REF	fragments de restriction enzymatique
RFLPs	fragments de restriction de longueurs polymorphiques
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	unité formant une colonie
µL	microlitres

DÉDICACE

Je voudrais rendre hommage à mes parents: *Michelle* et *Robert* qui m'ont encouragé et supporté durant ma maîtrise.

Merci à ma famille qui s'est intéressée à mes travaux.

Merci à mes amies: *Katia* et *Marie-Eve* qui m'ont permis de décrire, expliquer et vulgariser mes recherches.

Merci à *Hayssam* de m'avoir poussé à toujours me questionner un peu plus.

Finalement pour toi *Mémé* qui n'auras pas vu la fin de ce mémoire, merci de m'avoir fait sentir fière de ce que j'ai accompli !

CHAPITRE 1 – REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Les mammites bovines contagieuses et leur importance

1.1.1 Généralités

La mammite est une inflammation de la glande mammaire. Cette réponse inflammatoire de la mamelle a pour but de détruire ou de neutraliser les agents infectieux et leurs toxines afin de permettre à la glande de revenir à des fonctions normales. L'inflammation peut être causée par plusieurs types de blessures dont les agents infectieux et leurs toxines, un traumatisme physique et des irritants chimiques (National Mastitis Council, 1996).

Chez la vache laitière, la mammite est presque toujours causée par des microorganismes, habituellement des bactéries. Les cas de mammites causées par un traumatisme physique ou un irritant sans la présence de microorganismes infectieux sont rares (National Mastitis Council, 1996).

1.1.2 Développement de la maladie

Les bactéries envahissent la mamelle, se multiplient dans les tissus producteurs de lait et synthétisent des toxines qui causent des blessures. La guérison d'un quartier précédemment infecté peut être lente et l'inflammation peut persister pour une longue période, même si l'organisme en cause a été éliminé. L'infection peut être clinique ou sub-clinique, tout dépendant du degré

d'inflammation (National Mastitis Council, 1996; <http://prevmed.vet.ohio-state.edu/teaching/Vm611/Lab4/Mastitis.htm>).

Dans le cas de mammite sub-clinique, aucun changement ne peut être détecté dans la mamelle et le lait semble normal. Par contre, la présence de microorganismes dans le lait peut être démontrée par culture microbiologique et les changements inflammatoires dans le lait peuvent être décelés par des tests spécifiques comme le décompte de cellules somatiques. Dans la majorité des troupeaux, la mammite sub-clinique est la forme la plus répandue de la maladie et elle entraîne les pertes les plus importantes à cause d'une diminution de la production de lait. De plus, la mammite sub-clinique engendre un réservoir de microorganismes, ce qui peut mener à l'infection de d'autres animaux du troupeau. Étant donné que cette forme de mammite n'est pas évidente (aucun changement dans l'apparence du lait), beaucoup de producteurs laitiers ne sont pas conscients de l'importance des pertes de production laitière et de la menace de l'infection pour les animaux non infectés du troupeau (<http://www.nmconline.org/glossary.htm>; <http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-233/404-233.html>).

Lorsque la mamelle semble anormale et que des sécrétions sont facilement observables, la mammite est classée comme étant sub-aiguë clinique. La sévérité de l'infection varie selon le type de microorganisme causant l'infection. Les anomalies du lait sont évidentes. L'apparence de ce dernier

changera; il contiendra des flocons, des caillots et aura un aspect aqueux. Les modifications de la mamelle telles: la chaleur, l'enflure ou la sensibilité sont légères ou absentes (<http://www.nmconline.org/glossary.htm>; <http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-233/404-233.html>).

La mammite aiguë est caractérisée par un début soudain. La mamelle présentera de la rougeur, un gonflement, une dureté et une douleur distincte. Le lait sera excessivement anormal et son rendement réduit. Des symptômes systémiques tels: la fièvre, la perte de l'appétit, une diminution des fonctions du rumen, un pouls accéléré, la déshydratation, la faiblesse et la dépression peuvent être observés. Lorsque le début de l'infection est très soudain et que les signes sont sévères, la maladie est classée mammite sur-aiguë (<http://www.nmconline.org/glossary.htm>; <http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-233/404-233.html>).

La mammite est appelée chronique lorsqu'elle est de longue durée (> 6 mois). La mammite chronique peut demeurer en phase sub-clinique indéfiniment ou l'infection peut alterner avec des phases sub-cliniques et cliniques (<http://www.nmconline.org/glossary.htm>; <http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-233/404-233.html>).

Dans le cas où aucun microorganisme ne peut être isolé des échantillons de lait, l'inflammation mammaire est définie comme mammite non-bactérienne.

Ces cas peuvent être cliniques ou sub-cliniques (<http://www.nmconline.org/glossary.htm>; <http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-233/404-233.html>).

1.1.3 Importance économique

La mammite est la maladie la plus coûteuse de l'agriculture animale en Amérique du Nord tout comme dans le reste du monde. Aux États-Unis, les pertes économiques annuelles dues à la mammite sont estimées à environ 185 \$US / vache pour un nombre total d'environ 1,8 milliards \$US. Ce montant représente approximativement 11% du montant total des ventes des fermes laitières et 2/3 de ces pertes sont directement causées par une réduction du rendement du lait chez les vaches infectées par une mammite de type sub-clinique (National Mastitis Council, 1996; <http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-233/404-233.html>). Il a été démontré que l'incidence de la mammite pourrait être diminuée de 40% si des programmes de contrôle appropriés étaient appliqués. Un diagnostic et un traitement appliqué rapidement font partie de ces moyens de contrôle (National Mastitis Council, 1996).

1.1.4 Signification pour la santé publique

Les microorganismes retrouvés dans le lait des vaches infectées ne représentent pas une menace sérieuse pour la santé humaine car les bactéries qui causent la mammite bovine (MB) sont rarement la cause d'infections humaines. Toutefois, il peut arriver à l'occasion que des bactéries pouvant causer de sévères infections humaines puissent être retrouvées dans le lait. La

pasteurisation détruit tous les pathogènes humains. Toutefois, ces derniers sont à considérer quand il est question de lait crû ou de pasteurisation incomplète (West Agro Inc., 1988).

Par exemple, certaines souches de *Staphylococcus aureus* qui est un pathogène commun de la mammite, produisent des entérotoxines qui causent des nausées, des vomissements et des crampes abdominales lorsque ingérées par l'humain. La production de ces toxines peut survenir lorsque du lait contenant *S. aureus* n'est pas refroidi adéquatement, ainsi que lors de la production de fromage au lait crû. Une fois formées, ces toxines ne sont pas détruites par la chaleur ou le séchage. La contamination post-traitement des produits laitiers tels la crème sûre est aussi possible si la manipulation et l'entreposage ne sont pas adéquats (West Agro Inc., 1988).

La présence dans le lait et la viande de résidus d'antibiotiques utilisés dans le traitement de la MB est un problème de santé publique important. Des résidus dans la nourriture pourraient engendrer des réactions sévères chez les personnes allergiques aux antibiotiques. Un autre problème est la sensibilisation d'individus normaux par la consommation de nourriture contenant un faible taux d'antibiotiques, ainsi que le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques. Une utilisation prudente des antibiotiques en évitant l'utilisation de produits non-approuvés pour les vaches laitières, l'emploi de dosages appropriés, le respect des temps de retrait

spécifiés sur l'étiquette du produit, ainsi que l'examen des réservoirs citernes, minimisent le risque de la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait et la viande (West Agro Inc., 1988).

1.2 Les microorganismes causant la mammite bovine

La majorité des cas de MB sont causés par des bactéries (West Agro Inc., 1988). Néanmoins, d'autres types de microorganismes comme les levures, les mycoplasmes, et même parfois les algues, peuvent causer des infections intramammaires (West Agro Inc., 1988). Les virus sont rarement la cause primaire d'infection de la glande mammaire bovine. La plupart des infections sont causées par quelques types de bactéries (staphylocoques, streptocoques et plusieurs bactéries gram-négatives). Les pathogènes communs peuvent être divisés en deux catégories: les bactéries contagieuses qui sont transmises d'un quartier infecté aux autres quartiers d'une vache et les bactéries environnementales qui sont présentes dans l'environnement normal de la vache et peuvent rejoindre l'extrémité externe du trayon (<http://prevmed.vet.ohio-state.edu/teaching/Vm611/Lab4/-mastitis.htm>).

1.2.1 Bactéries contagieuses

Streptococcus agalactiae et *Staphylococcus aureus* sont les bactéries contagieuses les plus communes, alors que *Corynebacterium bovis* est aussi une bactérie contagieuse, mais moins fréquente. Les principaux réservoirs de ces bactéries sont les mamelles contaminées. Cependant, *S. aureus* peut aussi

coloniser le canal du trayon et la peau gercée ou endolorie du trayon et survivre en d'autres sites sur la vache. Les microorganismes contagieux sont très bien adaptés pour survivre dans la mamelle et établissent habituellement des infections légères, sub-cliniques de longue durée (infections chroniques). Ces bactéries sont dissimulées dans le lait de quartiers infectés et la transmission aux quartiers non-infectés se fait au moment de la traie (National Mastitis Council, 1996; <http://www.nmconline.org/contmast.htm>).

1.2.2 Bactéries environnementales

Les bactéries environnementales qui causent habituellement la MB sont de plusieurs types: streptocoques (*S. dysgalactiae*, *S. parauberis*, *S. uberis* et *S. equinus*), entérocoques (*E. faecalis* et *E. faecium*) et coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp. et *Enterobacter* sp.). Ces bactéries diffèrent des bactéries contagieuses parce qu'elles sont présentes dans l'environnement normal de la vache. Par exemple, *E. coli* et les entérocoques sont présentes dans les fèces bovines; d'autres peuvent se retrouver dans le sol ou dans l'enclos. Malheureusement, ces bactéries ne peuvent pas être éliminées de l'environnement de la vache. La transmission des bactéries d'un quartier infecté à un quartier non-infecté peut se produire, mais ce n'est pas la forme de propagation la plus répandue (National Mastitis Council, 1996; <http://prevmed.vet.ohio-state.edu/teaching/Vm611/Lab4/Mastitis.htm>; <http://www.nmconline.org/environmental.htm>; <http://www.nmconline.org/contmast.htm>).

1.2.3 Autres pathogènes communs

Il est possible de retrouver plusieurs autres types de bactéries dans la mamelle bovine, mais elles ne causent que de légères irritations et mènent rarement à la mammite clinique. Parmi ces bactéries, on retrouve des souches de staphylocoques coagulases-négatives (*S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. xylosus* et *S. sciuri*) et *Corynebacterium bovis*. Ces pathogènes sont fréquemment isolés dans la majorité des troupeaux. De plus, leur présence dans le lait entraîne une augmentation de 2 à 3 fois du décompte de cellules somatiques dans le lait (National Mastitis Council, 1996; <http://prevmed.vet.ohio-state.edu/teaching/Vm611/Lab4/Mastitis.htm>).

1.2.4 Pathogènes rares

Des pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomyces pyogenes*, *Nocardia* sp., les mycobactéries (*Mycobacterium bovis*), *Bacillus* sp., les levures, les moisissures et les algues causent plutôt des infections sporadiques qui n'affectent que quelques vaches dans le troupeau mais peuvent aussi causer des épidémies sévères. *P. aeruginosa* peut causer des mammites aiguës, mais typiquement cette bactérie cause des infections chroniques caractérisées par des crises soudaines et épisodiques de mammite clinique sub-aiguë. L'antibiothérapie peut réduire les signes cliniques, mais n'élimine habituellement pas l'infection. Les vaches infectées sont fréquemment éliminées (National Mastitis Council, 1996; <http://prevmed.vet.ohio-state.edu/teaching/Vm611/Lab4/Mastitis.htm>).

1.3 La détection et l'identification des agents pathogènes de la mammite bovine

1.3.1 Méthodes traditionnelles

Les méthodes traditionnelles pour détecter les agents pathogènes comme la morphologie des colonies, la culture enrichie, la culture sélective sur agar, les tests biochimiques (production de certains enzymes comme la coagulase, les nucléases de restriction et la sensibilité aux enzymes comme la lysostaphine) sont laborieuses et les résultats ne sont disponibles qu'en 2 à 3 jours (National Mastitis Council, 1989). Malgré tout, de plus en plus de souches avec des caractères phénotypiques atypiques sont mal identifiées par les laboratoires de microbiologie clinique (Freney et al., 1993). À cause d'un manque de sensibilité, les méthodes d'identification traditionnelles sont toujours dépendantes des quantités de bactéries disponibles pour la détection. Ceci est l'une des raisons pour laquelle une étape de culture de l'échantillon est nécessaire. En effet, le besoin de travailler sur des colonies isolées dans le but de discriminer les résultats de tests selon les agents bactériens isolés de flores mixtes nécessite aussi une étape de culture de l'échantillon.

1.3.2 Méthodes moléculaires

Il y a un besoin pour la détection rapide, spécifique de bactéries pour des buts de diagnostic et d'étude épidémiologique. En effet, il a été démontré qu'une identification rapide de l'agent pathogène causant la MB permettait

d'appliquer un traitement antibiotique approprié plus rapidement et ainsi d'augmenter ses chances de succès (Hubert, 1977).

Il existe à l'heure actuelle plusieurs méthodes qui utilisent les acides nucléiques pour l'identification d'organismes (Johnson, 1989). Entre autres, l'analyse des fragments chromosomaux polymorphiques générés par des enzymes de restriction (RFLPs). Le site de clivage de l'ADN par une endonucléase dépend de la séquence. La présence de mutations à des sites potentiels de clivage résulte dans différents motifs de fragments d'ADN lorsqu'ils sont séparés sur gel d'agarose. Il est important de porter une attention toute particulière à ce que la digestion soit complète pour ne pas avoir de produits de digestion partiels qui obstrueraient l'analyse finale des bandes. Cette méthode est simple et démontre un large spectre d'utilisation mais elle comporte deux limitations majeures. Premièrement, la présence d'une mutation ne peut pas être détectée à moins que cette mutation ne se produise dans la séquence de reconnaissance de l'endonucléase de restriction utilisée pour la digestion de l'ADN. L'utilisation de différents enzymes de restrictions optimisera la probabilité de détecter les mutations dans un génome ou une portion de génome. Toutefois, l'absence de motifs de restriction différenciés est peut-être tout simplement le résultat de l'évaluation de trop peu d'enzymes de restriction. Deuxièmement, les enzymes de restrictions utilisées en ce moment génèrent un grand nombre de fragments chromosomaux, ce qui génère un patron de bandes d'ADN très complexe et

difficile à comparer. Il existe des enzymes de restriction avec des séquences de reconnaissance rares (ex.: 8 paires de base), mais ces enzymes génèrent des fragments chromosomaux trop gros (ex.: > 50 kb) qui ne peuvent pas être différenciés par méthode conventionnelle sur gel d'agarose. L'analyse des fragments de restriction enzymatique (REF) est facile à faire mais la comparaison des fragments d'ADN digéré peut être ardue (Matthews et al., 1992).

La méthode classique d'hybridation d'ADN (« Southern blotting ») est une modification de l'analyse RFLPs. L'ADN est tout d'abord coupé avec une enzyme de restriction et les fragments sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide. Les fragments séparés sont ensuite transférés sur membrane de nitrocellulose et hybridés avec une sonde marquée construite à partir du génome entier ou d'une région spécifique. Cette méthode a les avantages d'avoir un large spectre d'utilisation et de permettre l'analyse de génomes complexes. Néanmoins, cette technique est complexe à réaliser et peut nécessiter l'utilisation de radioisotopes (Arens, 1999).

La méthode d'analyse du polymorphisme de la conformation en brin unique (« SSCP: single-strand conformation polymorphism ») est basée sur le fait qu'une substitution d'un seul nucléotide est suffisante pour causer un changement dans la mobilité d'un fragment d'ADN en brin unique dans un gel neutre de polyacrylamide. Initialement, la procédure utilisait les fragments

RFLPs d'ADN génomique (un du génome sauvage et l'autre d'un mutant probable), après dénaturation par traitement alcalin et migration par électrophorèse sur gel de polyacrylamide neutre, leur motilité était comparée. Dernièrement, la méthode a été modifiée afin de s'adapter à l'amplification par PCR d'une région spécifique d'un génome sauvage ou mutant avant la dénaturation et la séparation sur gel neutre (Hayashi, 1991). Pour chacune des deux techniques mentionnées, si des mutations sont présentes dans le segment du génome mutant testé, ce segment va migrer à une position différente dans le gel que le même segment amplifié à partir du génome sauvage. Le motif altéré d'électrophorèse est apparemment dû à une modification de la structure secondaire du fragment de restriction ou de l'amplicon de PCR (Orita et al., 1989). La détection de quelques mutations sur une large séquence et la simplicité d'application sont des avantages de ce procédé. Toutefois, seulement la présence d'une mutation est décelée et non pas la location de celle-ci.

L'effet de la délétion d'une seule base sur l'électrophorèse en gel de polyacrylamide d'hétéroduplexes d'ADN (« HMA: heteroduplex mobility assay ») a été étudiée par Wang et Griffith (Wang et Griffith, 1991). Ce qu'ils ont observé c'est que tous les brins d'ADN contenant un repliement dû à la délétion d'une base sur un des deux brins étaient retardés sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide comparativement aux homoduplexes d'ADN sans repliement. Le principe de la procédure est le suivant: après une

amplification par PCR, les produits sont chauffés et rapidement refroidis avant d'être analysés sur gel neutre de 5% polyacrylamide. Le retard relatif des hétéroduplexes est proportionnel à la distance d'ADN, c'est-à-dire au pourcentage de nucléotides différents entre les souches testées. Cette procédure est surtout utilisée pour l'étude de la variabilité génétique (au niveau moléculaire) de souches bactériennes et virales. Elle peut détecter des différences génétiques jusqu'à 2% dans un amplicon de plusieurs centaines de bases mais n'est pas fiable pour détecter des différences inférieures à ce pourcentage. L'avantage majeur de cette technique est qu'elle peut être utilisée pour trier des isolats et déterminer leur parenté génétique sans avoir à les séquencer (Arens, 1999).

L'utilisation d'oligonucléotides spécifiques est avantageuse si la séquence d'ADN est connue. L'hybridation d'ADN, l'hybridation en point (« dot hybridization ») (Hyypia et al., 1985; Sanchez et al., 1984), le ribotypage et la réaction de polymérisation en chaîne ne sont que quelques exemples où les oligonucléotides peuvent être utilisés.

La méthode d'hybridation inverse est basée sur un système dans lequel les produits amplifiés par PCR à partir d'échantillons cliniques sont hybridés à des sondes liées parallèlement à des bandes de membrane (Arens, 1999).

La méthode de PCR combinée au séquençage offre la possibilité de détecter la mutation d'une seule paire de base. Le développement du séquençage automatique (incluant des cycles de marquage des oligonucléotides) permet l'obtention de séquences complètes en environ 3 jours à partir de la réception de l'échantillon clinique. La possibilité d'identifier la mutation d'une seule base est un avantages majeur de la méthode de séquençage. Toutefois, la technique est complexe, génère beaucoup de données et l'équipement dispendieux (Arens, 1999).

Le ribotypage consiste en la digestion d'ADN extrait d'isolats bactériens avec une endonucléase de restriction. Les fragments résultants sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et transférés sur une membrane d'hybridation où ils seront mis en contact avec une sonde marquée radioactivement conçue à partir de la séquence d'ARN ribosomal. Étant donné que les bactéries ont plusieurs copies des opérons d'ARNr dans leur chromosome, plusieurs fragments de restrictions s'hybrideront avec la sonde. Le résultat sera un motif qui permettra de différencier diverses souches bactériennes (Tannock, 2001).

Les résultats de plusieurs études suggèrent que les marqueurs phénotypiques comme les biotypes ou la susceptibilité aux antibiotiques sont moins stables dans le temps que les techniques basées sur les acides nucléiques (Archer et Mayhall, 1983; Carles-Nurit et al., 1992; Gaston et al., 1988; Gillespie et al.,

1990; Mulligan et al., 1988; Schlichting et al., 1993; Selander et al., 1986; Van Belkum et al., 1993; Zuccarelli et al., 1990). De plus, les technologies utilisant l'ADN démontrent plusieurs avantages comme la rapidité, la spécificité, la sensibilité de diagnostic (Engleberg et Eisenstein, 1992; Kricka, 1992). De plus, ce type de technologie peut être appliquée en absence d'organismes viables et pour la détection d'organismes non-cultivables *in vitro*. Lorsqu'une méthode PCR est appliquée directement à partir de la matrice d'échantillonnage, la rapidité de diagnostic est grandement améliorée. Le lait peut être utilisé comme matrice pour le PCR (Hirose et al., 2001; Lorenz et al., 1998; Martinez et al., 2001; Salmanzadeh Ahrabi et al., 1999; Zanini et al., 1998). Pourtant, aucune méthode publiée ne fait mention d'une technique de détection sans extraction, pré-traitement avec tampon de lyse ou pré-culture *in vitro* en moins de 24 h.

1.4 Étapes de la pathogénicité bactérienne

1.4.1 Adhérence

L'adhérence à la matrice extracellulaire aide à la colonisation bactérienne des tissus endommagés. Une des premières étapes de plusieurs infections est l'attachement spécifique de la bactérie aux tissus de l'hôte via les pili qui sont des intermédiaires avides et spécifiques. Cette adhérence aux tissus de l'hôte permet à la bactérie de résister aux systèmes de défense mécaniques non-spécifiques de l'organisme mis en place à la surface des tissus, en plus d'initier la colonisation de domaines tissulaires spécifiques. Toutefois, l'adhésion

spécifique ne suffit pas car les surfactants et autres facteurs de défense importants de l'hôte empêchent la colonisation. Les bactéries pathogènes emploient souvent des mécanismes d'adhésion moins spécifiques et avides comme les exopolysaccharides. Ces mécanismes peuvent agir seuls ou en concert avec les pili. L'adhésion par les exopolysaccharides est forte et résistante contrairement aux pili qui sont des structures plus fragiles (Ofek et Doyle, 1994).

La matrice extracellulaire est faite de collagène, laminine (protéines hautement glycosylées), fibronectine (Fn, protéines hautement glycosylées) et de protéoglycans (chaînes de glycosaminoglycans liées à des protéines). Les staphylocoques et les streptocoques possèdent des protéines capables de se lier à la matrice extracellulaire (Westerlund et Korhonen, 1993). Ces protéines de surface ont une affinité pour la fibronectine soluble ou le collagène. Par exemple, *S. aureus* est capable d'adhérer à la fibronectine, au collagène, à la laminine, l'élastine et au sulfate d'héparan (Westerlund et Korhonen, 1993). De plus, il a été démontré que ces protéines incitaient la colonisation bactérienne par *S. aureus* de la surface endommagée de la vessie, de valves cardiaques (Nozohoor et al., 1998; Flock et al., 1996) et de cellules du trayon (Opdebeeck et Frost, 1987). L'organisation structurale de ces protéines ressemble à celle des autres protéines associées à la paroi cellulaire comme la protéine M et les protéines liant les immunoglobulines.

Des travaux publiés ont démontré que les éléments de la surface cellulaire des bactéries en croissance *in vitro* et *in vivo* n'étaient pas identiques (Brown et Williams, 1985) et même qu'une gamme complètement différente de structures de la paroi cellulaire peut être produite chez les bactéries de la même espèce selon la variation de nutriments, la surface de croissance et d'autres facteurs environnementaux (Lorian et al., 1985). Le taux de croissance (Lorian et al., 1985; Zak et Sande, 1982), l'exposition à des concentrations sous-inhibitrices de certains antibiotiques (Lorian et al., 1982) et la croissance sur des surfaces solides (Lorian et al., 1985) sont tous des facteurs provoquant des modifications de la surface bactérienne.

1.4.2 Exemples spécifiques de l'adhérence bactérienne

L'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales de l'hôte via les lectines de surface est considérée comme un événement initial important dans la pathogenèse bactérienne. On retrouve des exemples de cette adhérence autant chez les bactéries Gram-négatives que Gram-positives.

Les fimbriae de type 1 (spécifiques au mannose) sont les lectines les plus fréquentes chez les entérobactéries. Chez *E. coli* par exemple on retrouve les fimbriae K88 (Hacker, 1990), K99 (Hacker, 1990), P (Gal α -1, 4Gal), G, S et les molécules de surface CFA/I, CFA/II (CS 1, 2, 3), CFA/III, 987P, F41, E8775, AF/R1 et PCF8775 (CFA 4, 5, 6) (Baddour et al., 1989). *E. coli* dispose aussi d'adhésines de type non fimbriae tel nfa, d'hémagglutinines

comme Dr et finalement d'agglutinines comme l'agglutinine M (Baddour et al., 1989).

On retrouve aussi des lectines chez la bactérie Gram-négative *Pseudomonas aeruginosa*. Parmi celles-ci, la lectine MS (Firon et al., 1987), la lectine capable de lier le récepteur de l'acide sialique (Hazlett et al., 1986), PA-I et PA-II, la lectine spécifique au récepteur du N-acetylmannosamine (Hazlett et al., 1987) et l'hydrophobine (Garber et al., 1985). *P. aeruginosa* sécrète aussi l'exoenzyme S (Baker et al., 1991) qui est capable de lier les gangliosides (Krivan et al., 1988). Grâce à ces lectines, *P. aeruginosa* a la capacité d'adhérer au mucus, à un épithélium endommagé et à la matrice extracellulaire mais ne peut adhérer à un épithélium sain (Pittet et al., 1995). Ce microorganisme a de plus, la particularité de pouvoir produire en présence de certaines conditions de croissance des exopolysaccharides muqueux qui lui permettent d'adhérer aux cellules de la trachée (Ramphal et Pier, 1985).

Chez les bactéries Gram-positives comme les streptocoques on retrouve aussi plusieurs adhésines (Hasty et al., 1992). Par exemple, chez *S. agalactiae* on retrouve les acides lipotéichoïques de la paroi (Mattingly et Johnston, 1987; Teti et al., 1985) et la lectine spécifique au N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) (Bagg et al., 1982). Il a été démontré que des isolats bovins cliniques de streptocoques de groupe B (*S. agalactiae*) possédaient des adhésines hémagglutinantes qui seraient directement impliquées dans les mécanismes

d'adhérence de ces organismes (Wibawan et al., 1993). Chez *S. dysgalactiae*, on retrouve les adhésines FnBA et FnBB (Hasty et al., 1992) qui peuvent lier la fibronectine et *S. uberis* a la capacité d'adhérer au collagène, à la fibronectine et à la laminine (Almeida et al., 1996).

S. aureus est une autre bactérie Gram-positive chez laquelle on retrouve des molécules adhésives. Cet organisme possède des acides lipotéichoïques (Carruthers et Kabat, 1983; Aly et Levit, 1987), des protéines (Maxe et al., 1986), FnBPA, FnBPB, CnA et finalement des protéines liant le collagène (Holderbaum et al., 1985). Ces molécules confèrent à *S. aureus* la capacité d'adhérer au mucus et à la matrice extracellulaire. Une adhérence aux cellules épithéliales n'a jamais été observée (Van Alphen et al., 1995; Mack, 1999) mais une adhérence à l'épithélium du trayon a toutefois été démontrée (Frost et al., 1977; Wanasinghe, 1981; Opdebeeck et Frost, 1987).

1.5 Phénomène de biofilm

1.5.1 Description du biofilm

Le biofilm est formé de bactéries individuelles et micro-colonies entourées d'une matrice très hydratée, majoritairement anionique et formée d'exopolymères bactériens et de macromolécules emprisonnées (Cf. Figure 1 du chapitre 1). Dans ce gel les molécules et leurs ions peuvent être présents à des concentrations différentes de celles retrouvées dans la phase liquide environnante (Costerton et Marrie, 1983). Les bactéries adhérentes formant

les micro-colonies (Malone et Caldwell, 1983) se divisent et de nouvelles bactéries de la phase planctonique (c'est-à-dire en suspension), se joignent aux bactéries fixées à la phase solide. Ce gel polysaccharidique limite l'accès des agents antibactériens (Cf. Figure 2 du chapitre 1) comme les anticorps, les bactériophages et les cellules eucaryotes phagocytes, aux molécules à la surface des bactéries; les bactéries adhérentes au substrat de croissance sont par conséquent protégées des lymphocytes (Peterson et al., 1978; Schwarzmann et Boring, 1971; Whitnak et al., 1981; Potera, 1996) et antibiotiques (Nickel, Ruseska et Costerton, 1985; Nickel et al., 1985). Cette matrice visqueuse permet aux bactéries de se lier ensemble dans un réseau désordonné de fibres polysaccharidiques et de s'ancrer à une surface (Cf. Figure 1 du chapitre 1) de façon irréversible.

La plupart des bactéries ont la capacité de former un biofilm sous certaines conditions de croissance favorables. Plusieurs populations bactériennes multi espèces poussent en biofilm adhérent formant un consortium structuré de bactéries. Ce phénomène n'a jamais été observé en culture pure dans un milieu riche en nutriments (Costerton et al., 1987).

1.5.2 Formation du biofilm

Le biofilm se forme en deux étapes. La première étape, l'attachement à la surface polymérique, est permise grâce aux adhésines intercellulaires. Cette étape est suivie par l'accumulation de bactéries (Cf. Figure 1 du chapitre 1)

(Heilmann et al., 1996). Les adhésines spécifiques telles PS/A (Muller et al., 1993) et non-spécifiques sont responsables de cette adhésion. Les bactéries pathogènes expriment souvent à leur surface des protéines ayant une affinité pour les composantes de la matrice extracellulaire tel que le collagène, la laminine, la fibronectine ou les protéoglycans. Ces informations sont détaillées dans la section 1.4.1 Adhérence du présent chapitre.

La deuxième étape de la formation du biofilm, l'accumulation, implique la prolifération des microorganismes en groupes multicellulaires (Cf. Figure 1 du chapitre 1: « microcolony » (microcolonies)). Cette deuxième étape est médiée par l'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA: β -1,6-linked glucosaminoglycan) (Mack et al., 1996). La PIA est synthétisée à partir des produits de l'opéron *ica* chez *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) (Heilmann et al., 1996; Gerke et al., 1998).

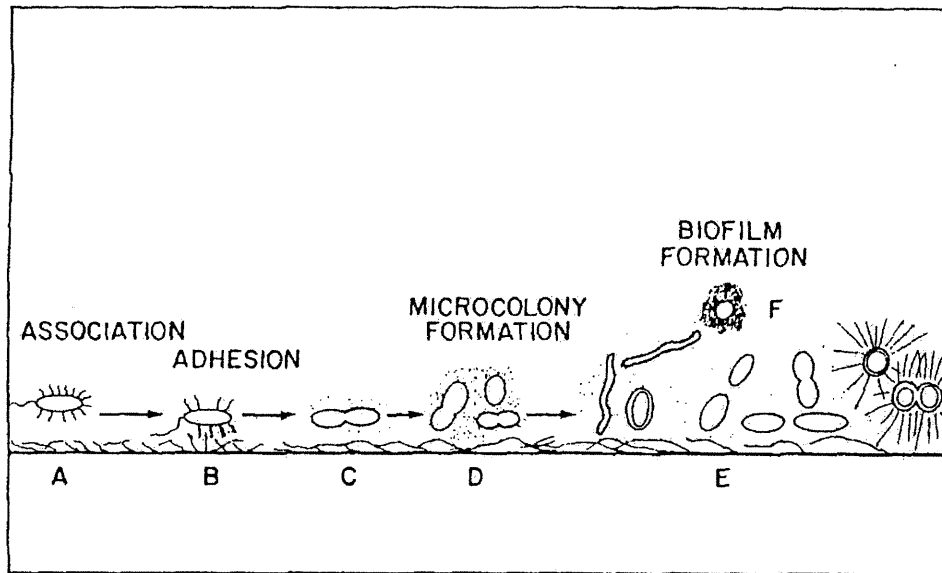


Figure 1 Bacteria may associate reversibly with a polymer-coated surface (A), or they may adhere irreversibly (B) and divide (C) to produce microcolonies (D) within an adherent multispecies biofilm (E). The biofilm grows by internal replication and by recruitment (F) from the bulk fluid phase.

FIGURE 1. Schéma représentant la formation du biofilm. Traduction française de la légende: « Les bactéries peuvent s'associer réversiblement avec une surface couverte de polymère (A), ou elles peuvent adhérer irréversiblement (B) et se diviser (C) pour produire des micro-colonies (D) dans un biofilm multi espèces adhérent (E). Le biofilm croît par réplication interne et par recrutement (F) de la phase environnante liquide ». Tiré de: Costerton et al., 1987.

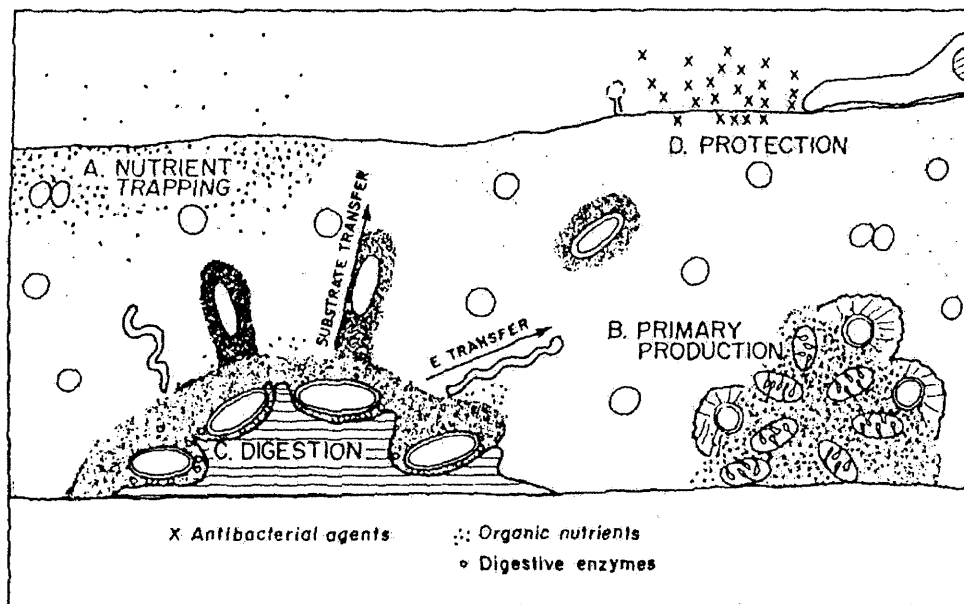


Figure 2 Modes of nutrient acquisition and protection of a bacterial biofilm. (A) Nutrient trapping. (B) Primary production. (C) Formation of a digestive consortium. (D) Exclusion of antibacterial substances.

FIGURE 2. Schéma représentant le fonctionnement du biofilm. Traduction française de la légende: « Modes d'acquisition de nutriments et protection du biofilm. (A) Emprisonnement des nutriments. (B) Production primaire. (C) Formation d'un consortium digestif. (D) Exclusion des substances antimicrobiennes ». Tiré de: Costerton et al., 1987.

1.6 Méthodes pour l'évaluation de l'adhérence aux cellules

On appelle hémagglutination la technique qui permet de mesurer l'adhésion spécifique de lectines microbiennes aux composantes d'hydrate de carbone des glycoprotéines ou glycolipides à la surface de cellules eucaryotes particulières, les érythrocytes. Le test d'hémagglutination a été très utilisé pour la détection et la caractérisation de lectines bactériennes. En effet, la grande variabilité naturelle des glycoprotéines et glycolipides à la surface des érythrocytes d'espèces animales fournit un outil d'évaluation pour la spécificité de l'adhérence bactérienne (Clark et al., 1994). L'existence d'hémagglutinines est mieux caractérisée chez les bactéries Gram-négatives que Gram-positives même si elle a été prouvée chez certaines souches de bactérie Gram-positives telles *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) (Hell et al., 1998) et *S. epidermidis* (*Rupp et al., 1995). Alors que l'hémagglutinine de *S. saprophyticus* ne peut lier que les érythrocytes de mouton et la fibronectine, celle de *S. epidermidis* est non-spécifique et peut lier une grande variété d'érythrocytes (Hell et al., 1998; *Rupp et al., 1995).

Il a été démontré que chez *S. epidermidis* une forte association existe entre la formation de biofilm par des souches produisant des adhésines intercellulaires de nature polysaccharidique et l'hémagglutination (Fey et al., 1999). En effet, une corrélation de 100% a été démontrée entre les phénotypes qui forment des biofilms et l'hémagglutination dans le cas de *S. epidermidis* (Fey et al., 1999).

De plus, cette étude a démontré que PIA (β -1,6-linked glucosaminoglycan) ne médiait pas seulement la production de biofilm, mais aussi l'hémagglutination.

Un article à propos de *S. aureus* a identifié une protéine de 145 kDa dont les propriétés suggéreraient un rôle potentiel dans les premières étapes du développement de la MB (Lindahl et al., 1990). *S. aureus* est la cause la plus fréquente de la MB. Cette bactérie peut causer des infections autant aiguës que chroniques et les infections chroniques sont difficiles à éliminer (<http://prevmed.vet.ohio-state.edu/teaching/Vm611/Lab4/Mastitis.htm>). Une corrélation a été établie entre les propriétés hémagglutinantes de *S. aureus* isolé de la MB et l'habileté à adhérer aux cellules épithéliales (Lindahl et al., 1989).

Le test d'hémagglutination est une évaluation indirecte de la capacité de la souche à former un biofilm. Ce test est un outil très utile mais il est possible qu'une étude approfondie de la formation de biofilm comme ELLA (« enzyme-linked lectinsorbent assay » (Thomas et al., 1997)), la mesure du marqueur de l'uréase cellulaire (Dunne et Burd, 1991) et l'utilisation de bioluminescence pour mesurer l'attachement bactérien au polyéthylène (Ludwicka et al., 1985) puissent apporter des informations complémentaires sur ce phénomène et le lien existant avec l'hémagglutination.

Dans le cadre de notre étude épidémiologique, seul le test d'hémagglutination a été retenu pour caractériser la mucosité de nos souches cliniques puisqu'un membre de notre équipe avait démontré (résultats non-publiés) l'absence d'une corrélation solide entre la présence d'un biofilm évident et les tests classiques tels la méthode de Freeman rouge congo-agar (Freeman et al., 1989) et le test en tube de Christensen (Christensen et al., 1987; Christensen et al., 1982) associé au test à l'acide périodique de Schiff et au test de carbazole utilisés pour identifier les souches muqueuses. Nos études préliminaires (résultats non-publiés), basées sur l'utilisation de souches bactériennes reconnues comme étant fortement muqueuses et d'autres connues pour leur absence de mucosité, appuyaient les travaux du groupe de Fey (1999).

1.7 Épidémiologie de la mammite bovine

95% des infections bactériennes causant la MB sont causées par *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. aureus* et *E. coli* (<http://prevmed.vet.ohio-state.edu/teaching/Vm611/Lab4/Mastitis.htm>).

Les bactéries pathogènes qui se développent en biofilm à la surface des tissus et qui causent des maladies chroniques doivent être traitées avec de fortes doses d'antibiotiques afin de tuer tous les organismes protégés dans le biofilm. La guérison complète de ces foyers continus d'infection est très rare (Mayberry-Carson et al., 1986; Rabin et al., 1980). Ainsi on peut conclure que les bactéries dans le biofilm sont généralement plus résistantes aux biocides et

antibiotiques que leurs équivalents planctoniques. Il a été démontré *in vitro* que les bactéries encapsulées sont moins susceptibles que les bactéries non protégées aux effets opsoniques et bactéricides des anticorps spécifiques (Baltimore et Mitchell, 1980) et des phagocytes (Peterson et al., 1978; Schwarzmann et Boring, 1971; Whitnak et al., 1981). Les biofilms ont été détectés dans les tissus (Lam et al., 1980; Mayberry-Carson et al., 1984; Mills et al., 1984) infectés chroniquement par des bactéries. Les bactéries impliquées sont résistantes aux antibiotiques et aux mécanismes de défense humoraux et cellulaires de l'hôte (*Costerton, 1984; Costerton, 1984). *Staphylococcus aureus* est un agent infectieux fréquemment isolé d'infections mammites bovines chroniques (Baumgartner et al., 1984). 18% des infections mammites à streptocoques environnementaux (*S. uberis*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae*) deviennent chroniques et persistent plus de 100 jours (<http://prevmed.vet.ohio-state.edu/teaching/Vm611/Lab4/Mastitis.htm>).

Plusieurs auteurs, y compris notre équipe, pensent que la formation d'un biofilm de la part de ces bactéries infectieuses pourrait expliquer le phénomène de chronicité dans le cas de la MB (Rupp et al., 1995; Ziebuhr et al., 1997; Shibl, 1985). Cette hypothèse est renforcée par l'observation que plus de souches isolées du sang et autre infections liées aux liquides biologiques peuvent former un biofilm comparativement à des souches infectant la peau par exemple (Ziebuhr et al., 1997).

1.8 Pénicilline G

Nous avons sélectionné la pénicilline G comme antibiotique de référence pour déterminer la résistance microbienne des souches cliniques hémagglutinantes parce que la pénicilline G est utilisée couramment pour le traitement de la MB (Wilson et al., 1999; Hirvonen et al., 1994).

La pénicilline G est un antibiotique à large spectre d'efficacité contre les bactéries Gram-positives. Elle s'attaque à la formation du peptidoglycane qui est le composant majeur de l'enveloppe des bactéries Gram-positives. La pénicilline, comme plusieurs autres agents inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne inhibe les enzymes de transpeptidation impliqués dans le pontage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Elle active aussi les enzymes lytiques de la paroi. La pénicilline G ou benzylpénicilline est le premier antibiotique à avoir été largement utilisé en médecine. Les pénicillines G et V diffèrent l'une de l'autre de diverses manières. La pénicilline G est efficace contre les gonocoques, les méningocoques et certaines bactéries Gram-positives telles que les streptocoques et les staphylocoques mais elle doit être administrée par voie parentérale car elle est détruite par l'acide stomacal. La pénicilline V est similaire à la pénicilline G mais elle est plus résistante à l'acide et peut être donnée par voie orale (Prescott et al., 1995).

1.9 Objectifs de la présente étude

La MB est actuellement la cause de perte de profit la plus importante de l'industrie laitière. Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de détection rapide et spécifique des agents pathogènes bactériens qui peuvent causer la MB. En se basant sur la méthode moléculaire de PCR, nous avons développé 4 sondes contre chacune des principales espèces bactériennes causant la MB: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis* et *Streptococcus uberis* en plus de 4 sondes universelles. L'originalité de nos travaux repose sur le fait d'utiliser le lait comme matrice de détection. Nous avons comparé la sensibilité de détection à partir des microorganismes d'échantillons de lait, avec et sans étape de lyse cellulaire enzymatique et à partir d'échantillon en bouillon de culture. Notre méthode permet d'éliminer les étapes de pré-culture et l'utilisation de réactifs dispendieux ce qui en fait une méthode spécifique, efficace, peu coûteuse et applicable à l'industrie.

Dans le cadre de notre étude épidémiologique nous avons étudié le taux d'hémagglutination de souches bactériennes cliniques de la MB avec des érythrocytes de mouton. Nous avons ensuite évalué le lien possible entre une forte hémagglutination et une résistance prononcée à la pénicilline G chez des échantillons cliniques de la mammite bovine. Étant donné que ces échantillons cliniques provenaient de vaches infectées de façon chronique, nous soupçonnions que les souches pathogènes présentent une forte

hémagglutination et une forte résistance à la pénicilline G dû à la présence de biofilm. Ces deux tests complémentaires nous avérait les meilleurs outils afin d'étudier les souches cliniques de la mammité bovine et de mieux les caractériser. Notre témoin négatif était la souche de *Staphylococcus carnosus* ATCC 51 365 (Fey et al., 1999) et notre témoin positif était la souche de *Pseudomonas aeruginosa* 508 dont l'hémagglutination a pu être observée dans notre laboratoire. Nous avons ensuite déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la pénicilline G des souches cliniques présentant une forte capacité d'hémagglutination et de quelques souches faiblement hémagglutinantes choisies au hasard. Notre objectif était de démontrer l'existence possible d'un lien entre une forte hémagglutination et une résistance prononcée à la pénicilline G chez des souches prélevées *in vivo* de vaches chroniquement infectées et ayant subit un minimum de passages en culture. Nous avons établi que 32% (43/136) des souches bactériennes que nous avons testé hémagglutinaient avec les érythrocytes de mouton, mais seulement 9% des souches testées pour la susceptibilité à la pénicilline G ont démontré une résistance. Nous n'avons donc pu établir de lien entre une forte hémagglutination et une résistance prononcée à la pénicilline G.

CHAPITRE 2 – ARTICLE

Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR

Renée Riffon, Khampoune Sayasith, Hayssam Khalil, Pascal Dubreuil, Marc Drolet, et Jacqueline Lagacé

Département de Microbiologie et Immunologie
Université de Montréal
Montréal, Québec, Canada

Article publié dans *Journal of Clinical Microbiology* 2001 Jul;39(7):2584-2589.

Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR

RENÉE RIFFON,¹ KHAMPOUNE SAYASITH,¹ HAYSSAM KHALIL,¹ PASCAL DUBREUIL,²
MARC DROLET,¹ AND JACQUELINE LAGACÉ^{1*}

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec H3C 3J7,¹ and Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200, Saint-Hyacinthe, Montreal, Quebec J2S 2M2,² Canada

Received 4 December 2000/Returned for modification 8 April 2001/Accepted 29 April 2001

Bovine mastitis is the most important source of loss for the dairy industry. A rapid and specific test for the detection of the main pathogens of bovine mastitis is not actually available. Molecular probes reacting in PCR with bacterial DNA from bovine milk, providing direct and rapid detection of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis*, and *Streptococcus uberis*, have been developed. Two sets of specific primers were designed for each of these microorganisms and appeared to discriminate close phylogenetic bacterial species (e.g., *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*). In addition, two sets of universal primers were designed to react as positive controls with all major pathogens of bovine mastitis. The sensitivities of the test using *S. aureus* DNA extracted from milk with and without a pre-PCR enzymatic lysis step of bacterial cells were compared. The detection limit of the assay was 3.125×10^2 CFU/ml of milk when *S. aureus* DNA was extracted with the pre-PCR enzymatic step compared to 5×10^3 CFU/ml of milk in the absence of the pre-PCR enzymatic step. This latter threshold of sensitivity is still compatible with its use as an efficient tool of diagnosis in bovine mastitis, allowing the elimination of expensive reagents. The two PCR tests avoid cumbersome and lengthy cultivation steps, can be performed within hours, and are sensitive, specific, and reliable for the direct detection in milk of the six most prevalent bacteria causing bovine mastitis.

Bovine mastitis (BM) is an inflammation of the mammary gland, usually due to a microbial infection (28), which causes North American dairy producers to lose billions of dollars every year. These losses are primarily due to lower milk yields, reduced milk quality, and higher production costs. BM often becomes chronic, and it is important to identify quickly the new clinical cases in order to control infection in the herd. The bacteria responsible for BM can be classified as environmental (*Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis*, and *Streptococcus uberis*) or contagious (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*) depending of their primary reservoir (environment versus infected mammary gland quarter) (11, 25).

The suitability of a detection method for routine diagnosis depends on several factors, such as specificity, sensitivity, expense, amount of time, and applicability to large numbers of milk samples. The most common but unspecific method (2) to identify potential chronic infections is a somatic cell count: the California Mastitis Test in field conditions and the automated method in the diagnosis laboratory. Currently, the method of identification of the mammary gland pathogens is by in vitro culture, which provides the "gold standard"; however, this technique is labor-intensive and time-consuming. Two other problems can be encountered when these methods of identification are used: first, 2 to 3 days are required to grow, isolate, and identify the pathogen; second, some bacteria, like *S. uberis*

and *S. parauberis* (*S. uberis* type II), cannot be distinguished by biochemical assays (16). It has been demonstrated that early detection procedures have been shown to enhance cure rates and reduce the time required to return to normal milk when coupled with appropriate antimicrobial therapy (20). It is important to identify the pathogen not only for antimicrobial therapy purposes but also to monitor and control the rate of infection at the farm level.

During the last 7 years, many tests have been developed for the diagnosis of BM. However, a rapid (less than 1 day), simple, and specific test for each kind of bacterium involved has not been achieved. Many tests for the detection of human pathogens already exist. Some of these tests have been applied to pathogens of a bovine origin, such as the Minitek Gram-Positive Set for *Streptococcus* (29), but with no success because of a lack of information on veterinary pathogens in the database. Enzyme-linked immunosorbent assay methods exist for *S. aureus* detection in cases of BM (10), but the antibody titer does not correlate with the amount of infecting bacteria (10, 15). Other enzyme-linked immunosorbent assays were developed to screen milk for contamination with *Listeria* organisms (1, 9). Most PCR and API methods used for the detection of microorganisms in milk or in other organic samples need a step of multiplying the bacteria in culture media (3, 18, 21, 22, 27, 30) and are, therefore, time-consuming. Rapid identification methods, in particular nucleic acid-based tests, have the potential to be extremely specific and can also discriminate between closely related organisms, such as *S. parauberis* and *S. uberis*. It has been previously shown that milk samples could serve as substrate for the amplification of specific DNA sequences using PCR (6, 17). For all these reasons, we selected

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Case Postal 6128, Succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada. Phone: (514) 343-2180. Fax: (514) 343-6358. E-mail: jacqueline.lagace@umontreal.ca.

TABLE 1. Oligonucleotide primer sequences used for PCR

Primer	Specificity	Sequence(5'-3')	G+C content (%)
Eco 223	<i>E. coli</i>	ATC AAC CGA GAT TCC CCC AGT	52
Eco 455	<i>E. coli</i>	TCA CTA TCG GTC AGT CAG GAG	52
Eco 2083	<i>E. coli</i>	GCT TGA CAC TGA ACA TTG AG	45
Eco 2745	<i>E. coli</i>	GCA CTT ATC TCT TCC GCA TT	45
Sau 234	<i>S. aureus</i>	CGA TTC CCT TAG TAG CGG CG	60
Sau 1501	<i>S. aureus</i>	CCA ATC GCA CGC TTC GCC TA	60
Sau 327	<i>S. aureus</i>	GGG CGA CAT TAG ACG AAT CA	45
Sau 1645	<i>S. aureus</i>	CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT	45
Sag 40	<i>S. agalactiae</i>	CGC TGA GGT TTG GTG TTT ACA	48
Sag 445	<i>S. agalactiae</i>	CAC TCC TAC CAA CGT TCT TC	50
Sag 432	<i>S. agalactiae</i>	CGT TGG TAG GAG TGG AAA AT	45
Sag 1018	<i>S. agalactiae</i>	CTG CTC CGA AGA GAA AGC CT	55
Sdy 105	<i>S. dysgalactiae</i>	AAA GGT GCA ACT GCA TCA CTA	43
Sdy 386	<i>S. dysgalactiae</i>	GTC ACA TGG TGG ATT TTC CA	45
Sdy 519	<i>S. dysgalactiae</i>	GGC TCA ACC ACT NTA CGC TT	50
Sdy 920	<i>S. dysgalactiae</i>	ATC TCT ACG CCG GTC AGG AG	55
Spa 301	<i>S. parauberis</i>	GCG ACG TGG GAT CAA ATA CT	50
Spa 1219	<i>S. parauberis</i>	TAC CAT TAC CTC TAA AGG TA	35
Spa 2152	<i>S. parauberis</i>	TTT CGT CTG AGG CAA TGT TG	45
Spa 2870	<i>S. parauberis</i>	GCT TCA TAT ATC GCT ATA CT	35
Sub 302	<i>S. uberis</i>	CGA AGT GGG ACA TAA AGT TA	40
Sub 396	<i>S. uberis</i>	CTG CTA GGG CTA AAG TCA AT	45
Sub 1546	<i>S. uberis</i>	TGA TGG GGA GCG AAA ATA AG	45
Sub 2170	<i>S. uberis</i>	CCC AAC AAC GCC TCA AAC GA	55
Uni 678	Universal	AGT GGA ATT CCA TGT GTA GC	45
Uni 888	Universal	GAG TGC TTA ATG CGT TAG CT	45
Uni 1870	Universal	TGG AAG GTT AAG AGG AGT GG	50
Uni 2308	Universal	GCC TCC GTT ACC TTT TAG GA	50

a PCR technique as a method for identifying BM pathogens because of its precision, high limit of detection, and rapidity.

The aim of this study was to develop molecular tools to identify with rapidity, sensitivity, and specificity the major pathogens involved in intramammary infections in cows. To reach this objective, two sets of universal primers used as positive controls and two sets of specific primers for each bacterium species were developed to identify, by PCR, *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis*, and *S. uberis* in milk samples inoculated with these bacteria. Finally, the sensitivity of two PCR assays performed on *S. aureus* DNA samples prepared with and without a pre-enzymatic lysis step in milk and in Tryptic Soy Broth (TSB) was analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The organisms used in this study include *E. coli* DH5 α , *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *S. parauberis* ATCC 13386, *S. uberis* ATCC 9927, and three clinical isolates from cases of BM, *S. aureus* 97-6609, *S. agalactiae* 91-0121, and *S. dysgalactiae* 97-6617, which were identified biochemically by the API Staph and Strep systems accordingly. All organisms were cultured in TSB (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) at 37°C for about 17 h before DNA extraction. Cell numbers were determined by the preparation of serial dilutions of an overnight culture in phosphate-buffered saline (PBS) and plating on blood agar (Columbia agar base supplemented with 5% defibrinated sheep blood).

Preparation of bacterial DNA for PCR using the Dneasy Tissue kit from Qiagen. Bacteria were grown overnight in 20 ml of TSB, and then 1.5 ml of this culture was centrifuged at 5,000 \times g for 10 min. The Dneasy Tissue kit from Qiagen was used with some modifications to the protocol for gram-positive bacteria: the pellet was resuspended in 200 μ l of enzyme incubation buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.2% Triton, 20 μ g of lysozyme/ml, and 200 μ g of lysostaphin/ml) followed by an incubation period of 30 min at 37°C. Then, 20 μ g of RNase H (GIBCO Life Technologies, Montreal, Canada)/ml was added with 200 μ l of AL buffer (supplied with the kit) and incubated at 70°C for 10 min followed by the addition of 25 μ l of proteinase K (supplied with the kit) and incubation at 70°C for 30 min. This mixture was transferred into columns and

eluted with deionized autoclaved water by following the manufacturer's recommendation.

Preparation of bacterial DNA for the comparative study. A culture of *S. aureus* (1.6 \times 10⁸ CFU/ml) in TSB was distributed in tubes and centrifuged at 5,000 \times g for 15 min and the pellets were kept at -20°C until subsequent use. CFU per milliliter was determined by limit dilution and plating on blood agar (Columbia agar base supplemented with 5% defibrinated sheep blood). Thawed cells were resuspended in sterile bovine milk (ultra high temperature-treated [UHT] milk; Grand-Pré, Québec, Canada) or in TSB and submitted to twofold serial dilutions to reach concentrations of 4 \times 10⁴ to 3.125 \times 10² CFU/ml. Aliquots of 1 ml of these dilutions were centrifuged for 5 min at 7,000 \times g and submitted to four washes, and then the pellets were resuspended in 1 ml of 1 \times PBS and centrifuged at 5,000 \times g for 5 min. PBS rather than water was used for washes to precipitate calcium ions from the milk, which is known to be a PCR inhibitor (8), and to protect the bacterial membranes from lysis during these steps. After the last centrifugation, the pellet was resuspended in 1 ml of autoclaved distilled water to allow the burst of bacterial cells. This preparation was directly used for PCR or treated with the Dneasy Tissue kit. At the end of this latter step, 600 μ l of deionized autoclaved water was added to the DNA preparation to obtain a total volume of 1 ml ready for PCR use. Sample of 5 μ l of these preparations were used for PCR.

PCR primers. PCR primers were designed from highly divergent and species-specific regions of the DNA coding for 16S and 23S rRNA (16S or 23S rRNA) based on previously published sequence entries available in the GenBank database (*E. coli*, GI no. 42756; *S. aureus*, GI no. 288516; *S. agalactiae*, GI no. 2353759; *S. dysgalactiae*, GI no. 560494; *S. parauberis*, GI no. 433515; and *S. uberis*, GI no. 433703 and 2668550). Genes encoding rRNA were used as target sequences rather than genes encoding mRNA because of the signal enhancement due to the presence of several copies of genes encoding rRNA in the genome (4). The sequences, specificities, and G+C contents are summarized in Table 1. The primer combinations, the annealing temperatures, and the lengths of the amplified products are summarized in Table 2. These primers were synthesized by AlphaDNA (Montreal, Canada). All these primers were resuspended to a final concentration of 200 μ M in deionized autoclaved water. The working concentration of the primers for PCR was 5 μ M.

PCR amplification. PCR was performed in a GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer). All reactions were carried out in a final volume of 100 μ l. Volumes of 200 ng of extracted DNA template or 5 μ l of bacterial preparation, 5 μ M primer, 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (GIBCO Life Technologies, Montreal, Canada), 10 μ l of 10 \times PCR buffer minus Mg (GIBCO Life Technologies), 3 μ l of 50 mM MgCl₂, and all four deoxynucleotide triphosphates (supplied by GIBCO Life Technologies) were added to a 0.5-ml microcentrifuge tube. A pre-PCR step at 94°C for 2 min was applied. A total of 35 PCR cycles were run under the following conditions: denaturation at 94°C for 45 s, annealing (at the temperature in Table 2) for 1 min, and extension at 72°C for 2 min. After the final cycle, the preparation was kept at 72°C for 10 min to complete the reaction. The PCR products were stored in the thermocycler at 4°C until they were collected.

Detection of PCR products. Twenty microliters of the PCR-amplified product was analyzed by electrophoresis on a 1.7% agarose gel stained with 0.5 μ g of ethidium bromide/ml. Electrophoresis was carried out in 1 \times TAE (pH 8.0; 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) at 80 V for 2 h. The molecular size marker, a

TABLE 2. Primer conditions during PCR

Forward primer	Reverse primer	Annealing temp (°C)	Size of product amplified (bp)
Eco 223	Eco 455	64	232
Eco 2083	Eco 2745	57	662
Sau 234	Sau 1501	70	1,267
Sau 327	Sau 1645	64	1,318
Sag 40	Sag 445	60	405
Sag 432	Sag 1018	65	586
Sdy 105	Sdy 386	57	281
Sdy 519	Sdy 920	57	401
Spa 301	Spa 1219	57	918
Spa 2152	Spa 2870	57	718
Sub 302	Sub 396	56	94
Sub 1546	Sub 2170	59	624
Uni 678	Uni 888	56	210
Uni 1870	Uni 2308	58	438

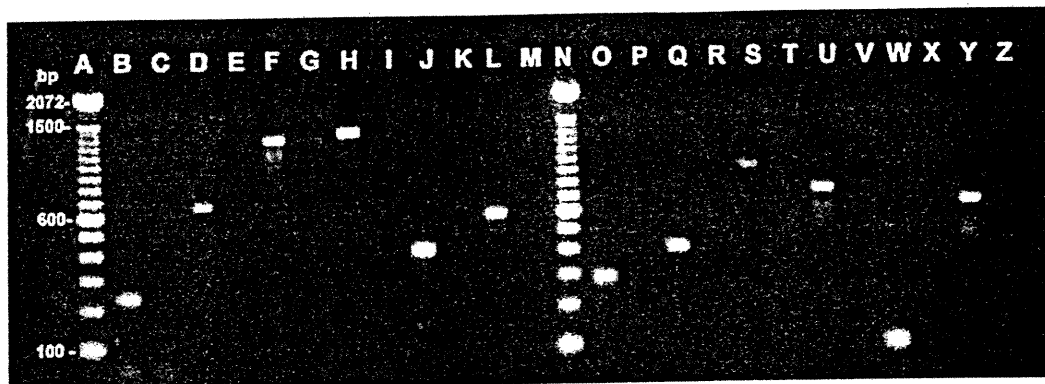


FIG. 1. Demonstration of the specificity of the molecular probes in PCR assay with purified bacterial DNA from different species. Amplification products of the different primer combinations were analyzed by electrophoresis on a 1.7% agarose gel. Lanes: A, 100-bp DNA ladder (GIBCO Life Technologies); B and C, primers Eco 223 and Eco 455 with *E. coli* (B) and *P. aeruginosa* (C); D and E, primers Eco 2083 and Eco 2745 with *E. coli* (D) and *P. aeruginosa* (E); F and G, primers Sau 234 and Sau 1501 with *S. aureus* (F) and *S. epidermidis* (G); H and I, primers Sau 327 and Sau 1645 with *S. aureus* (H) and *S. epidermidis* (I); J and K, primers Sag 40 and Sag 445 with *S. agalactiae* (J) and *S. dysgalactiae* (K); L and M, primers Sag 432 and Sag 1018 with *S. agalactiae* (L) and *S. dysgalactiae* (M); N, 100-bp DNA ladder (Life Technologies, Inc.); O and P, primers Sdy 105 and Sdy 386 with *S. dysgalactiae* (O) and *S. agalactiae* (P); Q and R, primers Sdy 519 and Sdy 920 with *S. dysgalactiae* (Q) and *S. agalactiae* (R); S and T, primers Spa 301 and Spa 1219 with *S. parauberis* (S) and *S. uberis* (T); U and V, primers Spa 2152 and Spa 2870 with *S. parauberis* (U) and *S. uberis* (V); W and X, primers Sub 302 and Sub 396 with *S. uberis* (W) and *S. parauberis* (X); and Y and Z, primers Sub 1546 and Sub 2170 with *S. uberis* (Y) and *S. parauberis* (Z).

100-bp, 1-kb DNA ladder (GIBCO Life Technologies), was run concurrently. Gels were visualized under UV illumination (Alphadoc; Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Calif.) and photographed.

RESULTS

Specificity of primers. The specific oligonucleotide primer sequences designed to amplify and identify the main bacteria causing BM are presented in Table 1. Twelve pairs of primers were tested (2 pairs/bacterium). Prior to PCR, purified DNA was run on 0.8% agarose gel and quantified by UV absorbance at 260 and 280 nm to confirm its quantity and presence in PCR. The specificity of the primer pairs was confirmed by the positive amplification of the DNA from bacteria found in BM, whereas no DNA amplification was observed with the closest phylogenetic bacteria tested, as demonstrated in Fig. 1. The assay

was controlled as follows: *Pseudomonas aeruginosa* was tested as a negative control for *E. coli*. *S. epidermidis* was a negative control for *S. aureus*, *S. dysgalactiae* was a negative control for *S. agalactiae*, *S. agalactiae* was a negative control for *S. dysgalactiae*, *S. uberis* was a negative control for *S. parauberis*, and finally, *S. parauberis* was a negative control for *S. uberis*. Amplification of the DNA templates using proper primers produced the expected fragments (Fig. 1) between 94 and 1,318 bp as shown in Table 2.

Universal primer amplification. Universal primer pairs Uni 678 plus Uni 888 and Uni 1870 plus Uni 2308 were tested against six bacterial species: *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis*, and *S. uberis* (Fig. 2). A product of 210 bp was observed when Uni 678 and Uni 888 were tested, and a product of 438 bp was observed when Uni 1870 and Uni

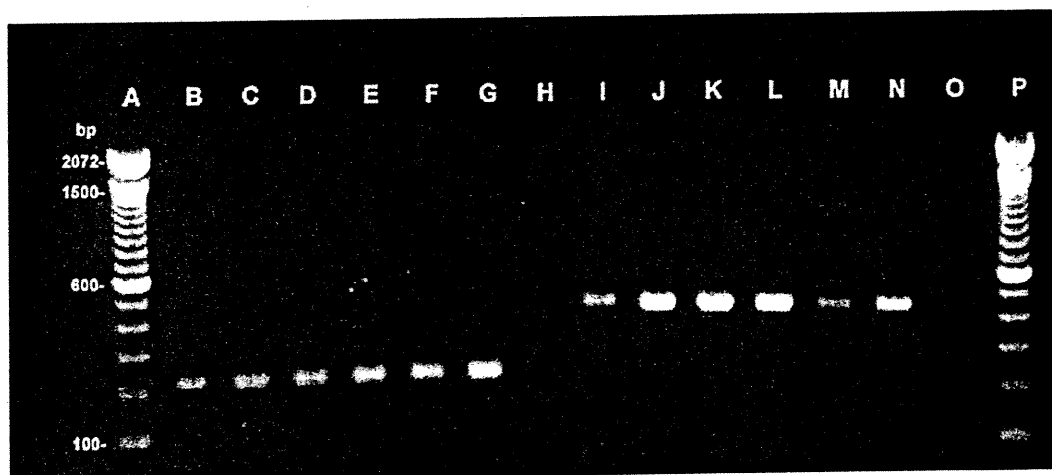


FIG. 2. PCR amplification of purified bacterial DNA by using two pairs of universal primers. Amplification products for the different primer combinations were analyzed by electrophoresis on a 1.7% agarose gel. Lanes: A, 100-bp DNA ladder (GIBCO Life Technologies); B to H, primers Uni 678 and Uni 888 with *E. coli* (B), *S. aureus* (C), *S. agalactiae* (D), *S. dysgalactiae* (E), *S. parauberis* (F), *S. uberis* (G), and a negative control without DNA (H); I to O, primers Uni 1870 and Uni 2308 with *E. coli* (I), *S. aureus* (J), *S. agalactiae* (K), *S. dysgalactiae* (L), *S. parauberis* (M), *S. uberis* (N), and a negative control without DNA (O); P, 100-bp DNA ladder (GIBCO Life Technologies).

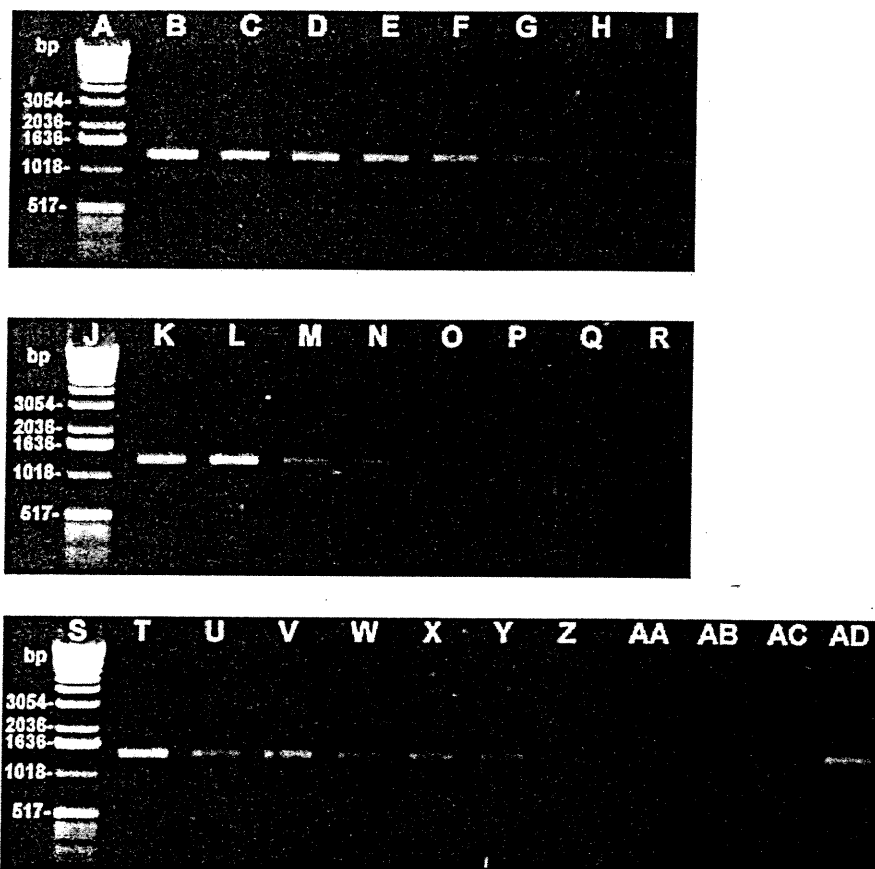


FIG. 3. Sensitivity of the PCR assay in detecting DNA from two different media (milk and TSB) artificially inoculated with *S. aureus* 97-6609 with and without a pre-PCR enzymatic lysis step of bacterial cells. Primers Sau 327 and Sau 1645 were used. The amounts of bacteria used were 4×10^4 (lanes B, K, and T), 2×10^4 (C, L, U), 1×10^4 (D, M, V), 5×10^3 (E, N, W), 2.5×10^3 (F, O, X), 1.25×10^3 (G, P, Y), 6.25×10^2 (H, Q, Z), and 3.125×10^2 (I, R, AA) CFU. Lanes: A, J, and S, 1-kb DNA ladder (GIBCO Life Technologies); B to I, *S. aureus* samples resuspended in milk at the concentrations indicated above and extracted with the pre-PCR enzymatic step; K to R, *S. aureus* samples resuspended in milk at the concentrations indicated above and not subjected to the pre-PCR treatment; T to AA, *S. aureus* samples resuspended in TSB at the concentrations indicated above and not subjected to the pre-PCR treatment; AB, PCR mixture without bacteria in milk; AC, PCR mixture without bacteria in TBS; AD, positive control using 200 ng of *S. aureus* DNA.

2308 were used. Amplification was not observed in negative controls of PCR mix. The universal primers used in this study, Uni 678 plus Uni 888 and Uni 1870 plus Uni 2308, were able to detect all BM pathogens cited above. The intensity of each amplification was good with all the bacteria tested. The strongest signal was obtained with the primers Uni 678 and Uni 888 for *S. uberis* and Uni 1870 and Uni 2308 for *S. aureus* (Fig. 2). These primer sets were designed from DNA regions coding for 16S and 23S rRNA, respectively. Nucleotide sequence data comparison (BLASTN 2.0) showed that the primers Uni 678, Uni 888, Uni 1870, and Uni 2308 are conserved for all pathogens of BM.

Sensitivity of PCR assay depending on pretreatment used.

In the aim to make the test as simple and cheap as possible, we tried to eliminate the pre-PCR enzymatic lysis step of bacterial cells. Secondly, in comparing milk with the TSB as support medium, it was possible to measure the inhibitory effect of milk, particularly calcium ions, on the PCR test. For control purposes, uninoculated samples of UHT milk and TSB media were also subjected to the sample preparation methods and to PCR. No amplification could be observed (Fig. 3c). Figure 3a shows the PCR results obtained following the pre-PCR enzy-

matic lysis step using the Qiagen kit: a very high level of sensitivity corresponding to 1.56 CFU/5 μ l of PCR mixture or 3.125×10^2 CFU/ml of milk was obtained, as demonstrated by the twofold serial dilutions of the *S. aureus* samples. The sensitivity of the assay fell to 6.25 CFU/5 μ l of PCR mixture or 1.25×10^3 CFU/ml of TSB in the absence of the pre-PCR enzymatic lysis step of the *S. aureus* cells (Fig. 3c). In milk, the elimination of the pre-PCR enzymatic lysis step of *S. aureus* gave a level of sensitivity of 25 CFU/5 μ l of milk, or 5.0×10^3 CFU/ml of milk (Fig. 3b).

DISCUSSION

An efficient vaccine against BM is not yet available, and prevention as a measure of control needs sensitive, rapid, and specific tests to identify the main bacteria that cause heavy losses in the dairy industry. Conventional procedures for the identification of BM pathogens are labor-intensive, and most of the commercial identification systems are not designed to identify important veterinary pathogens (16, 29). We aimed to develop a detection and identification test for BM pathogens that produced results in 1 day, did not need a culture step, and

was as specific, sensitive, and cheap as possible. Molecular methods are very efficient tools for the development of newly improved diagnosis tests. When methods such as ribotyping are laborious, new methods using PCR based on the 16S or the 23S rDNA region sequences have been successfully applied for the identification of many bacteria (5, 7, 12, 19, 23, 24, 26, 31). The major advantages of PCR lay in the possibility of using only nanograms of nucleic acid samples, allowing the elimination of culture, rapidity, and easy analysis. Therefore, we selected PCR amplification of DNA regions coding for rRNA because of the presence of hypervariable regions, which facilitates the design of highly specific oligonucleotide probes (13) and common regions for the design of universal probes (14). Moreover, rDNA is present in many copies, which permits signal enhancement (4).

Specific primers described here (Table 1 and Fig. 1) were proven to be specific since on agarose gel only one band was observed for each set of primers and no signal was detected with negative controls. The primers for *E. coli*, *S. aureus*, *S. parauberis*, and *S. uberis* were designed based on a DNA sequence coding for 23S rRNA, and primers for *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* were based on DNA coding for 16S rRNA. All the signals were very obvious even though the bands produced by the primers Eco 2083 and Eco 2745 with *E. coli* and Spa 301 and Spa 1219 with *S. parauberis* were of lower intensity (Fig. 1). The difference of signal cannot be explained by the amount of DNA used for PCR because the same amount (200 ng) was used for all bacteria. Therefore, it is possible that the difference in the copy numbers of the coding regions for these particular probes could explain the phenomenon (4). Negative controls made with the closest phylogenetic bacteria found in BM confirmed the specificity of each primer set. While the bacteria *S. parauberis* and *S. uberis* are genotypically and phenotypically close, PCR performed with the described primers made it possible to distinguish between them. The universal primer sets used as positive controls, Uni 678 plus Uni 888 and Uni 1870 plus Uni 2308, were designed from DNA regions coding for 16S and 23S rRNA, respectively. Even though the nucleotide sequence data comparison (BLASTN 2.0) showed that the four universal primers are conserved in all pathogens of BM, the sequences can vary by 1 or 2 nucleotides, therefore varying the signal intensity.

In the aim to evaluate the sensitivity level of the PCR test and to reduce the cost and the duration of the test, a study to compare the sensitivities of the test with and without a pre-PCR enzymatic lysis step of the bacterial cells was performed. It appeared that the limits of detection of the PCR test performed on infected milk samples treated with a pre-PCR enzymatic lysis step were 1.56 CFU/5 μ l of PCR mixture and 3.12×10^2 CFU/ml of milk. Although these very high levels of sensitivity were diminished to 1.25×10^3 CFU per ml of TSB and 5×10^3 CFU per ml of milk (Fig. 3) in the absence of the pre-PCR enzymatic lysis step, these levels of the detection limit are sensitive enough to be used as a diagnosis tool for BM. The level of this detection limit was obtained by significantly reducing the quantity of calcium ions from milk by performing four washes with PBS. We think that it would be possible to increase the sensitivity level of CFU detection in milk in the absence of the pre-PCR enzymatic lysis step to the same level observed in TSB by improving the method to eliminate calcium

ions. Even though PCR is less labor-intensive than bacterial culture and conventional methods of bacterial identification, the elimination of the pre-PCR enzymatic lysis step leads to a more important economy of expensive reagents and time.

In conclusion, a PCR-based assay for the detection of the major pathogens involved in BM is described here. The test, directly performed from milk samples without a culture step, is specific for *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis*, and *S. uberis*. The primers were designed from the 16S and 23S rRNA sequences available in GenBank. The test can be performed with and without a pre-PCR enzymatic lysis step of the bacterial cells. The greatest advantage of the latter version is the elimination of expensive reagents. When used with the pre-PCR enzymatic lysis step, the test can be performed in 6 h and reaches a limit of detection of 3.12×10^2 CFU/ml of milk. The test without the pre-PCR enzymatic lysis step can be performed in 4.5 h and reaches a limit of detection of 5×10^3 CFU/ml of milk. Considering the level of detection obtained in TSB without the pre-PCR enzymatic lysis step, it could be possible to improve the detection limit of the latter assay in milk by using a better method to eliminate calcium ions. Secondly, it will be important to test in the near future the detection limit of the molecular probes in milk from actual mastitis cases. If the results comply with the present study, these PCR tests could be readily implemented in clinical veterinary microbiological laboratories and be of great value for promoting prevention of BM.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR, Québec, Canada) and Novalait.

REFERENCES

- Adams, D. S., J. S. McDonald, D. Hancock, and T. C. McGuire. 1988. *Staphylococcus aureus* antigens reactive with milk immunoglobulin G of naturally infected dairy cows. *J. Clin. Microbiol.* 26:1175-1180.
- Andrews, A. H., R. W. Blowey, H. Boyd, and R. G. Eddy. 1992. Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle, p. 289-300. Blackwell Publishing Co., London, United Kingdom.
- Andrews, A. T. 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50:45-55.
- Bentley, R. W., and J. A. Leigh. 1995. Determination of 16S ribosomal RNA gene copy number in *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. parauberis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12:1-7.
- Bentley, R. W., and J. A. Leigh. 1995. Development of PCR-based hybridization protocol for identification of streptococcal species. *J. Clin. Microbiol.* 33:1296-1301.
- Berri, M., K. Laroucau, and A. Rodolakis. 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 72:285-293.
- Bes, M., V. Guerin-Fauble, H. Meugnier, J. Etienne, and J. Freney. 2000. Improvement of the identification of Staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. *Vet. Microbiol.* 71:287-294.
- Bickley, J., J. K. Short, D. G. McDowell, and H. C. Parkes. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:153-158.
- Bourry, A., T. Cochard, and B. Poutrel. 1997. Serological diagnosis of bovine, caprine, and ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* by using an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 35:1606-1608.
- Bourry, A., and B. Poutrel. 1996. Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*: kinetics of antibody responses in serum and milk after experimental infection. *J. Dairy Sci.* 79:2189-2195.
- Bramley, A., J. 1996. Current concepts of bovine mastitis. National Mastitis Council, Madison, Wis.
- Forsman, P., A. Tilsala-Timisjarvi, and T. Alatossava. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology* 143:3491-3500.
- Giovannoni, S. J., E. F. DeLong, G. J. Olsen, and N. R. Pace. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of sin-

- gle microbial cells. *J. Bacteriol.* **170**:720-726.
14. Gray, M. W., D. Sankoff, and R. J. Cedergren. 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in a small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **12**:5837-5852.
 15. Heisick, J. E., F. M. Harrell, E. H. Peterson, S. McLaughlin, D. E. Wagner, I. V. Wesley, and J. Bryner. 1989. Comparison of four procedures to detect *Listeria* spp. in foods. *J. Food Prot.* **52**:154-157.
 16. Jayarao, B. M., J. J. Dore, Jr., G. A. Baumbach, K. R. Matthews, and S. P. Oliver. 1991. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2774-2778.
 17. Lipkin, E., A. Shalom, H. Khatib, M. Soller, and A. Friedmann. 1993. Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* **76**:2025-2032.
 18. Lorenz, H., C. Jager, H. Willems, and G. Baljer. 1998. PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4234-4237.
 19. Mendoza, M., H. Meugnier, M. Bes, J. Etienne, and J. Freney. 1998. Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1049-1055.
 20. Milner, P., K. L. Page, and J. E. Hillerton. 1997. The effects of early antibiotic treatment following diagnosis of mastitis detected by a change in the electrical conductivity of milk. *J. Dairy Sci.* **80**:859-863.
 21. Queipo-Ortuno, M. I., M. A. Garcia-Ordenez, J. D. Colmenero, and P. Morata. 1999. Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *BioTechniques* **27**:248-250, 252.
 22. Reale, S., L. Maxia, F. Vitale, N. S. Glorioso, S. Caracappa, and G. Vesco. 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2931-2935.
 23. Sabat, G., P. Rose, W. J. Hickey, and J. M. Harkin. 2000. Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:844-849.
 24. Saruta, K., T. Matsunaga, M. Kono, S. Hoshina, S. Ikawa, O. Sakai, and K. Machida. 1997. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**:271-278.
 25. Smith, B. P. 1996. Large animal internal medicine, 2nd ed., p. 1181-1193. Mosby, Boston, Mass.
 26. Straub, J. A., C. Hertel, and W. P. Hammes. 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Prot.* **62**:1150-1156.
 27. Thomas, E. J., R. K. King, J. Burchak, and V. P. Gannon. 1991. Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2576-2580.
 28. Watts, J. L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **16**:41-66.
 29. Watts, J. L. 1989. Evaluation of the Minitek Gram-Positive Set for identification of streptococci isolated from bovine mammary glands. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1008-1010.
 30. Wernars, K., C. J. Heuvelman, T. Chakraborty, and S. H. Notermans. 1991. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J. Appl. Bacteriol.* **70**:121-126.
 31. Whitehead, T. R., and M. A. Cotta. 2000. Development of molecular methods for identification of *Streptococcus bovis* from human and ruminal origins. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**:237-240.

CHAPITRE 3 – DISCUSSION ET CONCLUSION

Les méthodes de détection et d'identification des agents pathogènes causant la MB doivent être sensibles, rapides et spécifiques afin d'être utilisées comme moyen de dépistage pour le contrôle et pour la prévention de la MB. Les méthodes conventionnelles utilisées pour l'identification des pathogènes de la MB sont laborieuses et la plupart des systèmes d'identification commerciaux ne sont pas élaborés pour l'identification de pathogènes vétérinaires importants (Jayarao et al., 1991; Watts, 1989). Les méthodes moléculaires sont des outils très efficaces pour le développement de tests diagnostiques améliorés. Les techniques comme le ribotypage sont laborieuses mais de nouvelles techniques utilisant le PCR et basées sur les séquences d'ADN codant pour la région 16S ou le 23S de l'ARN ribosomal (ARNr) ont été utilisées pour l'identification de plusieurs bactéries (Bentley et Leigh, 1995; Bes et al., 2000; Forsman et al., 1997; Mendoza et al., 1998; Sabat et al., 2000; Saruta et al., 1997; Straub et al., 1999; Whitehead et Cotta, 2000). L'amplification d'acides nucléiques par PCR a déjà beaucoup d'applications dans la détection de bactéries et autres agents infectieux en laboratoire de microbiologie clinique (Batt, 1997; McKee et al., 1991; Pillai, 1997; Pimbley et Patel, 1998; Tang et al., 1997). Ainsi, nous avons décidé d'utiliser la méthode d'amplification par PCR des séquences d'ADN codant pour l'ARNr à cause de la présence de régions hypervariables qui facilitent le développement d'oligonucléotides extrêmement spécifiques (Giovannoni et al., 1988) et de régions communes

pour le développement de sondes universelles (Gray et al., 1984). En plus de ces deux avantages, l'ADN ribosomal est présent en plusieurs copies ce qui permet une amplification du signal de détection (*Bentley et Leigh, 1995).

Du lait artificiellement contaminé a été utilisé pour notre travail puisque des bactéries comme *P. aeruginosa* et *S. epidermidis* (nos contrôles négatifs) peuvent aussi être présentes dans le lait. *S. aureus* a été notre contrôle positif pour détection dans le lait sans pré-traitement enzymatique parce que *S. aureus* est une bactérie dont il est difficile de rompre la couche de peptidoglycane à cause de ses ponts inter peptides. La lysostaphine est habituellement utilisée pour rompre ces ponts (Boneca et al. 2000). Si l'absence de pré-traitement enzymatique permet la détection de cette bactérie, notre traitement pourrait être efficace pour tous les autres types de bactéries étudiées dans le présent travail.

La spécificité des amorces développées dans ce travail (Cf. Table 1 et Figure 1 du chapitre 2) a été démontrée sur gel d'agarose. En effet, seulement une bande sur gel d'agarose a pu être observée pour chaque paire d'amorces et aucun signal n'a été détecté avec les contrôles négatifs. Les amorces pour *E. coli*, *S. aureus*, *S. parauberis* et *S. uberis* ont été conçues à partir de la séquence d'ADN codant pour l'ARNr 23S et les amorces pour *S. agalactiae* et *S. dysgalactiae* sont basées sur la séquence d'ADN codant pour l'ARNr 16S. Tous les signaux observés sur gel d'agarose étaient évidents même si les

bandes produites avec les amorces Eco 2083 et Eco 2745 pour *E. coli* et Spa 301 et Spa 1219 pour *S. parauberis* étaient de moindre intensité (Cf. Figure 1 du chapitre 2). La différence dans le signal ne peut pas être expliquée par la quantité d'ADN utilisée pour le PCR puisque la même quantité (200 ng) a été utilisée pour toutes les bactéries. Ainsi, il est possible que la différence dans le nombre de copies de séquences codant pour ces sondes particulières puisse expliquer ce phénomène (*Bentley et Leigh, 1995). Les contrôles négatifs à partir de bactéries phylogénétiquement proches et retrouvées dans la MB confirment la spécificité de chaque paire d'amorces. Alors que les bactéries *S. parauberis* et *S. uberis* sont génétiquement et phénotypiquement rapprochées, le PCR appliqué avec les amorces décrites a permis de les différencier. Les paires d'amorces universelles utilisées comme contrôle positif, Uni 678 avec Uni 888 et Uni 1870 avec Uni 2308 ont été conçues à partir de régions d'ADN codant pour l'ARNr 16S et 23S respectivement. Même si la comparaison de séquences nucléotidiques (BLASTN 2.0) a démontré que les quatre amorces universelles étaient conservées parmi tous les pathogènes de la MB, les séquences peuvent varier de 1 ou 2 nucléotides, ce qui pourrait expliquer la variation d'intensité du signal sur gel d'agarose.

Dans le but de vérifier le niveau de sensibilité et de réduire les coûts et la durée de notre test PCR, nous avons comparé la sensibilité du test avec et sans pré-traitement de lyse enzymatique. La limite de détection du test PCR appliqué sur des échantillons de lait infectés et traités avec une étape de lyse

enzymatique était de 1,56 UFC/5 μ L de mélange PCR, soit $3,12 \times 10^2$ UFC/mL de lait. Même si ce niveau très sensible de détection a diminué à $1,25 \times 10^3$ UFC par mL de bouillon de culture TSB et 5×10^3 UFC par mL de lait (Cf. Figure 3 du chapitre 2) en absence du pré-traitement de lyse enzymatique, ces niveaux de limite de détection sont assez sensibles pour être utilisés comme outil de diagnostic pour la MB. Cette limite de détection a été obtenue en réduisant de façon significative la quantité d'inhibiteurs possible du PCR (ex.: ions calcium) par de simples lavages au PBS et par dilution de l'échantillon. Nous pensons qu'il serait possible d'améliorer le niveau de détection de UFC dans le lait en absence de pré-traitement de lyse enzymatique au même niveau observé dans le TSB en améliorant la méthode d'élimination des ions calcium. Le PCR est moins laborieux que la culture bactérienne et les méthodes d'identification traditionnelles mais l'élimination de l'étape de pré-traitement de lyse enzymatique nous amène à réaliser des économies importantes de temps et d'argent.

Notre méthode de détection par PCR, en plus d'être plus rapide (< 6 heures) que les méthodes d'identification biochimique traditionnelles (2 à 3 jours) (National Mastitis Council, 1989), démontre plusieurs avantages évidents sur ces méthodes. D'une part, il se peut que dans certains cas d'identification biochimique d'organismes, la détection et l'identification puissent être entravées par une thérapie antimicrobienne en cours chez l'animal puisque ce traitement peut ralentir la croissance cellulaire *in vitro* à cause de résidus

d'antibiotique présents dans l'échantillon. Étant donné qu'une étape de multiplication des bactéries dans l'échantillon est nécessaire pour l'identification par méthode biochimique, celle-ci peut-être erronée dû au faible nombre de bactéries disponibles. D'autre part, certaines espèces bactériennes pathogènes comme *S. agalactiae* et *S. dysgalactiae* analysées dans cette étude sont fastidieuses, c'est-à-dire que leur taux de croissance en milieu *in vitro* est généralement plus lent que celui des autres espèces bactériennes tel qu'observé dans notre laboratoire. Ceci confère un avantage aux méthodes qui ne nécessitent pas d'étape de culture, comme notre méthode PCR qui est assez sensible pour l'éviter. Ainsi, ces organismes peuvent alors être identifiés aussi rapidement que les autres espèces qui poussent plus rapidement en culture *in vitro*.

Finalement, une méthode de détection des agents pathogènes majeurs de la MB basée sur le PCR est décrite ici. Ce test, appliqué directement sur des échantillons de lait sans étape de culture est spécifique pour *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* et *S. uberis*. Notre méthode offre trois avantages évidents; premièrement, elle permet la détection et l'identification d'espèce bactérienne même dans les échantillons de lait polymicrobiens, deuxièmement, étant donné que l'organisme n'est pas amplifié par pré-culture, le signal obtenu est proportionnel au nombre d'organismes présents initialement. Ainsi notre méthode offre l'avantage d'une évaluation semi-quantitative de la quantité de bactéries présentes dans

l'échantillon par l'utilisation d'une culture bactérienne de concentration connue pour fin de comparaison; troisièmement, un test diagnostique comme le nôtre aura comme effet direct de permettre l'établissement plus rapide d'une thérapie antimicrobienne efficace et ainsi réduire le niveau d'utilisation de traitements empiriques à large spectre d'efficacité. Ce type de traitement est associé à des coûts élevés et présente des dangers de toxicité (Bergeron et Ouellette, 1995). La diminution de l'utilisation d'antibiotiques devrait aussi par conséquent réduire l'émergence de résistance. Les amorces ont été générées à partir de séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S et 23S disponibles dans GenBank. Ce test peut être appliqué avec et sans pré-traitement de lyse enzymatique des bactéries présentes dans l'échantillon. Le plus grand avantage de l'absence de pré-traitement est l'élimination de réactifs dispendieux. Lorsque l'étape de pré-traitement enzymatique est appliquée, le test peut être fait en 6 h et atteint une limite de détection de $3,12 \times 10^2$ UFC/mL de lait. Sans cette étape, le test peut être fait en 4,5 h et atteint une limite de détection de 5×10^3 UFC/mL de lait. Considérant le niveau de détection obtenu dans le TSB sans pré-traitement enzymatique, il serait possible d'améliorer la limite de détection de cette méthode dans le lait en utilisant un meilleur moyen pour éliminer les ions calcium et en augmentant le nombre de cycles d'amplification (35 cycles d'amplification) de notre protocole de PCR. Maintenant, il serait important de tester la limite de détection de nos sondes moléculaires dans des échantillons cliniques de lait mammites. En effet, par la méthode de PCR quantitatif décrite par Boeckh et

Boivin (Boeckh et Boivin, 1998), la quantité relative ou absolue d'ADN soumit à la réaction d'amplification peut être déterminée. Ainsi, la relation mathématique suivante est utilisée pour établir un rapport entre la concentration initiale d'ADN et la concentration d'ADN amplifiée:

$$Y = X (1 + E)_n$$

où Y est la quantité d'ADN amplifiée, X est la quantité d'ADN avant le PCR, E est l'efficacité moyenne de chaque cycle de PCR et n est le nombre de cycles d'amplification. La concentration de la quantité inconnue d'ADN dans un échantillon clinique peut-être estimée à partir d'une courbe standard, générée en indiquant la valeur logarithmique des produits de PCR (exprimée dans n'importe laquelle des unités de mesure) en ordonnée et la valeur logarithmique d'une quantité connue d'ADN cible (standards) en abscisse. Le nombre original de copies génomiques présentes dans l'échantillon clinique peut être déterminé par l'interpolation de la valeur logarithmique des produits amplifiés à partir de la courbe standard. Toutefois, dans la plupart des procédures de PCR, l'efficacité globale est inférieure à 100% et l'augmentation de la quantité d'amplicons demeure exponentielle pour un nombre limité de cycles après lesquels l'amplification atteint un plateau (Clementi et al., 1993; Ferre, 1992). Des protocoles de PCR semi-quantitatifs ont été développés en déterminant le titre de l'ADN ou d'un contrôle externe avant amplification (Lu et Andrieu, 1993) ou par co-amplification d'une séquence endogène pour contrôler la variabilité dans chaque tube (Murphy et al., 1990; Noonan et al., 1990). Si les résultats obtenus confirment la présente

étude, ces tests PCR pourront être implantés dans les laboratoires cliniques de microbiologie vétérinaire et seront d'une grande valeur dans la prévention de la MB.

La capacité d'hémagglutination a été très utilisée pour l'évaluation de la spécificité de l'adhérence bactérienne (Clark et al., 1994) aux surfaces cellulaires. En s'inspirant de cette prémisse et du fait qu'une forte association a été démontrée chez *S. epidermidis* entre la formation de biofilm par des souches produisant des adhésines intercellulaires de nature polysaccharidiques et l'hémagglutination (Fey et al., 1999), nous avons décidé d'évaluer la capacité d'hémagglutination de 136 souches cliniques de la mammite bovine pour vérifier si le lien hémagglutination-biofilm existait chez ces souches. Nous avons également tenté de vérifier s'il y avait un lien entre l'hémagglutination et la résistance à la pénicilline G.

Notre étude a porté essentiellement sur des souches cliniques Gram-positives pour deux raisons principales; premièrement, les échantillons cliniques disponibles étaient majoritairement composés de bactéries Gram-positives, deuxièmement, les infections aux bactéries Gram-positives sont les plus communes en tant que cause de la mammite bovine.

Dans la littérature, il a été établi qu'environ 23% des souches de *S. aureus* (Rupp et al., 1995) et plus de 50% des souches de *S. dysgalactiae* causant la

MB sont capables d'hémagglutination (Calvinho et al., 1998). Nos résultats (Cf. Tableau I de l'Annexe 1) confirment ces études puisque 21% des souches de *S. aureus* et 59% des souches de *S. dysgalactiae* que nous avons testées sont capables d'hémagglutination. Nos souches provenant d'échantillons de lait mammitieux reflètent donc la population générale pathogène infectant les vaches mammitieuses.

En se basant sur les résultats présentés au Tableau II de l'Annexe 1, aucune corrélation ne peut être observée entre la capacité d'hémagglutination d'une souche et une résistance accrue à la pénicilline G. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque la littérature évoque une résistance accrue aux antibiotiques de la part de souches formant un biofilm (ex.: *K. pneumoniae* mucoïdes (Domenico et Straus, 1985), *P. aeruginosa* mucoïdes (Baltimore et Mitchell, 1980)) (Cf. Figure 2 du chapitre 1). La différence entre nos résultats et ceux publiés, c'est-à-dire la non-corrélation entre une forte hémagglutination et l'observation d'une résistance accrue à la pénicilline G peut être expliquée de la façon suivante: les observations publiées sont tirées d'études *in vivo*. Il est connu de la littérature que les bactéries cultivées *in vivo* et *in vitro* démontrent des différences dans leur virulence (Lee et al., 1993; Watson, 1982) et que par conséquent, une étude sur le biofilm utilisant des bactéries planctoniques (non-adhérentes) cultivées *in vitro* ne reflète pas nécessairement le phénomène se produisant *in vivo*. Ceci pourrait expliquer

pourquoi nous n'avons pas observé de résistance accrue à la pénicilline G chez les souches ayant démontré une forte hémagglutination.

Des expériences *in vitro* sur des bactéries planctoniques prélevées (lait de vaches mammites) d'organismes où la formation de biofilm est soupçonnée (infection chronique) peuvent être très utiles. En effet, ces tests indiqueraient l'efficacité des agents antibactériens envers les bactéries planctoniques qui pourraient se détacher du biofilm *in vivo*. Des résultats négatifs obtenus avec les bactéries planctoniques discréditeraient donc un agent pour usage contre des bactéries adhérentes du biofilm (Costerton et al., 1987) présentes lors d'infections chroniques. Dans une publication du groupe de De Oliveira (De Oliveira et al., 2000), 811 souches cliniques de *S. aureus* ont été isolées de cas de mammites bovines dans 11 pays d'Europe. Cette étude ne mentionne pas si ces cas étaient de type chronique, mais elle fournit par contre le renseignement suivant: aucune résistance à la pénicilline n'a été observée chez ces souches. Il serait maintenant intéressant de vérifier le phénomène d'hémagglutination chez ces échantillons cliniques afin de corréler nos résultats.

BIBLIOGRAPHIE

Almeida, R. A., D. A. Luther, S. J. Kumar, L. F. Calvino, M. S. Bronze et S. P. Oliver. 1996. Adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells and to extracellular matrix proteins. Zentralbl Veterinarmed [B]. **43(7):385-392.**

Aly, R. et S. Levit. 1987. Adherence of *S. aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. Rev. Infect. Dis. **9(Suppl 4):S341-S350.**

Archer, G. L. et C. G. Mayhall. 1983. Comparison of epidemiologic markers used in the investigation of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. J. Clin. Microbiol. **18:395-399.**

Arens, M. 1999. Methods for Subtyping and Molecular Comparison of Human Viral Genomes. Clin. Microbiol. Rev. **12:612-626.**

Baddour, L. M., G. D. Christensen et K. H. J. Schadow. 1989. The effect of slime production on vancomycin efficacy in the treatment of experimental endocarditis due to *Staphylococcus epidermidis*. J. Antimicrob. Chemother. **24(3):365-73.**

Bagg, J., I. R. Poxton, D. M. Weir et P. W. Ross. 1982. Binding of type III group B streptococci to buccal epithelial cells. J. Med. Microbiol. **15(3):363-372.**

Baker, N. R., V. Minor, C. Deal, M. S. Shahrabadi, D. A. Simpson et D. E. Woods. 1991. Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S is an adhesin. Infect. Immun. **59(9):2859-2863.**

Baltimore, R. S. et M. Mitchell. 1980. Immunologic investigations of mucoid

strains of *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of susceptibility by opsonic antibody in mucoid and nonmucoid strains. *J. Infect. Dis.* **141**:238-247.

Batt, C. A. 1997. Molecular diagnostics for dairy-borne pathogens. *J. Dairy Sci.* **80**:220-229.

Baumgartner, A., J. Nicolet et M. Eggimann. 1984. Plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. *J. Appl. Bacteriol.* **56**:159-163.

***Bentley, R. W. et J. A. Leigh.** 1995. Determination of 16S ribosomal RNA gene copy number in *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. parauberis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**:1-7.

Bentley, R. W. et J. A. Leigh. 1995. Development of PCR-based hybridization protocol for identification of streptococcal species. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1296-1301.

Bergeron, M. G. et M. Ouellette. 1995. Diagnosing bacterial infectious diseases in one hour: an essential upcoming revolution. *Infection.* **23**:69-72.

Bes, M., V. Guerin-Fauble, H. Meugnier, J. Etienne et J. Freney. 2000. Improvement of the identification of Staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. *Vet. Microbiol.* **71**:287-294.

Boeckh, M. et G. Boivin. 1998. Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:533-554.

Boneca, I.G., Z. H. Huang, D. A. Gage, A. Tomasz. 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* cell wall glycan strands, evidence for a new beta-N-

acetylglucosaminidase activity. *J. Biol. Chem.* **275**:9910-9918.

Brown, M. R. W. et P. Williams. 1985. The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**:527-556.

Calvinho, L. F., R. A. Almeida et S. P. Oliver. 1998. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **61**:93-110.

Carles-Nurit, M. J., B. Christophle, S. Broche, A. Gouby, N. Bouziges et M. Ramuz. 1992. DNA polymorphisms in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2092-2096.

Carruthers, M. M. et W. J. Kabat. 1983. Mediation of staphylococcal adherence to mucosal cells by lipoteichoic acid. *Infect. Immun.* **40**(1):444-446.

Christensen, G. D., L. M. Baddour et W. A. Simpson. 1987. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.* **55**(12):2870-2877.

Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Bisno et E. H. Beachey. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* **37**(1):318-326.

Clark, V., L. Bavoil et M. Patrik. Bacterial pathogenesis. Part B, interaction of pathogenic bacteria with host cells. *Collection Methods in enzymology.* Vol. 236. Academic Press. San Diego. Toronto. 1994.

Clementi, M., S. Menzo, P. Bagnarelli, A. Manzin, A. Valenza et P. E. Varaldo. 1993. Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *PCR Methods Appl.* **2**:191-196.

***Costerton, J. W.** 1984. The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: a hypothesis. *Rev. Infect. Dis.* **6**:S608-S616.

Costerton, J. W. 1984. The formation of biocide-resistant biofilms in industrial, natural and medical systems. *Dev. Ind. Microbiol.* **25**:363-372.

Costerton, J. W., K. -J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta et T. J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**:435-464.

Costerton, J. W. et T. J. Marrie. 1983. The role of the bacterial glycocalyx in resistance to antimicrobial agents. In *Role of the Envelope in the Survival of Bacteria in Infection*. ed. C. S. F. Easmon, J. Jeljaszewicz, M. R. W. Brown, P. A. Lambert, pp. 63-85. London/New York: Academic.

De Oliveira, A. P., J. L. Watts, S. A. Salmon et F. M. Aarestrup. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.* **83**:855-862.

Domenico, P. et D. C. Straus. 1985. Extracellular polysaccharide production by *Klebsiella pneumoniae* and its relation to virulence. *Can. J. Microbiol.* **32**:472-478.

Dunne, W. M. et E. M. Burd. 1991. *In vitro* measurement of adherence of *Staphylococcus epidermidis* to plastic using cellular urease as a marker. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 863-866.

Engleberg, N. C. et B. I. Eisenstein. 1992. Detection of microbial nucleic acids for diagnostic purposes. *Ann. Rev. Med.* **43**:147-155.

Ferre, F. 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl.* **2**:1-9.

Fey, P. D., J. S. Ulphani, F. Götz, C. Heilmann, D. Mack et M. E. Rupp. 1999. Characterization of the Relationship between Polysaccharide Intercellular Adhesin and Hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **179**:1561-1564.

Firon, N., S. Ashkenazi, D. Mirelman, I. Ofek et N. Sharon. 1987. Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to yeast and intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **55**(2):472-476.

Flock, J. I., S. A. Hienz, A. Heimdahl et T. Schennings. 1996. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **64**(5):1876-1878.

Forsman, P., A. Tilsala-Timisjarvi et T. Alatossava. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology.* **143**:3491-3500.

Freeman, D. J., F. R. Falkiner et C. T. Keane. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* **42**(8):872-874.

Frenay, J., H. Meugnier, M. Bes et J. Fleurette. 1993. Identification of *Staphylococcus aureus* using a DNA probe: Accuprobe. *Ann. Biol. Clin.* **51**:637-639.

Frost, A. J., D. D. Wanasinghe et J. B. Woolcock. 1977. Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. *Infect. Immun.* **15**:245-253.

Garber, N., N. Sharon, D. Shohet, J. S. Lam et R. J. Doyle. 1985. Contribution of hydrophobicity to hemagglutination reactions of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **50**(1):336-337.

Gaston, M. A., P. S. Duff, J. Naidoo, K. Ellis, J. I. S. Roberts, J. F. Richardson, R. R. Marples et E. M. Cooke. 1988. Evaluation of electrophoretic methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **26**:189-197.

Gerke, C., A. Kraft, R. Sußmuth, O. Schweitzer et F. Götz. 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* **273**:18586-18593.

Gillespie, M. T., B. R. Lyon et R. A. Skurray. 1990. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotic resistance phenotypes. *J. Med. Microbiol.* **31**:57-64.

Giovannoni, S. J., E. F. DeLong, G. J. Olsen et N. R. Pace. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170**:720-726.

Gray, M. W., D. Sankoff et R. J. Cedergren. 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in a small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **12**:5837-5852.

Hacker, J. 1990. Genetic determinants coding for fimbriae and adhesins of extraintestinal *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **151**:1-27.

Hasty, D. L., I. Ofek, H. S. Courtney et R. J. Doyle. 1992. Multiple Adhesins of Streptococci. *Infect. Immun.* **60**(6):2147-2152.

Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Res.* **1**:34-38.

Hazlett, L. D., M. Moon et R. S. Berk. 1986. *In vivo* identification of sialic acid as the ocular receptor for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **51**(2):687-689.

Hazlett, L. D., M. M. Moon, M. Strejc et R. S. Berk. 1987. Evidence for N-acetylmannosamine as an ocular receptor for *P. aeruginosa* adherence to scarified cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**(12):1978-1985.

Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakam, D. Mack D et F. Götz. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* **20**:1083-1091.

Hell, W., H. Meyer et S. Gatermann. 1998. Cloning of *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Mol. Microbiol.* **29**:871-881.

Hirose, K., Y. Kawasaki, K. Kotani, A. Tanaka, K. Abiko et H. Ogawa. 2001. Detection of mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method. *J. Vet. Med. Sci.* **63**:691-693.

Hirvonen, J., S. Pyorala, A. Heinasuo et H. Jousimies-Somer. 1994. Penicillin G and penicillin G-tinidazole treatment of experimentally induced summer mastitis--effect on elimination rates of bacteria and outcome of the disease. *Vet. Microbiol.* **42**:307-315.

Holderbaum, D., R. A. Spech et L. A. Ehrhart. 1985. Specific binding of collagen to *Staphylococcus aureus*. *Coll. Relat. Res.* **5**(3):261-271.

Hubert, W. G. 1977. Antibacterial drug effectiveness against mastitis pathogens. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **170**:1182-1184.

Hyypia, T., A. Jalava, S. H. Larsen, P. Terho et V. Hukkanen. 1985. Detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens by nucleic acid spot hybridization. *J. Gen. Microbiol.* **131**:975-978.

Jayarao, B. M., J. J. Dore, Jr. G. A. Baumbach, K. R. Matthews et S. P. Oliver. 1991. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2774-2778.

Johnson, J. L. 1989. Nucleic acid hybridization: principles and techniques. In *Nucleic Acid and Monoclonal Antibody Probes - Applications in Diagnostic Microbiology*. Swaminathan, B. et Prakash, G., editeurs. pp. 3-31. New York - Basel: Marcel Dekker, Inc.

Kricka, L. J. 1992. *Non-isotopic DNA probe Techniques*. Acad. Press, San Diego CA.

Krivan, H. C., V. Ginsburg et D. D. Roberts. 1988. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients

bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). Arch. Biochem. Biophys. **260**(1):493-496.

Lam, J. S., R. Chan, K. Lam et J. W. Costerton. 1980. The production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. Infect. Immun. **28**:546-556.

Lee, J. C., S. Takeda, P. J. Livolsi et L. C. Paoletti. 1993. Effects of *in vitro* and *in vivo* growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. **61**:1853-1858.

Lindahl, M., P. Jonsson et P. A. Mardh. 1989. Hemagglutination of *Staphylococcus aureus*. Studies on strains isolated from bovine mastitis. Acta Pathol. Microbiol. Scand. **97**:175-180.

Lindahl, M., O. Holmberg et P. Jonsson. 1990. Adhesive proteins of haemagglutinating *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. J. Gen. Microbiol. **136**:935-939.

Lorenz, H., C. Jager, H. Willems et G. Baljer. 1998. PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix. Appl. Environ. Microbiol. **64**:4234-4237.

Lorian, V., B. Atkinson, A. Waluschka et Y. Kim. 1982. Ultrastructure, *in vitro* and *in vivo* of staphylococci exposed to antibiotics. Curr. Microbiol. **7**:301-304.

Lorian, V., O. Zak, J. Suter et C. Bruecher. 1985. Staphylococci *in vitro* and *in vivo*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **3**:433-444.

Lu, W. et J. M. Andrieu. 1993. Early identification of human immunodeficiency virus-infected asymptomatic subjects susceptible to zidovudine by quantitative viral coculture and reverse transcription-linked polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* **167**:1014-1020.

Ludwicka, A., L. M. Switalski, A. Lundin, G. Pulverer et G. Wadstrom. 1985. Bioluminescent assay for measurement of bacterial attachment to polyethylene. *J. Microbiol. Methods.* **4**:169-177.

Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge et R. Laufs. 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* **178**(1):175-183.

Mack, D. 1999. Molecular mechanisms of *S. epidermidis* biofilm formation. *J. Hosp. Infect.* **43**(Suppl):S113-S125.

Malone, J. S. et D. E. Caldwell. 1983. Evaluation of surface colonization kinetics in continuous culture. *Microbiol. Ecol.* **9**:299-306.

Martinez, G., J. Harel et M. Gottschalk. 2001. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. *Can. J. Vet. Res.* **65**:68-72.

Matthews, K. R., B. M. Jayarao et S. P. Oliver. 1992. Restriction endonuclease fingerprinting of genomic DNA of *Staphylococcus* species of bovine origin. *Epidemiol. Infect.* **109**:59-68.

Mattingly, S. J. et B. P. Johnston. 1987. Comparative analysis of the localization of lipoteichoic acid in *S. agalactiae* and *S. pyogenes*. *Infect. Immun.* **55**(10):2383-2386.

Maxe, I., C. Ryden, T. Wadstrom et K. Rubin. 1986. Specific attachment of *S. aureus* to immobilized fibronectin. *Infect. Immun.* **54**(3):695-704.

Mayberry-Carson, K. J., B. Tober-Meyer, J. K. Smith, D. W. Lambe et J. W. Costerton. 1984. Bacterial adherence and glycocalyx formation in osteomyelitis experimentally induced with *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **43**: 825-833.

Mayberry-Carson, K. J., B. Tober-Meyer, D. W. Jr. Lambe et J. W. Costerton. 1986. An electron microscopic study of the effect of clindamycin therapy on bacterial adherence and glycocalyx formation in experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Microbios.* **48**:189-206.

McKee, R. A., C. M. Gooding, S. D. Garrett, H. A. Powell, B. M. Lund et M. Knox. 1991. DNA probes and the detection of food-borne pathogens using the polymerase chain reaction. *Biochem. Soc. Trans.* **19**:698-701.

Mendoza, M., H. Meugnier, M. Bes, J. Etienne et J. Freney. 1998. Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1049-1055.

Mills, J., L. Pulliam, D. Dall, J. Marzouk, W. Wilson et J. W. Costerton. 1984. Exopolysaccharide production by viridans streptococci in experimental endocarditis. *Infect. Immun.* **43**:359-367.

Muller, E., J. Hubner, N. Gutierrez, S. Takeda, D. A. Goldman et G. B. Pier. 1993. Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide adhesin and slime. *Infect. Immun.* **61**:551-558.

Mulligan, M. E., R. Y. Y. Kwok, D. M. Citron, J. F. John, Jr. et P. B. Smith. 1988. Immunoblots, antimicrobial resistance and bacteriophage typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2395-2401.

Murphy, L. D., C. E. Herzog, J. B. Rudick, A. T. Fojo et S. E. Bates. 1990. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry.* **29**:10351-10356.

National Mastitis Council. 1989. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection. 3e édition. Arlington, VA.

National Mastitis Council. 1996. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4e édition. Arlington, VA.

Nickel, J. C., I. Ruseska et J. W. Costerton. 1985. Tobramycin resistance of cells of *Pseudomonas aeruginosa* growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:619-624.

Nickel, J. C., I. Ruseska, C. Whitfield, T. J. Marrie et J. W. Costerton. 1985. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter *in vivo*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **4**:213-218.

Noonan, K. E., C. Beck, T. A. Holzmayer, J. E. Chin, J. S. Wunder, I. L. Andrulis, A. F. Gazdar, C. L. Willman, B. Griffith, D. D. Von Hoff et al. 1990. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:7160-7164.

Nozohoor, S., A. Heimdahl, P. Colque-Navarro, I. Julander, B. Soderquist et R. Mollby. 1998. Virulence factors of *Staphylococcus aureus* in the

pathogenesis of endocarditis. A comparative study of clinical isolates. Zentralbl. Bakteriol. **287**(4):433-447.

Ofek, I. et R. J. Doyle. 1994. Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall, New York.

Opdebeeck, J. P. et A. J. Frost. 1987. Effect of milk whey on adhesion of bacteria to bovine udder epithelial cells. Aust. Vet. J. **64**:282-283.

Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi et T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**:2766-2770.

Peterson, P. K., B. J. Wilkinson, Y. Kim, D. Schmeling et P. G. Quie. 1978. Influence of encapsulation on staphylococcal opsonization and phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. **19**:943-949.

Pillai, S. D. 1997. Rapid molecular detection of microbial pathogens: breakthroughs and challenges. Arch. Virol. Suppl. **13**:67-82

Pimbley, D. W. et P. D. Patel. 1998. A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. **27**:98S-109S.

Pittet, J. F., J. P. Wiener-Kronish, V. Serikov et M. A. Matthay. 1995. Resistance of the alveolar epithelium to injury from septic shock in sheep. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **151**(4):1093-1100.

Potera, C. 1996. Biofilms Invade Microbiology. Science. **273**:1795-1797.

Prescott, Harley et Klein. 1995. Microbiologie. 2e édition. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles.

Rabin, H. R., F. L. Harley, L. E. Bryan, G. L. Elfring. 1980. Evaluation of a high dose tobramycin anticarcillin treatment protocol in cystic fibrosis based on improved susceptibility criteria and antibiotic pharmacokinetics. In Perspectives in Cystic Fibrosis, ed. J. M. Sturgess, pp.370-375. Toronto: Can. Cystic Fibrosis Found.

Ramphal, R. et G. B. Pier. 1985. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. Infect. Immun. **47**(1):1-4.

***Rupp, M. E., N. Sloat, H. G. W. Meyer, J. Han et S. Gatermann.** 1995. Characterization of the hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis. **172**:1509-1518.

Rupp, M. E., J. Han et S. Gatermann. 1995. Hemagglutination by *S. aureus* strains responsible for human bacteremia or bovine mastitis. Med. Microbiol. Immunol. **184**(1):33-36.

Sabat, G., P. Rose, W. J. Hickey et J. M. Harkin. 2000. Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil. Appl. Environ. Microbiol. **66**:844-849.

Salmanzadeh Ahrabi, S., O. Koseoglu, T. Kocagoz, S. Erguven et A. Gunalp. 1999. Detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction. Zentralbl. Bakteriol. **289**:31-36.

Sanchez, D. O., R. Madrid, J. C. Engel et A. C. C. Frasch. 1984. Rapid identification of *Trypanosoma cruzi* isolates by 'dot-spot' hybridization. FEBS Lett. **168**:139-142.

Saruta, K., T. Matsunaga, M. Kono, S. Hoshina, S. Ikawa, O. Sakai et K. Machida. 1997. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. FEMS Microbiol. Lett. **146**:271-278.

Schlichting, C., C. Branger, J.-M. Fournier, W. Witte, A. Boutonnier, C. Wolz, P. Goulet et G. Doring. 1993. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulse-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing: resolution of clonal relationships. J. Clin. Microbiol. **31**:227-232.

Schwarzmann, S. et J. R. III Boring. 1971. Antiphagocytic effect of slime from mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. **3**:762-767.

Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour et T. S. Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol. **51**:873-884.

Shibl, A. 1985. Effect of antibiotic on adherence of microorganisms to epithelial cell surfaces. Rev. Infect. Dis. **7**(1):51-65.

Straub, J. A., C. Hertel et W. P. Hammes. 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. J. Food Prot. **62**:1150-1156.

Tang, Y. W., G. W. Procop et D. H. Persing. 1997. Molecular diagnostics of infectious diseases. Clin. Chem. **43**:2021-2038.

Tannock, G. W. 2001. Molecular assessment of intestinal microflora. Am. J. Clin. Nutr. **73**(Suppl):410S-414S.

Teti, G., N. M. Burdash, K. Corey et C. Fava. 1985. Detection of group B streptococci by agglutination testing from selective broth cultures. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **15**(4):292-298.

Thomas, V. L., B. A. Sandford, R. Moreno et M. A. Ramsay. 1997. Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay Measures *N*-Acetyl-D-Glucosamine in Matrix of Biofilm Produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Curr. Microbiol.* **35**: 249-254.

West Agro Inc. 1988. Udder Health: Mastitis Prevention and Control. Kansas City, MO.

Van Alphen, L., H. M. Jansen et J. Dankert. 1995. Virulence factors in the colonization and persistence of bacteria in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**:2094-2100.

Van Belkum, A., R. Bax, P. Peerbooms, W. H. F. Goessens, N. van Leeuwen et W. G. V. Quint. 1993. Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discriminating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **31**:798-803.

Wanasinghe, D. D. 1981. Adherence as a prerequisite for infection of the bovine mammary gland by bacteria. *Acta Vet. Scand.* **22**:109-117.

Wang, Y.-H. et J. Griffith. 1991. Effects of bulge composition and flanking sequence on the kinking of DNA by bulged bases. *Biochemistry* **30**:1358-1363.

Watson, D. L. 1982. Virulence of *Staphylococcus aureus* grown *in vitro* or *in vivo*. *Res. Vet. Sci.* **32**:311-315.

Watts, J. L. 1989. Evaluation of the Minitex Gram-Positive Set for identification of streptococci isolated from bovine mammary glands. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1008-1010.

Westerlund, B. et T. K. Korhonen. 1993. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **9**:687-694.

Whitehead, T. R. et M. A. Cotta. 2000. Development of molecular methods for identification of *Streptococcus bovis* from human and ruminal origins. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**:237-240.

Wibawan, I. W., C. Lammler, R. S. Seleim et F. H. Pasaribu. 1993. A haemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells. *J. Gen. Microbiol.* **139**(pt9):2173-2178.

Wilson, D. J., R. N. Gonzalez, K. L. Case, L. L. Garrison and Y. T. Grohn. 1999. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* **82**:1664-1670.

Whitnak, E., A. L. Bisno et E. H. Beachey. 1981. Hyaluronate capsule prevents attachment of Group A streptococci to mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **31**:985-991.

Zak, O. et M. A. Sande. 1982. Correlation of *in vitro* activity of antibiotics with results of treatment in experimental animal models and human infection. In *Action of Antibiotics in Patients*, ed. L. D. Sabath, pp.55-67, Berne, Switzerland: Huber.

Zanini, M. S., E. C. Moreira, M. T. Lopes, P. Mota et C. E. Salas. 1998. Detection of *Mycobacterium bovis* in milk by polymerase chain reaction. Zentralbl. Veterinarmed. **45**:473-479.

Ziebuhr, W., C. Heilmann, F. Gotz, P. Meyer, K. Wilms, E. Straube et J. Hacker. 1997. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. Infect. Immun. **65**:890-896.

Zuccarelli, A. J., I. Roy, G. P. Harding et J. J. Couperus. 1990. Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **28**:97-102.

Sites internet

<http://prevmed.vet.ohio-state.edu/teaching/Vm611/Lab4/Mastitis.htm>

<http://www.nmconline.org/glossary.htm>

<http://www.nmconline.org/environmental.htm>

<http://www.nmconline.org/contmast.htm>

<http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-233/404-233.html>

ANNEXE 1 - ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE

A.1 Matériels et méthodes

A.1.1 Souches bactériennes et conditions de croissance

Cent-trente-six souches cliniques de la MB (streptocoques et staphylocoques) ont fait l'objet de cette étude. Une souche d'*Enterococcus spp.* et de *Pseudomonas maltophilia* ont aussi été analysées. Les résultats de ces souches sont présentés à titre informatif seulement dans le Tableau I de l'Annexe 1 puisqu'elles sont de type Gram-négatives et que notre étude porte essentiellement sur des souches cliniques Gram-positives. Ainsi, les résultats de ces souches ne sont pas comptabilisés dans le Tableau II de l'Annexe 1. Les souches bactériennes utilisées pour cette étude sont pour la majorité des souches cliniques (Cf. Tableau I de l'Annexe 1) offertes par le laboratoire du Dr Pascal Dubreuil (Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada) et isolées d'échantillons de lait mammiteux. La souche de *Staphylococcus carnosus* ATCC 51 365 (American Type Culture Collection, Rochester, NY, États-Unis), qui ne forme pas de biofilm et n'hémagglutine pas (Götz, 1990), a été utilisée comme contrôle négatif pour le test d'hémagglutination. *Pseudomonas aeruginosa* 508 (une souche clinique isolée à partir des expectorations d'un patient atteint de fibrose kystique) qui montre une mucosité importante sur gélose préparée à l'aide de Protéose Peptone no.2 (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), tel qu'observé dans notre laboratoire a été utilisée comme contrôle positif pour le test d'hémagglutination. Les cultures stock on été préparées dans du Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) contenant 30% de glycérol

(Sigma, Oakville, Ontario, Canada) et conservées à -80°C jusqu'à utilisation. Les souches bactériennes ont été cultivées dans 20 mL de Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Tout au long de l'expérience, 10 mL de milieu TSB ont été retirés et remplacés par 10 mL de milieu TSB toutes les 12 heures. Aux temps 0 h, 24 h et 48 h, les 10 mL de cultures bactériennes prélevés ont été divisés en 2 parties dont 5 mL de la culture bactérienne ont été utilisés pour le test d'hémagglutination et 5 mL pour la détermination de la CMI (lorsque ce test était appliqué).

A.1.2 Traitement des érythrocytes à l'acide tannique

Des érythrocytes de mouton (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) lyophilisés ont été resuspendus dans un volume approprié (selon le format de l'ampoule) de PBS 1X, pH 6,4 préparé fraîchement et stérilisé par filtration. Des érythrocytes de mouton plutôt que d'origine bovine ont été utilisés tel que décrit précédemment (Fey et al., 1999; Lindahl et al., 1989). À 3 mL de cette suspension d'érythrocytes, 1,5 mL de solution d'acide tannique (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) 1 / 5 000 préparée fraîchement, stérilisée par filtration et préchauffée à 37°C ont été ajoutés. Une incubation à 37°C de 10 minutes a suivi. La solution d'érythrocytes a ensuite été centrifugée à 1 000 x g durant 10 minutes. Le surnageant a été rejeté et le culot lavé avec 40 mL de PBS 1X, pH 6,4. Les érythrocytes traités à l'acide tannique ont finalement été resuspendus à une concentration finale de 4 % dans 2 mL de PBS 1 X, pH 6,4. Cette solution pouvait être conservée à 4°C pendant 1 mois.

A.1.3 Test d'hémagglutination

Les 5 mL de suspension bactérienne prélevés aux temps 0, 24 h et 48 h ont été centrifugés à 5 000 X g durant 15 minutes, suivi d'un lavage avec 10 mL de tampon phosphate salin (PBS 1X, pH 7,2) contenant 0,1 % d'albumine sérique de bœuf (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) selon un protocole déjà publié (Fey et al., 1999). La densité optique de la suspension bactérienne a alors été ajustée à un McFarland de 0,5 (densité optique de 0,152 à une longueur d'onde de 550 nm, ce qui correspond à environ 10^8 UFC (unités viables/mL)) dans 12 mL de tampon phosphate salin (PBS 1X, pH 7,2) contenant 0,1 % d'albumine sérique de bœuf (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). La suspension bactérienne a ensuite été diluée en série selon un facteur de 2, avec du tampon phosphate salin (PBS 1X, pH 7,2) contenant 0,1% d'albumine sérique de bœuf (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). Cinquante μ L de la suspension bactérienne diluée ont été ajoutés dans les puits d'une plaque de 96 puits en forme de U (GIBCO Life Technologies, Montréal, Canada). Ensuite, 50 μ L d'une solution de 1 % d'érythrocytes traités à l'acide tannique et dilués dans du tampon phosphate salin (PBS 1X, pH 7,2) contenant 0,1 % d'albumine sérique de bœuf (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) ont été ajoutés, suivi par une incubation à la température de la pièce durant 2 heures. L'intensité d'hémagglutination a été déterminée en fonction d'une échelle maximale de 8+. Les résultats d'hémagglutination ont été évalués de la façon suivante: en absence d'hémagglutination (observation d'un culot évident, compact d'érythrocytes au fond du puits), la notation « - » était attribuée. En présence

d'hémagglutination, une notation de « 1+ » à « 8+ » était attribuée selon l'intensité, « 1+ » étant l'intensité la plus faible, et « 8+ » étant l'intensité d'hémagglutination la plus forte.

A.1.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la pénicilline G

Une solution stock de pénicilline G (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) de 10 mg/mL a été préparée dans du Tryptic Soy Broth frais (TSB) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) à un pH 7,2. À partir de cette solution stock, des dilutions en série d'un facteur de 2 dans du TSB ont été réalisées afin d'obtenir des concentrations de travail de 2 048 à 0,125 µg/mL de pénicilline G. Cent µL de ces dilutions d'antibiotique ont ensuite été aliquotés dans les puits d'une plaque de 96 puits en forme de U (GIBCO Life Technologies, Montréal, Canada) pour obtenir des concentrations finales de 1024 à 0,0625 µg/mL de pénicilline G après dilutions avec 100 µL de suspension bactérienne. Une fois l'antibiotique aliquoté dans les puits, les plaques d'antibiotique scellées de pellicule-film malléable (Parafilm M, Fisher, Nepean, Ontario, Canada) pouvaient être conservées à -80°C jusqu'à 2 semaines. Cinq mL de chacune des suspensions bactériennes prélevés aux temps 0, 24 h et 48 h ont été centrifugés 15 minutes à 5 000 X g. Le culot a ensuite été resuspendu dans 12 mL de milieu de culture TSB. La densité optique a été ajustée à 0,5 McFarland (densité optique de 0,152 à une longueur d'onde de 550 nm, ce qui correspond à environ 10^8 UFC (unités viables/mL)) dans 5 mL de milieu de

culture liquide TSB. Cette suspension bactérienne a été diluée 1/100 (10^6 UFC/mL). Cent μ L de la solution bactérienne diluée 1/100 ont été ajoutés à chacun des puits contenant déjà l'antibiotique (5×10^5 UFC/mL), et ce, dans un délai maximal de 15 à 20 minutes. Un témoin positif pour chaque souche a été réalisé en incorporant 100 μ L de milieu de culture TSB à la dilution 1/100 de suspension bactérienne. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C (avec agitation) pendant 16 à 20 heures.

A.2 Résultats

Pour les expériences d'hémagglutination et de susceptibilité des différentes souches bactériennes (CMI) envers la pénicilline G, des prélèvements aux temps 0 h, 24 h et 48 h ont été réalisés. Ces différents temps de prélèvement ont été sélectionnés afin de vérifier l'évolution dans le temps de l'hémagglutination et de la CMI. Étant donné que les résultats ne diffèrent pas dans le temps, une seule série de résultats a été présentée (Cf. Tableau I de l'Annexe 1).

A.2.1 Test d'hémagglutination

En aucun cas la souche de *S. carnosus* ATCC 51365 n'a démontré une hémagglutination alors que la souche de *P. aeruginosa* 508 a démontré une hémagglutination de 8+ pour chacune des expériences. Ce sont les souches de *S. agalactiae* et *S. dysgalactiae* qui font montre du plus grand pouvoir hémagglutinant avec 13 souches positives parmi les 32 souches analysées. 10

/ 38 souches de *S. aureus* ont démontré une forte hémagglutination. Chez *S. suis* et *S. uberis*, seulement 1 et 2 souches respectivement ont été identifiées comme hémagglutinantes. Pour chacune des espèces bactériennes, la proportion de souches hémagglutinantes était de 59% (13/22), 41% (13/32), 27% (4/15), 20% (1/5), 21% (10/47) et finalement de 13% (2/15) pour *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. suis*, *S. aureus* et *S. uberis* respectivement. Les résultats concernant l'espèce *S. suis* ne sont pas représentatifs puisque seulement 5 spécimens de cette espèce ont été analysés et que seulement 1/5 souche présentait une hémagglutination.

A.2.2 Détermination de la susceptibilité des souches bactériennes (CMI) pour la pénicilline G

La susceptibilité à la pénicilline G a été déterminée seulement chez les souches présentant une forte hémagglutination (7+ et 8+) et chez 12 autres souches choisies au hasard incluant *Enterococcus sp.* (Cf. Tableau I de l'Annexe 1), ceci afin de vérifier si une corrélation existait entre une forte hémagglutination et l'importance de la résistance à la pénicilline G (Cf. Tableau II de l'Annexe 1). Uniquement les souches présentant une forte hémagglutination ont été testées pour leur susceptibilité à la pénicilline G étant donné que la présence d'adhésines / hémagglutinnines en surface des bactéries étaient notre critère de sélection de départ. De plus, ce test était beaucoup plus simple à effectuer que la détermination de la pénicilline G et nécessitait moins de matériel. Le choix

arbitraire de 12 autres souches testées pour la CMI de la pénicilline G a été motivé par la contrainte de temps et de ressources.

On remarquera que pour toutes les souches choisies au hasard, l'intensité d'hémagglutination est \leq « 5+ » et la susceptibilité (CMI) à la pénicilline G équivaut à $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$.

TABLEAU I. Intensité d'hémagglutination (échelle de « 1+ » à « 8+ ») et susceptibilité (CMI) de chaque souche clinique testée envers la pénicilline G.

# Pathologie ¹	Espèce ²	Intensité d'hémagglutination sans dilution	Susceptibilité (CMI) (ug/mL) envers la pénicilline G
91-0002-2	<i>Enterococcus sp.</i>	-	0,25
91-0003-2	<i>Pseudomonas maltophiliae</i>	-	
508 ³	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8+	1024
00-0217-K1-3	<i>S. agalactiae</i>	8+	0,0625
00-0217-K142-3	<i>S. agalactiae</i>	6+	
00-0217-K48-1	<i>S. agalactiae</i>	1+	
00-0217-K68-3	<i>S. agalactiae</i>	8+	0,0625
00-0217-K7-2	<i>S. agalactiae</i>	1+	
00-0217-K73-3	<i>S. agalactiae</i>	1+	
00-0306-52Q3-1	<i>S. agalactiae</i>	5+	
00-0306-66Q3-1	<i>S. agalactiae</i>	-	
00-0306-85Q1-2	<i>S. agalactiae</i>	7+	0,0625
91-194-1	<i>S. agalactiae</i>	-	
91-194-14	<i>S. agalactiae</i>	7+	0,0625
91-194-17	<i>S. agalactiae</i>	-	
91-194-5	<i>S. agalactiae</i>	7+	0,0625
91-194-8	<i>S. agalactiae</i>	4+	
91-194-9	<i>S. agalactiae</i>	6+	
94-0009	<i>S. agalactiae</i>	* +/-	
99-1907-1	<i>S. agalactiae</i>	-	
99-1907-5	<i>S. agalactiae</i>	5+	
99-1907-7	<i>S. agalactiae</i>	-	
99-1907-7	<i>S. agalactiae</i>	2+	
99-1907-8	<i>S. agalactiae</i>	7+	0,0625
99-1907-9	<i>S. agalactiae</i>	-	
99-2182	<i>S. agalactiae</i>	8+	0,0625
99-3530-1	<i>S. agalactiae</i>	7+	0,0625
99-3530-8	<i>S. agalactiae</i>	7+	0,0625
99-3682	<i>S. agalactiae</i>	7+	0,0625

99-4037-1	<i>S. agalactiae</i>	6+	
99-4037-2	<i>S. agalactiae</i>	2+	
99-4037-3	<i>S. agalactiae</i>	8+	0,0625
99-4037-4	<i>S. agalactiae</i>	8+	0,0625
99-4425Q2	<i>S. agalactiae</i>	8+	0,0625
99-4425Q4	<i>S. agalactiae</i>	* +	
00-0208-13-3	<i>S. aureus</i>	-	0,0625
00-0208-21-1	<i>S. aureus</i>	-	
00-0208-30-2	<i>S. aureus</i>	8+	0,0625
00-0208-42-2	<i>S. aureus</i>	-	0,0625
00-0208-51-2	<i>S. aureus</i>	1+	
00-0208-73-2	<i>S. aureus</i>	8+	32
00-0208-94-1	<i>S. aureus</i>	-	
00-0217-F12-1	<i>S. aureus</i>	4+	
00-0217-F249-1	<i>S. aureus</i>	5+	
00-0217-F255-1	<i>S. aureus</i>	7+	1024
00-0306-29Q3-1	<i>S. aureus</i>	-	
76-1488-1	<i>S. aureus</i>	2+	
91-0059	<i>S. aureus</i>	-	
91-13-1	<i>S. aureus</i>	8+	32
91-13-5	<i>S. aureus</i>	-	
96-1488-1	<i>S. aureus</i>	-	
96-6008-5	<i>S. aureus</i>	-	0,0625
98-55364	<i>S. aureus</i>	* +	
98-7116	<i>S. aureus</i>	-	
98-8510(11)	<i>S. aureus</i>	3+	
98-8757	<i>S. aureus</i>	-	
98-8760	<i>S. aureus</i>	-	0,0625
98-8857	<i>S. aureus</i>	-	
98-8858	<i>S. aureus</i>	8+	0,0625
98-8861	<i>S. aureus</i>	-	
98-8863	<i>S. aureus</i>	-	
98-8903	<i>S. aureus</i>	-	
99-1453-1	<i>S. aureus</i>	-	
99-1604-1	<i>S. aureus</i>	2+	
99-1604-2	<i>S. aureus</i>	-	0,0625
99-1604-3	<i>S. aureus</i>	-	0,0625

98-8510	<i>S. aureus</i>	* -	
98-8510	<i>S. aureus</i>	* -	
98-8510(10)	<i>S. aureus</i>	* +/-	
98-8510(12)	<i>S. aureus</i>	3+	
98-8510(14)	<i>S. aureus</i>	8+	0,0625
98-8510(15)	<i>S. aureus</i>	3+	
98-8510(9)	<i>S. aureus</i>	8+	0,0625
91-15	<i>S. bovis</i>	-	0,0625
94-07	<i>S. bovis</i>	-	
98-6511	<i>S. bovis</i>	1+	
98-9427	<i>S. bovis</i>	8+	0,0625
98-9429-7	<i>S. bovis</i>	-	0,0625
98-9613	<i>S. bovis</i>	1+	
98-9669	<i>S. bovis</i>	6+	
98-9762	<i>S. bovis</i>	8+	0,0625
98-A260	<i>S. bovis</i>	* +	
98-A306	<i>S. bovis</i>	* +/-	
98-A312	<i>S. bovis</i>	-	
98-B492	<i>S. bovis</i>	4+	
98-B493	<i>S. bovis</i>	8+	0,0625
98-B777	<i>S. bovis</i>	8+	0,0625
98-C526	<i>S. bovis</i>	* -	
91-0068-2	<i>S. dysgalactiae</i>	8+	0,0625
91-0068-3	<i>S. dysgalactiae</i>	6+	
91-0068-4	<i>S. dysgalactiae</i>	7+	0,0625
91-0148	<i>S. dysgalactiae</i>	8+	0,0625
93-0006-1	<i>S. dysgalactiae</i>	8+	64
93-0014	<i>S. dysgalactiae</i>	7+	0,0625
93-0022-2	<i>S. dysgalactiae</i>	8+	0,0625
93-14	<i>S. dysgalactiae</i>	5+	0,0625
94-39	<i>S. dysgalactiae</i>	7+	0,0625
96-1117	<i>S. dysgalactiae</i>	8+	0,0625
97-101	<i>S. dysgalactiae</i>	-	
98-2439	<i>S. dysgalactiae</i>	* +	
98-7345-12	<i>S. dysgalactiae</i>	* +	
98-7592	<i>S. dysgalactiae</i>	8+	0,0625
98-8197	<i>S. dysgalactiae</i>	* +	

98-8881	<i>S. dysgalactiae</i>	8+	0,0625
98-8971	<i>S. dysgalactiae</i>	8+	0,0625
98-9193	<i>S. dysgalactiae</i>	7+	0,0625
98-9827	<i>S. dysgalactiae</i>	1+	
98-9829-1	<i>S. dysgalactiae</i>	1+ à 2+	0,0625
99-1278	<i>S. dysgalactiae</i>	8+	0,0625
99-3682Q3	<i>S. dysgalactiae</i>	* +	
98-B607	<i>S. suis sero 1/2</i>	4+	
98-B264	<i>S. suis sero 19</i>	4+	
98-B575	<i>S. suis sero 2</i>	* -	
98-B609	<i>S. suis sero 3</i>	4+	
98-462	<i>S. suis sero 30</i>	8+	0,0625
91-00152	<i>S. uberis</i>	5+	
91-170-1	<i>S. uberis</i>	6+	
91-194-16	<i>S. uberis</i>	-	
91-194-3	<i>S. uberis</i>	5+	
93-0014-1	<i>S. uberis</i>	8+	0,0625
95-1162-1	<i>S. uberis</i>	-	
95-1162-1	<i>S. uberis</i>	-	
95-3094-2	<i>S. uberis</i>	2+	
95-3094-4	<i>S. uberis</i>	-	
98-8679	<i>S. uberis</i>	-	0,25
98-8760	<i>S. uberis</i>	* -	
98-8863	<i>S. uberis</i>	8+	0,0625
99-1462	<i>S. uberis</i>	1+	
99-2553	<i>S. uberis</i>	1+	
99-3978-3	<i>S. uberis</i>	-	
91-0063-3	<i>Staphylococcus _</i>	-	
91-0063-1	<i>Staphylococcus nh</i>	8+	0,125
93-0011-3	<i>Staphylococcus nh</i>	-	
93-0011-8	<i>Staphylococcus nh</i>	-	
93-0022-7	<i>Staphylococcus nh</i>	3+	
93-006-1	<i>Staphylococcus nh</i>	8+	64
94-0007	<i>Staphylococcus nh</i>	7+	0,125
99-3530-4	<i>Staphylococcus nh</i>	* +/-	
93-0009-1	<i>Staphylococcus spp</i>	2+	
ATCC 51 365	<i>Staphylococcus carnosus</i>	-	

contrôle négatif: *S. carnosus* ATCC 51-365

contrôle positif: *P. aeruginosa* 508

* Hémagglutination positive mais trop faible pour évaluer son intensité.

¹ numéro de pathologie attribué par la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

² espèce identifiée par tests biochimiques au Service de Diagnostic de la Faculté de Médecine Vétérinaire de St-Hyacinthe, Québec, Canada.

³ numéro de pathologie attribué par notre laboratoire.

Note: La nomenclature *S. uberis* est utilisée ici pour nommer la souche, mais cette souche peut être de type I ou II (*S. parauberis*). Les tests d'identification biochimiques ne permettant pas de distinguer entre le type I ou II, la nomenclature *S. uberis* est utilisée de façon arbitraire.

TABLEAU II. Compilation des résultats concernant les caractéristiques d'hémagglutination et de susceptibilité à la pénicilline G des différentes souches analysées (Tableau I).

espèce bactérienne	nombre de souches hémagglutinantes / nombre de souches testées	nombre de souches résistantes à la pénicilline G (CMI \geq 32 $\mu\text{g/mL}$) / nombre de souches testées	nombre de souches hémagglutinantes et résistantes à la pénicilline G (CMI \geq 32 $\mu\text{g/mL}$)
<i>S. agalactiae</i>	13 / 32	0 / 13	-
<i>S. bovis</i>	4 / 15	0 / 6	-
<i>S. dysgalactiae</i>	13 / 22	1 / 15	1*
<i>S. suis</i>	1 / 5	0 / 1	-
<i>S. uberis</i>	2 / 15	0 / 3	-
<i>S. aureus</i> ‡	10 / 47	4 / 16	3†
Total:	43 / 136	5 / 54	5

* 93-0006-1, CMI = 64 $\mu\text{g/mL}$, hémagglutination = 8+

† 00-0208-73-2, CMI = 32 $\mu\text{g/mL}$, hémagglutination = 8+

00-0217-F255-1, CMI = 1024 $\mu\text{g/mL}$, hémagglutination = 7+

91-13-1, CMI = 32 $\mu\text{g/mL}$, hémagglutination = 8+

‡ *Staphylococcus nh* 93-006-1, CMI = 64 $\mu\text{g/mL}$, hémagglutination = 8+