

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

L'antibiorésistance acquise des bactéries de la glande mammaire et des intestins en fonction des traitements intramammaires de tarissement chez les bovins laitiers

Par
Etienne Poirier

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
Option épidémiologie

Décembre 2007



© Etienne Poirier, 2007

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'antibiorésistance acquise des bactéries de la glande mammaire et des intestins en
fonction des traitements intramammaires de tarissement chez les bovins laitiers

par
Etienne Poirier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

.....
Jean-Pierre Vaillancourt, président-rapporteur

.....
Daniel Scholl, directeur de recherche

.....
Emile Bouchard, codirecteur

.....
Marie Archambault, codirectrice

.....
Serge Messier, membre du jury

Résumé

Le projet de recherche a été effectué pour déterminer si les antibiotiques utilisés lors du traitement au tarissement intramammaire parviennent à augmenter la résistance aux antibiotiques des bactéries commensales *Escherichia coli* et *Enterococcus* spp. ainsi que les bactéries pathogènes de la glande mammaire. La présence de ces antibiotiques de tarissement dans la circulation sanguine a été également confirmée par spectromètre de masse en tandem. Cette présence était nécessaire pour justifier la relation entre les traitements intramammaires et la résistance aux antibiotiques des bactéries commensales.

Pour évaluer un changement de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries, des échantillons de lait et de fèces ont été pris avant le tarissement et à la suite du vêlage. Les bactéries des échantillons ont été isolées et identifiées selon le protocole du «National Mastitis Council» (NMC) pour être ensuite séparées en deux groupes : les vaches qui ont reçu un traitement au tarissement et celles qui n'en n'ont pas reçu. Les bactéries commensales ont été soumises à un protocole d'antibiorésistance par la méthode de microdilution pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices. Pour ce qui est des bactéries pathogènes du lait, un protocole de diffusion par disque a été effectué.

À partir des analyses statistiques, le traitement au tarissement s'est révélé significativement lié à une augmentation de la résistance des *E. coli* envers le ceftiofur. Par contre, des baisses de résistance envers la quinupristine / dalfoipristine et la lincomycine ont été observées chez les entérocoques suite aux traitements au tarissement. Finalement, une légère augmentation de résistance, sans toutefois être significative, a été remarquée chez les *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative pour la pénicilline / novobiocine et le sulfisoxazole respectivement.

Mots clés en français : Antibiorésistance, traitement intramammaire, tarissement, bovins laitiers, Ceftiofur, céphapirine, Concentration minimale inhibitrice, GEE.

Abstract

The objective of the project was to determine if the intramammary dry cow treatment (DCT) can increase the antimicrobial resistance of the intestinal bacteria *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. and also the mammary pathogens. The presence of the antibiotic from DCT in plasma was confirmed by tandem mass spectrometry. This presence is required to address the relationship between the intramammary treatment and the antimicrobial resistance of the bacteria from the intestinal tract.

Milk and fecal samples were taken before dry-off and after calving to observe the antimicrobial resistance effect in *E. coli* and *Enterococcus* as well as mammary pathogens. These bacteria were isolated and identified as per protocols from the National Mastitis Council. These isolated bacteria were separated in two groups: dry treated cows and non-dry treated cows. *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. were submitted to the antimicrobial susceptibility microdilution protocol to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) while bacterial isolates recovered from milk samples were examined with the disk diffusion test.

Statistical analysis revealed that DCT increased significantly the ceftiofur resistance of the *E. coli* from the intestinal tract. However, the quinupristin / dalfopristin and the lincomycin resistances found in the enterococci isolates were decreased when cows were treated at dry-off. A non statistically significant increase in resistance was also observed in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus* spp., recovered from milk, against penicillin / novobiocin and sulfisoxazole respectively in the dry treated group.

Key words: Ceftiofur, cephalosporin, antimicrobial resistance, intramammary treatment, dry off period, dairy cows, minimal inhibitory concentration, GEE.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	xi
Liste des sigles et des abréviations	xii
Dédicace.....	xiv
Remerciements.....	xv
1. Introduction	1
2. Recension de la littérature.....	3
2.1. Généralité sur la mammite bovine.....	3
2.2. Période de tarissement	8
2.3. Pertes économiques engendrées par la mammite	10
2.4. Prévention de la mammite	11
2.5. Micro-organismes pathogènes principaux.....	14
2.5.1. Environnementaux	15
2.5.1.1. <i>Escherichia coli</i>	15
2.5.1.2. <i>Streptococcus uberis</i>	15
2.5.1.3. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	16
2.5.1.4. <i>Klebsiella</i> spp.	17
2.5.1.5. Staphylocoques à coagulase négative.....	17
2.5.2. Contagieux.....	18
2.5.2.1. <i>Streptococcus agalactiae</i>	18
2.5.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.5.2.3. <i>Mycoplasma</i> spp.	20
2.5.2.4. <i>Corynebacterium bovis</i>	21
2.6. Traitements	21

2.7. Antibiorésistance	25
2.7.1. Généralités.....	25
2.7.2. Transfert de l'antibiorésistance entre les bactéries	26
2.7.3. Antibiorésistance chez les bactéries causant la mammite	29
2.7.4. Risque de transfert de l'antibiorésistance des bactéries d'origine bovines à l'homme.....	31
3. Matériel et méthodes.....	34
3.1. Sélection de la population d'étude	34
3.1.1. Sélection des fermes	34
3.1.2. Sélection des vaches et schéma d'échantillonnage.....	35
3.1.3. Attribution des traitements au tarissement	36
3.1.4. Collecte et gestion des données.....	37
3.1.5. Détermination du nombre de colonies requises	37
3.2. Échantillonnage du sang et de l'eau.....	37
3.2.1. Détermination de la concentration d'Antibiotique dans le plasma de bovin par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	40
3.3. Échantillonnage du lait.....	41
3.4. Identification microbiologique des bactéries du lait	41
3.5. Antibiorésistance des bactéries pathogènes du lait.....	44
3.6. Analyses statistiques.....	45
3.6.1. Analyses statistiques sur l'antibiorésistance des bactéries pathogènes du lait.....	45
4. Résultats	46
4.1. Résultats de la concentration d'antibiotique dans le plasma	46
4.1.1 Transfert d'antibiotique intramammaire dans la circulation sanguine	46
4.1.2. Confirmation de la céphapirine dans le plasma avant le traitement au tarissement	48

4.1.3. Confirmation du traitement au tarissement comme source de céphapirine.....	49
4.1.4. Détermination de l'eau comme vecteur	50
4.2. Antibiorésistance des bactéries pathogènes du lait.....	50
5. Number of fecal <i>Escherichia coli</i> colonies required to representative the change minimal inhibitory concentration to a panel of antibiotics over the dry-period of dairy cows.....	59
6. The effect of dry cow treatment on antimicrobial resistance of fecal <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus spp.</i>	75
7. Discussion.....	101
8. Conclusion.....	109
9. Références	xvi

Tableau XIII	Fréquence et proportion des agents pathogènes de la mammite des quartiers dont l'échantillonnage est complet et a été effectué avant le tarissement et après le vêlage au cours d'octobre 2005 à janvier 2007 ..51
Tableau XIV	Fréquence et proportion des agents pathogènes de la mammite des vaches dont l'échantillonnage est complet et a été effectué avant le tarissement et après le vêlage au cours d'octobre 2005 à janvier 2007 ..52
Tableau XV	Médianes des diamètres de zones d'inhibition, en millimètres, des groupes qui ont été affectés significativement par le traitement au tarissement53
Tableau XVI	Médianes des zones d'inhibition par combinaison d'espèces bactériennes et d'antibiotiques qui ont exprimé une différence de 2 millimètres et plus entre les groupes traité et non traité et par ferme, en millimètre (n = bactérie(s))58

Chapitre 5

Table I	Percentage of replicates in disagreement with Δ MIC ₅ of one dilution or more for Δ MIC calculated with 1 to 4 isolates, respectively69
---------	--

Chapitre 6

Table I	Antimicrobial agents, concentration ranges and dilution numbers of microbroth in the dilution plates used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of bovine fecal <i>E. coli</i>81
Table II	Antimicrobial agents, concentration ranges and dilution numbers of microbroth in the dilution plates used to determine the MIC of bovin fecal <i>Enterococcus</i> spp.81
Table III	Frequency of treated and non treated cows per farm for <i>E. coli</i>83
Table IV	Frequency of treated and non treated cows per farm for <i>Enterococcus</i> spp.84

Table V	P-value, 95% confidence interval and coefficient of the final GEE model with all the confounders of the DCT for drug not affected by the region for the <i>E. coli</i>	85
Table VI	P-value, 95% confidence interval and coefficient of the final GEE model with all the confounders of the DCT for drug affected by the region for the <i>E. coli</i>	85
Table VII	P-value, 95% confidence interval and coefficient of the final GEE model of the new Δ MIC groups with the DCT and their confounders for the five drugs statistically significant for the <i>Enterococcus</i> spp. before the news Δ MIC groups	87
Table VIII	P-value, 95% confidence interval and coefficient of the final GEE model of the new Δ MIC groups with the DCT and their confounders for the five drugs statistically significant for the <i>Enterococcus</i> spp. before the news Δ MIC groups	87
Table IX	Screening of the risk factor and the explanatory variables with the model GEE univariate for <i>E. coli</i>	97
Table X	P-value, 90% confidence interval and coefficient of the final GEE model with all the confounders of the DCT for drug affected by the DCT antibiotic for the <i>E. coli</i>	97
Table XI	Screening of the risk factor and the explanatory variables with the model GEE univariate for <i>Enterococcus</i> spp.....	98
Table XII	P-value, 95% confidence interval and coefficient of the finale GEE model with all the confounders of the DCT for drug not affected by the region for the <i>Enterococcus</i> spp.	99
Table XIII	P-value, 95% confidence interval and coefficient of the finale GEE model with all the confounders of the DCT for drug affected by the region for the <i>Enterococcus</i> spp.	99
Table XIV	P-value, 90% confidence interval and coefficient of the final GEE model with all the confounders of the DCT for drug affected by the DCT antibiotic for <i>Enterococcus</i> spp.	100

Liste des tableaux

Chapitre 1 à 4

Tableau I	Bactéries de type contagieux et environnemental causant fréquemment la mammite chez les bovins.....	5
Tableau II	Liste des principaux staphylocoques à coagulase négative isolés dans les glandes mammaires bovines.....	6
Tableau III	Tableau des micro-organismes pathogènes non communs causant des mammites bovines.....	7
Tableau IV	Liste des estimations des pertes absorbées par les producteurs anglais au cours du projet de recherche effectué en 1995 sur la mammite bovine..	10
Tableau V	Bactéries isolées des cas de mammite selon les différentes moyennes de comptages de cellules somatiques à la ferme.....	13
Tableau VI	Tests diagnostiques pour identifier les streptocoques de la mammite....	43
Tableau VII	Résultats des tests biochimiques pour identifier des bactéries à Gram négatif provenant du lait.....	43
Tableau VIII	Concentration de novobiocine dans le plasma des 10 vaches de la ferme E avant le traitement au tarissement à la novobiocine ainsi que 8 et 96 heures après le traitement.....	46
Tableau IX	Concentration de céphapirine dans le plasma des 6 vaches de la ferme E et 3 de la ferme A avant le traitement au tarissement à la céphapirine ainsi que 8 et 96 heures après le traitement.....	47
Tableau X	Concentration de céphapirine des échantillonnages avant le tarissement dans les plasma de bovins de la ferme E traités à la novobiocine.....	47
Tableau XI	Concentration de céphapirine dans le plasma des bovins échantillonnés dans les quatre fermes de l'étude.....	49
Tableau XII	Concentration de céphapirine dans les échantillons après vêlage de la ferme E dans les plasma des bovins traités à la novobiocine durant l'été 2006.....	50

Liste des figures

Chapitre 1 à 4

Figure 1	Schéma d'échantillonnage des vaches pour le projet d'antibiorésistance d'octobre 2005 à janvier 2007	36
Figure 2	Historique de l'échantillonnage sur la ferme E et de l'utilisation de a) la céphapirine et de b) la pénicilline / novobiocine	39
Figure 3	Fréquence relative accumulée des différents degrés de susceptibilité à la pénicilline / novobiocine des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> après le vêlage	54
Figure 4	Fréquence relative accumulée des différents degrés de susceptibilité à la tétracycline des isolats des CNS après le vêlage	55
Figure 5	Fréquence relative accumulée des différents degrés de susceptibilité au sulfisoxazole des isolats des CNS après le vêlage	56
Figure 6	Fréquence relative accumulée des différents degrés de susceptibilité à l'ampicilline des isolats des CNS après le vêlage.....	57

Chapitre 5

Figure 1	Percentage of replicates that were non identical to the corresponding Δ MIC5 by Δ MIC1, Δ MIC2, Δ MIC3, or Δ MIC4 for each of 15 antibiotics.....	68
----------	--	----

Liste des sigles et abréviations

°C:	Degré Celsius
α :	Alpha
Δ :	Variation
A :	Adénine
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AMR :	Antimicrobial resistance
ATQ4:	Agri-traçabilité Québec à 4 chiffres
CFU :	«Colony-Forming Unit»
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CNS :	«Coagulase Negative <i>Staphylococcus</i> spp.» ou Staphylocoque à coagulase négative
DCT :	«Dry-Cow Treatment» ou traitement au tarissement
EDTA :	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
g :	Force relative de la centrifugation
GEE :	«Generalized Estimating Equations»
HPLC :	Chromatographie liquide à haute performance
L/min :	Litre par minute
MIC :	«Minimum Inhibitory Concentration»
min :	Minute
mL :	Millilitre
μ L :	Microlitre
mL/min :	Millilitre par minute
mm :	Millimètre
MS/MS :	Spectromètre de masse en tandem
ng/mL :	Nanogramme par millilitre
NTSEC :	«Non-Typable Specific <i>E. coli</i> »
O/N :	«Over Night»
PCR :	«Polymerase chain reaction» ou Amplification en chaine par polymérase

QQQ :	Triple quadrupole
RPM :	Rotation par minute
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline
SCC :	«Somatics Cells Count» ou Comptage de cellules somatiques
T :	Thymine
TSA :	«Trypticase Soy Agar»
TSI :	«Triple Sugar Iron»
UFC :	Unité formant colonie
V :	Volts

Dédicace

À ma grand-maman, Marcelline Beauregard

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Daniel T. Scholl de m'avoir offert la possibilité d'effectuer ma maîtrise sous sa supervision ainsi que les Dr Emile Bouchard et Marie Archambault pour leur expertise et leurs conseils tout au long du projet.

Pour le support, je tiens à remercier l'ensemble du Réseau Canadien de Recherche sur la Mammite Bovine ainsi que les étudiants qui ont contribué au projet, mais particulièrement François Dubois pour son aide précieuse pour le prélèvement et le traitement des échantillons.

Je remercie le CORPAQ, le MAPAQ et l'Agence de Santé Publique du Canada pour le financement du projet et l'aide accordée tout au long du projet pour le traitement des bactéries.

Finalement, je tiens à remercier Sandra Gauthier, ma famille et mes amis qui ont si généreusement contribué à la correction de ce mémoire. Je les remercie également pour leur support au cours des deux dernières années, leur soutien m'a permis de réaliser ma maîtrise.

1. Introduction

La mammite est un problème bien présent dans les troupeaux laitiers du monde entier et l'utilisation d'antibiotiques en industrie laitière est pratique courante. L'apparition de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques dans la population humaine devient une situation de plus en plus alarmante. Ces deux problématiques qui semblent éloignées l'une de l'autre pourraient possiblement être en relation. En effet, certaines bactéries d'origine animale, devenues résistantes à la suite de traitements aux antibiotiques, pourraient potentiellement atteindre la population humaine.

La mammite bovine est une maladie du domaine laitier depuis bon nombre d'années (Bradley, 2002). Au Canada, les pertes économiques rapportées dues à cette pathologie se chiffrent à 300 millions de dollars annuellement. Dans le reste du monde, ces pertes sont évaluées à plusieurs milliards de dollars (Gill et al., 1990, Kossaibati and Esslemont, 1997).

L'utilisation d'antibiotiques à grande échelle pourrait favoriser le développement de l'antibiorésistance. Les antibiotiques utilisés au tarissement, tels la céphapirine et la pénicilline combiné à la novobiocine, sont administrés pour traiter une infection à la fin de la période de lactation et pour prévenir les nouvelles infections au début du tarissement. Ce type de traitement peut causer une pression sélective de bactéries résistantes à certains antibiotiques. Bien que ce genre de développement dû au traitement au tarissement n'a pas été prouvé, plusieurs craintes persistent face à cette pratique (Bratlie, 1973, Osteras et al., 1999). L'étude menée par Osteras en 1999 démontrait que la résistance aux antibiotiques des *Staphylococcus aureus* n'était pas seulement causée par le traitement au tarissement, mais également par le traitement en lactation (Osteras, et al., 1999). De leur côté, Tenhagen et al. (2006) ont trouvé une augmentation de la résistance aux antibiotiques de cette même bactérie lors de la première lactation mais dont les causes demeurent toujours inconnues (Tenhagen et al., 2006). Après avoir évalué la résistance aux antibiotiques de 337 bactéries environnementales en provenance de 93

fermes de la Californie, Kirk et al. (2005) n'ont pas été en mesure de définir une relation précise entre les traitements faits aux vaches et que la résistance aux antibiotiques observée chez les bactéries à l'étude. (Kirk et al., 2005). Ces conclusions concordent avec une étude suisse qui affirme qu'il n'y a pas de différence entre le développement de résistance aux antibiotiques des fermes biologiques et conventionnelles (Roesch et al., 2006). Il y a développement de résistance aux antibiotiques dans l'industrie laitière et son origine demeure donc un sujet d'étude.

Des études démontrent que les antibiotiques utilisés pour le traitement au tarissement peuvent traverser la paroi de la glande mammaire et atteindre la circulation sanguine (Larson and Anderson, 1985, Mercer et al., 1970, Nouws and Ziv, 1982), mais le développement de résistance aux antibiotiques des bactéries commensales du à ce type de traitement n'a pas encore été démontré.

La recension de littérature présentera les différents aspects de la mammite, en relation avec l'émergence de la résistances aux antibiotiques et du transfert possible de micro-organismes résistants à la population humaine.

L'hypothèse de cette étude est que les antibiotiques utilisés au tarissement augmentent l'antibiorésistance des *E. coli* et des entérocoques fécaux, suite au passage des antibiotiques intramammaires vers la circulation sanguine. L'objectif de ce projet est de déterminer si le traitement intramammaire au tarissement est associé au développement de l'antibiorésistance chez les bactéries commensales *Escherichia coli* et *Enterococcus* spp. mais également pour les bactéries pathogènes retrouvées dans le lait.

2. Recension de la littérature

2.1. Généralité sur la mammite bovine

La mammite est une inflammation au niveau de la glande mammaire. Cette maladie est fréquemment retrouvée chez le bovin laitier. Le terme mammite provient du grec «mastos» et «itis», désignant respectivement «poitrine» et «inflammation de». Dans les années 1940, alors que les troupeaux au Royaume-Uni étaient en moyenne composés de 15 vaches, il y avait environ 23 cas de mammite par troupeau, par année (Bradley, 2002). Durant ces années, le principal antibiotique pour combattre cette maladie était la pénicilline. Plus tard, dans les années 1960, les chercheurs ont fondé un groupe de recherche sur la mammite, le NIRD (National Institute for Research in Dairying) (Bradley, 2002). Ce groupe avait pour mission de trouver différents moyens de traiter, de gérer, de comprendre ou de mieux prévenir la mammite bovine. Deux des principaux résultats de l'opération du NIRD ont été la mise en place d'une limite supérieure de cellules somatiques dans les réservoirs de lait et l'implantation d'une thérapie au moment du tarissement. L'efficacité de ce groupe, ainsi que celle des chercheurs de l'époque, fut si impressionnante que le nombre de cas de mammite chuta drastiquement de 150 à 40 cas cliniques par 100 vaches par année. La moyenne de cellules somatiques dans les réservoirs chuta aussi de 600 000 cellules/mL à 400 000 cellules/mL (Bradley, 2002). De nos jours, le nombre de cas de mammite demeure autour de 40 cas par centaine de vaches par année (Bradley, 2002).

Il y a deux formes de mammite identifiées : la mammite sub-clinique et la mammite clinique (Tableau I). La première des deux formes a moins de répercussion pour la vache. Elle est asymptomatique, ne causant qu'une diminution de la production de lait et une hausse des cellules somatiques. La mammite clinique provoque une perte de la production laitière en plus de divers signes cliniques visibles (Leigh, 1999). Les signes cliniques sont ceux associés à l'inflammation soit : rougeur, douleur et enflure de la glande mammaire affectée. Bien que ces épisodes se présentent en général de façon

aiguë, il est possible que les deux formes se transforment en mammite chronique. Cette dernière est la plus sérieuse pour la productivité de la vache puisqu'il s'agit d'une infection persistante, pour laquelle l'efficacité des thérapies est grandement réduite. Pour les mammites chroniques, la solution la plus efficace est la réforme (Bradley, 2002).

Une étude a distingué les bactéries les plus souvent impliquées dans les cas de mammite cliniques dans une population de vaches laitières en Angleterre. Parmi les principales, il y a *Escherichia coli* (34.7%), *Streptococcus uberis* (12.8%), *Streptococcus dysgalactiae* (4.7%), les staphylocoques coagulase positive (5.3%), les staphylocoques coagulase négative (3.3%), *Corynebacterium* spp. (2.7%), et plusieurs autres entérobactéries (40.9%) (Bradley and Green, 2001). Une autre étude réalisée à l'Ile-du-Prince-Edouard a été effectuée pour déterminer la prévalence des bactéries de type contagieux dans les réservoirs de lait (Olde Riekerink et al., 2006). Les trois bactéries étudiées étaient *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* et les mycoplasmes; cells-ci avaient une prévalence respective de 74%, 2% et 2%.

Tableau I

Bactéries de type contagieux et environnemental causant fréquemment la mammite chez les bovins (Bramley, 1999)

Bactéries contagieuses	Bactéries environnementales
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Citrobacter</i> spp.
<i>Mycoplasma</i> spp. ¹	<i>Enterobacter</i> spp.
	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ²
	<i>Streptococcus equinus</i>
	<i>Streptococcus</i> spp.
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative

¹ : Considéré comme bactérie pathogène non commune selon d'autres auteurs

² : Ce micro-organisme peut se retrouver dans l'une ou l'autre des classes, selon les auteurs

Les micro-organismes pathogènes contagieux ont la capacité de persister à l'intérieur des glandes mammaires de la vache pour servir de réservoir et ainsi contaminer les autres vaches (Gonzalez et al., 1986). Ils sont transférables d'une vache à l'autre par plusieurs moyens tels la trayeuse, les mains ou les vêtements des employés. Ces agents pathogènes ont même la capacité de passer d'un quartier à l'autre chez une même vache. Ils provoquent des infections sub-cliniques ou cliniques. Les bactéries environnementales, quant à eux, se retrouvent dans l'environnement des vaches, ce qui les distingue des micro-organismes pathogènes contagieux. Ils sont présents, par exemple, dans les fèces, dans le sol, dans les enclos, dans les litières ou sur la vache elle-même. De toutes les bactéries environnementales, les coliformes causent 29,7% des cas cliniques, 25,4% pour les streptocoques environnementaux, 27,2% pour les staphylocoques à coagulase négative et que 17,6% pour les autres micro-organismes environnementaux. Selon Smith et Hogan (1993), seulement 3% des cas cliniques aux

États-Unis sont dus aux bactéries pathogènes contagieuses. Les résultats présentés par cette étude sont différents de ceux présentés par Green et al. (2002). Les principales causes de mammite de la seconde étude étaient que 44% des cas cliniques étaient dus aux *E. coli*, 12% pour les streptocoques environnementaux, 6% pour les staphylocoques à coagulase positive, 2% pour les staphylocoques à coagulase négative et 11% des cas n'avait pas de cause identifiable. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence, entre autre l'année de la réalisation de l'étude, les techniques impliquées dans le contrôle de certaines bactéries pathogènes, la région géographique à l'étude et les diverses techniques de production.

Les staphylocoques à coagulase négative représentent un groupe de bactéries environnementales. En général, l'identification de ces bactéries s'arrête au genre et non à l'espèce. Parmi les principaux de cette famille, il y a le *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus sciuri* (Bramley, 1999). Bien que les effets pathologiques de ces bactéries sur la vache n'aient pas été bien démontrés, il y a tout de même une hausse modérée du décompte de cellules somatiques, soit environ de 500 000 cellules/ml lorsque retrouvé dans les échantillons de lait (Bramley, 1999).

Tableau II

Liste des principaux staphylocoques à coagulase négative isolés des glandes mammaires bovines (Bramley, 1999)

<i>Staphylococcus chromogenes</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>
<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Le tableau III présente un dernier groupe de micro-organismes qui peut provoquer la mammite, mais isolé beaucoup moins fréquemment que les autres bactéries (Bramley, 1999). En général, une mammite causée par ce genre de micro-organisme est très sévère. Une confirmation de mammite causée par un de ces agents pathogènes nécessitera

aussitôt des mesures hygiéniques importantes pour contrôler l'infection et la source des bactéries.

Tableau III

Tableau des micro-organismes pathogènes non communs causant des mammites bovines (Bramley, 1999)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus</i> spp.
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Levures
<i>Nocardia</i> spp.	Moisissures
<i>Mycoplasma bovis</i> ¹	<i>Prototheca</i> spp.
Mycobactérie	<i>Serratia</i> spp.

¹ : Aussi considéré comme des micro-organismes contagieux selon certains auteurs

Dans la littérature, il semble que les opinions soient partagées à savoir si la mammite constitue une cause importante de mortalité. Une étude (Esslemont and Kossaibati, 1997) a été réalisée en Angleterre sur les raisons des réformes effectuées sur les bovins. Les résultats montrent que la mammite bovine est responsable de 10% des réformes et de 9% des décès, ce qui la place au second rang derrière l'encéphalopathie spongiforme bovine avec 12% de mortalité. Une seconde étude (Bradley and Green, 2001) rapporte un taux de mortalité dû à la mammite de 2%, et de seulement 0,6% chez les vaches en lactation. Quelques hypothèses pourraient expliquer les différences entre les deux études. Pour commencer, le genre de bactérie qui cause la mammite dans chacun des cas peut influencer le taux de mortalité. En effet, *E. coli* et *S. aureus* sont les deux principales bactéries pathogènes provoquant des mammites pouvant mener au décès de l'animal. Donc, si dans la première étude la majorité des cas étaient dus à l'une ou l'autre de ces bactéries et non dans la deuxième, il est normal de voir un taux de mortalité plus élevé dans la première étude. De plus, il est parfois difficile de déterminer la cause de décès. Ainsi, il se pourrait que les causes de mortalité dans les deux études soient parfois difficiles à identifier.

2.2. Période de tarissement

Pendant tout le cycle de lactation d'une vache, le début de la période de tarissement est le moment où le risque de développer une mammites se trouve à son maximum (Radostits O.M., 1995). Cette période dure environ huit semaines (plus ou moins 60 jours). Pendant ces huit semaines, les trois premières ainsi que les deux dernières sont les plus favorables à développer une mammites (Radostits O.M., 1995). Ceci s'explique en partie par trois facteurs : la population bactérienne sur les glandes mammaires, les variations physiologiques des canaux des mamelles et la diminution de l'efficacité du système de défense à l'intérieur de la glande mammaire (Eberhart, 1986).

Le premier facteur, soit la population bactérienne présente sur les glandes mammaires, évolue en fonction du temps (Eberhart, 1986). Au début de la période de tarissement, les bactéries pathogènes les plus observables sur la glande mammaire sont celles de type contagieux. Par contre, plus la période de tarissement avance, moins ce genre de micro-organismes se trouve à la surface de la glande mammaire. Ils seront remplacés par les bactéries environnementales, comme *Streptococcus uberis*. Lors de la période de tarissement, une des raisons principales qui explique l'augmentation de toutes les bactéries sur les glandes mammaires est la cessation des mesures hygiéniques, qui sont normalement effectuées de façon routinière lors de la période de lactation. Cette hypothèse est confirmée à la suite du vêlage (Eberhart, 1986). En effet, lorsque la vache retourne dans la phase de lactation et que les mesures hygiéniques sont reprises, la population bactérienne environnementale aura tendance à diminuer. La traite qui est effectuée deux ou trois fois par jour améliore l'hygiène indirectement puisqu'elle permet un lessivage du canal, empêchant ainsi les bactéries de bien s'implanter dans la glande mammaire.

En second lieu, deux changements majeurs dans la conformation des canaux des mamelles surviennent lorsqu'une vache entre en période de tarissement : l'augmentation du diamètre du lumen du canal du trayon ainsi que la formation d'un «bouchon» de kératine dans le canal (Eberhart, 1986). Pour le premier facteur, si le canal s'élargit sans

qu'il y ait de protection, le risque d'avoir une mammite augmente. Le second changement physiologique est la formation d'un «bouchon» de kératine dans le canal papillaire. Les cellules sécrèteront cette protéine pour empêcher les bactéries d'entrer et d'infecter à l'intérieur du pis. Par contre, l'inconvénient de ce système de défense est que la mise en place est longue. Pour que le «bouchon» soit efficace, il faut attendre environ 16 jours (Cousins, et al., 1980). Pendant les 16 premiers jours, l'entrée de la glande mammaire est facilitée pour les bactéries (Eberhart, 1986), ce qui explique pourquoi le risque de mammite est plus élevé lors des 3 premières semaines du début de la période de tarissement (Comalli, et al., 1984). Il est à noter que ce «bouchon» de kératine n'est pas attaché au canal. Il est plutôt emboîté mais sans liaison directe avec la paroi du canal (Eberhart, 1986). Durant les semaines suivantes, soit les semaines 4, 5 et 6, le risque est beaucoup moins élevé, puisque les systèmes de défense sont bien en place. Par contre, lors des deux dernières semaines, le risque de développer une mammite augmente largement. Cela s'explique par un agrandissement du volume de la glande mammaire et un accroissement de la quantité de sécrétions pouvant mener à des écoulements; ce qui indique que le bouchon de kératine n'est plus efficace.

Un troisième facteur entre en ligne de compte lors du développement de mammite pendant la période de tarissement : la diminution de l'efficacité du système de défense à l'intérieur de la glande mammaire. Au début du tarissement, la concentration de cellules immunitaires (phagocytes et lymphocytes) descend au plus bas (Eberhart, 1986). Durant cette période, un micro-organisme pathogène peut s'implanter dans la glande mammaire plus rapidement que les globules blancs. Cette faiblesse sera résolue dans une période de 10 à 14 jours puisqu'une réponse immunitaire deviendra, au bout de ce temps, plus forte et plus rapide que l'invasion de micro-organismes. Il y a également une diminution des mécanismes de défenses vers la fin de la période de tarissement, environ 1 semaine avant le vêlage (Eberhart, 1986). Cette baisse est attribuable aux facteurs de stress nutritionnels (changement de régime alimentaire) et physiologiques (changement de conformation des glandes, préparation au vêlage) auxquels la vache est exposée.

2.3. Pertes économiques engendrées par la mammite

La mammite bovine est la plus grande source de perte de revenu pour les producteurs. Une étude effectuée en Angleterre (Kossaibati and Esslemont, 1997) a permis d'estimer les pertes économiques engendrées par les différentes maladies bovines. Après avoir évalué les différents coûts reliés à chacune des maladies (i.e antibiotiques, employés, vétérinaire, perte de production laitière, etc.), les chercheurs ont estimé qu'en combinant toutes les maladies, une ferme ayant un troupeau d'environ une centaine de têtes perdait 13 800 \$ CAN en 1995 (Kossaibati and Esslemont, 1997). La mammite est la maladie qui coûtait le plus chère aux producteurs avec 38% du total des pertes (soit 4 900 \$ CAN). Le tableau IV résume les pertes que les auteurs ont calculées pour les fermes étudiées. Les deux conclusions à tirer du tableau sont l'importante perte de production de lait ainsi que la différence entre les trois niveaux de mammite possibles.

Tableau IV

Liste des estimations des pertes absorbées par les producteurs anglais au cours d'un projet de recherche effectué en 1995 sur la mammite bovine (Kossaibati and Esslemont, 1997)

Cause	Mammite légère	Mammite grave	Mammite fatale
	Coût	Coût	Coût
Médicament	23,0	50,1	80,0
Employé	2,7		
Lait jeté	42,0	63,1	
Perte de production	108,3	197,2	
Vétérinaire		137,3	357,8
Fatalité			4415,0
Total	176,1	793,3	4852,7

Une autre étude a été effectuée aux États-Unis en tenant compte des mêmes critères que la recherche anglaise. Les résultats de cette étude montrent que les coûts

moyens reliés à la mammite sont entre 161.79\$ CAN et 344.16\$ CAN par bête annuellement (Morin et al., 1993). En 1979, aux États-Unis, le total des pertes dues à la mammite s'élevait à 1,3 milliard \$ CAN (Blosser, 1979). Les pertes enregistrées au Canada représentent les mêmes écarts, soit entre 140\$ et 300\$ par vache (Gill, et al., 1990). En supposant que la population de vaches laitières du Canada se situe à 1 062 300 bovins (Statistiques Canada, juillet 2005), les pertes seraient situées entre 149 millions \$ CAN et 319 millions\$ CAN par année.

2.4. Prévention de la mammite

Au début des années 1940, pour combattre la mammite, la National Institute of Rural Development (NIRD) a été fondé en Angleterre et a concentré ses recherches sur cinq points. Il s'agissait de la gestion de la mammite (identification rapide des vaches infectées ainsi que les soins à apporter), les traitements en période de tarissement, la désinfection des trayons après la traite, la réforme des vaches atteintes de façon chronique et l'entretien routinier des trayeuses (Bradley, 2002). Les résultats apportés par ces recherches s'avèrentrent profitables puisque les cas de mammite ont diminué de façon impressionnante. Donc, à la lumière des nouvelles méthodes de gestion des troupeaux laitiers proposées par ces recherches, la clé pour tenter de limiter la mammite se résume en un mot : la prévention.

Le contrôle de la mammite nécessite plusieurs mesures préventives. Un bon suivi du comptage des cellules somatiques peut aider à réduire la mammite, bien que la prévention se fasse de façon indirecte. Les cellules somatiques, qui comprennent les cellules du système immunitaire et des cellules épithéliales, sont un indicateur indirect de la quantité de micro-organismes pathogènes qui se retrouvent dans le lait (Bramley, 1999). Plus le nombre de cellules somatiques est élevé dans le lait, plus le nombre de micro-organismes le sera aussi. Bien qu'un producteur ne puisse prévenir leurs fluctuations directement, il peut obtenir un rapport régulier sur le nombre des cellules somatiques, l'aidant à identifier les cas de mammite sub-cliniques. Si un producteur sait quelles vaches sont atteintes sub-cliniquement, il pourra traire ces vaches après les vaches

saines, permettant ainsi de limiter la propagation des agents infectieux à l'intérieur du troupeau.

Pour la sécurité de la population, il est primordial de séparer le lait des vaches sous traitement et de le jeter. Cette mesure préventive est nécessaire lorsqu'un animal est traité avec un antibiotique pour éviter la présence de résidus dans le lait. Par contre, un producteur qui possède un bovin atteint d'une mammite grave doit tout de même traire sa bête pour ne pas perturber son cycle de lactation. Il y a, depuis peu, des systèmes automatiques (robots) pour traire les vaches. Ces systèmes peuvent fonctionner sans assistance humaine. Il suffit d'entraîner les animaux au système et la traite peut se faire. Par contre, une lacune de ces systèmes automatiques est leur incapacité à détecter les cas de mammite (Pyorala, 2002), ce qui implique que le lait infecté ne sera pas séparé du lait sain. Klungel et al. (2000) ont mené une étude traitant de l'effet de ces systèmes sur la qualité du lait. Leurs recherches étaient axées sur deux aspects : le comptage des cellules somatiques et le nombre de bactéries isolées. La comparaison, avant et après l'implantation du système automatique, n'indique pas de changement dans le dénombrement des cellules somatiques. Par contre, le nombre de bactéries isolées connaît une légère hausse, ce qui indique que le système ne fait pas de distinction entre le lait contaminé et celui qui ne l'est pas.

Une étude réalisée par Erksine en 1988 a mis en relation le comptage des cellules somatiques du réservoir de lait par rapport aux types de mammite identifiée sur la ferme. Cette étude démontre que plus le nombre de cellules somatiques est élevé (plus de 700 000), plus les cas de mammite ont tendance à être de type contagieux (Tableau V). Inversement, plus le nombre de cellules somatiques diminue (moins de 150 000), plus les cas de mammite auront tendance à être causés par des bactéries de type environnemental (Miltenburg, et al., 1996).

Tableau V

Bactéries isolées des cas de mammite selon les différentes moyennes de comptages de cellules somatiques à la ferme (Erskine *et al.*, 1988)

Comptage de cellules somatiques	Élevé	Bas
Nombre de cellules somatiques (cellules/mL)	+ 700 000	- 150 000
Nombre total de mammite (/100 vaches/an)	35	51
	(%)	(%)
<i>S. agalactiae</i>	41.5	0.0
<i>S. aureus</i>	18.3	2.2
Streptocoques	12.6	12.3
Coliformes	8.0	43.5
Pathogène non isolé	8.8	28.6

Il y a une forte baisse du comptage des cellules somatiques au début de la période de tarissement et une seconde juste avant le vêlage (Eberhart, 1986). Au cours de cette période, les cas de mammite sont beaucoup plus de type environnemental que contagieux. Après le vêlage, le comptage des cellules somatiques est encore bas, ce qui implique que le risque de développer une mammite environnementale demeure très élevé (Eberhart, 1986).

Certaines mesures préventives doivent être prises à la ferme par les producteurs pour tenter de limiter les cas de mammite. Par exemple, pour contrôler les bactéries environnementales, une gestion de l'entourage immédiat de la vache est très importante. Un changement fréquent de la litière des animaux, l'enlèvement des matières fécales de façon régulière et un bon système d'abreuvoir pour les vaches sont tous des moyens pour parvenir à contrôler la propagation de bactéries (Pyorala, 2002). Évidemment, une bonne gestion est nécessaire suite à l'instauration de telles mesures afin de les maintenir à long terme. Il y a une seconde étape de prévention à effectuer lors de la traite des bovins pour tenter de contrôler davantage les pathogènes contagieux. Le fait de bien désinfecter les trayons des vaches avant de procéder à la traite, de faire le bain de trayons avant sa

désinfection et un autre après la traite sont d'autres méthodes de prévention (Pyorala, 2002). Si des cas de mammite provoqués par des micro-organismes pathogènes contagieux sont connus, il importe de faire la traite de ces animaux après ceux qui sont sains pour ne pas propager l'infection dans le troupeau. Évidemment, si une vache est atteinte de mammite chronique, la réforme peut s'avérer un moyen de prévention efficace (Bramley, 1999, Fox and Gay, 1993). Le traitement en période de tarissement est une autre manière de prévenir la contamination (Berry and Hilterton, 2002).

Il y a également des moyens supplémentaires mis en place pour contrôler ou prévenir les cas de mammite. Parmi ceux-ci, il y a la vaccination. Une étude (Yancey, 1999) démontre deux problèmes majeurs pour le développement de vaccins pour la mammite. Le premier est que l'entrée des immunoglobulines dans les glandes mammaires se fait seulement à la suite de l'implantation de la mammite. Le second est que chaque micro-organisme pathogène possède des protéines de surface bien différentes de celles des autres micro-organismes responsables de mammites, ce qui veut dire qu'il est pratiquement impossible de concentrer tous les antigènes importants dans un seul vaccin.

Un autre moyen de protection possible est l'utilisation des immunomodulateurs (système de défense non spécifique) qui peuvent être envoyés dans les glandes mammaires pour tenter de contrer des infections. Bien qu'en conditions expérimentales leur efficacité ait été démontrée, leur action *in vivo* sur des glandes mammaires ne semble pas efficace jusqu'à maintenant (Pyorala, 2002).

2.5. Micro-organismes pathogènes principaux

Les micro-organismes pathogènes responsables de la mammite bovine sont séparés en deux groupes : les agents pathogènes environnementaux et les agents pathogènes contagieux. Pour le premier des deux groupes, les bactéries étudiées ici sont *E. coli*, *S. uberis* et *S. dysgalactiae*, les *Klebsiella* spp., ainsi que les staphylocoques à

coagulase négative. Pour le groupe des contagieux, les pathogènes vus sont *S. agalactiae*, *S. aureus*, *Mycoplasma* spp. et *C. bovis*.

2.5.1. Environnementaux

2.5.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est l'une des principales bactéries responsable des cas de mammite. Cette bactérie est un bâtonnet à Gram négatif. Il est un des micro-organismes pathogènes qui cause de la mortalité dans certains cas de mammite (Radostits O.M., 1995). Ce micro-organisme se retrouve dans les matières fécales, ce qui implique qu'il est fréquent de le retrouver dans tout l'environnement de la vache, comme la litière, le pâturage et aussi sur la vache elle-même. Par contre, *E. coli* n'a pas la capacité de survivre dans le canal du trayon ou bien dans les glandes mammaires, impliquant que les infections sont rarement sub-cliniques, mais elles sont plutôt sporadiques et entraîneront de très fortes réponses immunitaires (Eberhart, 1984). L'endotoxine de la bactérie entraîne des complications majeures puisqu'elle peut passer dans le sang et affecter les organes vitaux de la vache (Huszenicza, et al., 2004). C'est d'ailleurs la principale cause de mortalité lors d'infections dues à cet agent pathogène. Parmi les principaux signes cliniques, il y a une hausse de température, des avortements, le choc endotoxinique et la diarrhée (Smith, 2002).

2.5.1.2. *Streptococcus uberis*

Streptococcus uberis est un coque à Gram positif formant des chaînes. Il est un agent pathogène relativement commun dans les cas de mammite partout dans le monde. Une étude menée dans quatre pays (Canada, États-Unis, Pays-Bas et Royaume-Uni) a identifié cette bactérie comme agent causal dans 14 à 26% des cas de mammite clinique (Hogan, 1987). Le réservoir de ce micro-organisme se retrouve, en grande partie, sur la vache elle-même : les amygdales, le tractus génital, le rumen, le rectum ainsi que la peau. Par contre, il arrive souvent de retrouver *S. uberis* dans les litières. Il est plus fréquent de

les retrouver dans une litière en paille que dans une litière faite de base de bois, lieu où les coliformes ont tendance à être majoritaires (Smith, 2002).

Streptococcus uberis se sert de cellules endommagées pour s'y attacher (Matthews, et al., 1994) et envahir la glande mammaire de la vache (Leigh, 1999). Les cellules sont endommagées, la majorité du temps, par une trop grande réaction immunitaire dirigée par les neutrophiles (Matthews, et al., 1994). Les tests biochimiques permettant d'identifier ce streptocoque donnent un résultat positif aux tests d'esculine, hippurate et inuline et un résultat négatif au test de raffinose et de CAMP (bien que parfois positif). Une infection de la glande mammaire due à *S. uberis* peut devenir chronique sub-clinique (Radostits and Arundel, 2000).

2.5.1.3. *Streptococcus dysgalactiae*

Streptococcus dysgalactiae est une bactérie à Gram positif en forme de coque et qui fait partie du groupe C de Lancefield. Cet agent ne peut être classé de façon définitive dans l'un des deux groupes (environnemental ou contagieux) puisqu'il peut se propager en utilisant deux différentes méthodes (Calvinho, et al., 1998). Premièrement, durant la période de lactation, la bactérie peut être transférée par l'équipement de lactation ainsi que par les employés de la ferme. De plus, pendant la période de tarissement, puisque le micro-organisme a plusieurs réservoirs (amygdales, bouche et vagin), il est possible que de nouveaux cas de mammite se déclarent chez un bovin à cause d'une infection à *S. dysgalactiae*. Tout comme *S. uberis*, il est possible que *S. dysgalactiae* cause une infection chronique sub-clinique (Radostits and Arundel, 2000). Le micro-organisme peut aussi se propager grâce à la mouche *Hydrotaea irritans* (Calvinho, et al., 1998).

Dans une étude effectuée en Angleterre sur les causes des cas cliniques à la suite du tarissement, sur 84 cas cliniques rapportés, 6% étaient causés par *S. dysgalactiae*, qui se classait ainsi deuxième à égalité avec *S. uberis* et les staphylocoques à coagulase positive (Green, et al., 2002). *Escherichia coli* se classait premier, loin devant tous les pathogènes avec un total de 37 cas.

2.5.1.4. *Klebsiella* spp.

Klebsiella spp. sont des bactéries pathogènes à Gram négatif en forme de bâtonnet. Ces bactéries contiennent des endotoxines et elles font partie de la famille des Enterobacteriaceae (Smith, 2002). Les deux types d'infection se ressemblent et les *Klebsiella* spp. peuvent aussi causer de la mortalité chez les bovins (Radostits O.M., 1995). Une infection aux *Klebsiella* spp. peut venir des fèces ou bien de la litière (Zdanowicz, et al., 2004). Comme *S. uberis*, une litière faite de matériel inorganique, comme le sable, est un bon moyen pour limiter les mammites causées par des bactéries pathogènes environnementales. Lorsque la litière est faite de matière organique, *Klebsiella* a tendance à être beaucoup plus nombreuse, pouvant être six fois plus présentes que dans une litière faite de sable (Zdanowicz, et al., 2004).

2.5.1.5. Staphylocoques à coagulase négative

Ce type de micro-organisme est fréquemment isolé à partir d'échantillons de lait. Tout comme le *S. aureus*, les *Staphylococcus* spp. sont des bactéries à Gram positif, avec une morphologie de coque. Ces bactéries se distinguent de *S. aureus* par le résultat négatif du test de la coagulase. Par contre, certains staphylocoques donneront une réaction positive dans une certaine proportion (ex. *S. hyicus* est positif entre 24 et 40%). En général, le taux de mammites dus à ces agents pathogènes est relativement bas lorsque *S. aureus* et d'autres bactéries sont présentes dans la ferme. Par contre, si les micro-organismes principaux sont contrôlés dans une ferme, les staphylocoques à coagulase négative prendront une part importante des cas de mammites (Sears and McCarthy, 2003).

Lors de la collecte d'échantillons, il est relativement facile de contaminer les échantillons avec ce genre de staphylocoque. De plus, de nombreuses espèces peuvent faire partie du groupe des staphylocoques à coagulase négative. Une étude menée dans 16

troupeaux en Ohio (Hogan et al., 1987) a permis d'identifier plusieurs espèces causant la mammite tels *Staphylococcus epidermidis* (37%), *Staphylococcus hyicus* (12.4%), *Staphylococcus hominis* (6.7%), *Staphylococcus xylosus* (6.7%) et *Staphylococcus simulans* (6.7%), ainsi que plusieurs autres en moins grande quantité tels *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus saprophytius* et *Staphylococcus lentus* (Sears and McCarthy, 2003).

2.5.2. Contagieux

2.5.2.1. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae est un coque à Gram positif faisant partie du groupe B de Lancefield. Malgré l'existence de nombreux moyens pour contrer cette bactérie, la prévalence de troupeau avec cette infection varie entre 11% en Alberta (Alberta Agriculture, Food and Rural Development 1993) et 47% au Vermont (Hogan et al., 1986). Comme beaucoup de bactéries pathogènes, sa virulence est extrêmement liée à sa capacité d'adhérer aux cellules épithéliales de la glande mammaire puisqu'il est un parasite obligatoire (Keefe, 1997). En général, ce micro-organisme se traite relativement bien avec de la pénicilline. Son principal réservoir est constitué des glandes mammaires des vaches infectées (Keefe, 1997), ce qui en fait une bactérie de type contagieuse. La majorité des infections par cette bactérie donne lieu à une mammite sub-clinique, détectable principalement par une baisse de la production de lait ainsi que par une hausse du décompte des cellules somatiques. Dans une étude effectuée sur *S. agalactiae*, les chercheurs ont échantillonné une douzaine de fermes où la présence de l'agent pathogène était confirmée (Erskine and Eberhart, 1990). La moyenne de cellules somatiques était de 918 000 cellules/mL. Après un traitement massif du troupeau, cette moyenne a diminué à 439 000 cellules/mL en seulement 30 jours. Par la suite, des mesures hygiéniques ont été implantées (bain de trayons, thérapie en période de tarissement). La moyenne a continué de chuter et s'est rendue à 268 000 cellules / mL après un an d'intervention (Erskine and Eberhart, 1990).

Pour ce qui est de la prévalence de cette bactérie au Canada, une étude a été effectuée auprès de 291 fermes. La prise d'échantillons se faisait directement dans le

réservoir de lait. Il y avait 3 fermes dans lesquelles *S. agalactiae* était présent (Olde Riekerink, 2005). En 2006, la prévalence de la bactérie dans les réservoirs de lait de l'Île-du-Prince-Édouard était de 1,6% (Olde Riekerink, 2006)

2.5.2.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est un des principaux agents pathogènes contagieux de la mammite, affectant grandement la quantité de lait produite et sa qualité et menant souvent à des mammites chroniques. C'est un coque à Gram positif. Cette bactérie est relativement facile à diagnostiquer grâce à la double hémolyse sur gélose sang. Dans certain cas, *S. aureus* peut causer la mortalité lors d'une mammite gangréneuse (Han and Park, 2000).

Ce staphylocoque se distingue des autres staphylocoques puisqu'il se transmet par contagion et non à partir de l'environnement (Sears and McCarthy, 2003). Il y a plusieurs endroits où ces agents pathogènes sont retrouvés : sur le corps, les membres ou la tête des vaches, dans les litières et sur les mouches qui les transportent. Mais, il n'en reste pas moins que le principal moyen de transmission de la maladie se fait de façon contagieuse, c'est-à-dire par les machines à traire ainsi que par les employés.

Il y a des facteurs de virulence qui aident la bactérie à survivre dans la glande mammaire. Parmi ceux-ci, il y a la capsule, la protéine A et les toxines. Même si la bactérie est phagocytée, elle est en mesure de survivre dans la cellule à l'aide de sa capsule, ce qui explique pourquoi il est facile pour elle de faire des infections de type chronique (Hensen, 2000; Sears and McCarthy, 2003). Une fois la bactérie cachée dans les cellules, les antibiotiques ne peuvent pas l'atteindre, ce qui lui permet de persister dans les glandes mammaires des vaches. La protéine A joue également un rôle dans la persistance. Il s'agit d'une protéine qui lie la portion Fc des anticorps, permettant ainsi de se camoufler du système immunitaire. L'apparition de gangrène au niveau de la glande mammaire sera souvent causée par la toxine α . Lorsque cela se produit, le taux de mortalité augmente significativement (Smith, 2002).

2.5.2.3. *Mycoplasma* spp.

Le mycoplasme est un micro-organisme de morphologie sphérique ou ovale. Il est également le procaryote auto-répliquant le plus petit et le plus simple (Fox and Gay, 1993). Puisqu'il possède un très petit génome, il n'a pas assez de gènes pour synthétiser ses propres précurseurs qui lui permettent de fabriquer ses protéines. Son comportement ressemble à celui des virus, même s'il est classé parmi les bactéries (Fox, et al., 2005).

Puisqu'il se retrouve dans les trayons et la glande mammaire, il fait parti de la classe des micro-organismes contagieux. Les mammites causées par ce micro-organisme sont difficiles à traiter puisque le micro-organisme survit à l'intérieur des cellules, le protégeant ainsi de l'action de certains antibiotiques. À titre préventif, toutes nouvelles vaches acquises par un producteur devraient être immédiatement soumises à un test diagnostique pour détecter le mycoplasme (Fox and Gay, 1993). D'autres mesures préventives doivent être prises pour combattre ce micro-organisme : réformer les vaches atteintes, les traire en dernier, jeter le matériel utilisé pour soigner ce genre de cas, et tester de façon routinière le réservoir de lait (Fox, et al., 2005, Smith, 2002).

La persistance de cette bactérie dans l'environnement est assez grande: 2 jours sur le métal, 7 jours sur le caoutchouc ou les vitres, 18 jours sur les éponges et le coton et 37 jours dans le fumier. Il est même important pour le trayeur de bien se laver les mains avant et après la traite des vaches pour éviter la transmission. Aux États-Unis, les données obtenues en analysant les réservoirs de lait ont évalué entre 1 et 8% la proportion de troupeaux avec au moins une vache atteinte par ce micro-organisme (Fox, et al., 2005). Dans une étude au Canada en 2005, aucun *Mycoplasma* n'avait été isolé des fermes échantillonnées (Olde Riekerink, 2005) tandis qu'à l'Île-du-Prince-Édouard, en 2006, la prévalence du troupeau à cette bactérie était de 1,9% (Olde Riekerink, 2006)

2.5.2.4. *Corynebacterium bovis*

Corynebacterium bovis est une bactérie à Gram positif, avec une morphologie de courts bâtonnets. Ce micro-organisme se retrouve habituellement sur la peau de la vache. La pathogénicité de cette bactérie n'est pas très bien comprise et elle ne cause habituellement qu'une légère hausse des cellules somatiques (Fox and Gay, 1993). Il est très facile de contaminer des échantillons avec cette bactérie, c'est pourquoi il est très important de faire attention et de bien nettoyer les trayons avant d'effectuer un prélèvement.

2.6. Traitements

Pour soigner une maladie infectieuse, l'usage d'antibiotiques demeure encore une méthode efficace. Plusieurs classes d'antibiotiques existent et chacune d'entre elles possède des mécanismes d'actions différents. Pour traiter en période de lactation au Canada, les antibiotiques intramammaires les plus utilisés sont la pénicilline combinée à de la streptomycine, de la novobiocine et de la polymyxine B, l'érythromycine, la céphapirine, la pirlimycine et la cloxacilline de sodium (Radostits and Arundel, 2000). Tous, excepté la pirlimycine, ont leurs homologues pour le traitement au tarissement.

Il existe deux types de traitements pour la mammite bovine, soit les médicaments à utilisation en période de tarissement et ceux à utilisation en période de lactation (Radostits O.M., 1995). La grande différence réside dans la persistance de l'antibiotique dans la glande mammaire après l'injection. Un traitement donné durant la période de lactation aura une diffusion ainsi qu'une élimination rapide. Puisqu'il est interdit de laisser des traces d'antibiotiques dans le lait, une élimination rapide permet aux producteurs de ne pas jeter le lait de cette vache durant une trop longue période. Les médicaments de tarissement se donnent une fois au début de cette période. Leur présence dans la glande sera prolongée, empêchant l'implantation de nouvelles infections ainsi que

l'élimination des micro-organismes causant des mammites chroniques qui datent de la lactation précédente (Eberhart, 1986).

La céphapirine, la cloxacilline et la pénicilline font tous parties du groupe des β -lactames. Le principal mode d'action est de lier les «penicillin-binding proteins» (PBP) localisées sur la paroi des bactéries pour inhiber la formation de cette paroi en bloquant les enzymes (Merck & Co., 1955, Prescott et al., 2000). Il y a la novobiocine, un aminocoumarin, dont la liaison avec l'ADN gyrase inhibe le surenroulement de l'ADN (Prescott et al., 2000). L'action de l'érythromycine, faisant parti des macrolides, est de lier principalement les ribosomes 50S, ce qui inhibera par conséquent la production des protéines. La pirlimycine est un antibiotique de la classe des lincosamides dont le mode d'action est le même que les macrolides. Bien que le mode d'action et la cible soient les mêmes que les macrolides, la structure moléculaire des lincosamides et des macrolides sont différentes, ce qui expliquent pourquoi ils sont classés dans deux familles différentes (Merck & Co., 1955, Prescott et al., 2000).

Des six antibiotiques communs au tarissement, la céphapirine est le plus efficace pour combattre les *E. coli*. La bactérie résiste habituellement à la cloxacilline, la pénicilline, l'érythromycine et la pirlimycine (Prescott et al., 2000). Pour ce qui est de la novobiocine, son activité est réduite de beaucoup lorsqu'elle est utilisée contre les *E. coli*. La cloxacilline résiste aux β -lactamases que les staphylocoques produisent pour se protéger des antibiotiques (Prescott et al., 2000).

Puisque le *S. aureus* est en mesure de se cacher au niveau intracellulaire, l'efficacité du traitement aux antibiotiques est estimée à 50% ou moins (Osteras, et al., 1999, Radostits and Arundel, 2000). Ce faible taux de guérison est dû en grande partie à la pénétration inadéquate des antibiotiques à l'intérieur de la glande mammaire comparativement à l'efficacité de la bactérie pour s'y établir (Erskine, 2002, Hensen, 2000). Bien que les traitements en période de tarissement soient peu efficaces, il est courant de laisser une infection chronique aux *S. aureus* persister jusqu'au tarissement. Cela permet de soigner l'infection, et de prévenir une seconde infection. Plusieurs

facteurs peuvent causer une diminution de l'efficacité du traitement. Entre autres, il y a l'augmentation du nombre de cellules somatiques, le vieillissement de la vache et le pourcentage de quartiers infectés avant le tarissement (Sol, et al., 1994).

Pour ce qui est des staphylocoques à coagulase négative, ils sont habituellement très sensibles à l'action de la pénicilline, de l'ampicilline, de l'amoxicilline, de l'acide clavulinique, de la céphalothine, de l'érythromycine, de la gentamicine, des sulfonamides, de la tétracycline et de la vancomycine (Radostits and Arundel, 2000).

Streptococcus agalactiae est une bactérie dont le contrôle dans un troupeau se fait relativement bien (voir la section 2.4.). Il y a différents moyens pour tenter d'éradiquer cette bactérie de la ferme, soit le traitement en période de lactation et de tarissement et la réforme des vaches infectées de façon chronique (Radostits and Arundel, 2000). Il y a différents antibiotiques qui sont plus ou moins efficaces contre cette bactérie pathogène. Parmi les antibiotiques utilisés en période de lactation, la pénicilline, l'érythromycine, la cloxacilline et la céphalosporine ont un bon taux de guérison (entre 90 et 100%). La gentamicine, la néomycine, la nitrofurazone ainsi que la polymyxine B démontrent une moins bonne efficacité. Pour finir, la combinaison de novobiocine avec de la pénicilline, toujours en période de lactation, a une efficacité située entre 89 et 98% (Erskine, et al., 1996). Il y a également de bons traitements aux antibiotiques disponibles lors de la période de tarissement. Ceux-ci comprennent la cloxacilline avec une efficacité de 98% (Keefe, 1997) et l'érythromycine avec 100% (Radostits and Arundel, 2000).

Le traitement du *Mycoplasma* spp. présente différents problèmes. Les traitements proposés n'obtiennent pas souvent de bons résultats. Une injection parentérale d'oxytétracycline peut, à l'occasion, guérir temporairement un quartier (Radostits and Arundel, 2000). Une étude a aussi démontré qu'une injection intramammaire de tétracycline avec de la tylosine peut parfois guérir l'animal (Ball and Campbell, 1989). Vu la mauvaise réponse aux traitements, un moyen efficace qui permet d'éliminer ce micro-organisme du troupeau est de réformer les vaches montrant des réponses négatives aux traitements. Devant la complexité du problème, avant d'introduire un bovin dans un

troupeau, il est important, pour un producteur, de mettre la vache en quarantaine et de faire des tests diagnostiques par rapport à ce micro-organisme pathogène. Cette pratique permettra au producteur de protéger plus efficacement son troupeau.

Le groupe de coliformes comprend, entre autre, *E. coli*, *Klebsiella* spp. et *Enterobacter aerogenes* (Radostits and Arundel, 2000). En général, le taux de guérison d'une infection aux coliformes suite à l'injection de sulfonamide-triméthoprimine sera de 89% (Shpigel, et al., 1998). *Escherichia coli* est susceptible aux différents antibiotiques injectés par voie parentérale : la gentamicine, l'amikacine, la céphalothine, la polymyxine B et le triméthoprimine combiné au sulfonamide. La cefquinone, quant à elle, est un antibiotique efficace, car cette molécule est résistante aux β -lactamases produites par l'agent pathogène pour se protéger (Shpigel, et al., 1997). Le ceftiofur injecté par voie intra-veineuse ne pourra pas atteindre la glande mammaire en concentrations suffisantes pour affecter les bactéries pathogènes (Erskine, et al., 1995). Par contre, une injection intramammaire assurera une bonne guérison (Bezek, 1998) bien qu'il ne soit pas homologué pour cet usage.

Le dernier groupe est celui des streptocoques environnementaux. La plupart des streptocoques isolés de ce groupe sont les *S. uberis* ainsi que les *S. dysgalactiae*. Ils sont sensibles à la pénicilline, la tétracycline, la cloxacilline et la céphalosporine. Un bon rendement est obtenu lorsque ces antibiotiques sont injectés de façon intramammaire (Radostits and Arundel, 2000). Pour la période de tarissement, le céphalonium sera un excellent moyen à utiliser pour tenter de réduire les incidences de mammites causées par ces agents pathogènes. L'efficacité des antibiotiques intramammaires sera plus haute face aux streptocoques environnementaux. Les médicaments disponibles pour les coliformes obtiennent de moins bons résultats contre les streptocoques (Smith and Hogan, 1993).

2.7. Antibiorésistance

2.7.1. Généralités

Dans le domaine microbiologique, il y a deux types de résistance : naturelle et acquise. La première des deux s'effectue de façon naturelle, sans devoir impliquer l'acquisition de gènes de résistance ou de mutation. Par exemple, il y a le mycoplasme qui résiste à la pénicilline puisque cette bactérie n'a pas de paroi, site d'action de cet antibiotique.

Il y a deux types de résistance acquise : la mutation cellulaire ou bien, l'acquisition de gènes exogènes. La première des deux est une mutation effectuée au niveau du chromosome bactérien, ce qui aura pour conséquence de muter les cibles auxquelles les molécules de l'antibiotique se lient normalement. Si le changement de structure est assez important, l'antibiotique ne pourra plus s'y lier, rendant la bactérie résistante (Prescott et al., 2000). Le transfert de ce genre de résistance se fait à partir de la cellule-mère à la cellule fille, un transfert qualifié de vertical.

Pour ce qui est de la seconde classe de résistance acquise, il y a trois éléments génétiques de transfert qui sont à considérer : les plasmides, les transposons et les intégrons. Les plasmides sont des molécules d'ADN extra-chromosomique qui contiennent, à l'occasion, des gènes de résistance. Ce genre d'élément peut se répliquer indépendamment de l'ADN chromosomique (Prescott et al., 2000). Pour sa part, le transposon est une courte séquence d'ADN, parfois contenant des gènes de résistance, qui parvient à sauter entre deux plasmides ou bien d'un plasmide vers un chromosome. Les transposons ne peuvent se répliquer seul, sauf les transposons conjugatifs. Ils auront donc besoin d'un élément capable de se répliquer pour que le transposon le soit en même temps. Une seconde possibilité serait de le faire transférer en même temps qu'un plasmide par une simple conjugaison. Puisque plusieurs transposons peuvent se retrouver sur de l'ADN plasmidique, une conjugaison permettra un transfert de multi-résistance entre deux bactéries (Prescott et al., 2000).

En plus des plasmides et des transposons, il y a les intégrons, des éléments génétiques mobiles qui sont formés de deux régions conservées et d'une région variable qui peut contenir plusieurs cassettes de gènes de résistance (Hall, 1997). Les cassettes des intégrons sont sous le contrôle de deux promoteurs, mais comme les transposons, les intégrons ne peuvent se répliquer seuls. Ils se retrouvent parfois dans le chromosome, mais, sont le plus souvent dans les plasmides ou les transposons. Tout comme ces derniers, une conjugaison parviendra à transférer un intégron localisé sur un plasmide (Hall, 1997).

2.7.2. Transfert de l'antibiorésistance entre les bactéries

Les bactéries pathogènes de la glande mammaire, exposées aux antibiotiques, ont l'occasion de développer une antibiorésistance. Suite à des infusions intramammaires, que cela soit en période de tarissement ou de lactation, les bactéries pathogènes sont exposées à des antibiotiques lors d'un épisode de mammite. Cette exposition permettra la sélection des micro-organismes les plus aptes à résister à des antibiotiques spécifiques. Certaines bactéries de la mammite effectuent déjà ce phénomène (Erskine, 2002). L'inconvénient lorsque des agents pathogènes deviennent résistants, c'est qu'ils peuvent souvent transférer leurs gènes aux autres bactéries. Devant l'apparition de l'antibiorésistance, l'homme s'est mis à créer d'autres antibiotiques pour enrayer cette menace. Cependant, la population bactérienne a su s'adapter à nouveau pour éviter de se faire anéantir par les antibiotiques. Il suffit de penser aux *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) (Kowalski, et al., 2005) ou bien à la tuberculose qui cause bien des problèmes.

Dans le tractus intestinal humain ou animal se trouve une flore bactérienne normale qui aide à la survie de son hôte en facilitant la digestion des aliments. Une étude, tenant compte du comportement de *Bacteroides* spp., s'est attardée sur la possibilité de transfert des gènes de résistances à l'intérieur des intestins chez l'humain (Salyers, et al., 2004). Ces bactéries utilisent, entre autres, deux types de conjugaisons possibles pour le transfert de matériel génétique : la conjugaison de plasmides et la conjugaison de

transposons. Ces plasmides ou transposons ont la capacité de changer le profil de résistance des bactéries. Ils ont également un rôle à jouer dans la virulence, pouvant transporter certains gènes de virulence et des gènes de résistance (de la Cruz and Davies, 2000).

Les principales étapes de la conjugaison par transposon sont : l'excision, le transfert, la réplication et l'intégration (Whittle, et al., 2002). Tout d'abord, les pilis sexuels de la bactérie donneuse s'accrocheront et formeront un canal, ce qui permettra l'échange d'information génétique (Snyder and Champness, 2003). Ensuite, il y aura excision d'une séquence de double brins d'ADN (transposon) (Marra, et al., 1999). Un des deux brins d'ADN sera transféré dans la bactérie réceptrice, à partir de l'origine de transfert *oriT* (Whittle, et al., 2002). Les simples brins d'ADN du transposon dans chaque bactérie seront répliqués et ensuite ils seront insérés dans leur génome ou plasmide respectif de manière aléatoire. Les régions visées dans ce genre de conjugaison seront les fragments d'ADN riches en A-T. De cette façon, il est plus ou moins facile de prédéterminer les régions les plus susceptibles à recevoir ce genre de transposon (Whittle, et al., 2002). La différence entre une conjugaison à transposon ou bien à plasmide réside dans le fait que le plasmide ne se localisera pas dans le génome de la bactérie (Snyder and Champness, 2003).

Il y a un moyen de transférer plus spécifiquement de l'information génétique. Il s'agit d'une conjugaison de type Hfr (Snyder and Champness, 2003). La différence de cette conjugaison avec celle par transposon c'est que l'insertion du gène de résistance se fera plus précisément. L'ADN double brins du donneur se sépare en deux par dénaturation, faisant passer ainsi un brin dans le canal. Une fois le brin transféré, il se coupera. Il ira trouver sa séquence homologue pour y adhérer. Une fois cette liaison accomplie, il y aura une fusion, ce qui fera que le gène entrera dans le génome, donnant ainsi la résistance désirée.

Un second moyen que les bactéries possèdent pour s'échanger de l'information génétique est la transformation. Ce phénomène consiste en l'acquisition d'ADN libre

dans le milieu environnemental. Bien que cette pratique soit couramment utilisée en laboratoire avec la méthode de chocs thermiques ou électriques, la transformation est un principe totalement naturel. Les cinq grandes étapes d'une transformation sont : l'attachement des doubles brins d'ADN sur la protéine de surface de la bactérie, le mouvement d'entrée du double brin dans la bactérie, la dégradation d'un des deux brins d'ADN, la translocation du simple brin dans le cytoplasme et l'intégration du brin d'ADN dans le génome bactérien par recombinaison homologue (Snyder and Champness, 2003).

Par contre, un élément important entre en jeu dans l'antibiorésistance : l'attaque de la flore bactérienne par les antibiotiques. Donc, si un antibiotique est administré et que ses molécules actives diffusent dans le tractus intestinal, ce sont toutes les bactéries de cette flore qui subiront son impact (Mazel and Davies, 1999). La sélection naturelle fait en sorte que les micro-organismes de la flore qui ne succombent pas à cet antibiotique sont plus résistants. Donc, ces bactéries sont en mesure de transférer les gènes de résistance aux autres, ce qui résulte en une flore qui est résistante à l'antibiotique donné.

Il faut se souvenir que les premiers antibiotiques des années 1940 et 1950 étaient des produits d'origine naturelle (Mazel and Davies, 1999). Donc, les premières bactéries résistantes devaient se retrouver à proximité des sites d'expositions naturelles. Le problème survient lorsque ces bactéries non pathogènes entrent en contact avec celles qui le sont et qu'elles commencent à transférer leurs antibiorésistances à plusieurs types de bactéries (Hughes and Datta, 1983). Par exemple, l'étude de Campos cite *Neisseria meningitis* comme étant résistante à la pénicilline avec le gène *penA*. Ce gène possède une similarité de 78% avec une souche de *Neisseria meningitis* sensible à la pénicilline. Par contre, en comparant avec une souche de *N. flavescens*, la similarité est pratiquement parfaite (Spratt, et al., 1989). La preuve que les gènes de résistance étaient les mêmes a été faite lorsqu'une étude a démontré que *N. meningitis* était une bactérie qui effectuait la transformation naturelle (Campos, et al., 1992).

2.7.3. Antibiorésistance chez les bactéries causant la mammite

Parmi les antibiotiques intramammaires les plus utilisés au Canada, la céphapirine, la cloxacilline et la pénicilline font parties des β -lactamines. Pour se protéger contre ces antibiotiques, les bactéries produisent les enzymes β -lactamases, enzymes qui dégradent les molécules (Merck & Co., 1955). Par contre, certains antibiotiques résistent à ces β -lactamases. C'est le cas de la cloxacilline qui est utilisée pour combattre les infections aux bactéries qui produisent cet enzyme (Prescott et al., 2000). Dans deux études réalisées en France et aux États-Unis, bien des staphylocoques résistaient à la pénicilline par la production d'enzymes β -lactamases, tous étaient susceptibles à la céphapirine et la cloxacilline (Guerin-Fauble et al., 2003, Craven et al., 1983). En Argentine, 40% des *Staphylococcus aureus* présentent une résistance à la pénicilline tandis que celle à la céphapirine est inexistante (Gentilini et al., 2000) et selon les résultats du Danemark, 12% des *S. aureus* résisteraient à la pénicilline (Bennedsgaard et al., 2006).

En France, 10% des *E. coli* résistent aux céphalosporines tandis que seulement 3% et 0% des souches de *S. uberis* et de *S. dysgalactiae* résistent (Guerin-Fauble et al., 2003). Rossitto, en 2002, a testé la résistance des *S. uberis* et *S. dysgalactiae* contre la pénicilline, la novobiocine, l'érythromycine et la pirlimycine. Ses résultats démontrèrent que les résistances du *S. uberis* étaient de 50%, 1%, 48% et 40% tandis que celles du *S. dysgalactiae* étaient de 2%, 0%, 7% et 8% respectivement (Rossitto et al., 2002). Une étude similaire réalisée en Argentine faite sur le *S. aureus* a trouvé que 12% et 8% des souches résistaient à l'érythromycine et la à pirlimycine (Gentilini et al., 2000). Pour ce qui est de l'étude de Makovec, aucune résistance n'a augmenté par rapport à la combinaison novobiocine / pénicilline (Makovec and Ruegg, 2003).

Il y a quelques agents pathogènes qui sont résistants aux antibiotiques autres que ceux utilisés contre la mammite (Tenhagen et al., 2006). Il a été démontré que certains isolats de *S. aureus* possèdent des résistances face à l'ampicilline et à la pénicilline. Il est prouvé que les *Staphylococcus aureus* à résistances multiples (SARM) ne proviennent pas

du milieu bovin suite à différents traitements, comme ceux faits pour la mammite (Devriese, 1997). Pour ce qui est des streptocoques, la résistance varie plus ou moins selon l'espèce. Par exemple, une population de *S. uberis* était plutôt susceptible à la gentamicine, à l'oxacilline et à la tétracycline (Erskine, 2002). Certaines souches de *S. dysgalactiae* résistent à la tétracycline et certaines populations de *S. agalactiae* le sont à la gentamicine, et d'autres au sulfa-triméthoprimine et à la tétracycline. Pour ce qui est des coliformes étudiés (*E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*), les deux micro-organismes pathogènes présentaient une résistance commune à la cloxacilline, à l'érythromycine, à la novobiocine et à la pénicilline, tandis qu'il y en a d'autres plus faibles pour la streptomycine, la tétracycline et la céphalothine (céphalosporine). Par rapport à l'ampicilline, *Klebsiella* spp. est très résistant tandis que *E. coli* est davantage sensible à cet antibiotique (Erskine, et al., 2002, Makovec and Ruegg, 2003, McDonald and al., 1977, Sears, 1986).

L'étude de Tragesser, en 2006, démontrait que la résistance des bactéries *E. coli* commensales s'effectuait au niveau du troupeau et non au niveau de la vache (Tragesser and al., 2006). Si un producteur faisait usage du ceftiofur pour soigner les bovins, une résistance grâce au gène *bla_{CMY-2}* se faisait ressentir dans tout le troupeau. Par contre, lorsque les données étaient analysées au niveau de la vache, il n'y avait pas de relation entre traitement et antibiorésistance des bactéries. Cela laisse croire que la résistance dans un troupeau peut se propager à l'intérieur du troupeau. Les auteurs concluent que pour réduire les résistances des *E. coli* face au ceftriaxone, il fallait mieux prévenir à l'échelle du troupeau (Tragesser and al., 2006). Il est important de noter ici que les traitements faits à base de ceftiofur n'étaient pas obligatoirement administrés par voie intramammaire.

2.7.4. Risque de transfert de l'antibiorésistance des bactéries d'origine bovine à l'homme

Les micro-organismes résistants aux antibiotiques d'origine animale sont potentiellement dangereux pour l'homme dû à la possibilité de transfert d'antibiorésistance. Dans le cas des bovins, il y a différents modes possibles de transmission de bactéries pathogènes de l'animal à l'homme : par le lait, les écoulements d'eau contaminés par des fèces et la viande. Les exemples cités plus bas ne démontrent pas tous des contaminations par des micro-organismes pathogènes résistants aux antibiotiques. Par contre, ils présentent tous la contamination de la population humaine avec des pathogènes provenant des animaux. Si des micro-organismes pathogènes non résistants aux antibiotiques proviennent d'une source animale et contaminent les hommes, il n'y a pas de raison pour qu'une bactérie résistante aux antibiotiques ne puisse pas le faire.

Un lait mal pasteurisé ou bien mal entreposé peut entraîner une croissance de bactéries. Un exemple récent de ce phénomène s'est produit il y a cinq ans, en Pennsylvanie ainsi qu'au New Jersey (Olsen, et al., 2004). Une souche de *Salmonella* Typhimurium multi-résistante s'est propagée dans le lait, infectant ainsi plusieurs personnes. Un problème dans l'entreposage du lait après la transformation a permis aux micro-organismes de croître et de survivre dans la chaîne de consommation humaine. La température était située au-dessus des 10 °C alors que la norme exigeait 7,2 °C (Olsen, et al., 2004). Depuis 1960, environ une douzaine d'épisodes se sont produits dans divers états aux États-Unis (Olsen, et al., 2004). *Salmonella* Typhimurium n'est pas un agent pathogène fréquent de la mammite, ce qui veut dire que sa présence dans le lait n'est pas courante. Il peut y avoir plusieurs raisons qui expliqueraient la présence de cette bactérie dans le lait. Que ce soit lors de la traite, ou bien sur la chaîne de transformation, il est possible que le lait devienne contaminé avec ce micro-organisme.

Les écoulements d'eau représentent un problème de grande envergure. Les matières fécales, qui réussissent à entrer dans les nappes d'eau, ou qui coulent tout simplement dans les lacs où l'eau est destinée à la consommation humaine, peuvent causer, sous certaines conditions, bien des problèmes de santé publique. Il suffit de penser à Walkerton, en Ontario en l'an 2000 où plus de 2300 personnes furent contaminées par une souche d'*E. coli* O157:H7 et dont 7 personnes en sont décédées (Richards, 2005). Les puits d'eau potable avaient été infectés par des coliformes fécaux d'origine animale lors d'un orage violent en même temps que survenait une défectuosité du système d'assainissement des eaux.

La mauvaise cuisson de la viande peut également représenter un risque potentiel pour l'homme. En 2002, entre janvier et avril, 47 personnes ont été infectées par une souche de *Salmonella* multi-résistante dans divers états américains (Zansky, et al., 2002). Cette épidémie mettait en évidence l'importance de bien cuire la viande, ceci permettant d'empêcher la propagation de bactéries pathogènes. Cette contamination peut aussi survenir lors de la coupe de la viande puisqu'il est possible que des bactéries pathogènes des intestins entrent en contact avec la viande dans la chaîne de transformation.

Les trois exemples précédents ne démontrent pas tous des transferts de micro-organismes pathogènes résistants aux antibiotiques, mais ils mettent en évidence le risque de contamination par les bactéries des animaux de la ferme comme une réalité. Dans le cas de Walkerton, la situation montre bien à quel point les bactéries pathogènes peuvent facilement s'infiltrer dans la chaîne de consommation humaine. Il a suffi, dans ce cas, d'une pluie pour contaminer l'eau potable d'un village entier. Par contre, il ne faut pas penser que cela se produit fréquemment. En général, les systèmes de sécurité réussissent assez bien à prévenir ce genre d'incident. Un des enjeux représentés par le problème de Walkerton est la possibilité pour ces micro-organismes pathogènes de demeurer dans l'environnement et de se propager entre individus. Que ce soit les autres vaches, les fermiers ou même un village à proximité de la ferme, le danger de transfert des agents pathogènes est bien présent. Si, dans un cas comme celui de Walkerton, des bactéries

multi-résistantes avaient été présentes dans ce cas, les dommages auraient pu être plus importants.

3. Matériel et méthodes

L'objectif principal du projet était de comparer le changement de susceptibilité des bactéries commensales *Escherichia coli* et *Enterococcus* spp. au-delà de la période de tarissement en fonction des vaches traitées et non traitées au tarissement. Le plan de l'étude était de type cohorte prospective. Les échantillons ont été prélevés avant et après le tarissement. Quelques tests ont été complétés pour identifier les bactéries isolées. À la suite de cette identification, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées et les changements de susceptibilités ont été évalués par groupe. Finalement, ces différences de susceptibilité ont été comparées statistiquement avec le modèle «generalised estimating equations» (GEE). Pour des fins pratiques d'écriture, le matériel et les méthodes reliés aux fèces sont décrits dans les articles.

3.1. Sélection de la population d'étudiée

3.1.1. Sélection des fermes

Une période de recrutement a été effectuée durant l'été 2005. Le critère principal de la sélection était que dans le troupeau le traitement au tarissement devait se faire de façon sélective. L'échantillonnage a eu lieu d'octobre 2005 à janvier 2007. À cause du nombre limité de fermes pratiquant le traitement sélectif au tarissement, cinq des neuf fermes ont été trouvées avant le début de l'échantillonnage. Les 4 dernières fermes ont été inscrites au mois de juin 2006, ce qui fait que leur échantillonnage a été retardé de quelques mois. Des fermes de deux régions ont été recrutées, soit la province de Québec et l'état de l'Ohio (8 et 1 fermes respectivement). Puisque les vaches des fermes américaines et canadiennes sont soumises, en grande partie, aux mêmes traitements, cette ferme de l'Ohio a été ajoutée à l'étude.

Les comptages de cellules somatiques devaient également être disponibles à la ferme soit via un programme de surveillance ou soit via un échantillonnage pour les besoins de l'étude. Les producteurs ont été pleinement informés et ont consenti au projet, ayant participé eux-mêmes en prenant en note tous les traitements effectués sur les vaches du projet. Ils avaient également pleine autorité sur le choix des traitements au tarissement puisqu'il s'agit d'une étude observationnelle.

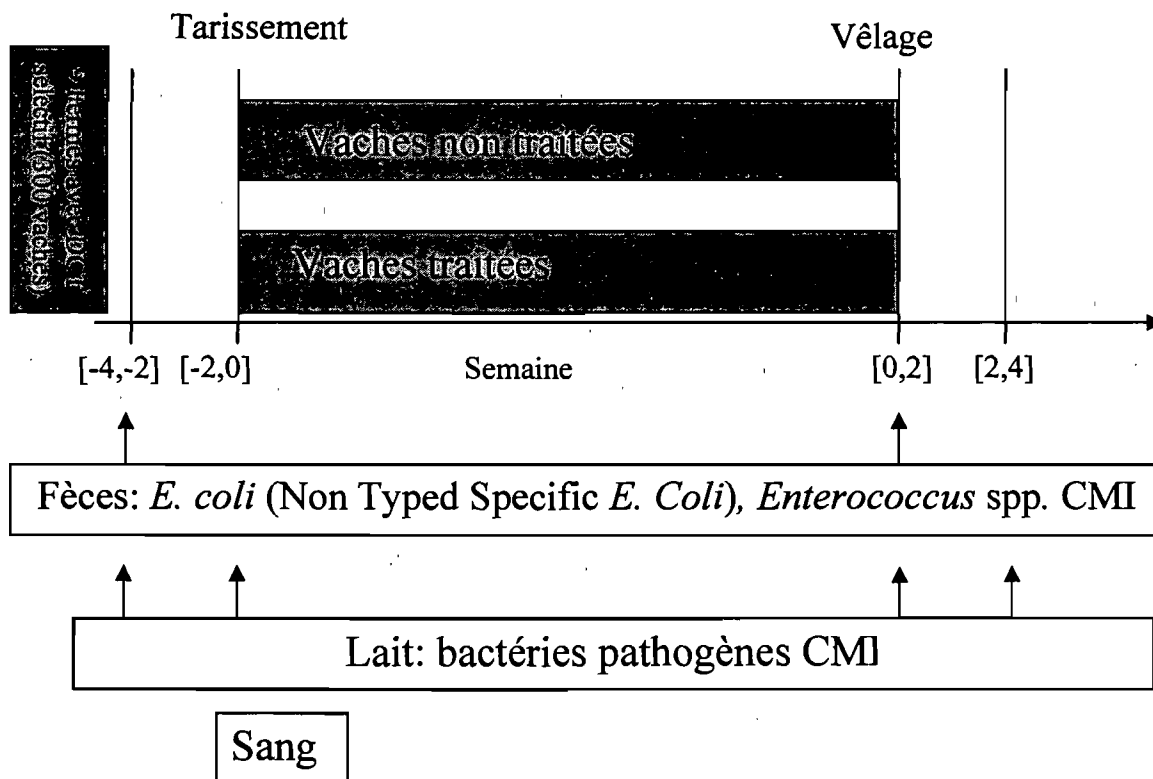
Tous les protocoles d'échantillonnage des bovins ont été approuvés par le comité d'éthique de l'Université de Montréal.

3.1.2 Sélection des vaches et schéma d'échantillonnage

Pour inclure une vache dans le projet, elle devait être tarie au plus tôt en octobre 2005 et vêler au plus tard en janvier 2007. Toutes les vaches qui ont répondu à ces deux critères ont été incluses dans le projet. La date de tarissement a été définie comme étant 7 mois après la saillie. À partir de cette date théorique, deux visites ont été faites en l'espace d'un mois à intervalle de deux semaines, permettant de récolter deux échantillons de lait et de fèces. À la suite du vêlage, deux visites ont été également effectuées, à deux semaines d'intervalle (figure 1).

Figure 1

Schéma d'échantillonnage des vaches pour le projet d'antibiorésistance d'octobre 2005 à janvier 2007



3.1.3. Attribution des traitements au tarissement

Puisqu'il s'agit d'une étude observationnelle, aucune décision par rapport au traitement ou intervention n'a été faite par les chercheurs. Donc, les seules personnes qui ont pris des décisions à propos des traitements de tarissement alloués aux vaches ont été les producteurs laitiers. Les critères de sélection pour traiter une vache ont été les mêmes que si le projet n'avait pas lieu.

3.1.4. Collecte et gestion des données

D'autres données ont été récoltées aux fermes. Il s'agit de variables dont le potentiel confondant devait être évalué. En plus des SCC, il y avait le nombre de parités ainsi que les autres traitements donnés aux vaches. Toutes ces informations ont été conservées dans le programme informatique DS@HR (St-Hyacinthe, Québec, Canada). Une base de données a été montée dans Access (Microsoft, Redmond, USA) pour conserver les informations sur les bactéries. Les informations notées sur chacune des bactéries sont les suivantes : la date d'échantillonnage et d'isolement, la ferme, le numéro de la vache et son ATQ4, le numéro de quartier, si la bactérie provenait du lait et l'espèce de la bactérie.

3.1.5. Détermination du nombre de colonies requises

Un autre projet a été fait en parallèle avec les données obtenues au cours du projet principal. Il s'agissait de déterminer si les concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'un nombre inférieur à 5 colonies par échantillonnage de fèces donne la même information sur l'antibiorésistance au travers de la période de tarissement que 5 colonies (voir Chapitre 5)

3.2. Échantillonnage du sang et de l'eau

Cette analyse sanguine a été effectuée pour confirmer que l'antibiotique diffuse hors de la glande mammaire après le traitement au tarissement. Dix et 9 vaches traitées à la novobiocine et à la céphapirine respectivement ont été échantillonnées. Les dates d'échantillonnage ont été du 29 mai 2006 jusqu'au 12 août 2006. Les antibiotiques testés ont été la céphapirine ainsi que la novobiocine, deux antibiotiques de tarissement donnés à la ferme A et E respectivement. Dix vaches traitées à la novobiocine et 6 à la céphapirine provenaient de la ferme E, tandis que 3 vaches traitées à la céphapirine provenaient de la ferme A. Pour compléter le nombre de vaches à échantillonner, des

doses pour traiter six vaches à la céphapirine ont été remises à la ferme E. Du plasma a été pris avant le traitement ainsi que 8 et 96 heures suivant le traitement.

Le sang a été collecté sous la queue dans la veine coccygienne dans un tube contenant de l'EDTA. Après le prélèvement, les tubes identifiés à la ferme et à la vache ont été mis au frais sur glace. Lors du retour au laboratoire, les tubes ont été centrifugés à 3 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant était constitué de plasma qui a été pris pour être alliqué dans des tubes en polypropylène à raison de 1,5 mL. Ces tubes ont été entreposés à -80°C jusqu'à leur lecture au spectromètre en tandem de masse.

Les résultats obtenus à partir des 9 échantillons de vaches traitées au tarissement avec la céphapirine de plasma ont démontré des concentrations détectables de céphapirine dans le plasma avant traitement. Ces concentrations étaient également présentes dans le plasma de bovins qui n'avaient pas reçu de traitement. En conséquent, un plan d'étude a été amorcé pour mieux comprendre l'ampleur d'exposition des vaches non-traitées au tarissement à la céphapirine.

L'objectif premier a été de déterminer s'il y avait de la céphapirine en circulation sanguine avant le tarissement et après le vêlage indépendamment du traitement au tarissement employé aux autres fermes que E, soit A, B, C et D, un premier échantillon de plasma a été prélevé deux semaines avant le tarissement et un second, deux semaines après le vêlage chez toutes les vaches inscrites dans l'étude principale entre le 5 septembre 2006 et le 9 janvier 2007.

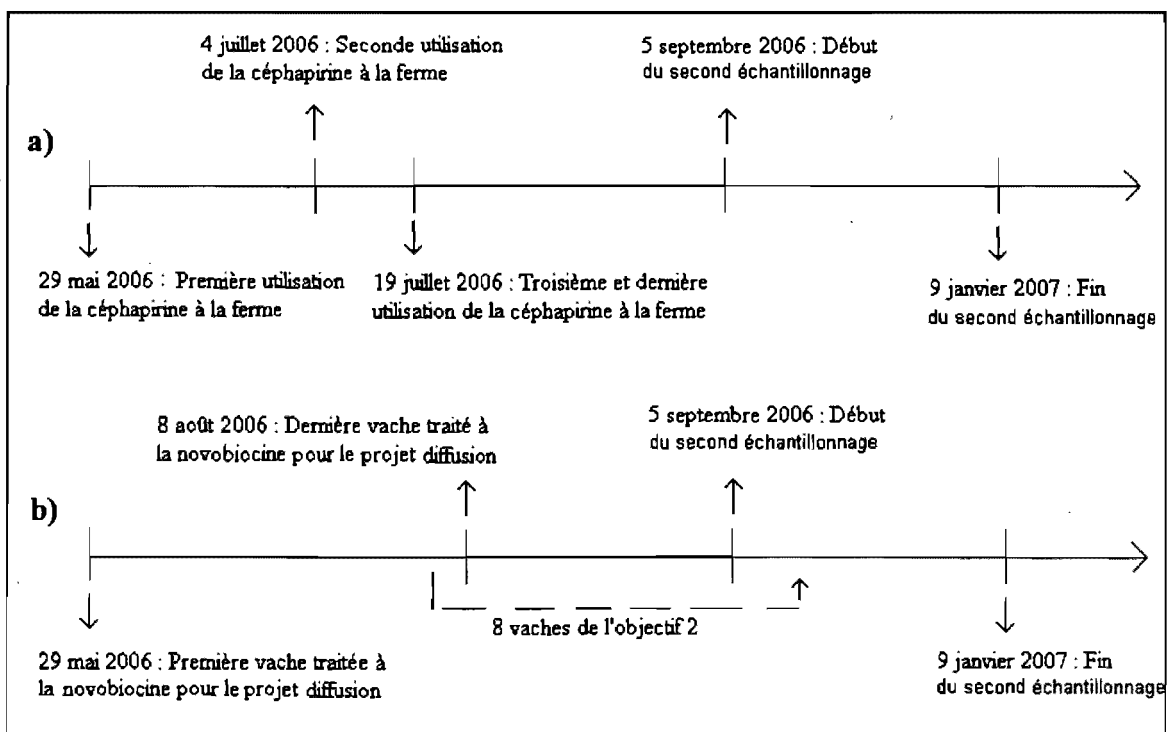
Le deuxième objectif était de déterminer si les concentrations sanguines de céphapirine disparaissaient après l'arrêt total de l'utilisation de céphapirine à la ferme E. Un premier échantillon de plasma a été prélevé deux semaines avant le tarissement et un second, deux semaines après le vêlage chez toutes les vaches inscrites dans l'étude principale entre le 5 septembre 2006 et le 9 janvier 2007. De plus, 8 vaches tariées et traitées à la novobiocine au même moment que celles tariées et traitées à la céphapirine ont été échantillonnées. La figure 2 met en relation l'échantillonnage effectué pour le

deuxième objectif et celui effectué pour le projet confirmation de la diffusion des molécules d'antibiotique.

Le troisième objectif était d'exclure que les sources d'eau des fermes A et E étaient impliquées dans l'exposition des antibiotiques aux vaches. Les échantillons ont été pris dans les abreuvoirs des enclos de tarissement et dans les abreuvoirs des vaches en lactation. De la ferme A, 4 échantillons ont été pris dans les abreuvoirs des vaches en lactation et 1 dans les abreuvoirs des enclos de tarissement. Pour la ferme E, 6 échantillons ont été pris dans les abreuvoirs des vaches en lactation et 3 dans les abreuvoirs d'enclos de tarissement. Les échantillons ont été prélevés le 5 septembre 2006.

Figure 2

Historique de l'échantillonnage sur la ferme E et de l'utilisation de a) la céphapirine et de b) la pénicilline / novobiocine



3.2.1. Détermination de la concentration d'antibiotique dans le plasma de bovin par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Le système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) utilisé était composé d'un autosampler Perkin-Elmer Serie 200 (Boston, MA, USA) et d'une pompe binaire Thermo Separation System P2000 (San Jose, CA, USA). Le spectromètre de masse était un triple quadrupole (QQQ) de *PE*Sciex API 3⁺ (*Applied Biosystem/MDS Sciex*, Concord, ON, Canada).

Les concentrations d'antibiotique ont été mesurées par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem. Brièvement, l'extraction des antibiotiques a été effectuée par précipitation des protéines plasmatiques. Cent μL de plasma ont été mélangés avec 500 μL d'acetonitrile contenant 500 ng/mL de réserpine (standard interne). Les échantillons ont été vortexés vigoureusement pour être ensuite mis au repos à température de la pièce pendant 10 minutes. Ils furent ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes et 300 μL du surnageant ont été transférés dans les tubes de HPLC pour l'analyse en chromatographie liquide et spectromètre en tandem de masse.

La chromatographie en phase liquide a été effectuée dans des conditions isocratiques avec une phase mobile contenant de l'acetonitrile, de l'eau et de l'acide formique dans les proportions de 80 :20 :0.1 et un débit de 0.9 mL/min. L'éluât fut ensuite nébulisé et ionisé avec une source d'énergie opérant à 4000V utilisant un gaz de nébulisation chauffé à 400°C à un débit de 3 L/min. Les ions ont, par la suite, été dégarnis des agrégats de solvant en utilisant un potentiel de 20V entre l'orifice et Q0. Le spectre de masse opérait en mode de réaction sélectionné (MS/MS) avec une énergie de collision de 22V et des transitions de masse m/z 424 \rightarrow 292 (cephapirin), 613 \rightarrow 189 (novobiocin) et 609 \rightarrow 174 (reserpine). La quantification s'est effectuée sur la base d'une courbe de calibration et d'une régression linéaire ($y = ax + b$) pondérée. La réponse mesurée fut normalisée en calculant le ratio de l'aire sous le pic chromatographique de l'analyse sur le standard interne.

3.3. Échantillonnage du lait

Un protocole de collecte stérile de lait a été appliqué pour ce projet. Pour débiter, les tubes ont été identifiés aux niveaux de la ferme, vache et quartier. Par la suite, après avoir mis des gants en latex, la glande mammaire a été nettoyée avec un papier sec. Un bain de trayon fut appliqué sur chaque trayon de la glande mammaire. Après une attente d'au moins 20 à 30 secondes les trayons ont été nettoyés avec une gaze imbibée d'alcool 70%; une gaze par trayon en commençant par les deux trayons les plus éloignés de l'opérateur. Durant le nettoyage, les trois premiers jets de lait ont été jetés dans une tasse et les bouts des trayons ont été nettoyés à nouveau. Le lait a été collecté en commençant par les trayons les plus rapprochés. Le tube ainsi que le trayon ont été penchés pour limiter une contamination de l'échantillon tout en tenant le bouchon du tube avec le côté interne en dessous. Une fois que 5 à 10 mL de lait ont été collectés, le bouchon a été fermé le plus rapidement possible. Lorsque les quatre trayons furent échantillonnés, le tube pour le comptage des cellules somatiques a été rempli, si nécessaire (si le producteur ne fait pas parti d'un programme de gestion de troupeau), avec approximativement la même quantité de lait des quatre trayons (applicable seulement pour la ferme E). Pour terminer, un bain de trayon a été donné pour éviter d'infecter la glande mammaire de la vache. Les tubes ont été mis sur la glace le plus rapidement possible. Tous les échantillons ont été mis au réfrigérateur à 4°C une fois de retour à la faculté jusqu'à leurs analyses microbiologiques.

3.4. Identification microbiologique des bactéries du lait

Les protocoles utilisés ont suivi les lignes directrices du «National Mastitis Council» (NMC) pour l'identification de bactéries (Hogan et al., 1999), à la différence que les échantillons n'étaient pas incubés sur MacConkey et que les géloses au sang utilisée ne contenaient pas de l'esculine. Dix μL de lait ont été inoculés sur un quart de gélose sang TSA 5% (Tryptic soy agar) pour être ensuite incubé à 35°C pendant 18 heures. Le lendemain, les géloses incubées ont été examinées et analysées en fonction de

la croissance, du type de colonie, ainsi que de l'hémolyse. S'il n'y a pas eu de croissance, l'échantillon a été abandonné et aucune croissance n'a été déclarée. S'il y avait croissance de bactérie, tous les types de colonies qui se différençaient par la couleur, l'hémolyse ou la taille étaient transférées sur de gélose sang TSA 5% et incubées à 35°C pendant 18 heures. À partir des colonies pures obtenues, le premier test effectué fut celui de la coloration de Gram.

À partir de cette lecture de bactéries colorées au Gram, les tests suivants ont été effectués en fonction de la morphologie et de la coloration. Si les bactéries étaient des coques à Gram positif, un test de catalase était effectué. À partir du test de catalase de coques positifs, il y avait trois séries de tests possibles. Si les bactéries étaient catalase positive mais ne présentaient pas d'hémolyse, elles ont été identifiées comme étant des *Staphylococcus* spp. Pour les bactéries catalase positive qui avaient une hémolyse complète, un test de coagulase a été effectué pour différencier les *Staphylococcus aureus* des *Staphylococcus* spp. Les tests ont été lus après 4 et 18 heures après une incubation à 35°C. Si le test était positif, la bactérie a été considérée comme étant *S. aureus*. Dans le cas contraire, il s'agissait de *Staphylococcus* spp. Pour les bactéries qui furent identifiées catalase négative, une série de cinq tests a été effectués : raffinose, inuline, CAMP, esculine et hippurate. Dépendamment des résultats, 4 bactéries ont été identifiées : *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* ou *Enterococcus* spp. Au besoin, des tests de Lancefield ou de NaCl ont complétés l'identification (voir le tableau VI)

Tableau VI**Tests diagnostiques pour identifier les streptocoques de la mammité**

CAMP	Esculine	Hippurate	Inuline	Raffinose	Autre*	Pathogène
-	-	-	-	-	Groupe : C	<i>S. dysgalactiae</i>
-	+	-	-	-	Groupe : C, NaCl	<i>S. dysgalactiae</i> , <i>Enterococcus</i>
-	+	+	-	-	Coque en chaîne, NaCl	<i>S. uberis</i> , <i>Enterococcus</i>
-	+	+	+	-	Coque en chaîne	<i>S. uberis</i>
-	+	+	+	+	Coque en chaîne ou API	<i>S. uberis</i>
+	+	+	+	-	Coque en chaîne	<i>S. uberis</i>
+	-	+	-	-	Groupe : B	<i>S. agalactiae</i>
-	+	-	+	-	-	<i>Enterococcus</i>
-	+	-	+	+	NaCl	<i>Enterococcus</i>

*: Autres tests à effectuer pour confirmer l'identification

Si la coloration de Gram des bactéries donnait des bâtonnets négatifs, sept tests ont été effectués pour identifier le genre et l'espèce : oxydase, indole, MacConkey, mobilité, citrate, urée et Triple Sugar Iron. À la suite des résultats obtenus, les bactéries à Gram négatif ont été identifiées. Le tableau VII montre les bactéries à Gram négatif identifiées au cours du projet.

Tableau VII**Résultats des tests biochimiques pour identifier des bactéries à Gram négatif provenant du lait**

	TSI				Oxydase	Indole	Mobilité	Urée	Citrate	MacConkey
	Pente	Culot	Gaz	H ₂ S						
<i>E. coli</i>	Acide	Acide	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>Klebsiella</i> spp.	Acide	Acide	+	-	-	-	-	-	-	+

Deux autres catégories de micro-organismes ont pu être identifiées : les bâtonnets à Gram positif et les autres types de micro-organismes (algues, levures). Les bâtonnets à Gram positif étaient des *Corynebacterium* spp. ou des *Bacillus* spp. Les *Bacillus* spp. sont apparus comme de longs bâtonnets, avec parfois présence de spores.

L'aspect des colonies était, en général, plutôt invasif, se propageant sur la gélose et envahissant les autres colonies. Les corynébactéries, quant à eux, avait l'aspect de corynéformes sous la coloration de Gram, ce qui veut dire de petits bâtons recourbés sur eux-mêmes ou formant des lettres chinoises. Les colonies étaient petites et blanches.

3.5. Antibiorésistance des bactéries pathogènes du lait

Le test de Kirby-Bauer, un test de diffusion en gélose (Ackerman and Dello Buono, 1996), a été utilisé pour évaluer l'antibiorésistance des *S. aureus* et des CNS provenant des infections intramammaires après le vêlage. Après avoir obtenu une concentration de 0,5 McFerland de bactérie dans de la saline stérile, la bactérie a été ensemencée sur une gélose Mueller-Hinton. Par la suite, les disques d'antibiotiques ont été placés sur la gélose qui a été incubée pendant 18 heures à 37 °C. Le lendemain, les zones d'inhibition ont été mesurées. Dix antibiotiques pertinents dans le domaine bovin ont été testés par le test de Kirby-Bauer : la pirlimycine, la tétracycline, la combinaison pénicilline / novobiocine, la céphalothine, le ceftiofur, le sulfisoxazole, l'ampicilline, la pénicilline, l'érythromycine et l'oxacilline. Le nombre d'infections intramammaires ont persisté avant le tarissement jusqu'à après le vêlage ont été trop faible pour analyser les changements d'antibiorésistances pendant la période de tarissement. Puisque les *S. aureus* et les CNS ont été les plus présents après le vêlage, ces deux de bactéries ont été choisi pour ce test. En prenant en considération qu'il y a 10 antibiotiques testés, cela fait un total de 20 combinaisons possibles. Dans le test de Kirby-Bauer, un test de sensibilité par diffusion en gélose, les diamètres d'inhibition de croissance bactérienne permettent de définir la sensibilité de l'isolats. Plus le diamètre d'inhibition autour du disque est petit, plus la bactérie peut pousser à de fortes doses du même antibiotique, dont plus elle est résistante.

3.6. Analyses statistiques

3.6.1. Analyses statistiques sur l'antibiorésistance des bactéries pathogènes du lait

Le test de permutation a été utilisé pour tester l'hypothèse que l'antibiorésistance des bactéries *S. aureus* isolées après le vêlage sont égaux entre les vaches qui ont été traitées au tarissement et les vaches qui n'ont pas eu de traitement. L'analyse statistique a été effectuée pour les CNS aussi. Ce test tente d'évaluer l'égalité des distributions de zones d'inhibition entre les deux groupes de traitement, traités ou non traités. Le logiciel Stat-X act3 pour windows (Cytel, Cambridge, Massachusetts, USA) a servi pour effectuer le test de permutation.

4. Résultats

4.1 Confirmation de la diffusion des molécules d'antibiotiques

4.1.1. Transfert d'antibiotique intramammaire dans la circulation sanguine

La ferme E a utilisé la novobiocine comme traitement au tarissement. Les 10 vaches échantillonnées présentent le schéma de pharmacocinétique attendu (Tableau VIII). Toutes les vaches échantillonnées ne présentèrent aucune concentration de novobiocine pour le temps contrôle, suivi d'une forte augmentation de concentration à temps 8 heures et une diminution de concentration à 0 pour le temps 96 heures.

Tableau VIII

Concentration de novobiocine dans le plasma des 10 vaches de la ferme E avant le traitement au tarissement à la novobiocine ainsi que 8 et 96 heures après le traitement

Vache	Concentration de novobiocine dans le plasma (ng/mL)			Date de traitement
	Contrôle	8 heures	96 heures	
2142	0	179	0	2006-05-29
8810	0	249	0	2006-07-04
7936	0	295	0	2006-07-04
74	0	268	0	2006-07-13
3611	0	205	0	2006-07-13
3826	0	259	0	2006-07-28
7489	0	216	0	2006-07-28
8636	0	189	0	2006-07-28
7734	0	241	0	2006-08-08
7804	0	317	0	2006-08-08

Dans cette même ferme, 6 autres vaches ont été sélectionnées par le producteur pour recevoir des doses de céphapirine au tarissement au lieu de la novobiocine. Trois vaches traitées à la céphapirine de la ferme A ont été échantillonnées au cours de la

même période. Le tableau IX montre les concentrations de céphapirine aux temps contrôle ainsi que 8 et 96 heures après le traitement.

Tableau IX

Concentration de céphapirine dans le plasma des 6 vaches de la ferme E et 3 de la ferme A avant le traitement au tarissement à la céphapirine ainsi que 8 et 96 heures après le traitement

Ferme	Vache	Concentration de céphapirine dans le plasma (ng/mL)			Date de traitement
		Contrôle	8 heures	96 heures	
E	40	0	43	20	2006-05-29
E	111	0	36	16	2006-05-29
E	42	18	34	16	2006-07-04
E	166	24	95	17	2006-07-04
E	81	23	53	15	2006-07-13
E	121	23	68	18	2006-07-13
A	83	9	34	17	2006-06-19
A	42	22	123	20	2006-07-06
A	47	27	98	23	2006-07-06

Des prélèvements sanguins de vaches de la ferme E traitées et tarées avec de la novobiocine ont été analysés également pour corroborer la détection de céphapirine sanguin des vaches qui n'ont pas été traitées par de la céphapirine (Tableau X)

Tableau X

Concentration de céphapirine des échantillonnages avant le tarissement dans le plasma de bovins de la ferme E traités à la novobiocine

Vache	Concentration de céphapirine (ng/mL)	Date	
		d'échantillonnage (aaaa-mm-jj)	Traitement au tarissement (aaaa-mm-jj)
2142	5,1	2006-05-29	2006-05-29
7936	11,9	2006-05-29	2006-05-29
2142	28,3	2006-05-29	2006-05-29
2142	12,6	2006-06-02	2006-05-29
8810	16,5	2006-06-12	2006-07-04

4.1.2. Confirmation de la céphapirine dans le plasma avant le traitement au tarissement

Les tests effectués par la suite servirent à déterminer s'il est normal de retrouver de la céphapirine dans la circulation sanguine dans trois types de fermes du projet : celle qui se sert de l'antibiotique de façon courante, celle qui ne s'en sert pas du tout et celle qui a cessé son utilisation. Pour les fermes B, C et D, fermes qui ne servent pas de céphapirine, aucune concentration de céphapirine n'a été détectée dans le plasma des vaches. Par contre, les six vaches échantillonnées à la ferme A avaient de la céphapirine dans le sang avant le tarissement et après le vêlage, bien que la moitié n'ait pas reçue de traitement au tarissement. Les concentrations en ng/mL avant le tarissement et après le vêlage ont varié entre 9,5 et 40,4 ainsi que 23,9 et 32,7 respectivement (Tableau XI). Les médianes de chaque groupe étaient de 26,6 et de 29,6.

Tableau XI

Concentration de céphapirine dans le plasma des bovins échantillonnés dans quatre fermes de l'étude

Ferme ¹	Numéro Vache	Concentration de céphapirine dans le sérum (ng/mL)		Traitement au tarissement
		Avant tarissement	Après vêlage	
A	12	37	31	Non
A	33	40	26	Non
A	42	22	28	Céphapirine
A	47	27	33	Céphapirine
A	83	10	24	Céphapirine
A	86	26	31	Non
B	6	0	0	Novobiocine / Pénicilline
B	32	0	0	Tilmicosin
B	45	0	0	Tilmicosin
C	14	0	0	Novobiocine / Pénicilline
C	36	0	0	Novobiocine / Pénicilline
C	81	0	0	Novobiocine / Pénicilline
C	82	0	0	Novobiocine / Pénicilline
C	88	0	0	Non
D	14	0	0	Non
D	26	0	0	Novobiocine / Pénicilline
D	36	0	0	Tilmicosin
D	39	0	0	Tilmicosin
D	77	0	0	Novobiocine / Pénicilline

1: Seulement la ferme A utilisait la céphapirine pour traiter les animaux

4.1.3 Confirmation du traitement au tarissement comme source de céphapirine

Des échantillons ont été prélevés à la ferme E sur 8 vaches traitées à la novobiocine durant la période d'utilisation de la céphapirine à la ferme. De ces 8 vaches, 3 ont toujours présenté des traces de céphapirine dans leur plasma à la suite du vêlage

(voir Tableau XII). La médiane des concentrations était de 50,1 ng/mL et elles variaient entre 6,3 et 53,3 ng/mL.

Tableau XII
Concentration de céphapirine dans les échantillons après
vêlage de la ferme E dans les plasma des bovins traités à la
novobiocine

Vache	Concentration céphapirine (ng/mL)	Traitement au tarissement (a-m-j)	Nombre de jours après le traitement
8810	50	2006-07-04	76
74	6	2006-07-13	67
3611	0	2006-07-13	67
3826	0	2006-07-28	52
7489	0	2006-07-28	52
8636	0	2006-07-28	67
7777	0	2006-07-28	108
7734	53	2006-08-08	97

D'autre part, 9 vaches tarées à l'automne ont été échantillonnées avant le tarissement et après le vêlage pour donner un total de 18 échantillons. Un seul échantillon a présenté une concentration détectable de céphapirine dans le plasma. Il s'agissait d'une vache qui a été tarée le 18 septembre et elle avait une concentration de 10,6 ng/mL. Les 17 autres échantillons de plasma n'ont présenté aucune trace de céphapirine.

4.1.4. Détermination de l'eau comme vecteur

Les quatorze échantillons d'eau pris sur les deux fermes (A, n = 5 et E, n = 9) n'ont présenté aucune trace de céphapirine.

4.2. Antibiorésistance des bactéries pathogènes du lait

Durant la durée du projet, 59 vaches traitées ont pu avoir un échantillonnage de lait complet tandis qu'il y a eu 82 vaches non traitées. Le nombre de quartier total est de 236 et 328 respectivement. Le Tableau XIII montre la proportion ainsi que la fréquence, au niveau du quartier, de chacune des bactéries pathogènes du lait au cours de l'étude,

tandis que le Tableau XIV montre la proportion et la fréquence au niveau de la vache. Les résultats inclus ici sont ceux qui ont été complétés, soit deux prélèvements de lait avant le tarissement et deux autres à la suite du vêlage. Les deux bactéries les plus prévalentes étaient *Staphylococcus aureus* ainsi que les staphylocoques à coagulase négative (CNS). Ce sont ces bactéries qui ont été utilisées pour tenter d'associer le traitement au tarissement et l'antibiorésistance des bactéries pathogènes de la mammite.

Tableau XIII

Fréquence et proportion des agents pathogènes de la mammite des quartiers dont l'échantillonnage est complet et a été effectué avant le tarissement et après le vêlage au cours d'octobre 2005 à janvier 2007

Espèces	Avant				Après				Persistence ¹			
	Traité		Non-traité		Traité		Non-traité		Traité		Non-traité	
	N ²	Pr ³	N	Pr	N	Pr	N	Pr	N	Pr	N	Pr
<i>S. aureus</i>	32	15	11	4	18	8	14	4	7	3	5	2
CNS	23	11	30	10	12	5	12	4	1	1	5	2
<i>E. coli</i>	0	0	1	0	0	0	4	1	0	0	0	0
<i>S. uberis</i>	3	1	1	0	1	0	4	1	0	0	0	0
<i>Enterococcus spp.</i>	2	1	11	4	7	3	8	3	0	0	2	1
<i>C. bovis</i>	1	1	5	2	1	0	3	1	0	0	0	0
<i>S. dysgalactiae</i>	5	2	3	1	4	2	8	3	0	0	0	0
<i>Streptococcus spp.</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. agalactiae</i>	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Levures	0	0	1	0	1	0	4	1	0	0	0	0
<i>Prototheca spp.</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Total infectés	69	31	66	22	45	20	57	18	8	4	12	4
Non infectés	151	69	239	78	178	80	260	82	199	96	284	96
Échantillons contaminée	16	7	23	7	13	6	11	3	29	12	34	10
Grand total	236		328		236		328		236		328	

¹ : Présence de la même bactérie, dans le même quartier, avant et après le tarissement

² : Nombre

³ : Proportion en pourcentage

Tableau XIV

Fréquence et proportion des agents pathogènes de la mammite des vaches dont l'échantillonnage est complet et a été effectué avant le tarissement et après le vêlage au cours d'octobre 2005 à janvier 2007

Espèces	Avant				Après				Persistance ¹			
	Traité		Non-traité		Traité		Non-traité		Traité		Non-traité	
	N ²	Pr ³	N	Pr	N	Pr	N	Pr	N	Pr	N	Pr
<i>S. aureus</i>	18	31	10	12	13	22	11	13	7	12	3	4
CNS	20	34	25	30	11	19	11	13	1	2	5	6
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
<i>S. uberis</i>	2	3	2	2	0	0	4	5	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i> spp.	2	3	7	8	7	12	8	10	0	0	1	1
<i>C. bovis</i>	1	2	4	5	1	2	3	4	0	0	0	0
<i>S. dysgalactiae</i>	4	7	1	1	2	3	7	8	0	0	1	1
<i>Streptococcus</i> spp.	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. agalactiae</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total infectées	34	58	39	46	27	46	36	43	8	14	10	12
Non infectées	25	42	45	54	32	54	48	57	51	86	74	88
Grand total	59		84		59		84		59		84	

¹ : Présence de la même bactérie, dans le même quartier, avant et après le tarissement

² : Nombre

³ : Proportion en pourcentage

Au total, 134 *Staphylococcus aureus* et 118 CNS ont été obtenus. L'antibiorésistance des bactéries obtenues après le vêlage ont été étudiées seulement. Donc, pour les *S. aureus*, un total de 15 vaches non traitées et 18 traitées ont été retenues. En ce qui a trait aux CNS, 17 vaches non-traitées et 16 traitées ont fait partie de l'étude. Des quartiers n'ayant pas deux échantillonnages ont été inclus dans le test statistique, c'est-à-dire avec un échantillonnage au lieu de deux. Les antibiotiques utilisés pour traiter les antibiotiques dépendaient de ceux qu'utilisaient la ferme.

En comparant les médianes des diamètres d'inhibition des bactéries qui proviennent des groupes traités au tarissement et non-traités, seulement 4 combinaisons présentèrent des différences significatives entre les groupes, c'est-à-dire de 2 millimètres ou plus : *Staphylococcus aureus* avec la pénicilline / novobiocine, les CNS avec la

tétracycline, le sulfisoxazole et l'ampicilline (Tableau XV). Les 16 autres combinaisons ont eu une différence de diamètre nonsignificative, de moins de 2 mm. La différence de 2 mm des médianes a été déterminée par une étude de la répétabilité des zones d'inhibitions du test Kirby-Bauer (données non incluses)

Tableau XV

Médianes des diamètres de zones d'inhibition, en millimètres, des groupes qui ont été affectés significativement par le traitement au tarissement

	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylocoques à coagulase négative		
	Pénicilline – Novobiocine ¹	Tétracycline	Sulfisoxazole	Ampicilline
Non traité	42 (n = 15)	32 (n = 17)	32 (n = 17)	34 (n = 17)
Traité	40 (n = 18)	16 (n = 16)	30 (n = 16)	32 (n = 16)

¹Combinaison «espèce bactérienne / antibiotique» démontrant une différence statistiquement significative

Une série de quatre graphiques démontre le pourcentage cumulatif des 4 combinaisons en relation avec les diamètres de la zone d'inhibition de chaque bactérie de chaque groupe (traitée ou non). La différence de la sensibilité des bactéries de chaque groupe y est montrée.

Figure 3

Fréquence relative accumulée des différents degrés de susceptibilité à la pénicilline / novobiocine des isolats de *Staphylococcus aureus* après le vêlage

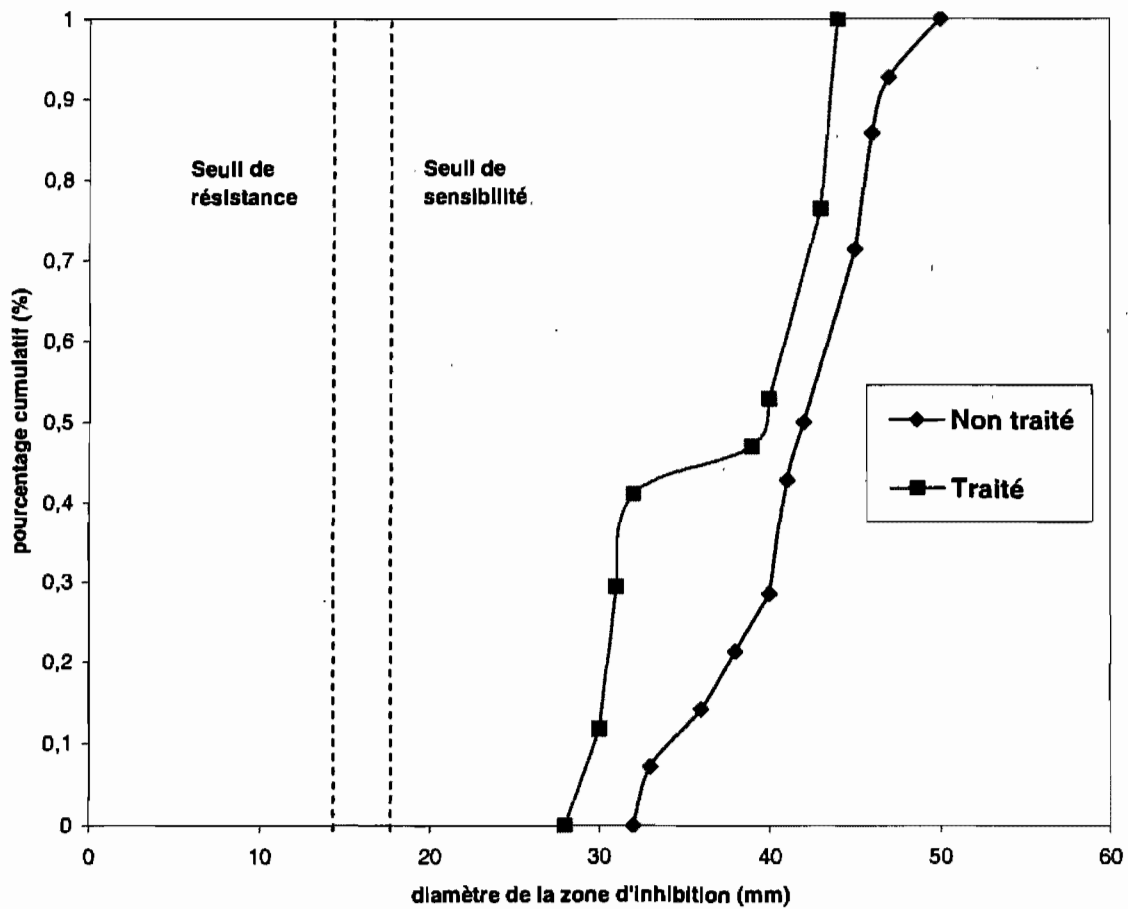


Figure 4

Fréquence relative accumulée des différents degrés de susceptibilité à la tétracycline des isolats des staphylocoques à coagulase négative après le vêlage

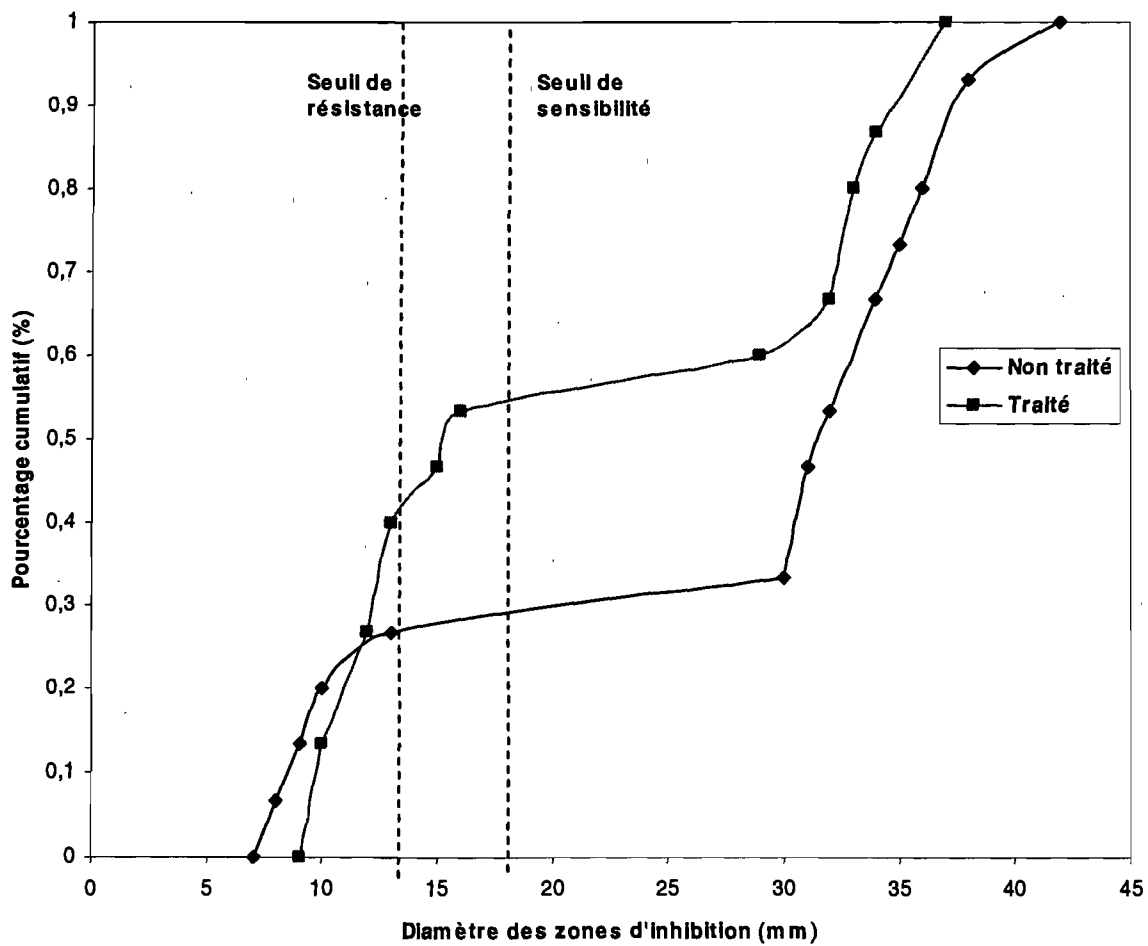


Figure 5

Fréquence relative accumulée des différents degrés de susceptibilité au sulfisoxazole des isolats des staphylocoques à coagulase négative après le vêlage

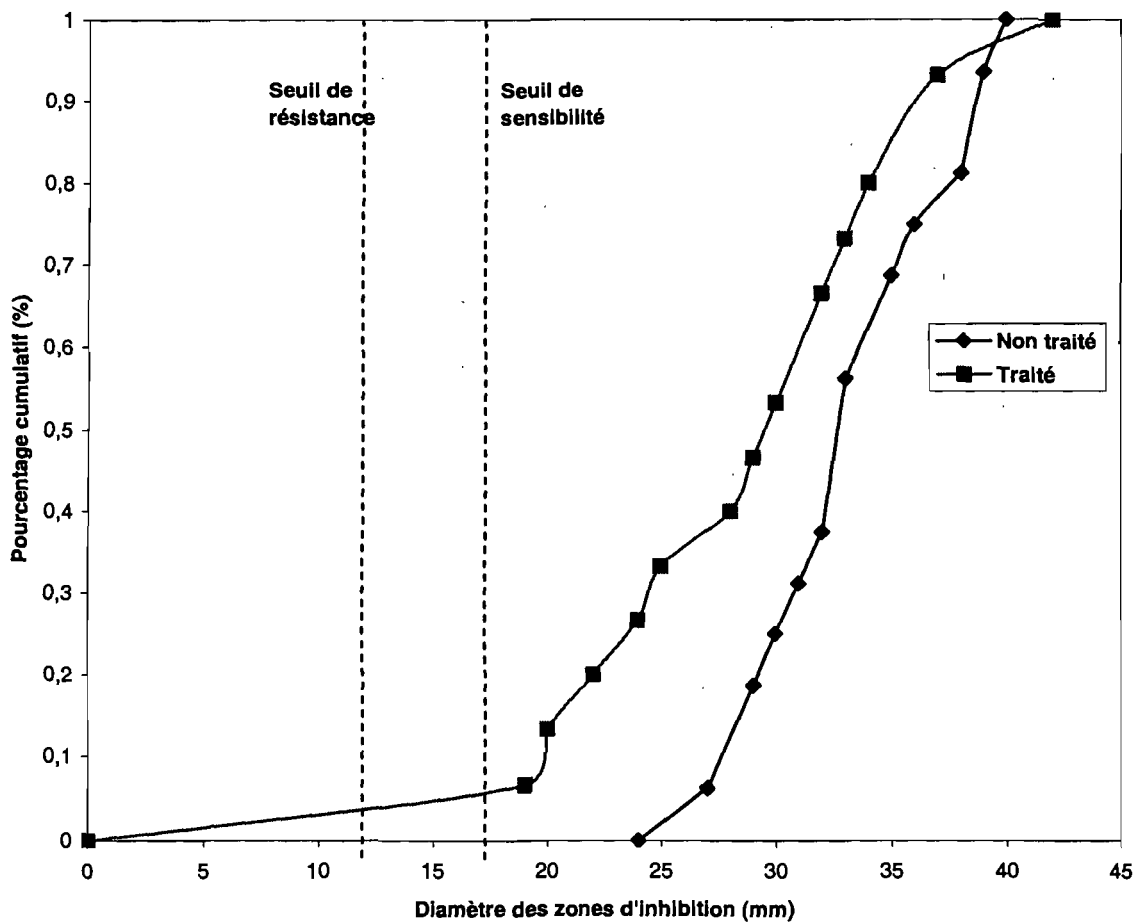
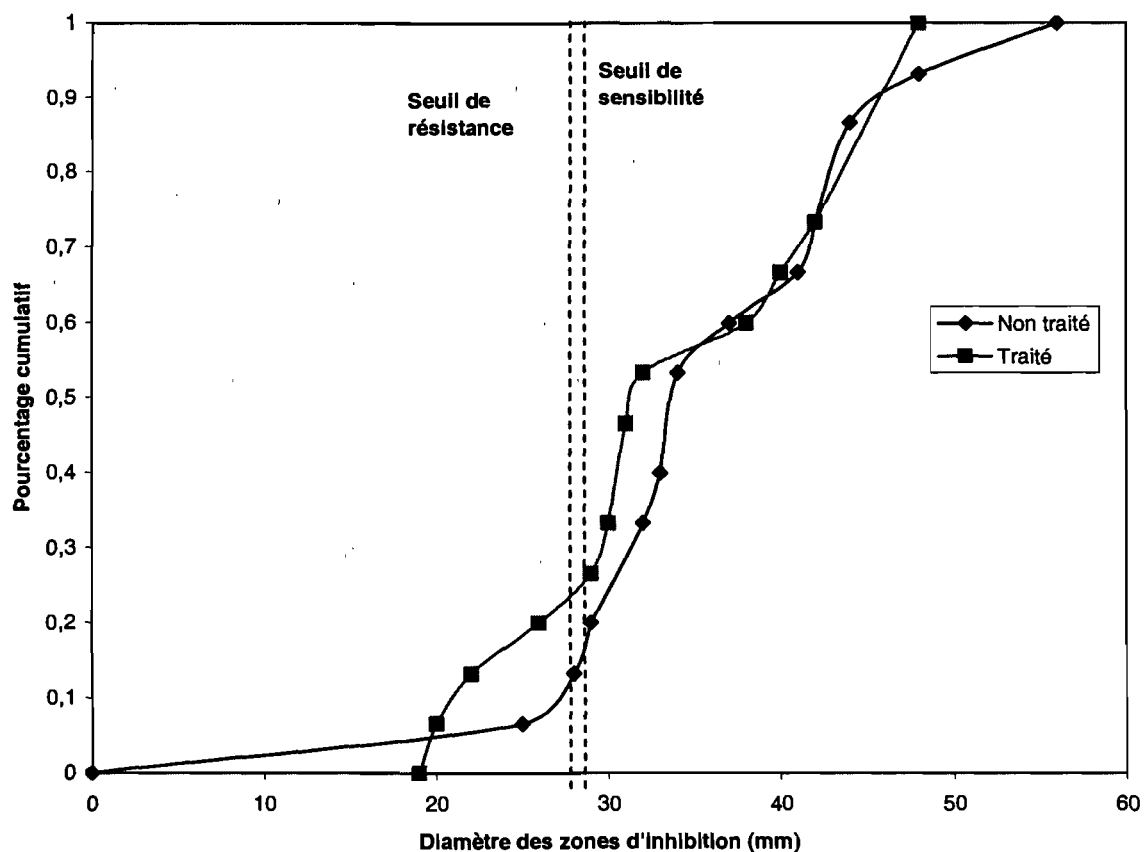


Figure 6

Fréquence relative accumulée des différents degrés de susceptibilité à l'ampicilline des isolats des staphylocoques à coagulase négative après le vêlage



Les bactéries qui provenaient des quartiers traités étaient davantage résistantes que les bactéries dont le quartier n'a pas été traité. Puisque le seuil fixé est de 0,05 la différence pour les *S. aureus* testées pour la pénicilline-novobiocine n'a pas été significative ($P = 0,08$). Pour leur part, les CNS rien n'était significatif avec des P de 0,35, 0,38 et 0,6 pour la tétracycline, l'ampicilline et le sulfisoxazole respectivement.

Après cette comparaison de quartiers traités ou non, le facteur ferme a également été pris en compte. Puisque les quartiers des vaches ont été regroupés par ferme, il se pouvait que ce facteur ait joué un rôle dans la résistance des bactéries avec des méthodes de gestions propres à chaque ferme. D'ailleurs, après avoir pris en compte le facteur

ferme dans l'analyse statistique, aucune des 4 combinaisons analysées ne présentaient de différences statistiques significatives. Le Tableau XVI montre les différences des médianes des zones d'inhibitions par ferme.

Tableau XVI

Médianes des zones d'inhibition par combinaison d'espèces bactériennes et d'antibiotiques qui ont exprimé une différence de 2 millimètres et plus entre les groupes traités et non traités par ferme, en millimètre (n = bactérie(s))

Combinaisons	Groupe	Fermes					
		A	B	C	D	E	I
<i>S. aureus</i> / Pénicilline- novobiocine	Non traité	41 (n = 2)	44 (n = 2)	33 (n = 1)	45 (n = 4)	41 (n = 6)	
	Traité	31 (n = 7)		32 (n = 5)	43 (n = 2)	37 (n = 2)	40 (n = 2)
CNS / Tétracycline	Non traité	32 (n = 2)		7 (n = 1)	36 (n = 1)	31 (n = 13)	
	Traité	9 (n = 1)		16 (n = 8)		29 (n = 5)	23 (n = 2)
CNS / Sulfisoxazole	Non traité	32 (n = 2)		40 (n = 1)	39 (n = 1)	32 (n = 13)	
	Traité	0 (n = 1)		30 (n = 8)		32 (n = 5)	24 (n = 2)
CNS / Ampicilline	Non traité	33 (n = 2)		26 (n = 1)	32 (n = 1)	39 (n = 13)	
	Traité	30 (n = 1)		35 (n = 8)		31 (n = 5)	40 (n = 2)

5. Number of fecal *Escherichia coli* colonies required to represent the change in minimal inhibitory concentration to a panel of antibiotics over the dry-period of dairy cows.

Etienne Poirier¹, Marielle Saint-Laurent¹, Emile Bouchard^{1,2}, Serge Messier^{1,3}, Danielle Daignault³, David Léger³, Herman Barkema² and Daniel Scholl^{1,2,*}

¹Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal
Saint-Hyacinthe, Qc J2S 2M2

²Canadian Bovine Mastitis Research Network (CBMRN)

³Public Health Agency of Canada

*Corresponding author. Tel : [information retirée / information withdrawn]

Fax : [information retirée / information withdrawn]

Email : [information retirée / information withdrawn]

Keywords: Dry cow treatment/ mastitis/ *Escherichia coli*/ CFU/ Resistance

5.1. Abstract

To evaluate a change in the antimicrobial resistance (AMR) of the intestinal bacterial population over time, we need to know the number of isolates bacteria required to provide a reliable estimate. To determine the change in level of AMR over the dry period of commercial dairy cows, fecal samples obtained before dry-off and after calving from 11 cows in one herd were cultured on selective media and five colonies were haphazardly selected. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of all five *E. coli* isolates per sample per cow to a panel of 15 antibiotics were estimated to measure the MIC change per cow over the dry-period (Δ MIC). To evaluate if fewer than five pre-dry and five post-calving isolates of *E. coli* could be used to obtain equivalent Δ MIC estimates, the Δ MIC were calculated with four, three, two and one haphazardly selected isolates or isolate per fecal sample per cow. Five replicates, each with an independent haphazard selection of isolates, of Δ MIC were estimated per cow for each of the reduced isolate numbers. The percent of replicates aggregated across cows that differed from Δ MIC calculated with five isolates and the percent that differed by more than one MIC dilution were calculated. The marginal homogeneity test with exact errors was performed to test the hypothesis that the Δ MIC based on four, three, two or one isolates or isolate, respectively, are equivalent to the Δ MIC based on five colonies. For all antibiotics in the panel, the percentages of replicates that yielded an erroneous Δ MIC and the percentages of replicates that yielded a Δ MIC in error by one MIC dilution or more declined as the number of isolates used to calculate Δ MIC was increased. When four isolates were used, two percent of the replicates had Δ MIC for chloramphenicol that were

erroneous by one or more MIC dilutions and no replicates had Δ MIC that were erroneous by one or more Δ MIC dilutions for the 14 other antibiotics on the panel. The marginal homogeneity test P-values were very variable and not internally consistent and thus did not demonstrate a pattern of decreasing comparability of Δ MIC calculated with progressively fewer isolates to Δ MIC calculated with five isolates. Based on the percentage of replicates that yielded Δ MIC estimates were in error by one or more MIC dilutions, we judged that using four isolates provides Δ MIC results adequately comparable to results obtained with five isolates, but at 80% of the cost.

5.2. Introduction

One method to control mastitis is to treat a cow with antibiotics at the beginning of the dry period. This practice is done to cure intramammary infections present before dry-off and to prevent new infections during this period (Bramley, 1999). Many studies have confirmed that dry-cow therapy does not increase the risk of antimicrobial resistance (AMR) of mastitis pathogens because sustained high drug concentrations lead to effective microbial killing (Rajala-Schultz et al., 2004, Roesch et al., 2006). However, other studies suggest that dry-off treatment increases the AMR of bacteria in milk (Berry and Hillerton, 2002, Osteras et al., 1999, Tenhagen et al., 2006).

During dry-cow treatment, it is possible to expose intestinal microflora to antimicrobial agents. Antimicrobial agents may diffuse from the mammary gland into systemic circulation during mammary involution (Anderson et al., 1985). It has been

hypothesized that this practice increases the proportion of bacteria that are resistant to certain antimicrobials, not only in the udder, but also in the intestinal tract (Berry and Hillerton, 2002, Osteras et al., 1999). Circulating antibiotic excreted into the bile and into the lumen of the gastrointestinal tract could favour a shift toward AMR in the intestinal bacterial population. If this occurs, there could be an impact on AMR of bacteria in the environment by bacteria excreted in dairy cow feces.

A limiting element for epidemiological studies of antimicrobial susceptibility of bovine intestinal bacteria populations is the unit cost of the antimicrobial susceptibility testing. To determine the AMR status of bovine intestinal *E. coli* populations, it is necessary to know how many isolates of the bacteria need to be tested per animal. If the number of *E. coli* isolates are insufficient, the random error of the mean or median antimicrobial susceptibility will be high. Therefore any longitudinal study of changes in the antimicrobial susceptibility would be subjected to non-differential misclassification and bias toward the null. There is substantial variation in the number of isolates used to estimate the prevalence of cattle with antimicrobial resistant fecal *E. coli*. From one isolate (Donaldson et al., 2006, Harada et al., 2005), to five isolates per animal (Berge et al., 2003) to more than five isolates per animal (Berge et al., 2005, Bettelheim et al., 2005) have all been employed in recent publications. In 2006, Villarroel *et al.* showed that variation among isolates was a much more important source of variation in antimicrobial resistance than either farm effect or cow effect. According to our knowledge, there has been no longitudinal study of the number of isolates necessary to quantify changes in AMR of bovine intestinal *E. coli*. The objectives of this study was to

determine if five or fewer than five fecal *E. coli* isolates were minimally sufficient to represent a change in AMR to a panel of antibiotics over the dry-period.

5.3. Material and Methods

This study was part of a larger longitudinal study to compare a change in the AMR of fecal *E. coli* over the dry period between dry-treated and non dry-treated commercial dairy cows. The minimal inhibitory concentrations (MIC) to a panel of 15 antibiotics of five fecal isolates per cow before dry-off was subtracted from the MIC of five isolates after calving to obtain the change in MIC (Δ MIC) for each antibiotic. Subsequently, Δ MIC calculated with fewer isolates (four, three, two or one) were estimated. The approximation of Δ MIC estimated with fewer than five isolates to Δ MIC estimated with a full five isolates were determined to determine if Δ MIC based on MIC of fewer than five isolates yielded equivalent information.

5.3.1. Herd, cows and sampling

One herd from among nine herds participating in the larger study was chosen for this investigation because cow sampling was sufficiently advanced to provide the necessary material. The first eleven cows with full MIC were selected independent of dry-cow therapy treatment group.

Fecal samples were collected four to two weeks before dry-off and two weeks after calving twice from January 10th 2006 to July 10th 2006. Samples were collected

directly from the rectum using a clean rectal examination glove, placed into a sterile bag and transported on ice to the laboratory.

5.3.2. Isolation of *E. coli*

Samples were cultured within four hours after sampling. A sterile swab of the feces was streaked on a MacConkey agar plate and incubated overnight at 37°C. Five colonies were haphazardly collected from this plate. The plate was retained until *E. coli* identity was confirmed. The selected colonies were transferred onto individual TSA 5% blood agar plates and incubated overnight at 37°C. To confirm *E. coli*, the colonies had to be oxydase-negative, spot indole-positive, motility-positive, citrate-negative and TSI slant, gas and base-positive and H₂S-negative (Berge et al., 2005). Any isolate that did not give the expected results for the five tests was rejected and additional isolates were randomly selected from the original MacConkey agar plate. The first five *E. coli* colonies identified were frozen at -80°C in a freezing media (*Brucella* media) containing 15% glycerol for later MIC determinations.

5.3.3. MIC determination

To measure the MIC, the Sensititre microtitre dilution system with National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) custom plates for gram-negative bacteria (CMV1AGNF, Trek diagnostic system, Ohio, USA) were used (Rajala-Schultz et al., 2004, Webster et al., 2007). The plate contains a panel of 15 antibiotics (Table I). The determination of MIC was performed at the laboratory of the Public Health Agency

of Canada (PHAC, St-Hyacinthe, Canada). Isolates were incubated on yeast extract agar overnight at 37°C. Colonies were transferred in 5 ml of demineralised water until a concentration equal to a 0.5 McFarland standard was obtained. Then, 10 µL were added to 10 ml of Mueller-Hinton broth (Trek diagnostic system, Ohio, USA) for a final concentration of 10^5 CFU/ml. Fifty µL of broth were added to each well of the CMVIAGNF plate. The plate was sealed and incubated at 37°C. *E. coli* ATCC25922 and *E. coli* ATCC35218 were used as positive controls.

5.3.4. Data manipulation and statistical analysis

The cow was the unit of analysis. To avoid the effect of right skewed mean MIC values, means were calculated with dilution number rather than actual MIC values. For each of the 15 antibiotics, the mean MIC dilution number of all five pre dry-off fecal *E. coli* isolates were calculated and subtracted from the mean of all five post-calving isolates (Δ MIC5). The differences between the post-calving and pre dry-off mean MIC dilution numbers (Δ MIC4) were calculated with four randomly chosen isolates from each sampling interval. Random selections were made using random numbers generated by Excel software (Microsoft, Redmond, USA). Five replicates of randomly chosen isolates were performed per cow. Also, five replicated calculations of MIC dilution number difference were done with three isolates (Δ MIC3), two isolates (Δ MIC2) and one isolate (Δ MIC1).

The differences between Δ MIC5 and the other Δ MIC calculations were analyzed subjectively. For Δ MIC1 through Δ MIC4 (test Δ MIC), the error between each replicate and its corresponding Δ MIC5 was calculated. To visualise the relationship between the

occurrence of Δ MIC error and the number of isolates selected to estimate Δ MIC, the percentage of replicates that were non identical to the corresponding Δ MIC5 was plotted against the respective test Δ MIC by the respective antibiotics. All replicates were aggregated, ignoring the fact that five replicates were nested within each of the 11 cows. To visualise the association between the magnitude of Δ MIC error and the number of isolates selected to estimate Δ MIC, the proportion of replicates that were different from the corresponding Δ MIC5 by one dilution or more were tabulated by test Δ MIC versus antibiotic. Again, grouping by cow was ignored.

The marginal homogeneity test with exact error estimates was used to objectively evaluate if each test Δ MIC distributed equivalently to Δ MIC5. The marginal homogeneity tests were performed within replicates to circumvent the effects of grouping by cow. That is five marginal homogeneity tests were performed per antibiotic and per test Δ MIC (Δ MIC1, Δ MIC2, etc.). Three hundred marginal homogeneity tests were performed. The α used to judge statistical significance of different Δ MIC distributions was 0.04 which would yield an approximate $\alpha=0.2$ over all five replicates. The large target $\alpha=0.2$ recognizes the small size and exploratory character of this study. The marginal homogeneity tests were performed using Stat-Xact3 for Windows (Cytel, Cambridge, Massachusetts, USA) and exact two-sided tail probabilities.

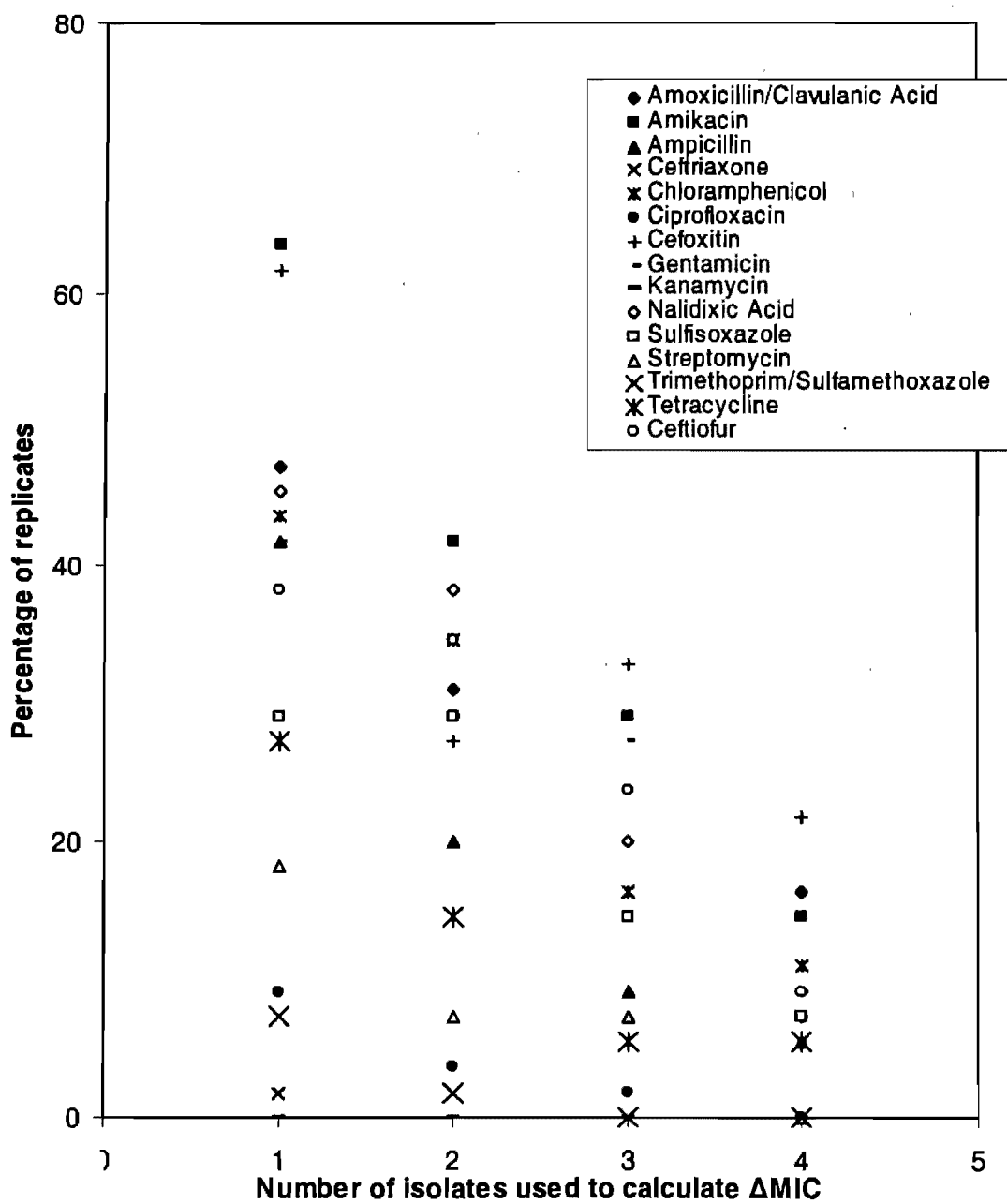
5.4. Results

The percentage of replicate Δ MIC that were in error relative to Δ MIC5 decreased markedly as the number of isolates used to calculate Δ MIC were increased (Figure 1). The range of percentage of isolates that were in error ranged from 0 to greater than 60%

for Δ MIC1, to a maximum of about 20% for Δ MIC4. With Δ MIC4, only four antibiotics had greater than 10% of replicates in error relative to Δ MIC4: amoxicillin/clavulanic acid (16%), amikacin (15%), chloramphenicol (11%) and cefoxitin (22%). For Δ MIC1, only four drugs had less than 10% of replicates in error: ceftriaxone (1.8%), kanamycin (0%), ciprofloxacin (9.1%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (7.3%). From 96% to 100% of all isolates were sensitive to the lowest dilution of each of these four antibiotics and the isolates from eight to 11 cows (of 11) showed no change in mean MIC over the dry-period.

Figure 1

Percentage of replicates that were non identical to the corresponding Δ MIC5 by Δ MIC1, Δ MIC2, Δ MIC3, or Δ MIC4 for each of 15 antibiotics



Considering the magnitude of error relative to ΔMIC_5 , only the ΔMIC_4 for chloramphenicol varied by one or more MIC (Table I). The ΔMIC_4 for all other antibiotic on the panel varied from ΔMIC_5 by less than one MIC dilution. With ΔMIC_3 , 5.5% of the replicates of the three following drugs had an error of one dilution or more relative to ΔMIC_5 : cefoxitin, chloramphenicol and ceftiofur.

Table I

Percentage of replicates in disagreement with ΔMIC_5 of one dilution or more for ΔMIC calculated with 1 to 4 isolates, respectively

Antibiotic	ΔMIC_1	ΔMIC_2	ΔMIC_3	ΔMIC_4
Amoxicillin/Clavulanic Acid	18	9	4	0
Amikacin	18	2	0	0
Ampicillin	18	4	4	0
Ceftriaxone	9	4	2	0
Chloramphenicol	13	4	6	2
Ciprofloxacin	0	0	0	0
Cefoxitin	27	4	6	0
Gentamicin	11	9	0	0
Kanamycin	0	0	0	0
Nalidixic Acid	13	0	0	0
Sulfisoxazole	11	6	2	0
Streptomycin	6	0	0	0
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	11	0	4	0
Tetracycline	16	11	2	0
Ceftiofur	16	6	6	0

The distributions of ΔMIC_4 were significantly different ($P < 0.04$) from ΔMIC_5 by the marginal homogeneity test in one of five replicates for two antibiotics: cefoxitin and nalidixic acid. The ΔMIC_3 and ΔMIC_2 were significantly different ($P < 0.04$) from ΔMIC_5 (one of five replicates only) for only one antibiotic each: sulfisoxazole and nalidixic acid, respectively. Finally, the outcome ΔMIC_1 was significantly different ($P < 0.04$, also in only one of five replicates) from ΔMIC_5 for four antibiotics: nalidixic acid, cefoxitin, ceftiofur and amoxicillin/clavulanic acid.

5.5. Discussion

The objective of this study was to determine the lowest number of bovine intestinal *E. coli* isolates necessary to approximate the change over the dry-period in antimicrobial resistance that would be observed with five isolates. The panel of 15 antibiotics were relevant to public health surveillance. The aim is to reduce the number of isolates for which it is necessary to perform MIC determinations while avoiding misclassification Δ MIC.

The percentage of replicates in error relative to Δ MIC5 showed a logical progression downward from Δ MIC1 to Δ MIC4 (figure 1). For the 15 antibiotics tested, Δ MIC4 is more accurate than Δ MIC determined with fewer isolates. However, complete agreement is an unreasonably high standard for a phenotypic outcome such as Δ MIC in a diverse population. Perhaps of greater importance is the magnitude of error in Δ MIC when four or fewer isolates are used to estimate it. The magnitude of error in Δ MIC is an indicator of the degree of misclassification of Δ MIC that might occur if four, three, two or one isolate is used for estimating Δ MIC. With Δ MIC4, the likelihood of an error of greater than one MIC dilution is minimal; whereas, the likelihood increases with fewer isolates employed to estimate Δ MIC. Thus despite Δ MIC4 often not being in complete agreement with Δ MIC5, the magnitude of error is small enough to expect that Δ MIC of fecal *E. coli* over the dry-period of dairy cows would be misclassified by less than one MIC dilution.

The marginal homogeneity test was not very informative for testing the equality of ΔMIC_5 and the replicates ΔMIC calculated with fewer randomly chosen isolates. Because ΔMIC is more variable the fewer the isolates used to calculate it, the number of antibiotics for which the ΔMIC differs significantly from ΔMIC_5 should logically follow a progressive increase as the number of isolates used to calculate the ΔMIC is decreased. Instead, the ΔMIC_4 seemed to be more frequently different from ΔMIC_5 than was ΔMIC_2 or ΔMIC_3 . It is likely that our data were too sparse to achieve the statistical power necessary to observe the expected progression. We tried to improve the limited power by analysing five replicates of each comparison to ΔMIC_5 , but this was apparently inadequate.

Although our results show that ΔMIC of fecal *E. coli* over the dry-period can be estimated with four isolates of *E. coli* and produce minimal error relative to ΔMIC estimated with five isolates, these results do not demonstrate that estimations made with four or five isolates reliably represent the ΔMIC of the intestinal *E. coli* population as a whole. It may be that ΔMIC_5 is an imprecise representation of ΔMIC_{10} for example. Nevertheless, the fact that the differences between ΔMIC_4 and ΔMIC_5 are small suggests that a plateau in information is achieved in the range of four to five isolates of *E. coli* and that increases in the number of isolates tested per sampling per cow would not likely yield concomitantly more precise or stable ΔMIC estimates. Finally, note that the ΔMIC were calculated using mean MIC rather than median MIC; mean MIC is likely to be more affected by the extremes values than the median.

In conclusion, four fecal *E. coli* isolates instead of five can be used to study the effects of risk factors for a change in antimicrobial susceptibility over the dry-period of dairy cows without a large concern of misclassification of error. This may reduce the cost of longitudinal observational studies of fecal *E. coli* antimicrobial resistance by 20%.

5.6. References

- Berge, A. C., E. R. Atwill, and W. M. Sischo. 2003. Assessing antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* in young calves using cluster analysis techniques. *Prev. Vet. Med.* 61(2):91-102.
- Berry, E. A. and J. E. Hillerton. 2002. The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 85(1):112-121.
- Bettelheim, K. A., A. Kuzevski, R. A. Gilbert, D. O. Krause, and C. S. McSweeney. 2005. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. *J. Appl. Microbiol.* 98(3):699-709
- Bramley, A. J., Cullor, J.S., Erskine, R.J., Fox, L.K., Harmon, R.J, Hogan, J.S, Nickerson, S.C., Oliver, S.P, Smith, K.L, Sordillo, L.M. 1999. Current concepts of mastitis. National mastitis council, Madison, USA.
- Donaldson, S. C., B. A. Straley, N. V. Hegde, A. A. Sawant, C. DebRoy, and B. M. Jayarao. 2006. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl. Env. Microbiol.* 72(6):3940-3948
- Harada, K., T. Asai, A. Kojima, C. Oda, K. Ishihara, and T. Takahashi. 2005. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs in Japan. *J. Vet. Med. Sci. / the Japanese Society Vet. Sci.* 67(10):999-1003.
- Larson, B. 1985. Biosynthesis and cellular secretion of milk. In: Larson, B. (ed.), *Lactation*. The Iowa State University Press, Ames. pp. 156 - 161.
- Osteras, O., V. L. Edge, and S. W. Martin. 1999. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. *J. Dairy Sci.* 82(6):1221-1231.
- Rajala-Schultz, P. J., K. L. Smith, J. S. Hogan, and B. C. Love. 2004. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet. Microbiol.* 102(1-2):33-42.
- Roesch, M., V. Perreten, M. G. Doherr, W. Schaeren, M. Schallibaum, and J. W. Blum. 2006. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms. *J. Dairy Sci.* 89(3):989-997.

- Tenhagen, B. A., G. Koster, J. Wallmann, and W. Heuwieser. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 89(7):2542-2551.
- Villarroel, A., P. S. Morley, T. E. Wittum, and D. S. Bolte. 2006. Use of a simulation model to evaluate sampling strategies for characterization of antimicrobial resistance in non-type-specific *Escherichia coli* isolated from dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 67(6):951-956.
- Webster, D., R. P. Rennie, C. L. Brosnikoff, L. Chui, and C. Brown. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Canada. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57(2):177-181.

**6. The effect of dry cow treatment on antimicrobial resistance of fecal
Escherichia coli and *Enterococcus* spp.**

Etienne Poirier¹, Marie Archambault^{1,2}, Émile Bouchard^{1,3}, Serge
Messier^{1,2,3}, Jérôme R.E. del Castillo^{1,2,4}, Marielle Saint-Laurent¹, Valérie
Côté¹, Päivi Rajala-Schultz⁵, David Léger⁶ and Daniel Scholl^{1,3,*}

¹Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal

Saint-Hyacinthe, Qc J2S 2M2

²Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP)

³Canadian Bovine Mastitis Research Network (CBMRN)

⁴Groupe de recherche en pharmacologie animale du Québec (GREPAQ)

⁵Ohio State University, Columbus, Ohio

⁶Public Health Agency of Canada

*Corresponding author. Tel : [information retirée / information
withdrawn]

Fax : [information retirée /
information withdrawn]

Email : [information retirée / information withdrawn]

Keywords: Dry cow treatment/ mastitis/ *Escherichia coli*/ *Enterococcus* spp./
antimicrobial resistance

6.1 Abstract

In this study, dry cow treatment (DCT) was examined intramammary antibiotic infusion to determine whether it affect the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. of the intestinal tract. After comparison of treated and non-treated cows, the ceftiofur resistance of *E. coli* was significantly increased if cows received a DCT. The resistance found in the *Enterococcus* spp. isolates against lincomycin and quinupristin / dalfopristin decreased if cows were treated at dry-off. Therefore, intramammary DCT affects the resistance of commensal *E. coli* and *Enterococcus* spp.

6.2. Introduction

The monetary losses due to this disease are as high as 300 million dollars per year in Canada (Gill et al., 1990, Kossaibati and Esslemont, 1997). Antibiotic therapy at dry-off (DCT) is a method to cure infectious causing mastitis from the lactation. It can also prevent the development of new mastitis cases during the dry-period (Bradley, 2002). Presently, selection for antibiotic resistant bacteria due to DCT is not proven, but concerns have been revised for it (Bratlie, 1973, Osteras et al., 1999). Osteras (1999) showed that the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* was not only associated with the DCT, but also with treatment during lactation. Some studies showed that antibiotics given in the mammary gland can reach the systemic circulation (Mercer et al., 1970, Nouws and Ziv, 1982). However, there are no literature reports on wheter intramammary treatments, like DCT can exert enough selective pressure to cause the development of resistant in bacteria population in intestinal tract.

The hypothesis of the study is that DCT leads to increase of in antibiotic resistance in fecal *E. coli* and *Enterococcus* spp. as a consequence of drug diffusion from the mammary gland into systemic circulation and excretion into the intestinal lumen. The effect of DCT over one dry period was examined.

6.3. Material and methods

6.3.1. Herd and cow selection

This observational study was conducted between October 2005 and January 2007. Herds were eligible for selection if they practiced selective DCT, were willing to participate in the study and the location of the farm to allow visits every two weeks. One herd (Farm F) located in Ohio, USA was practicing a selective DCT as part of a protocol of a study of the effect of a DCT decision protocol on intramammary infection at calving. To be enrolled in the study, cows had to be dried-off and have an expected calving date during these 16 months. Nine farms were selected for the project, eight were in Québec and one in Ohio. One hundred sixty-two cows were enrolled and of those, 84 cows were treated while 78 were not treated. The farmers selected cows to be treated at dry-off according to their veterinarian's recommendation. The researcher was responsible to collect the feces samples and collect the data from the cows.

Four farms in Québec were sampled during the entire project (October 2005 to January 2007). The four other farms in Québec were sampled from May 2006 to January 2007. The farm in Ohio was sampled from January 2006 to July 2006.

6.3.1.1. Data records

Potentially important covariates obtained for each enrolled cow included. The following data were taken: parity, DCT, other treatments during the preceding lactation, somatic cell counts (SCC) at the last test before dry-off date, calving, DCT product used and estimated conception date. All the data were collected at the farm and recorded in the program DS@HR (St-Hyacinthe, Québec, Canada). Parity and SCC were obtained from dairy herd health improvement records. Dry cow and other treatments were recorded by producers on a report sheet. Four of the nine farms had monthly veterinary visits and all treatments were obtained from these records.

6.3.2. Sampling

Fecal samples were collected from dry cows within four weeks before predicted dry-off and within four weeks after subsequent calving. Feces were collected directly the rectum using rectal sleeves putted in a sterile bag and place on ice for transport to the laboratory. Also, if the producer did not participate in a SCC monitoring program (Farm E), a composite milk sample was taken two weeks before dry-off and submitted to the Valacta (St-Anne-De-Bellevue, Québec, Canada) dairy herd improvement laboratory for SCC determination.

6.3.3. Bacterial isolation

6.3.3.1. *Escherichia coli*

Fecal samples were plated on MacConkey agar and incubated overnight at 35°C. Four colonies typical of *E. coli* (lactose positive) were transferred to a Trypticase Soy Agar plate with 5% sheep blood (TSAB) blood agar plate with 5% TSA to obtain pure subcultures. Five identification tests were done on each of the four pure cultures to presumptively identify *E. coli* (motility, oxydase, indole, citrate and TSI). Presumptively identified *E. coli* were frozen in 750 µl of *Brucella* freezing media with 15% of glycerol and conserved at -80°C for later antimicrobial susceptibility testing.

6.3.3.2. *Enterococcus spp.*

Fecal swabs were inoculated in tubes containing 5 mL of enterococcosel broth (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) and 5 mL of 1% peptone water, then vortexed and incubated at 45°C overnight for enrichment (Hershberger et al., 2005). This broth was then plated on enterococcosel agar (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) and incubated at

45°C overnight. Five suspects colonies per sample were then subcultured on TSAB to obtain pure colonies. These isolates were placed in a *Brucella* freezing media with 15% glycerol and conserved in a freezer at -80°C until further testing.

DNA extraction was performed with the Chelex 100 (Bio-Rad, Mississauga, Canada) ebullition method where many loops of pure colonies of our isolates were mixed with Chelex 10% then boiled for twenty minutes (Walsh et al., 1991). After centrifugation, the supernatant containing DNA was expressed by PCR to confirm presumptive *Enterococcus* spp. isolates. Primer sets for the *tuf* identification gene, encoding for the Tu elongation factor, were used to confirm *Enterococcus* as previously described (Fouad et al., 2005, Ke et al., 1999) using primer pairs 5' TACTGACAAACCATTTCATGATG-3' and 5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3' (*tuf*). The amplicon size of *tuf* is 112 base pair. This gene is known to identify a total of 14 enterococci species (Ke et al., 1999). Briefly, 5 µL of supernatant was added to 5 µl of PCR buffer 10X, 0.032 mM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl₂, 3.04 mM of each primers, and 2.5 U of Taq DNA polymerase (GE Healthcare, Baie d'Urfe, Québec) for a final volume of 25 µl. All reaction mixtures were amplified using the following program: 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C and 1 min at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. PCR amplifications were performed in a Biometra T Personal Thermocycler 48 (Montreal Biotech Inc., Montréal, Québec). For visualization of PCR products, 5 µl aliquots of each amplification were subjected to electrophoresis with a tris-acetate EDTA (TAE) buffer (VWR, Mississauga, Ontario) in a 1,4 % agarose gel stained with ethidium bromide for 35 minutes at 130V. A 100 bp ladder (GE Healthcare, Baie d'Urfe, Québec) was used as the marker. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 was used as a positive control. From all the isolates chosen systematically, 101 were identified as *Enterococcus* spp.

6.3.5. Antimicrobial susceptibility testing

The MIC of the *E. coli* isolates, the Sensititre plate CMV1AGNF (Trek diagnostic system, Ohio, USA) which contains 15 antibiotics was used according to the recommended Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards). The MIC determinations were performed at one of the laboratories of the Public Health Agency of Canada (PHAC, St-Hyacinthe, Canada). Briefly, the isolates were seeded on yeast extract agar. Their bacterial growth was inoculated in 5 ml of demineralised water to obtain a turbidity of 0,5 McFarland. From that 5 ml, 10 µL were inoculated into 10 ml of Mueller-Hinton broth (Trek diagnostic system, Ohio, USA) for a final concentration of 10^5 CFU/ml. Fifty µL of this broth were distributed in each well of the CMV1AGNF plate. The plates were sealed and incubated at 37°C for 24 hours. Antibiotics tested and concentrations ranges are indicated in Table I. Strains *E. coli* ATCC25922 and *E. coli* ATCC35218 were used as quality controls. To obtain the MIC for the *Enterococcus* spp. isolates, the same protocol was used except that the plate was the CMV2AGPF, which contains 17 antibiotics. Antibiotics tested and concentration ranges are indicated in Table II. The positive control strains used were *Enterococcus faecalis* ATCC29213 and *Enterococcus faecalis* ATCC51299.

Table I
Antimicrobial agents, concentration ranges and dilution numbers of microbroth in the dilution plates used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of bovine fecal *E. coli*

Antimicrobial agents	Abbreviation	MIC concentration range ($\mu\text{g/mL}$)	Resistance breakpoints ($\mu\text{g/mL}$)	Number of dilutions
Amikacin	AMK	0.5 – 64	32	9
Ampicillin	AMP	1 – 32	16	7
Amoxicillin/Clavulanic Acid	AMC	1 – 32	16	7
Ceftriaxone	CRO	0.25 – 64	16	10
Chloramphenicol	CHL	2 – 32	16	6
Ciprofloxacin	CIP	0.015 – 4	2	10
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	SXT	0.12 – 4	4	7
Cefoxitin	FOX	0.5 – 32	16	8
Gentamicin	GEN	0.25 – 16	8	8
Kanamycin	KAN	8 – 64	32	5
Nalidixic Acid	NAL	0.5 – 32	32	8
Sulfisoxazole	SOX	16 – 256	512	6
Streptomycin	STR	32 – 64	64	3
Tetracycline	TET	4 – 32	8	5
Ceftiofur	TIO	0.12 – 8	4	8

Table II

Antimicrobial agents, concentration ranges and dilution numbers of microbroth in the dilution plates used to determine the MIC of bovin fecal *Enterococcus* spp.

Antimicrobial agents	Abbreviation	MIC concentration range ($\mu\text{g/mL}$)	Resistance breakpoints ($\mu\text{g/mL}$)	Number of dilution
Chloramphenicol	CHL	2 – 32	32	6
Ciprofloxacin	CIP	0.12 – 4	4	7
Daptomycine	DAP	0.5 – 16	8	7
Erythromycin	ERY	0.5 – 8	8	6
Flavomycine	FLA	1 – 16	16	6
Gentamicin	GEN	128 – 1024	512	5
Kanamycin	KAN	128 – 1024	>1024	5
Lincomycin	LIC	1 – 32	8	7
Linezolid	LIZ	0.5 – 8	8	6
Nitrofurantoin	NIT	2 – 64	>64	7
Penicilline	PEN	0.5 – 16	16	7
Streptomycin	STR	512 – 2048	1024	4
Quinupristin / dalfopristin	QD	1 – 32	4	7
Tétracycline	TET	4 – 32	16	5
Tigecycline	TIG	0.015 – 0.5	2	7
Tylosin tartrate	TYL	0.25 – 32	8	9
Vancomycin	VAN	0.5 – 32	32	8

6.3.6. Data analysis

All MIC were converted to their corresponding dilution number for analysis to avoid the biasing effects of logarithmic concentration. For each antimicrobial, the lowest concentration included in the panel was assigned value 1, the 2nd lowest concentration value 2, etc. Four *E. coli* isolates from each cow both at dry-off and at calving were tested for their antimicrobial susceptibilities. For each cow, a median dilution number for each drug was calculated for each time point. The outcome of interest was the change in the median of MIC for each drug and bacteria from dry-off to calving (Δ MIC). Each change in Δ MIC was dichotomized to indicate an increase (Δ MIC greater than 0) or no increase (Δ MIC equal to or less than 0) in antimicrobial resistance. Data were analysed at the cow level. The factor of interest was the dry-cow therapy (DCT) versus no DCT and the three covariates were other treatment (yes, no), parity (1 or ≥ 2) and SCC ($\leq 200\ 000$ cells/ml or $>200\ 000$ cells/ml) at dry-off. Generalized estimating equation (GEE) models with a logit link function and binomial error distribution were used to estimate the association between DCT and Δ MIC for each bacterial species and antibiotic. Exchangeable correlation structure was used to reflect a uniform managing effect on cows within a herd. Analyses were performed with SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, USA).

All potential explanatory variables were individually screened for association with variables. They were included in a full model if they were associated with the Δ MIC $P < 0.25$. Covariates were retained in the model if dropping the variable and re-estimating the model caused at least 10% change in the coefficient of DCT. Dry-cow treatment was forced into all models. The Wald P-values were used for these model building analysis.

After fitting confounder-adjusted models, effect modification of the DCT- Δ MIC association by region (Québec or Ohio) were tested. Because the managing practices in Québec and Ohio can be different, this variable can affect the relation between DCT and the outcome. The GEE estimated odds-ratio of DCT fitted with Ohio cows was compared to the 90% confidence interval of the GEE estimated odds-ratio of DCT Québec cows. If

for a given antibiotic the Ohio odds-ratio fell outside of the Québec odds-ratio confidence interval, region was considered an effect modifier for the relation between DCT and Δ MIC of that antibiotic. Certain models of DCT and Δ MIC were refit if the DCT effect were modified by region. There include all antibiotics for which the confounder-adjusted association of DCT with Δ MIC was significant with $P \leq 0,05$. Refitting consisted of fitting a model for each region in turn and verifying the previously identified confounding associations. Seperate models were fit because treating the model fitted algorithmy did not converge when effect modification was treated by introducing an interation term of region and DCT.

In parallel to the foregoing, effect modificant of the DCT- Δ MIC associations by the DCT product used were tested. Different DCT antibiotic products make have differents effects on intestinal bacteria due to differing extra-mammary diffusion and bile excretion differing bacterial mechanisms of resistance expression. Two primary antibiotics used by farms studied during the project period: Cefadry® and Novodry plus®. To evaluate this effect, the odds-ratio of the cows treated with novodry® were compared with the confidence interval of 90% of the odds-ratio of the cows treated with cefadry®. If the odds-ratio of the novodry® cows was outside of the confidence interval of cefadry® cows, the DCT antibiotic was considered to be an effect modifier for the relation DCT and the specific Δ MIC involved.

6.4. Results

Tables III and IV showed the cows in each group per farm with complete *E. coli* and *Enterococcus* spp. dataset, respectively.

Table III

Frequency of treated and non treated cows per farm for *E. coli*

Group	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Total
Non treated	6	4	0	1	40	25	7	1	0	84
Treated	3	2	14	9	8	37	0	0	5	78

Table IV**Frequency of treated and non treated cows per farm for *Enterococcus* spp.**

Group	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Total
Non treated	4	4	2	1	37	26	6	1	3	84
Treated	3	3	17	8	6	36	0	0	6	79

6.4.2. Statistical analysis

6.4.2.1. *E. coli*

Among the bivariate associations with Δ MIC (Table IX), three drugs were statistically significant in their association with the DCT: amikacin, gentamicin and tetracycline. There was inadequate variation in susceptibility to test Δ MIC association with ciprofloxacin and DCT. But it was the ceftiofur Δ MIC that was significant by associated with DCT after confounding bias adjustment (log odds 0.49, $P = 0.02$, Table V). For the fourteen other drugs, no significant association of Δ MIC with DCT were observed. One interesting observation is the effect modification by the region of the gentamicin, tetracycline and amikacin Δ MIC with DCT. Table VI shows the effect of the region on the DCT and in Table X, the effect of the antibiotic treatment at the dry-off period was analysed. Only two drugs were statistically affected by the choice of DCT (ampicillin and nalidixic acid).

Table V

P-value, 95% confidence interval and coefficient of the final GEE model with all the confounders of the DCT for drug not affected by the region for the *Escherichia coli*

Drug*	DCT ^{1*}		Confidence interval		SCC ^{2*}		Parity ³		Other tx. ⁴	
	Coef.	P	Min	Max	Coef.	P	Coef.	P	Coef.	P
	AMK	0.50	0.01	0.12	0.87	-	-	-	-	-0.51
GEN	0.19	0.17	-0.08	0.47	-	-	-	-	0.47	0.12
KAN	0.05	0.88	-0.62	0.72	-1.64	<0.01	-0.30	0.03	-	-
STR	-0.44	0.50	-0.65	0.14	-	-	-1.05	0.11	-	-
AMC	0.03	0.89	-0.32	0.37	-0.76	<0.01	-0.86	0.01	0.07	0.79
AMP	0.32	0.08	-0.04	0.68	-0.82	<0.01	-	-	-	-
CRO	-0.07	0.82	-0.73	0.58	-1.29	<0.01	-	-	0.87	<0.01
FOX	0.03	0.92	-0.50	0.56	-0.68	<0.01	-0.67	<0.01	-	-
TIO	0.49	0.02	0.07	0.90	-1.21	<0.01	-0.68	0.02	-	-
CHL	-0.19	0.54	-0.78	0.40	-0.43	0.20	-	-	-	-
CIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAL	-0.66	0.07	-1.37	0.06	-	-	-	-	-	-
SOX	0.01	0.99	-1.18	1.20	-	-	-	-	-0.59	0.04
SXT	-0.40	0.31	-1.18	0.37	-	-	-0.81	0.05	-	-
TCY	-0.37	0.22	-0.97	0.22	0.13	0.57	-0.50	0.09	-	-

¹: Reference group was cows which did not receive antibiotic treatments at dry-off

²: Reference group was cows with low SCC (> 200)

³: Reference group was cows with one parity

⁴: Reference group was cows which did not receive other treatments during the previous lactation

*: AMK: Amikacin, GEN: Gentamicin, KAN: Kanamycin, STR: Streptomycin, AMC: Amoxicillin / Clavulanic Acid, AMP: Ampicillin, CRO: Ceftriaxone, FOX: Cefoxitin, TIO: Ceftiofur, CHL: Chloramphenicol, CIP: Ciprofloxacin, NAL: Nalidixic Acid, SOX: Sulfisoxazole, SXT: Trimethoprim / Sulfamethoxazole, TCY: Tetracycline, DCT: Dry Cow Treatment, SCC: Somatic Cells Count

Table VI

P-value, 95% confidence interval and coefficient of the final GEE model with all the confounders of the DCT for drug affected by the region for the *Escherichia coli*

Drug*	DCT ^{1*}		Confidence interval		SCC ^{2*}		Parity ³		Other tx. ⁴	
	Coef.	P	Min	Max	Coef.	P	Coef.	P	Coef.	P
	AMK QC	-0.01	0.98	-0.42	0.41	-	-	-	-	-0.62
AMK OH	0.88	0.12	-0.24	2.01	-	-	-	-	-	-
GEN QC	-0.30	0.14	-0.69	0.10	-	-	-	-	-	-
GEN OH	0.66	0.26	-0.48	1.79	-	-	-	-	-	-
TCY QC	-0.92	0.12	-1.94	0.09	0.9	0.03	-0.43	0.27	-	-
TCY OH	-0.08	0.91	-1.49	1.32	-	-	-0.73	0.30	-	-

¹: Reference group was cows which did not receive antibiotic treatment at dry-off

²: Reference group was cows with low SCC (> 200)

³: Reference group was cows with one parity

⁴: Reference group was cows which did not receive other treatments during the previous lactation

*: AMK: Amikacin, GEN: Gentamicin, TCY: Tetracycline, DCT: Dry Cow Treatment, SCC: Somatic Cells Count

6.4.2.2. *Enterococcus* spp.

A total of 163 cows were sampled during a 16 month period between October 2005 and January 2007. Of these 163 cows, 84 (52%) were dry-off treated and 79 (48%) were not. Overall, 1558 *Enterococcus* spp. were isolated from all the cows. The low number obtained was due to some cows having less than 10 isolated bacteria from feces.

The same screening method was done to make the final GEE model with the confounders for *Enterococcus* spp. As for the *E. coli*, more drugs were affected by the DCT. The resistance to five drugs were affected when cows had DTC: penicillin, lincomycin, tetracycline, tylosin and quinupristin/dalfopristin (Table XI). The region effect and antibiotic at dry-off effect are show in Tables VII and VIII respectively.

Table VII

P-value, 95% confidence interval and coefficient of the final GEE model of the new Δ MIC groups with the DCT and their confounders for the five drugs statistically significant for the *Enterococcus* spp. before the news Δ MIC groups

Drug*	DCT ^{1*}		SCC ^{2*}		Parity ³		Ohter tx. ⁴			
	Coef	P	Confidence interval		Coef	P	Coef	P		
			Min	Max						
LIC	-0,07	0,70	-0,41	0,27	-	-	-	-	0,36	0,24
PEN	-0,27	0,46	-0,97	0,44	-	-	-	-	-	-
QD	-0,85	0,02	-1,55	-0,15	-	-	-	-	-	-
TET	0,80	0,18	-0,37	1,98	-	-	-	-	-	-
TYL	-0,57	0,09	-1,22	0,08	-0,17	0,66	-0,22	0,70	-	-

1: Reference group was cows which did not received antibiotic treatment at dry-off

2: Reference group was cows with low SCC (>200)

3: Reference group was cows with 1 parity

4: Reference group was cows which did not received other treatment during the last lactation

*: TYL: Tylosin tartrate, LIC: Lincomycin, PEN: Penicilline, QD: Quinupristin / Dalfopristin,

TET: Tetracycline, DCT: Dry Cow Treatment, SCC: Somatic Cells Count

Table VII

P-value, 95% confidence interval and coefficient of the final GEE model of the new Δ MIC groups with the DCT and their confounders for the five drugs statistically significant for the *Enterococcus* spp. before the news Δ MIC groups

Drug*	DCT ^{1*}		SCC ^{2*}		Parity ³		Ohter tx. ⁴	
	Coef	P	Confidence interval		Coef	P	Coef	P
			Min	Max				
LIC QC	-0,39	0,03	-0,75	-0,03				
LIC OH	0,14	0,80	-0,96	1,25				

1: Reference group was cows which did not received antibiotic treatment at dry-off

2: Reference group was cows with low SCC (>200)

3: Reference group was cows with 1 parity

4: Reference group was cows which did not received other treatment during the last lactation

*: LIC: Lincomycin, DCT: Dry Cow Treatment, SCC: Somatic Cells Count

6.5. Discussion

6.5.1. Effect of DCT on *E. coli*

According to the results obtained with the three final GEE models, ceftiofur is the only drug for which Δ MIC over the dry period is associated. DCT given to cows (Table V and VI). The two main treatments given during the dry-off period were cefa-dry® and

novodry plus®. The first one contains cephalpirin, a first generation cephalosporin drug in the β -lactam family, and the second drug contains novobiocin and penicillin, a coumarin and a penam β -lactam drug respectively (Prescott et al., 2000). It has been reported that use of ceftiofur parenteral on a farm affects the resistance of fecal *E. coli* from dairy cows (Tragesser et al., 2006). In this study done in 18 Ohio farms, ceftiofur use reduced the susceptibility of fecal *E. coli* to ceftriaxone. This could be explained mainly by the presence of the *bla*_{CMY-2} resistance gene. This resistance gene is carried on large plasmids in commensal organisms (Winokur et al., 2000, Winokur et al., 2001). Resistance from the *bla*_{CMY-2} gene is characterized by a resistance to other cephalosporins and beta-lactams (Sawant et al., 2007). In our study, ceftriaxone, cefoxitin, ampicillin and amoxicillin / clavulanic acid sensitivities were also tested. Every time a ceftiofur resistance was observed, resistance to the four others drugs were also observed. This multi-resistance pattern coincides with what has already been reported by Zhao *et al.* (Zhao et al., 2001). However, many other genes encoding for β -lactamase and extended-spectrum beta-lactamase could also explain these resistance profiles.

Tragesser's study (Tragesser et al., 2006) shows that the selection association of antibiotic resistance is not evident at the cow level but more so at the herd level. Two hypotheses can explain a resistance at the herd level. The first one is the position of the resistance gene. Resistance to extended-spectrum beta-lactams is not associated with one particular chromosomal genotype (Zhao et al., 2001). The horizontal spread of the *bla*_{CMY} is due to a plasmid or a mobile transposon (Liebert et al., 1999, Winokur et al., 2001). This suggests the possibility of ceftriaxone resistance from intraspecies transfer (Liebert et al., 1999, Salyers and Amabile-Cuevas, 1997, White et al., 2000) which could result in inoculation of untreated cows with bacteria that have received the *bla*_{CMYZ} gene. Secondly, cephalpirin exposure among cows not receiving DCT was observed in herds using this drug in our study (data not shown). Thus, β -lactam resistance may potentially be induced even among intestinal bacteria of untreated cows. No further studies were completed to determine if these concentrations were high enough to make a selection for resistant bacteria in the gut. But, it is possible that if generalized cephalpirin exposure had

not occurred, the Δ MIC β -lactam drugs would have been more prominently greater among DCT cows

6.5.2. Effect of DCT on *Enterococcus* spp.

The response of enterococci against the DCT was markedly different from that of *E. coli*. Dry cow therapy appears to be associated with decrease in resistance of this genus against penicillin, tetracycline, tylosin tartrate, quinupristin / dalfopristin and lincomycin. In this case, the Δ MIC groups were: >0 versus ≤ 0 . Therefore, to be certain that the DCT is not simply does associated with Δ MIC not changing at all, two new Δ MIC groups were created: < 0 and ≥ 0 and the model refitted. With these new groups, the interpretation is that DCT decreases resistance versus no decrease in resistance.

After changing the Δ MIC dichotomization, only two drugs were still statistically significant and had a negative coefficient. The interpretation for this test is now that DCT decreases the resistance of *Enterococcus* spp. to quinupristin / dalfopristin and lincomycin. This implies that DCT does not decrease the resistance of the fecal *Enterococcus* spp. for the penicillin, tetracycline and tylosin, but that it simply does not affect their resistance to these drugs.

DCT given to the cows were mainly cephalosporins or novobiocin and penicillin. Except for penicillin, no other β -lactams or coumarin antibiotics were on the MIC plate. Further antimicrobial susceptibility studies with other antimicrobials are needed to address this issue.

Molecular biology information can help in the understanding of the decrease in resistance when antibiotic is given to a cow. Plasmid incompatibility in *Enterococcus* spp. has been reported in the literature (Colmar and Horaud, 1987, Ike and Clewell, 1992). Plasmid incompatibility is the failure of two plasmids to be stably inherited

(Novick, 1987). In other words, reception of a second plasmid in a bacteria cell destabilises the first plasmid already present. Two pathways can suggest this incompatibility: first, the presence of the plasmids is too low, so one of the two, or both cannot efficiently express their genes. Second, because the number of plasmids may be too high, they are not able to self correct, so the plasmids present are not active (Novick, 1987). Plasmid incompatibilities are not reported for penicillin, cephalosporins, lincosamides and streptogramins. But they have not been ruled out either. The DCT may also make a selection for bacteria susceptible to these two drugs (lincomycin and quinupristin / dalfopristin). The number of isolates or number of cows may be too low to see the true statistical significance of the relation between DCT and the resistance in enterococci. Finally, this DCT effect may be a spurious observation where no real relation exists between the resistance and the DCT.

The situation about the gene of beta-lactam resistance is entirely different for enterococci. Even though the presence of β -lactam resistance gene (*blaZ*) was detected in enterococci in four countries (Dworkin and Falkow, 2006), the production of β -lactamase to protect the bacteria is still a rare phenomenon (Gordon et al., 1992, Murray, 1998). Taken together, this could explain why penicillin resistance was not detected in the bacteria.

6.5.3. Occurrences

Potential limitations may have biased our results. One limitation is the likelihood cows were exposed to antibiotics before their inclusion in the project. In this case, the resistance of the bacteria before dry-off might be higher than they would be otherwise, possibly masking an increase due to dry-off treatment. Also, the study was completed on farms practicing selective DCT. In contrast, the majority of farms in North America use whole herd DCT, without considering SCC levels or previous mastitis cases. The results obtained may differ for each farm type. Finally, the Ohio farm was different from the Québec farms because since it was part of a clinical trial on treatments. The grounds for treating the cows in Ohio were not the same than those in Québec. On the other hand, in

principal, all cows receiving DCT were treated due to a perceived need to clear a late lactation intramammary infection

A few points with respect to the study design should be considered. Since cows from different treatment groups were not necessarily separated, untreated cows may have come in contact with commensal bacteria from the feces of treated cows, as well as with those of heifers or calves in the herd. Without separation, untreated cows can be contaminated with resistant bacteria from treated cows or vice-versa. The dry-period is a short time frame to expect an easily measurable change in the antibiotic resistance profile. However, Osteras *et al.* (Osteras *et al.*, 1999) demonstrated the development of resistance in *S. aureus* during one dry-off period.

Another element that may affect the variation of MIC is the number of bacteria isolated from the feces. A greater sample number would provide less variation in the MIC values thus less affected by the extreme values. Nevertheless, previous work (Poirier, *et al.*, 2008) showed that for measuring Δ MIC to the NARMS gram negative panel of antibiotics, four *E. coli* cfu per sampling generated measures reliably equivalent to five cfu per sample. It may be that ten cfu for example would have produced markedly more precise Δ MIC. But there are no data to support this. Similar work on the necessary cfu of *Enterococcus* spp. has not been done.

The number of cows targeted for the study was lower than expected due to the difficulty in finding a sufficient number of farms using selective DCT as well as to other farm related problems (death, culling), it decreased the power of the statistical analysis. In addition, traces of cephalosporin in non-treated cows may have biased the final results by increasing the MIC of the untreated cows. The impact of these traces on the resistance of bacteria in the intestinal tract is unknown for the moment. However, evidence of cephalosporin transfer has now been demonstrated (data not shown). At the beginning of the project, the enterococci were supposed to be identified at the species level. However, because of the variable representativeness of species, it was changed to a genus level of identification. The impact of that change is not known. There is a possibility that it

influences the Δ MIC since all the bacteria are not of the same species and different enterococcal species may respond differently to intestinal exposure to low level of DCT antibiotics (Aarestrup et al., 2002, Boerlin et al., 2001). Another study limitation is recording of other treatment and the DCT. Producers noted about all treatments given to the cows and some mistakes may have occurred.

6.6. Conclusion

Intramammary DCT is apparently associated with a decrease of susceptibility of commensal *E. coli* to ceftiofur. The main antibiotics given during the treatment were cephalosporin and novobiocin / penicillin. As for commensal *Enterococcus* spp., DCT is apparently associated with a decreased resistance to lincomycin and quinupristin / dalfopristin. This study help us to understand the impact of the DCT on commensal bacteria. Selective DCT is a good choice, but it must be reconsidered if the cases of mastitis are rising.

6.7. Acknowledgement

The authors are grateful to the «Ministère d'Agriculture, de Pêcherie et d'Alimentation du Québec», the «Conseil des Recherches en Pêche et Agroalimentaire du Québec» and the Public Health Agency of Canada for the grant and the help given during the project. We also thank François Dubois for collecting samples.

6.7. Reference

- Aarestrup, F.M., Hasman, H., Jensen, L.B., Moreno, M., Herrero, I.A., Dominguez, L., Finn, M., Franklin, A., 2002. Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 4127-4129.
- Boerlin, P., Wissing, A., Aarestrup, F.M., Frey, J., Nicolet, J., 2001. Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4193-4195.
- Bradley, A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164(2):116-128.
- Bratlie, O. 1973. Letter: Dry cow therapy. *Vet. Rec.* 93(15):430-431.
- Colmar, I. and T. Horaud. 1987. *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmids belong to the same incompatibility group. *Appl. Env. Microbiol.* 53(3):567-570.
- Dworkin, M. and S. Falkow. 2006. The prokaryotes : a handbook on the biology of bacteria. 3rd ed. Springer, New York.
- Fouad, A. F., J. Zerella, J. Barry, and L. S. Spangberg. 2005. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 99(1):112-118.
- Gill, R., W. H. Howard, K. E. Leslie, and K. Lissemore. 1990. Economics of mastitis control. *J. Dairy Sci.* 73(11):3340-3348.
- Gordon, S., Swenson, J.M., Hill, B.C., Pigott, N.E., Facklam, R.R., Cooksey, R.C., Thornsberry, C., Jarvis, W.R., Tenover, F.C., 1992. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2373-2378.
- Hershberger, E., S. F. Oprea, S. M. Donabedian, M. Perri, P. Bozigar, P. Bartlett, and M. J. Zervos. 2005. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 55(1):127-130.
- Ike, Y. and D. B. Clewell. 1992. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. *J. Bact.* 174(24):8172-8177.
- Ke, D., F. J. Picard, F. Martineau, C. Menard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 37(11):3497-3503.

- Kossaibati, M. A. and R. J. Esslemont. 1997. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet. J.* 154(1):41-51.
- Larson, B. L. and R. R. Anderson. 1985. *Lactation*. 1st ed. Iowa State University Press, Ames.
- Liebert, C. A., R. M. Hall, and A. O. Summers. 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(3):507-522.
- Mercer, H. D., J. N. Geleta, E. J. Schultz, and W. W. Wright. 1970. Milk-out rates for antibiotics in intramammary infusion products used in the treatment of bovine mastitis: relationship of somatic cell counts, milk production level, and drug vehicle. *Am. J. Vet. Res.* 31(9):1549-1560.
- Murray, B.E., 1998. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerging Infect. Dis.* 4, 37-47.
- Nouws, J. F. and G. Ziv. 1982. Pharmacological aspects of chloramphenicol administration by the intramammary route to lactating dairy cows. *Vet. Q* 4(1):23-31.
- Novick, R.P., 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Reviews* 51, 381-395.
- Osteras, O., V. L. Edge, and S. W. Martin. 1999. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. *J. Dairy Sci.* 82(6):1221-1231.
- Osteras, O., S. W. Martin, and V. L. Edge. 1999. Possible risk factors associated with penicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82(5):927-938.
- Prescott, J. F., J. D. Baggot, and R. D. Walker. 2000. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 3rd ed. Iowa State University Press, Ames.
- Rajala-Schultz, P. J., K. L. Smith, J. S. Hogan, and B. C. Love. 2004. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet. Microbiol.* 102(1-2):33-42.
- Salyers, A. A. and C. F. Amabile-Cuevas. 1997. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 41(11):2321-2325.
- Sawant, A. A., N. V. Hegde, B. A. Straley, S. C. Donaldson, B. C. Love, S. J. Knabel, and B. M. Jayarao. 2007. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *Appl. Env. Microbiol.* 73(1):156-163.

- Tragesser, L. A., T. E. Wittum, J. A. Funk, P. L. Winokur, and P. J. Rajala-Schultz. 2006. Association between ceftiofur use and isolation of *Escherichia coli* with reduced susceptibility to ceftriaxone from fecal samples of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 67(10):1696-1700.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4):506-513.
- Webster, D., R. P. Rennie, C. L. Brosnikoff, L. Chui, and C. Brown. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Canada. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57(2):177-181.
- White, D. G., C. Hudson, J. J. Maurer, S. Ayers, S. Zhao, M. D. Lee, L. Bolton, T. Foley, and J. Sherwood. 2000. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 38(12):4593-4598.
- Winokur, P. L., A. Brueggemann, D. L. DeSalvo, L. Hoffmann, M. D. Apley, E. K. Uhlenhopp, M. A. Pfaller, and G. V. Doern. 2000. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44(10):2777-2783.
- Winokur, P. L., D. L. Vonstein, L. J. Hoffman, E. K. Uhlenhopp, and G. V. Doern. 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45(10):2716-2722
- Zhao, S., D. G. White, P. F. McDermott, S. Friedman, L. English, S. Ayers, J. Meng, J. J. Maurer, R. Holland, and R. D. Walker. 2001. Identification and expression of cephamycinase bla(CMY) genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45(12):3647-3650.

6.8 Annex

Table IX

Screening of the risk factor with the model GEE univariate for the *E. coli* isolates

Drug*	DCT ^{1*}		SCC ^{2*}		Parity ³		Other treatment ⁴	
	Coef	P	Coef	P	Coef	P	Coef	P
AMK	0.40	0.01	-0.07	0.65	0.10	0.59	-0.32	0.18
GEN	0.28	0.01	-0.10	0.42	0.21	0.21	0.53	0.03
KAN	-0.10	0.77	-1.57	<0.01	-0.63	0.22	0.14	0.70
STR	-0.47	0.08	0.11	0.51	-1.03	<0.01	0.45	0.30
AMC	0.21	0.11	-0.65	<0.01	-0.74	0.01	0.37	0.04
AMP	0.15	0.50	-0.91	<0.01	-0.18	0.47	0.39	0.08
CRO	-0.25	0.58	-1.57	<0.01	-0.70	0.05	1.58	<0.01
FOX	-0.10	0.81	-0.58	<0.01	-0.71	<0.01	0.41	0.02
TIO	0.20	0.52	-1.24	<0.01	-0.76	0.01	0.19	0.31
CHL	0.11	0.71	0.41	0.21	-0.29	0.28	0.41	0.24
CIP	-	-	-	-	-	-	-	-
NAL	-0.66	0.07	-0.64	0.06	0.02	0.96	0.19	0.61
SOX	-0.03	0.95	0.64	0.28	0.22	0.22	-0.59	0.03
SXT	-0.49	0.23	0.33	0.31	-0.86	0.02	0.57	0.02
TCY	-0.57	0.01	0.39	0.08	-0.77	<0.01	0.92	0.01

¹: Reference group was cows which did not receive antibiotic treatments at dry-off

²: Reference group was cows with low SCC (< 200)

³: Reference group was cows with one parity

⁴: Reference group was cows which did not receive other treatments during the previous lactation

*= AMK: Amikacin, GEN: Gentamicin, KAN: Kanamycin, STR: Streptomycin, AMC: Amoxicillin / Clavulanic Acid, AMP: Ampicillin, CRO: Ceftriaxone, FOX: Cefoxitin, TIO: Ceftiofur, CHL: Chloramphenicol, CIP: Ciprofloxacin, NAL: Nalidixic Acid, SOX: Sulfisoxazole, SXT: Trimethoprim / Sulfamethoxazole, TCY: Tetracycline, DCT: Dry Cow Treatment, SCC: Somatic Cells Count

Table X

P-value, 90% confidence interval and coefficient of the final GEE model with all the confounders of the DCT for drug affected by the DCT antibiotics for the *E. coli*

Drug*	DCT ^{1*}		SCC ^{2*}		Parity ³		Other tx. ⁴	
	Coef	P	Confidence interval		Coef	P	Coef	P
			Min	Max				
AMP Ce	0,39	0,25	-0,17	0,96	-0,42	0,22	-	-
AMP No	-0,01	0,98	-0,87	0,85	-0,43	0,06	-	-
NAL Ce	-0,17	0,83	-1,19	0,91	-	-	-	-
NAL No	-1,39	0,01	-2,19	-0,59	-	-	-	-

¹: Reference group was cows which did not receive antibiotic treatments at dry-off

²: Reference group was cows with low SCC (> 200)

³: Reference group was cows with one parity

⁴: Reference group was cows which did not receive other treatments during the previous lactation

*: AMP: Ampicillin, NAL: Nalidixic Acid, DCT: Dry Cow Treatment, SCC: Somatic Cells Count

Table XI
Screening of the risk factor and the explanatory variables with the model GEE
univariate for *Enterococcus* spp.

Drug*	DCT ^{1*}		SCC ^{2*}		Parity ³		Other tx. ⁴	
	Coef	P	Coef	P	Coef	P	Coef	P
GEN	-	-	-	-	-	-	-	-
KAN	-0.02	0.96	-0.27	0.32	0.85	0.02	0.01	0.95
STR	0.03	0.92	-0.38	0.34	0.50	0.51	0.68	0.04
ERY	0.07	0.67	-0.83	<0.01	-0.06	0.81	-0.81	0.04
TYL	-1.08	<0.01	0.89	<0.01	-0.56	<0.01	-0.32	0.01
CHL	-0.50	0.16	0.56	0.01	0.21	0.39	-0.81	0.05
CIP	0.17	0.31	-0.43	0.23	0.09	0.68	-0.52	<0.01
DAP	-0.07	0.50	0.14	0.36	-0.03	0.93	-0.25	0.20
FLA	-0.02	0.92	0.23	0.31	-0.33	0.34	0.04	0.87
LIC	-0.47	0.02	-0.02	0.89	-0.05	0.83	0.43	0.12
LIZ	-0.92	0.33	-	-	-0.22	0.58	2.30	<0.01
NIT	-0.34	0.14	0.45	<0.01	-0.36	0.32	-0.34	0.05
PEN	-0.60	0.01	0.08	0.83	0.04	0.89	-0.28	0.22
QD	-0.58	0.04	0.40	0.22	-0.02	0.87	0.18	0.64
TET	-0.76	0.05	-0.31	0.33	0.38	0.33	-0.23	0.58
TIG	-0.34	0.26	0.41	0.31	-0.09	0.86	0.44	0.01
VAN	-0.20	0.61	0.29	0.31	-0.77	<0.01	0.56	0.23

¹: Reference group was cows which did not receive antibiotic treatments at dry-off

²: Reference group was cows with low SCC (> 200)

³: Reference group was cows with one parity

⁴: Reference group was cows which did not received other treatments during the previous lactation

*: GEN: Gentamicin, KAN: Kanamycin, STR: Streptomycin, ERY: Erythrocymin, TYL: Tylosin tartrate, CHL: Chloramphenicol, CIP: Ciprofloxacin, DAP: Daptomycine, FLA: Flavomycine, LIC: Lincomycin, LIZ: Linezolid, NIT: Nitrofurantoin, PEN: Penicilline, QD: Quinupristin / Dalfopristin, TET: Tetracycline, TIG: Tigecycline, VAN: Vancomycin, DCT: Dry Cow Treatment, SCC: Somatic Cells Count

Table XII

P-value, 95% confidence interval and coefficient of the final GEE model with all the confounders of the DCT for drug not affected by the region for the *Enterococcus* spp.

Drug*	DCT ^{1*}		SCC ^{2*}		Parity ³		Other tx. ⁴			
	Coef	P	Confidence interval		Coef	P	Coef	P		
			Min	Max						
CHL	-0.44	0.25	-1.19	0.31	0.29	0.39	-	-	-0.81	0.15
CIP	0.07	0.67	-0.24	0.38	-0.41	0.32	-	-	-0.64	<0.01
DAP	-0.03	0.83	-0.26	0.21	-	-	-	-	-0.25	0.29
ERY	-0.06	0.73	-0.41	0.29	-1.02	<0.001	-	-	-0.66	0.02
FLA	0.02	0.92	-0.50	0.45	-	-	-	-	-	-
GEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KAN	-0.06	0.83	-0.66	0.47	-	-	0.85	0.03	-	-
LIC	-0.61	0.01	-0.95	-0.27	-	-	-	-	0.61	0.01
LIZ	-1.23	0.18	-3.00	0.55	-	-	-	-	2.42	<0.01
NIT	-0.17	0.41	-0.56	0.22	0.38	0.02	-	-	-	-
PEN	-0.60	0.01	-1.04	-0.16	-	-	-	-	-	-
QD	-0.58	0.04	-1.13	-0.03	-	-	-	-	-	-
STR	-0.22	0.41	-0.75	0.30	-	-	-	-	0.74	0.04
TET	-0.76	0.05	-1.51	0.00	-	-	-	-	-	-
TIG	-0.42	0.18	-1.03	0.19	-	-	-	-	0.52	<0.01
TYL	-0.54	0.04	-1.06	-0.02	0.63	<0.01	-0.31	0.15	-	-
VAN	-0.34	0.34	-1.05	0.36	-	-	-	-	0.62	0.12

¹: Reference group was cows which did not receive antibiotic treatments at dry-off

²: Reference group was cows with low SCC (>200)

³: Reference group was cows with 1 parity

⁴: Reference group was cows which did not receive other treatments during the last lactation

*: GEN: Gentamicin, KAN: Kanamycin, STR: Streptomycin, ERY: Erythrocymin, TYL: Tylosin tartrate, CHL: Chloramphenicol, CIP: Ciprofloxacin, DAP: Daptomycine, FLA: Flavomycine, LIC: Lincomycin, LIZ: Linezolid, NIT: Nitrofurantoin, PEN: Penicilline, QD: Quinupristin / Dalfopristin, TET: Tetracycline, TIG: Tigecycline, VAN: Vancomycin, DCT: Dry Cow Treatment, SCC: Somatic Cells Count

Table XIII

P-value, 95% confidence interval and coefficient of the final GEE model with all the confounders of the DCT for drug affected by the region for the *Enterococcus* spp.

Drug*	DCT ^{1*}		SCC ^{2*}		Parity ³		Other tx. ⁴	
	Coef	P	Confidence interval		Coef	P	Coef	P
			Min	Max				
LIC QC	-0.54	0.01	-0.93	-0.15	-	-	-	-
LIC OH	-0.94	0.09	-2.02	0.13	-	-	-	-

¹: Reference group was cows which did not receive antibiotic treatments at dry-off

²: Reference group was cows with low SCC (>200)

³: Reference group was cows with 1 parity

⁴: Reference group was cows which did not receive other treatments during the last lactation

*: LIC: Lincomycin, DCT: Dry Cow Treatment, SCC: Somatic Cells Count

Table XIV

P-value, 90% confidence interval and coefficient of the final GEE model with all the confounders of the DCT for drug affected by the DCT antibiotics for the *Enterococcus* spp.

Drug*	DCT ^{1*}			SCC ^{2*}		Parity ³		Other tx. ⁴		
	Coef	P	Confidence interval		Coef	P	Coef	P	Coef	P
			Min	Max						
QD Ce	-0,40	0,23	-0,93	0,14	-	-	-	-	-	-
QD No	-1,53	<0,01	-2,20	-0,85	-	-	-	-	-	-

¹: Reference group was cows which did not receive antibiotic treatments at dry-off

²: Reference group was cows with low SCC (>200)

³: Reference group was cows with 1 parity

⁴: Reference group was cows which did not receive other treatments during the last lactation

*: QD: Quinupristin / Dalfopristin, DCT: Dry Cow Treatment, SCC: Somatic Cells Count

7. Discussion

L'étude du transfert d'antibiotique se veut un moyen de confirmer que les antibiotiques utilisés comme DCT intramammaires parviennent à traverser, lors de l'involution, la glande mammaire pour aller rejoindre la circulation sanguine. Théoriquement, les antibiotiques intramammaires peuvent diffuser à partir de la glande mammaire jusqu'à la circulation systémique pendant l'involution du pis suite à la cessation de la traite (Anderson and al., 1985). Mais une diffusion d'une quantité détectable d'antibiotique en condition pratique n'a jamais été démontré.

À partir des trois prises de sang échantillonnées (témoin, 8 et 96 heures) de notre étude, il est donc maintenant évident que les antibiotiques intramammaires parviennent à traverser la couche de cellules épithéliales pour rejoindre la circulation sanguine. Par contre, la présence de céphapirine aux temps témoins de vaches qui n'ont pas reçues ce traitement est surprenante. Selon les résultats obtenus, la céphapirine donnée au tarissement parvient à atteindre des vaches qui n'ont pas reçu ce genre d'antibiotique.

Les causes possibles de cette situation sont : une mauvaise prise de note sur les traitements des vaches à la ferme, une contamination au laboratoire ou bien des erreurs d'identification des échantillons. Une erreur faite à la ferme semble très peu probable étant donné qu'aucun autre traitement ne contenait cet antibiotique, mise à part 6 doses de céphapirine remises au producteur, d'après ce qu'indiquait l'inventaire. Pour ce qui est de la contamination au laboratoire, les courbes de standardisation réalisées par le spectromètre en tandem de masse laissent croire qu'aucune contamination d'échantillon ne s'est produite.

Les vaches qui reçoivent de la céphapirine en guise de traitement au tarissement ont une présence constante de cet antibiotique dans leur plasma. Cette conclusion s'appuie sur le fait qu'aucune trace de céphapirine n'a été détectée dans le plasma des bovins pour les trois fermes qui n'ont pas utilisé cet antibiotique comparativement à

toutes les vaches échantillonnées de la ferme qui se servait de l'antibiotique. Il est important de préciser que des concentrations de céphapirine ont été retrouvées avant le tarissement et après le vêlage dans le plasma de vaches qui n'avaient pas été traitées.

Le transfert d'antibiotique a même été confirmé en analysant les données de la ferme E. Il y avait de la céphapirine dans le plasma des vaches traitées avec la novobiocine pour le tarissement, comme démontre le tableau XVII.

Puisque la ferme E a cessé d'utiliser la céphapirine pour traiter les vaches, une occasion d'étudier la persistance à la ferme s'était présentée. Les six vaches traitées au CefaDry® n'ont pas pu être échantillonnées (trois étaient mortes au vêlage et les trois autres ont vêlé avant le début de l'échantillonnage). Le plasma prélevé provenait de vaches qui n'avaient jamais été mises en contact avec de la céphapirine volontairement. Il restait donc deux moyens pour évaluer la persistance dans le plasma : la première était de vérifier le plasma des vaches taries au même moment que les six vaches taries et traitées à la céphapirine (pour un total de 8 vaches) et en second, échantillonner toutes les vaches qui sont entrées au tarissement et ont vêlé avant la fin du projet (9 vaches).

Trois des 8 vaches taries et traitées à la novobiocine au même moment que les vaches taries et traitées à la céphapirine présentaient toujours des concentrations de l'antibiotique dans le sang après le vêlage bien que les bovins aient seulement été traités à la novobiocine. Fait intéressant, deux des vaches ont été échantillonnées au milieu du mois de septembre tandis que la dernière vache l'a été deux mois plus tard, soit au mois de novembre. Entre-temps, les cinq vaches ne présentaient aucune trace détectable. Pour le moment, la seule explication possible, étant donné que l'eau ne semble pas servir de vecteur pour le transfert d'antibiotique, est que chaque vache est différente et que chacune élimine l'antibiotique à différentes vitesses.

Pour ce qui est des 9 vaches échantillonnées avant et après le tarissement, une seule a présenté des traces de céphapirine avant le tarissement. L'échantillon a été prélevé

au milieu du mois de septembre, ce qui indique une persistance de l'antibiotique depuis au moins 2 mois (puisque le dernier traitement remonte au mois de juillet). Tous les autres échantillons étaient négatifs, cela démontre que l'exposition a cessé ou bien n'a pas été détectée.

Étant donné que l'eau ne contenait pas de céphaline dans les fermes A et E, cela suggère qu'elle ne soit pas un vecteur de l'antibiotique sur ces fermes. L'antibiotique aurait pu se retrouver dans les abreuvoirs des enclos de tarissement suite à une contamination par les vaches traitées. Mais puisque rien n'a été détecté, il faudrait déterminer par quel autre moyen l'antibiotique aurait pu se transférer d'un animal à l'autre. La méthode la plus probable, bien que non testée dans notre étude, pourrait être l'urine et les fèces (Barbiers and Swenson, 1974, Erskine et al., 1992).

Après le début de l'échantillonnage des fèces, nous avons réévalué le nombre de colonies nécessaires pour représenter la population intestinale des bovins, du moins pour *E. coli*. À l'origine du projet, une seule colonie devait être isolée et soumise à un test d'antibiorésistance. Par contre, voyant qu'il y aurait peut-être un problème de représentativité de la population des NTSEC, nous avons décidé d'augmenter à 5 colonies.

Suite aux observations de l'étude de Villarroel (Villarroel *et al.* 2006), nous nous sommes demandés si un nombre inférieur de colonies pouvait être aussi représentatif que 5 colonies. Aucune étude ne faisait mention de cette question et la variation d'antibiorésistance était plus apparente au niveau bactérien qu'aux niveaux vache et ferme. Donc, après avoir accompli les analyses statistiques, il s'est avéré que 4 colonies procuraient une probabilité d'erreur de Δ CMI de moins de 2%. Ce risque était acceptable sachant que les coûts en matériel et en temps allaient être réduits de 20%. Donc, pour représenter la population *E. coli* des intestins, 4 bactéries ont été isolées par échantillon.

Dû au manque de ressources (financière, matériel et temps), le test sur le nombre de colonies n'a pas été effectué avec les entérocoques. Pour des fins pratiques, 5 colonies

ont été isolées par échantillon (5 avant le tarissement et 5 après le vêlage). Par contre, comme dans le cas des *E. coli*, le projet a débuté en isolant une seule colonie. Ce n'est que 5 mois plus tard que nous avons décidé d'augmenter ce nombre pour mieux représenter la population intestinale. De nombreuses vaches ont dû être exclues du projet puisqu'elle n'avait qu'un seul entérocoque pour les représenter. Ce qui fait que le nombre total de vaches échantillonnées a chuté, diminuant du même coup la puissance statistique.

À partir des analyses effectuées sur les variations des CMI des bactéries commensales, les bactéries *E. coli* sont affectées par le traitement au tarissement qui augmente leur résistance au ceftiofur. Les deux principaux traitements donnés durant la période de tarissement étaient le cefa-dry® et le novodry plus®. Le premier contient de la céphapirine, une céphalosporine de première génération de la famille des β -lactam, tandis que la seconde contient de la novobiocine et de la pénicilline, un aminocoumarin et un β -lactam (Prescott et al., 2000)

Comme cité dans la discussion de l'article au chapitre 6, le gène de résistance *bla_{CMY-2}* pourrait être celui qui procure cette résistance aux bactéries, bien qu'un autre gène serait également possible. Aucune expérience n'ait été faite pour déterminer la présence de ce gène, les patrons de susceptibilité ont démontré une résistance pour l'ampicilline, l'amoxicilline et la cefoxitine en même temps que le ceftiofur. Également, d'autres résistances face à des antibiotiques provenant d'autres familles ont été détectées aux mêmes moments que les résistances faces aux β -lactamines, notamment le chloramphénicol (74%), le sulfisoxazole (100%), le sulfaméthoxazole / triméthoprim (59%) et la tétracycline (100%). Ces résistances peuvent être exprimées s'il y a présence du gène *bla_{CMY-2}* (Lowrance et al., 2007). Ces patrons de résistances multiples coïncident avec ce qui a déjà été rapporté par Zhao *et al.* (Zhao et al., 2001). Cependant, il y a beaucoup d'autres gènes qui peuvent encoder pour les β -lactamase et les β -lactamase à large spectre qui pourraient également expliquer ces patrons d'antibiorésistances

Une pression sélective chez les *E. coli* due aux transferts d'antibiotiques intramammaires véhiculés par le sang pourrait être la cause de ces développements de

résistance. L'antibiotique administré dans la glande mammaire atteint la circulation sanguine pour être ensuite dégradé dans les intestins. Puisque deux des trois antibiotiques font partie de la famille des β -lactamines (pénicilline et céphapirine), la sélection du gène de résistance contre cette famille d'antibiotique a pu être accentuée.

L'étude de Tragesser (Tragesser et al., 2006) montre que la sélection d'antibiorésistance ne s'effectue au niveau de la vache, mais bien au niveau du troupeau. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. La première est la position du gène de résistance bla_{CMY} . Cette résistance des β -lactamines à large spectre n'est pas associée avec un génotype chromosomal particulier (Zhao et al., 2001). La propagation horizontale du gène bla_{CMY} est due à un plasmide ou un transposon (Liebert et al., 1999, Winokur et al., 2001). Ceci suggère la possibilité d'une antibiorésistance aux β -lactamines d'un transfert intra-espèce (Liebert et al., 1999, Salyers et Amabile-Cuevas, 1997, White et al., 2000) qui expliquerait pourquoi une bactérie d'une vache non-traitée pourrait recevoir le gène de résistance. Deuxièmement, l'exposition à la céphapirine de vaches qui ne recevaient pas de traitement a été observée dans notre étude. Donc, les résistances aux β -lactamines peuvent potentiellement être développées dans les intestins des vaches même si aucun traitement n'a été administré. Aucune étude supplémentaire n'a été effectuée pour déterminer si ces concentrations sont assez élevées pour une sélection de bactéries résistantes dans les intestins. Il est tout à fait possible que si l'exposition générale à la céphapirine n'ait aucun effet, le Δ CMI des β -lactamines sera plus grandes pour les vaches traitées au tarissement.

La situation est tout à fait différente pour les entérocoques que pour les *E. coli*. Le traitement au tarissement semble vouloir diminuer la résistance des entérocoques pour la pénicilline, la tétracycline, la tylosine tartrate, la quinupristine / dalfopristine et la lincomycine. Dans ce cas précis, les groupes de Δ CMI étaient : >0 versus ≤ 0 . Cependant, pour être certain que le traitement au tarissement n'était pas simplement associé avec aucun changement d'antibiorésistance du tout, deux nouveaux groupes de Δ CMI ont été créés : <0 versus ≥ 0 et le modèle a été adapté. Avec ces nouveaux groupes, l'interprétation

a été que le traitement au tarissement diminue l'antibiorésistance versus aucune diminution d'antibiorésistance.

Après avoir changé les Δ CMI groupes, seulement deux antibiotiques demeuraient toujours statistiquement significatif avec un coefficient négatif. L'interprétation de ce test était maintenant que le traitement au tarissement diminue l'antibiorésistance des *Enterococcus* spp. pour la quinupristine / dalfopristine et la lincomycine. Ceci implique que le traitement au tarissement ne diminue pas l'antibiorésistance des entérocoques fécaux pour la pénicilline, la tétracycline et la tylosine tartrate, mais qu'il n'y a tout simplement aucun effet sur la résistance des ces antibiotiques.

Un élément limitant de l'étude est le fait que les traitements de tarissement étaient soit de la céphapirine ou bien de la novobiocine et de la pénicilline. Sauf pour la pénicilline, aucune autre β -lactamine ou aminocoumarin n'a été testé sur les plaques de CMI. D'autres études avec des antibiotiques plus ciblés devront se faire pour avoir une image plus précise de la situation.

Des information de biologie moléculaire peuvent aider à comprendre ce décroissement de résistance à la suite d'un traitement donné aux vaches. Des incompatibilités de plasmides dans les *Enterococcus* spp. ont déjà été rapportées dans la littérature (Colmar et Horaux, 1987, Ike et Clewell, 1992). Une incompatibilité de plasmide est l'échec de deux différents plasmides de demeurer stables dans une seule bactérie (Novick, 1987). En d'autres mots, l'acquisition d'un second plasmide dans une cellule bactérienne déstabilise le premier plasmide déjà présent. Deux interprétations peuvent suggérer ces incompatibilités : pour commencer, la présence du ce plasmide est trop basse, alors un des deux, voir les deux, ne pourront exprimer de façon efficace leurs gènes. Deuxièmement, parce que le nombre de plasmides peut être trop élevé, ces derniers ne seront pas en mesure de s'auto-réparer, donc ils deviendront inactifs (Novick, 1987). Bien qu'aucune incompatibilités de plasmides n'a été répertorié pour les pénicillines, les céphapirines, les linconsamides ou les streptogramines, il n'est pas dit qu'il faut exclure cette hypothèse.

Le traitement au tarissement peut également faire une sélection de bactérie susceptible aux deux antibiotiques (lincomycine et quinupristine / dalfopristine). Également, le nombre d'isolats ou nombre de vaches peut être trop bas pour voir la vraie situation statistique de la relation entre le traitement au tarissement et l'antibiorésistance des entérocoques fécaux. Finalement, l'effet observé ici peut être sporadique et qu'en réalité, il n'y a aucune relation entre le traitement au tarissement et l'antibiorésistances des entérocoques.

Bien que la présence du gène de résistance aux β -lactamines (*bla_Z*) a été répertoriée chez les entérocoques dans au moins 4 pays (Dworkin and Falkow, 2006), la production de β -lactamase en quantité suffisante pour protéger une bactérie est un phénomène rare (Gordon et al., 1992, Murray, 1998). Tout cela pourrait expliquer en grande partie pourquoi il n'est pas possible de voir une résistance chez les bactéries testées avec la pénicilline dans ce projet.

Mais avant de rejoindre la circulation sanguine pour ensuite aller sélectionner les bactéries commensales, l'antibiotique administré par voie intramammaire doit d'abord influencer les bactéries pathogènes présentes dans la glande mammaire. La présence de ce genre de bactéries dans le pis est d'ailleurs la raison principale du traitement au tarissement. Un total de 10 antibiotiques a été testé sur deux groupes de bactéries (*Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative).

Des 20 combinaisons de bactéries et d'antibiotiques testées pour l'association d'antibiorésistance après le vêlage, seulement 4 ont une différence apparente: *Staphylococcus aureus* avec la pénicilline / novobiocine et les staphylocoques à coagulase négative avec le sulfisoxazole, l'ampicilline et la tétracycline. Malgré que les différences n'ont pas été significatives, la diversité des différences à l'intérieur des troupeaux suggèrent qu'une population plus grandes d'isolats qui causent des infections intramammaires (IIM) seraient nécessaire pour arriver à une compréhension plus

définitive de l'association des DCT et l'antibiorésistance des *S. aureus* et des staphylocoques à coagulase négative d'IIM post-vêlage.

Le tableau représente les susceptibilités au niveau de la ferme (Tableau XVII), il est évident que les différences observées sont dues à l'effet ferme, ce qui biaise les premières interprétations obtenues. Bien que les différences ne soient pas significatives, il peut y avoir une légère tendance vers un développement de résistance.

Le développement de résistance des *S. aureus* face à la pénicilline / novobiocine peut être attribuable aux traitements au tarissement donnés aux bovins. Puisque 11 des 18 vaches traitées au tarissement l'ont été avec de la pénicilline / novobiocine, il est logique de voir un développement de résistance des bactéries contre cette combinaison d'antibiotique. Par contre, pour ce qui est de la tendance de la résistance des staphylocoques à coagulase négative contre le sulfisoxazole, rien n'indique la cause de la baisse de susceptibilité.

Il est à noter que les variations de résistances dans les bactéries du lait n'indiquent pas une hausse au-delà du seuil de résistance, mais bien une augmentation de la résistance des bactéries du lait des vaches traitées au tarissement comparativement aux vaches non traitées. Les résultats obtenus indiquent que la résistance semble augmenter chez les bovins traités sans toutefois franchir le seuil de 2 millimètres fixé. Cependant, si la susceptibilité diminue progressivement avec l'utilisation de produits à base de pénicilline / novobiocine ou de sulfisoxazole, il serait nécessaire de commencer à faire des choix judicieux pour les antibiotiques de traitement. En d'autres mots, un traitement sélectif au tarissement est un bon choix, mais doit être reconsidéré si les cas de mammite augmentent.

8. Conclusion

En conclusion, les parties étudiées au cours du projet, soit le plasma, les fèces et le lait, sont reliées l'une à l'autre. Le traitement au tarissement injecté par voie intramammaire semble être en mesure d'influencer significativement mais de façon limitée l'antibiorésistance des *E. coli* et des *Enterococcus* spp. dans le tube digestif. Pour se rendre jusqu'aux intestins, les antibiotiques intramammaires diffusent à l'aide de la circulation sanguine. Il est à noter également que les bactéries de la glande mammaire, soit les *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative, ont une légère tendance à augmenter leurs résistances, bien que non statistiquement significative ($\alpha = 0.05$), face à la pénicilline / novobiocine et au sulfisoxazole respectivement. Donc, le traitement au tarissement semble influencer la résistance de certaines bactéries du lait et des fèces. Par contre, un autre projet de recherche devrait se pencher sur deux nouvelles questions que ce projet apporte : premièrement, quelle est l'influence de la transmission de la céphapirine à l'intérieur du troupeau et deuxièmement, pourquoi chez les *Enterococcus* spp. observe-t-on une diminution significative ($\alpha = 0.05$) de la résistance contre la quinupristine / dalfopristine et la lincomycine avec des traitements au tarissement fait à base de céphapirine et de pénicilline / novobiocine?

Référence

- Aarestrup, F.M., Hasman, H., Jensen, L.B., Moreno, M., Herrero, I.A., Dominguez, L., Finn, M., Franklin, A., 2002. Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 4127-4129.
- Ackerman, B.H., Dello Buono, F.A., 1996, Mar-Apr. *pharmacotherapy.* 16(2):201-17.
- Anderson, R. R., R. J. Collier, A. J. Guidry, C. W. Heald, R. Jenness, B. Larson, and H. A. Tuckerm. 1985. *Lactation:*156 - 161.
- Ball, H. J. and J. N. Campbell. 1989. Antibiotic treatment of experimental *Mycoplasma californicum* mastitis. *Vet. Rec.* 125(14):377-378.
- Barbiers, A. R., G. H. Swenson. Report #751-6960-18, Agricultural Division, The upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, January 1974
- Bennedsgaard, T.W., Thamsborg, S.M., Aarestrup, F.M., Enevoldsen, C., Vaarst, M., Christoffersen, A.B., 2006. Resistance to penicillin of *Staphylococcus aureus* isolates from cows with high somatic cell counts in organic and conventional dairy herds in Denmark. *Acta veterinaria Scandinavica* 48, 24.
- Berge, A. C., E. R. Atwill, and W. M. Sisco. 2003. Assessing antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* in young calves using cluster analysis techniques. *Prev. Vet. Med.* 61(2):91-102.
- Berge, A. C., W. B. Epperson, and R. H. Pritchard. 2005. Assessing the effect of a single dose florfenicol treatment in feedlot cattle on the antimicrobial resistance patterns in faecal *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 36(5-6):723-734.
- Berry, E. A. and J. E. Hillerton. 2002. The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 85(1):112-121.
- Bettelheim, K. A., A. Kuzevski, R. A. Gilbert, D. O. Krause, and C. S. McSweeney. 2005. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. *J. Appl. Microbiol.* 98(3):699-709.
- Bezek, D. M. 1998. Genus identification and antibiotic susceptibility patterns of bacterial isolates from cows with acute mastitis in a practice population. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212(3):404-406.
- Blosser, T. H. 1979. Economic losses from and the national research program on mastitis in the United States. *J. Dairy Sci.* 62(1):119-127.

- Boerlin, P., Wissing, A., Aarestrup, F.M., Frey, J., Nicolet, J., 2001. Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4193-4195.
- Bradley, A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164(2):116-128.
- Bradley, A. J. and M. J. Green. 2001. Aetiology of clinical mastitis in six Somerset dairy herds. *Vet. Rec.* 148(22):683-686.
- Bramley, A. J., Cullor, J.S., Erskine, R.J., Fox, L.K., Harmon, R.J, Hogan, J.S, Nickerson, S.C., Oliver, S.P, Smith, K.L, Sordillo, L.M. 1999. Current concepts of mastitis. National mastitis council, Madison, USA.
- Bratlie, O. 1973. Letter: Dry cow therapy. *Vet Rec* 93(15):430-431.
- Calvinho, L. F., R. A. Almeida, and S. P. Oliver. 1998. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 61(1-2):93-110.
- Campos, J., M. C. Fuste, G. Trujillo, J. Saez-Nieto, J. Vazquez, J. G. Loren, M. Vinas, and B. G. Spratt. 1992. Genetic diversity of penicillin-resistant *Neisseria meningitidis*. *J. Infect. Dis.* 166(1):173-177.
- Colmar, I. and T. Horaud. 1987. *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmids belong to the same incompatibility group. *Appl. Env. Microbiol.* 53(3):567-570.
- Comalli, M. P., R. J. Eberhart, L. C. Griel, Jr., and H. Rothenbacher. 1984. Changes in the microscopic anatomy of the bovine teat canal during mammary involution. *Am. J. Vet. Res.* 45(11):2236-2242.
- Cousins, C. L., T. M. Higgs, E. R. Jackson, F. K. Neave, and F. H. Dodd. 1980. Susceptibility of the bovine udder to bacterial infection in the dry period. *J. Dairy Res.* 47(1):11-18.
- Craven, N., Anderson, J.C., Wilson, C.D., 1983. Penicillin (cloxacillin)-tolerant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: identification and lack of correlation between tolerance in vitro and response to therapy in vivo. *Res. Vet. Sci.* 34, 266-271.
- de la Cruz, F. and J. Davies. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* 8(3):128-133.
- Devriese, L. A., F. Haesebrouck, J. Hommeez et al. 1997. A 25-year survey of antibiotic susceptibility testing in *staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Belgium, with a special reference to penicillinase. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* 66:170-173.

- Donaldson, S. C., B. A. Straley, N. V. Hegde, A. A. Sawant, C. DebRoy, and B. M. Jayarao. 2006. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl. Env. Microbiol.* 72(6):3940-3948
- Dworkin, M. and S. Falkow. 2006. *The prokaryotes : a handbook on the biology of bacteria.* 3rd ed. Springer, New York.
- Eberhart, R. J. 1984. Coliform mastitis. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.* 6(2):287-300.
- Eberhart, R. J. 1986. Management of dry cows to reduce mastitis. *J. Dairy Sci.* 69(6):1721-1732.
- Erskine, R. J., R. C. Wilson, M. G. Riddell, Jr., J. W. Tyler, H. J. Spears, and B. S. Davis. 1992. Intramammary administration of gentamicin as treatment for experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *Am. J. Vet. Res.* 53(3):375-381.
- Erskine, R. J., P. C. Bartlett, G. L. Johnson, 2nd, and L. W. Halbert. 1996. Intramuscular administration of ceftiofur sodium versus intramammary infusion of penicillin/novobiocin for treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208(2):258-260.
- Erskine, R. J. and R. J. Eberhart. 1990. Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196(8):1230-1235.
- Erskine, R. J., R. J. Eberhart, L. J. Hutchinson, S. B. Spencer, and M. A. Campbell. 1988. Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192(6):761-765.
- Erskine, R. J., J. Cullor, M. Schaellibaum, B. Yancey, A. Zecconi. 2002. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. *National mastitis council*, 400-414.
- Erskine, R. J., R. D. Walker, C. A. Bolin, P. C. Bartlett, and D. G. White. 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J. Dairy Sci.* 85(5):1111-1118.
- Erskine, R. J., R. C. Wilson, J. W. Tyler, K. A. McClure, R. S. Nelson, and H. J. Spears. 1995. Ceftiofur distribution in serum and milk from clinically normal cows and cows with experimental *Escherichia coli*-induced mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 56(4):481-485.

- Esslemont, R. J. and M. A. Kossaibati. 1997. Culling in 50 dairy herds in England. *Vet. Rec.* 140(2):36-39.
- Fouad, A. F., J. Zerella, J. Barry, and L. S. Spangberg. 2005. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 99(1):112-118.
- Fox, L. K. and J. M. Gay. 1993. Contagious mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 9(3):475-487.
- Fox, L. K., J. H. Kirk, and A. Britten. 2005. *Mycoplasma mastitis*: a review of transmission and control. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 52(4):153-160.
- Gentilini, E., Denamiel, G., Llorente, P., Godaly, S., Rebuelto, M., DeGregorio, O., 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 83, 1224-1227.
- Gill, R., W. H. Howard, K. E. Leslie, and K. Lissemore. 1990. Economics of mastitis control. *J. Dairy Sci.* 73(11):3340-3348.
- Gonzalez, R.N., Jasper, D.E., Bushnell, R.B., Farver, T.B., 1986. Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections in California dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189, 442-445.
- Gordon, S., Swenson, J.M., Hill, B.C., Pigott, N.E., Facklam, R.R., Cooksey, R.C., Thornsberry, C., Jarvis, W.R., Tenover, F.C., 1992. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2373-2378.
- Green, M. J., L. E. Green, G. F. Medley, Y. H. Schukken, and A. J. Bradley. 2002. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85(10):2589-2599.
- Guerin-Fauble, V., Carret, G., Houffschmitt, P., 2003. In vitro activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. *Vet. Rec.* 152, 466-471.
- Hall, R. M. 1997. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Foundation symposium* 207:192-202; discussion 202-195.
- Han, H.R., Park, H.M., 2000. Effects of adjuvants on the immune response of staphylococcal alpha toxin and capsular polysaccharide (CPS) in rabbit. *J. Vet. Med. Sci. / the Japanese Society Vet. Sci.* 62, 237-241.

- Harada, K., T. Asai, A. Kojima, C. Oda, K. Ishihara, and T. Takahashi. 2005. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs in Japan. *J. Vet. Med. Sci. / the Japanese Society Vet. Sci.* 67(10):999-1003.
- Hensen, S. 2000. Bovine *Staphylococcus aureus* mastitis: Bacterial adhesion and invasion in relation to pathogenesis and antimicrobial sensitivity. Universiteit Utrecht, Utrecht.
- Hershberger, E., S. F. Oprea, S. M. Donabedian, M. Perri, P. Bozigar, P. Bartlett, and M. J. Zervos. 2005. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 55(1):127-130.
- Hogan, J. S., R. N. Gonzalez, R. J. Harmon, S. C. Nickerson, S. P. Oliver, J. W. Pankey, and K. L. Smith, eds. 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council, Madison.
- Hogan, J. S., J. W. Pankey, P. Murdough, and D. B. Howard. 1986. Survey of bulk tank milk using blood-esculin agar counts. *J. Food Protect.* 49:990-993.
- Hogan, J. S., D. G. White, and J. W. Pankey. 1987. Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 70(4):873-879.
- Hughes, V. M. and N. Datta. 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature*, 302(5910):725-726.
- Huszenicza, G., S. Janosi, A. Gaspardy, and M. Kulcsar. 2004. Endocrine aspects in pathogenesis of mastitis in postpartum dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:389-400.
- Ike, Y. and D. B. Clewell. 1992. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. *J. Bact.* 174(24):8172-8177.
- Ke, D., F. J. Picard, F. Martineau, C. Menard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 37(11):3497-3503.
- Keefe, G. P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet. J.* 38(7):429-437.
- Kirk, J.H., McCowan, B., Atwill, E.R., Glenn, K.S., Higginbotham, G.E., Collar, C.A., Castillo, A., Reed, B.A., Peterson, N.G., Cullor, J.S., 2005. Association of minimum inhibitory concentration cluster patterns with dairy management

- practices for environmental bacteria isolated from bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 88, 3710-3720.
- Klungel, G. H., B. A. Slaghuis, and H. Hogeveen. 2000. The effect of the introduction of automatic milking systems on milk quality. *J Dairy Sci.* 83(9):1998-2003.
- Kossaibati, M. A. and R. J. Esslemont. 1997. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet. J.* 154(1):41-51.
- Kowalski, T. J., E. F. Berbari, and D. R. Osmon. 2005. Epidemiology, treatment, and prevention of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Mayo Clin. Proc.* 80(9):1201-1207; quiz 1208.
- Larson, B. L. and R. R. Anderson. 1985. *Lactation*. 1st ed. Iowa State University Press, Ames.
- Liebert, C. A., R. M. Hall, and A. O. Summers. 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(3):507-522.
- Leigh, J. A. 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet. J.* 157(3):225-238.
- Lowrance, T.C., Loneragan, G.H., Kunze, D.J., Platt, T.M., Ives, S.E., Scott, H.M., Norby, B., Echeverry, A., Brashears, M.M., 2007. Changes in antimicrobial susceptibility in a population of *Escherichia coli* isolated from feedlot cattle administered ceftiofur crystalline-free acid. *American journal of veterinary research* 68, 501-507.
- Makovec, J. A. and P. L. Ruegg. 2003. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222(11):1582-1589.
- Marra, D., B. Pethel, G. G. Churchward, and J. R. Scott. 1999. The frequency of conjugative transposition of Tn916 is not determined by the frequency of excision. *J. Bact.* 181(17):5414-5418.
- Matthews, K. R., R. A. Almeida, and S. P. Oliver. 1994. Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*. *Infect. Immun.* 62(12):5641-5646.
- Mazel, D. and J. Davies. 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol. Life Sci.* 56(9-10):742-754.
- McDonald, J. S., T. J. McDonald, and A. J. Anderson. 1977. Antimicrobial sensitivity of aerobic gram-negative rods isolated from bovin udder infections. *Am. J. Vet. Res.* 38(10):1503-1507.

- Mercer, H. D., J. N. Geleta, E. J. Schultz, and W. W. Wright. 1970. Milk-out rates for antibiotics in intramammary infusion products used in the treatment of bovine mastitis: relationship of somatic cell counts, milk production level, and drug vehicle. *Am. J. Vet. Res.* 31(9):1549-1560.
- Merck & Co., 1955. *The Merck Veterinary Manual*. Merck and Co., Rahway, N.J., p. v.
- Miltenburg, J. D., D. de Lange, A. P. Crauwels, J. H. Bongers, M. J. Tielen, Y. H. Schukken, and A. R. Elbers. 1996. Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. *Vet. Rec.* 139(9):204-207.
- Morin, D. E., G. C. Petersen, H. L. Whitmore, L. L. Hungerford, and R. A. Hinton. 1993. Economic analysis of a mastitis monitoring and control program in four dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202(4):540-548.
- Murray, B.E., 1998. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerging Infect. Dis.* 4, 37-47.
- Nouws, J. F. and G. Ziv. 1982. Pharmacological aspects of chloramphenicol administration by the intramammary route to lactating dairy cows. *Vet. Q* 4(1):23-31.
- Novick, R.P., 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. reviews* 51, 381-395.
- Olde Riekerink, R. G. 2005. Mastitis situation in Canada. CBMRN meeting Montréal.
- Olde Riekerink, R. G., H. W. Barkema, S. Veenstra, D. E. Poole, R. T. Dingwell, and G. P. Keefe. 2006. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can. Vet. J.* 47(6):567-572.
- Olsen, S. J., M. Ying, M. F. Davis, M. Deasy, B. Holland, L. Iampietro, C. M. Baysinger, F. Sassano, L. D. Polk, B. Gormley, M. J. Hung, K. Pilot, M. Orsini, S. Van Duyne, S. Rankin, C. Genese, E. A. Bresnitz, J. Smucker, M. Moll, and J. Sobel. 2004. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium infection from milk contaminated after pasteurization. *Emerg. Infect. Dis.* 10(5):932-935.
- Osteras, O., V. L. Edge, and S. W. Martin. 1999. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. *J. Dairy Sci.* 82(6):1221-1231.
- Osteras, O., S. W. Martin, and V. L. Edge. 1999. Possible risk factors associated with penicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82(5):927-938.
- Prescott, J. F., J. D. Baggot, and R. D. Walker. 2000. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 3rd ed. Iowa State University Press, Ames.

- Pyorala, S. 2002. New strategies to prevent mastitis. *Reprod. Domest. Anim.* 37(4):211-216.
- Radostits O.M., L. K., Fetrow J. 1995. *Herd Health food animal production medicine* second edition. W.B Saunders compagny, Philadelphie.
- Radostits, O. M. and J. H. Arundel. 2000. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9th ed. Saunders, London; New York.
- Rajala-Schultz, P. J., K. L. Smith, J. S. Hogan, and B. C. Love. 2004. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet. Microbiol.* 102(1-2):33-42.
- Richards, A. 2005. The Walkerton Health Study. *Can. Nurse.* 101(5):16-21.
- Roesch, M., V. Perreten, M. G. Doherr, W. Schaeren, M. Schallibaum, and J. W. Blum. 2006. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms. *J. Dairy Sci.* 89(3):989-997.
- Rossitto, P.V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Luiz, K., Watts, J.L., Cullor, J.S., 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J. Dairy Sci.* 85, 132-138.
- Salyers, A. A. and C. F. Amabile-Cuevas. 1997. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41(11):2321-2325.
- Salyers, A. A., A. Gupta, and Y. Wang. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* 12(9):412-416.
- Sawant, A. A., N. V. Hegde, B. A. Straley, S. C. Donaldson, B. C. Love, S. J. Knabel, and B. M. Jayarao. 2007. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *Appl. Env. Microbiol.* 73(1):156-163.
- Sears, P. M. 1986. Antibigram information collected by the NYSMCP for the period of 02/75-07/85. *Quality milk promotion services newsletter.* 1(3).
- Sears, P. M. and K. K. McCarthy. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19(1):171-185, vii.
- Shpigel, N. Y., D. Levin, M. Winkler, A. Saran, G. Ziv, and A. Bottner. 1997. Efficacy of cefquinome for treatment of cows with mastitis experimentally induced using *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 80(2):318-323.

- Shpigel, N. Y., M. Winkler, G. Ziv, and A. Saran. 1998. Relationship between in vitro sensitivity of coliform pathogens in the udder and the outcome of treatment for clinical mastitis. *Vet. Rec.* 142(6):135-137.
- Smith, B. P. 2002. Large animal internal medicine. 3rd ed. Mosby, St. Louis.
- Smith, K. L. and J. S. Hogan. 1993. Environmental mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 9(3):489-498.
- Snyder, L. and W. Champness. 2003. Molecular genetics of bacteria. 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Sol, J., O. C. Sampimon, J. J. Snoep, and Y. H. Schukken. 1994. Factors associated with bacteriological cure after dry cow treatment of subclinical staphylococcal mastitis with antibiotics. *J. Dairy Sci.* 77(1):75-79.
- Spratt, B. G., Q. Y. Zhang, D. M. Jones, A. Hutchison, J. A. Brannigan, and C. G. Dowson. 1989. Recruitment of a penicillin-binding protein gene from *Neisseria flavescens* during the emergence of penicillin resistance in *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86(22):8988-8992.
- Sunde, M., K. Fossum, A. Solberg, and H. Sorum. 1998. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microbiol. Drug Resist.* 4(4):289-299.
- Switzer, R. E. and J. B. Evans. 1974. Evaluation of selective media for enumeration of group D streptococci in bovine feces. *Appl. Microbiol.* 28(6):1086-1087.
- Tenhagen, B. A., G. Koster, J. Wallmann, and W. Heuwieser. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 89(7):2542-2551.
- Tragesser, L. A., T. E. Wittum, J. A. Funk, P. L. Winokur, and P. J. Rajala-Schultz. 2006. Association between ceftiofur use and isolation of *Escherichia coli* with reduced susceptibility to ceftriaxone from fecal samples of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 67(10):1696-1700.
- Villarreal, A., P. S. Morley, T. E. Wittum, and D. S. Bolte. 2006. Use of a simulation model to evaluate sampling strategies for characterization of antimicrobial resistance in non-type-specific *Escherichia coli* isolated from dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 67(6):951-956.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4):506-513.

- Webster, D., R. P. Rennie, C. L. Brosnikoff, L. Chui, and C. Brown. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Canada. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57(2):177-181.
- White, D. G., C. Hudson, J. J. Maurer, S. Ayers, S. Zhao, M. D. Lee, L. Bolton, T. Foley, and J. Sherwood. 2000. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 38(12):4593-4598.
- Whittle, G., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers. 2002. The role of Bacteroides conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Cell Mol. Life Sci.* 59(12):2044-2054.
- Winokur, P. L., A. Brueggemann, D. L. DeSalvo, L. Hoffmann, M. D. Apley, E. K. Uhlenhopp, M. A. Pfaller, and G. V. Doern. 2000. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant salmonella isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44(10):2777-2783.
- Winokur, P. L., D. L. Vonstein, L. J. Hoffman, E. K. Uhlenhopp, and G. V. Doern. 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and Salmonella isolates from food animals and humans. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45(10):2716-2722.
- Yancey, R. J., Jr. 1999. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. *Adv. Vet. Med.* 41:257-273.
- You, J. Y., B. M. Moon, I. G. Oh, B. K. Baek, L. G. Li, B. S. Kim, B. D. Stein, and J. H. Lee. 2005. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 from cattle in Korea. *Int. J. Food Microbiol.*
- Zansky, S., B. Wallace, D. Schoonmaker-Bopp, P. Smith, F. Ramsey, J. Painter, A. Gupta, P. Kalluri, and S. Noviello. 2002. From the Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of multi-drug resistant Salmonella Newport--United States, January-April 2002. *J. Am. Med. Assoc.* 288(8):951-953.
- Zdanowicz, M., J. A. Shelford, C. B. Tucker, D. M. Weary, and M. A. von Keyserlingk. 2004. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. *J. Dairy Sci.* 87(6):1694-1701.
- Zhao, S., D. G. White, P. F. McDermott, S. Friedman, L. English, S. Ayers, J. Meng, J. J. Maurer, R. Holland, and R. D. Walker. 2001. Identification and expression of cephamycinase bla(CMY) genes in *Escherichia coli* and Salmonella isolates from food animals and ground meat. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45(12):3647-3650.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

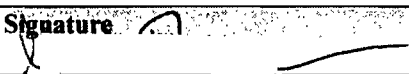



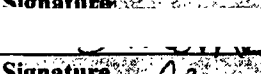
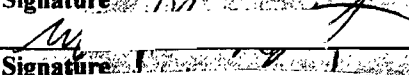

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Etienne Poirier		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Épidémiologie

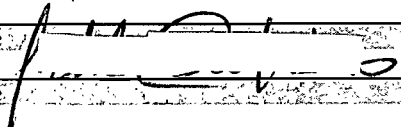
DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Etienne Poirier, Emile Bouchard, David Léger, Serge Messier, Marielle Saint-Laurent, Daniel Scholl	
Titre Number of <i>Escherichia coli</i> colonies required to provide a representative sample for determination of the MIC in dairy cow fecal samples	
Revue Preventive veterinary medicine	Date de publication En préparation
Auteurs Etienne Poirier, Emile Bouchard,, Dave Léger, Serge Messier, Marie Archambault, Jérôme Del Castillo, Marielle Saint-Laurent, Valérie Côté, Päivi Rajala-Schultz, Daniel Scholl	
Titre The effect of dry cow treatment on antibiotic resistance of fecal <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus</i> spp	
Revue Preventive veterinary medicine	Date de publication En préparation

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord qu'Etienne Poirier inclut ces articles dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : L'antibiorésistance acquise des bactéries de la glande mammaire et des intestins en fonctions des traitements intra-mammaire de tarissement chez les bovins laitiers.</i>		
Coauteur Marie Archambault	Signature 	Date 2007.10.22
Coauteur Emile Bouchard	Signature 	Date 2007/10/22
Coauteur Valérie Côté	Signature 	Date 2007/11/06
Coauteur Jérôme Del Castillo	Signature 	Date
Coauteur Serge Messier	Signature 	Date 2007.10.19
Coauteur Marielle Saint-Laurent	Signature 	Date 2007-10-24
Coauteur Daniel Scholl	Signature 	Date 2007.10.22

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<p>À titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord qu'Etienne Poirier inclut ces articles dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : L'antibiorésistance acquise des bactéries de la glande mammaire et des intestins en fonctions des traitements intra-mammaire de tarissement chez les bovins laitiers.</p>		
Coauteur	Signature	Date
Jérôme Del Castillo		5/11/07
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

