

**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

**Sensibilité d'isolats de *Staphylococcus aureus*  
d'origine bovine aux antimicrobiens et présence de  
gènes de résistance**

par

OLIVIA LABRECQUE

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 microbiologie

Décembre 2007

© Olivia Labrecque, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Sensibilité d'isolats de *Staphylococcus aureus* d'origine bovine aux antimicrobiens et  
présence de gènes de résistance

présenté par :  
OLIVIA LABRECQUE

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Marie Archambault, présidente-rapporteuse

Dr Serge Messier, directeur de recherche

Dre Josée Harel, co-directrice

Dr Jean-Philippe Roy, membre du jury

## Résumé

Les objectifs principaux de cette étude étaient d'établir le profil d'antibiorésistance de souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait de vaches laitières au Québec et de mettre en évidence les gènes de résistance liés aux phénotypes. Un total de 418 souches de *S. aureus* de diverses régions du Québec ont pu être testées pour la résistance aux antibiotiques par une technique de microdilution en bouillon. Par cette technique, il a été démontré que moins de 14,2% de ces souches présentaient de la résistance à au moins un des 10 antibiotiques testés. Par exemple, seulement 6,2% des souches étaient résistantes à la pénicilline alors que 3,7% des isolats l'étaient à la pirlimycine. Ces données sont parmi les plus faibles lorsque comparées à celles d'autres pays. Deux techniques génotypiques ont été utilisées afin de mettre en évidence la présence de gènes de résistance, soient l'amplification en chaîne par la polymérase (PCR) et l'hybridation sur colonies. Les résultats obtenus par ces deux techniques n'ont pas été très concluants en raison du manque de standardisation lors de leur application. Cette étude a permis de démontrer que la technique d'hybridation sur colonies, généralement réservée aux bactéries à Gram négatif, pouvait aussi être appliquée aux bactéries à Gram positif comme les *S. aureus*.

**Mots-clés :** *Staphylococcus aureus*, mammite, microdilution, hybridation sur colonies, PCR, gènes de résistance, antimicrobien, phénotype, génotype.

## **Abstract**

The main objectives of this study were to establish the antimicrobial resistance pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of dairy cattle in the province of Québec and to investigate the genes that regulate the resistance to these antibiotics. Four hundred and eighteen (418) *S. aureus* strains from all regions of the province of Québec were tested by the broth microdilution method. With this method, it was shown that less than 14.2% of *S. aureus* strains were resistant to at least one of the ten antibiotics tested. For example, 6.2% of *S. aureus* strains were resistant to penicillin and 3.7% for pirlimycin. These data show that the antimicrobial resistance level in *S. aureus* isolates from dairy cows in Québec is very low when compared to those of other countries. Two genotypic methods, PCR and colony hybridization, were used to find antimicrobial genes resistance. These two methods do not lead to conclusive results because we have not standardized them in our study. This study also demonstrated that colony hybridization method, usually use for Gram negative bacteria, could also be applied to Gram positive bacteria such as *S. aureus*.

**Keywords :** *Staphylococcus aureus*, mastitis, microdilutions, colony hybridization, PCR, antimicrobial gene resistance, antibiotics, phenotype, genotype.

# Table des matières

## Partie 1. Recension de la littérature

---

|   |    |
|---|----|
| 1. Caractéristiques bactériologiques des <i>Staphylococcus aureus</i>   | 5  |
| 1.1. Nomenclature   | 5  |
| 1.2. Caractéristiques   | 5  |
| 1.3. Facteurs de virulence  | 5  |
| 1.3.1. Coagulase  | 5  |
| 1.3.2. Adhésines  | 6  |
| 1.3.3. Capsule  | 6  |
| 1.3.4. Toxines  | 6  |
| 1.3.5. Hémolysines  | 7  |
| 1.3.6. Sidérophores   | 8  |
| 1.4. Habitat  | 8  |
| 1.5. Pouvoir pathogène  | 9  |
| 1.6. Pathogénie des infections intra-mammaires à <i>S. aureus</i>   | 9  |
| 1.7. Diagnostic   | 10 |
| 2. L'évolution de la résistance de <i>S. aureus</i> envers les antimicrobiens.  | 12 |
| 2.1. Situation en médecine humaine  | 13 |
| 2.2. Situation en médecine vétérinaire  | 14 |
| 3. Les différentes classes d'antimicrobiens, leurs mécanismes d'action et les stratégies de résistance développées par les <i>S. aureus</i> | 14 |
| 3.1. Bêta-lactamines  | 17 |
| 3.1.2. Mécanisme d'action des bêta-lactamines   | 17 |
| 3.1.3. Spectre d'action des bêta-lactamines   | 18 |
| 3.1.4. Mécanismes de résistance des <i>S. aureus</i> vis-à-vis les bêta-lactamines  | 18 |
| 3.1.5. Méthicilline   | 20 |
| 3.1.6. Mécanismes de résistance des <i>S. aureus</i> contre la méthicilline   | 20 |
| 3.2. Quinolones et fluoroquinolones   | 21 |
| 3.2.1. Mécanisme d'action des quinolones et des fluoroquinolones  | 21 |
| 3.2.2. Mécanismes de résistance des <i>S. aureus</i> face aux quinolones et fluoroquinolones  | 22 |
| 3.3. Aminoglycosides  | 22 |
| 3.3.1. Mécanisme d'action des aminoglycosides   | 23 |
| 3.3.2. Mécanisme de résistance des <i>S. aureus</i> aux aminoglycosides   | 23 |
| 3.4. Tétracyclines  | 24 |
| 3.4.1. Mécanisme d'action des tétracyclines   | 25 |
| 3.4.2. Mécanisme de résistance des <i>S. aureus</i> envers les tétracyclines  | 25 |

|   |    |
|---|----|
| 3.5. Macrolides et lincosamides   | 26 |
| 3.5.1. Mécanisme d'action des macrolides et lincosamides  | 26 |
| 3.5.2. Spectre d'action des macrolides et lincosamides  | 26 |
| 3.5.3. Mécanisme de résistance des <i>S. aureus</i> envers les macrolides et lincosamides                           | 27 |
| 3.6. Novobiocine  | 27 |
| 3.6.1. Mécanisme d'action de la novobiocine   | 28 |
| 3.7. Triméthoprime/sulfaméthaxazole   | 28 |
| 3.7.1. Mécanisme d'action de la combinaison triméthoprime/sulfaméthaxazole  | 28 |
| 3.7.2. Mécanisme de résistance des <i>S. aureus</i> envers la combinaison triméthoprime/sulfaméthaxazole            | 29 |
| 4. Méthodes de détection de la résistance aux antibiotiques chez <i>S. aureus</i> et résultats d'études antérieures | 29 |
| 4.1. Méthodes phénotypiques   | 31 |
| 4.1.1. Diffusion en gélose : méthode de Kirby-Bauer   | 31 |
| 4.1.2. Études antérieures utilisant la technique de Kirby-Bauer   | 32 |
| 4.1.3. Dilution en gélose   | 35 |
| 4.1.4. Techniques de dilutions en bouillon  | 36 |
| 4.1.5. Études antérieures utilisant la technique de la microdilution  | 36 |
| 4.1.6. E test   | 38 |
| 4.1.7. Autres techniques  | 39 |
| 4.2. Méthodes génotypiques  | 39 |
| 4.2.1. Hybridation  | 40 |
| 4.2.2. PCR : réaction de polymérisation en chaîne   | 42 |
| 4.2.3. Séquençage   | 44 |
| 4.2.4. Micropuces à ADN   | 45 |
| 5. Le phénomène des <i>S. aureus</i> résistants à la méthicilline (SARM)  | 45 |
| 5.1. Évolution en médecine humaine  | 45 |
| 5.2. SARM en médecine vétérinaire   | 46 |
| 6. Techniques de détection des SARM   | 47 |
| 7. Conclusion   | 48 |
| 7.1. Problématique  | 48 |
| 7.2. Buts et objectifs de l'étude   | 49 |
| 7.3. Retombées anticipées   | 49 |

## Partie 2. Méthodologie

|                     |    |
|---------------------|----|
| 1. Souches          | 51 |
| 1.1. Provenance     | 51 |
| 1.2. Sélection      | 51 |
| 1.3. Identification | 51 |
| 2.1. Microdilutions | 52 |

|  |    |
|--|----|
| 2.1.1. Antibiotiques   | 52 |
| 2.1.2. Préparation des plaques   | 52 |
| 2.1.3. Inoculation des plaques   | 53 |
| 2.1.4. Lecture des plaques   | 54 |
| 2.2. Technique de Kirby-Bauer  | 55 |
| 3. Techniques génotypiques   | 55 |
| 3.1. Vérification de la présence de gènes de résistance chez les souches contrôles                           | 55 |
| 3.2. Essais préliminaires : hybridation sur colonies et détection de gènes par radioactivité P <sup>32</sup> | 56 |
| 3.2.1. Préparation des membranes   | 56 |
| 3.2.2. Lyse bactérienne  | 56 |
| 3.2.3. Fabrication de la sonde   | 57 |
| 3.2.4. Préhybridation  | 57 |
| 3.2.5. Hybridation, lavage et révélation   | 57 |
| 3.3. Hybridation sur colonies et détection de gènes par chemiluminescence                                    | 58 |
| 3.3.1. Préparation des membranes   | 58 |
| 3.3.2. Lyse bactérienne  | 58 |
| 3.3.3. Fabrication des sondes  | 58 |
| 3.3.4. Préhybridation  | 59 |
| 3.3.5. Hybridation   | 59 |
| 3.3.6. Lavage  | 61 |
| 3.3.7. Révélation  | 62 |
| 3.4. Recherche de gènes de résistance par PCR  | 62 |

### **Partie 3. Résultats**

.....

|   |    |
|---|----|
| 1. Souches  | 65 |
| 2. Techniques phénotypiques   | 65 |
| 2.1. Microdilutions   | 65 |
| 2.2. Technique de Kirby-Bauer   | 65 |
| 2.3. Comparaison des techniques de microdilution et de Kirby-Bauer  | 65 |
| 2.4. Résistance simple et multiple  | 66 |
| 2.5. Répartition géographique   | 68 |
| 3. Techniques génotypiques  | 68 |
| 3.1. Présence de gènes de résistance chez les souches témoins   | 68 |
| 3.2. Hybridation sur colonies et détection par sondes marquées à la radioactivité P <sup>32</sup>                                       | 70 |
| 3.3. Hybridation sur colonies et détection par chemiluminescence  | 70 |
| 3.4. Détection des gènes de résistance par technique PCR  | 71 |
| 3.4.1. Comparaison des résultats obtenus par les techniques hybridation sur colonies avec sondes marquées à la chemiluminescence et PCR | 71 |
| 3.4.2. Comparaison des résultats obtenus par les techniques phénotypiques et PCR  | 71 |



## Partie 4. Discussion et conclusion

---

|  |     |
|--|-----|
| 1. Techniques phénotypiques  | 75  |
| 1.1. Microdilutions  | 75  |
| 1.1.1. Choix de la technique                                       | 75  |
| 1.1.2. Choix des antimicrobiens                                    | 75  |
| 1.1.3. Situation par rapport aux autres études publiées            | 76  |
| 1.1.3.1. Pénicilline   | 76  |
| 1.1.3.2. Oxacilline  | 76  |
| 1.1.3.3. Pirlimycine   | 77  |
| 1.1.3.4. Lincomycine   | 77  |
| 1.1.3.5. Érythromycine   | 77  |
| 1.1.3.6. Combinaison pénicilline/novobiocine                       | 78  |
| 1.1.3.7. Tétracycline  | 78  |
| 1.1.3.8. Combinaison triméthoprimé/sulfaméthaxazole                | 78  |
| 1.1.3.9. Enrofloxacin et gentamicine                               | 79  |
| 1.1.3.10 Données existantes pour le Canada                         | 79  |
| 2. Techniques génotypiques   | 79  |
| 2.1. Gènes de résistance chez les souches contrôles                | 79  |
| 2.1.1. Particularités des gènes de résistance pour la tétracycline | 79  |
| 2.1.2. Autres gènes  | 80  |
| 2.2. Hybridation sur colonies et radioactivité P <sup>32</sup>     | 80  |
| 2.3. Hybridation sur colonies et chemiluminescence                 | 81  |
| 2.3.1. Choix de la technique                                       | 81  |
| 2.3.2. Bruit de fond   | 81  |
| 2.3.2.1. Protéinase K  | 81  |
| 2.3.2.2. Sondes  | 82  |
| 2.3.2.3. Substrat  | 82  |
| 2.3.2.4. Membranes   | 83  |
| 2.3.2.5. Exposition  | 83  |
| 2.3.2.6. Hybridations non spécifiques                              | 83  |
| 2.4. Comparaison des résultats des techniques PCR et hybridation   | 84  |
| 2.5. Comparaison des résultats phénotypiques et génotypiques       | 85  |
| 2.5.1. Extraction de l'ADN   | 85  |
| 2.5.2. Amorces   | 85  |
| 2.5.3. Choix des gènes   | 85  |
| 2.5.4. Niveaux de résistance                                       | 86  |
| 3. Conclusion générale   | 86  |
| Bibliographie  | 88  |
| Annexe 1   | xiv |

# Liste des tableaux

---

## Partie 1

---

- Tableau 1. Principaux avantages et inconvénients des méthodes phénotypiques et génotypiques. 30
- Tableau 2. Concentrations minimales inhibitrices 90 (CMI<sub>90</sub>) des *S. aureus* provenant de laits de vaches laitières. 37
- Tableau 3. Concentrations minimales inhibitrices 90 (CMI<sub>90</sub>) des *S. aureus* provenant de laits de taures laitières. 38

## Partie 2

---

- Tableau 4. Normes établies par le CLSI pour classer les isolats de *S. aureus* comme sensibles, intermédiaires ou résistants à un antimicrobien. 54
- Tableau 5. Souches témoins servant de contrôles pour vérifier l'efficacité et la spécificité des techniques d'hybridation sur colonies et de PCR. 60
- Tableau 6. Séquences des amorces utilisées dans les réactions PCR et pour la fabrication des sondes utilisées dans les techniques d'hybridation sur colonies. 61

## Partie 3

---

- Tableau 7. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 8 antibiotiques envers les souches de *S. aureus* provenant d'échantillons de lait de bovins 66
- Tableau 8. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la combinaison TMS envers les souches de *S. aureus* provenant de lait de bovins. 67

Tableau 9. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la combinaison pénicilline/novobiocine envers les souches de *S. aureus* provenant d'échantillons de lait de bovins. 68

Tableau 10. Corrélation entre le phénotype de résistance aux antibiotiques et les résultats obtenus par PCR sur 38 souches présentant un phénotype de résistance aux antibiotiques. 73

## Liste des figures

---

### Partie 1

---

|  |    |
|--|----|
| Figure 1. Sites d'action des différents antimicrobiens.  | 15 |
| Figure 2. Stratégies développées par les <i>S. aureus</i> pour résister aux antimicrobiens.                      | 16 |
| Figure 3. Structure du noyau $\beta$ -lactame.   | 17 |
| Figure 4. Induction de la synthèse des bêta-lactamases chez les <i>S. aureus</i> sous l'effet de la pénicilline. | 19 |
| Figure 5. Évolution de la résistance des <i>S. aureus</i> à la pénicilline selon deux études à long terme.       | 33 |
| Figure 6. Évolution de la résistance des <i>S. aureus</i> à l'oxacilline selon deux études à long terme.         | 34 |
| Figure 7. Évolution de la résistance des <i>S. aureus</i> à l'érythromycine selon deux études à long terme.      | 35 |
| Figure 8. Schématisation de la technique d'hybridation sur colonies.   | 41 |
| Figure 9. Représentation du principe de base de la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR).      | 43 |

### Partie 3

---

|  |    |
|--|----|
| Figure 10. Essais préliminaire : démonstration de la présence des gènes de résistance sur les souches contrôles. | 69 |
|--|----|

## Liste des sigles et abréviations

- 
- AAC** : Aminoglycosides acétyltransférase  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ANT** : Aminoglycosides adényltransférases  
**APH** : Aminoglycosides phosphotransférases  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARN<sub>m</sub>** : Acide ribonucléique messenger  
**ARN<sub>r</sub>** : Acide ribonucléique ribosomal  
**CLSI** : « Clinical and laboratory standards institute »  
**CMI** : Concentration minimale inhibitrice  
**CMI<sub>50</sub>** : Concentration où 50% des souches sont inhibées  
**CMI<sub>90</sub>** : Concentration où 90% des souches sont inhibées  
**DNase** : Désoxyribonucléase  
**DNTP** : Dideoxynucléoside triphosphate  
**ETB** : Toxine exfoliante B  
**E test** : «Ellipsoïdal test»  
***Fem*** : «Factor essential to methicillin resistance»  
**Kpb** : Kilo paires de bases  
**MH** : Mueller Hinton  
**MLS** : Groupe des macrolides, lincosamides et spectinomycine  
**MSCRAMMs** : «Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules»  
**MprF** : «Multiple peptide resistance factor»  
**NaCl** : Chlorure de sodium  
**NCCLS** : « National committee for clinical laboratory standards »  
**NMC** : « National mastitis council »  
**P<sup>32</sup>** : Phosphore 32  
**PABA**: acide para-aminobenzoïque

**PBPs** : «Penicillin binding proteins»

**PBP2a** : «Penicillin binding protein 2a»

**PCR** : Réaction de polymérisation en chaîne

**PVL** : «Panton-Valentine leukocidin»

**PTSAg** : «pyrogenic toxin superantigen»

**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline

**SCCmec** : «Staphylococcal cassette chromosome» mec

**sETA** : Toxine exfoliante A des staphylocoques

**Taq DNA polymerase** : «*Thermus aquaticus* DNA polymerase»

**TMS** : Triméthoprime/sulfaméthaxazole

**TSB** : «Trypticase soy broth»

**TSST-1** : Toxine du syndrome du choc toxique

**VRSA** : *Staphylococcus aureus* résistants à la vancomycine

## Remerciements

Merci à mon maudit Français, qui est resté au Pays des Indiens pour me supporter, m'encourager et surtout, apprendre le fabuleux accent. Sans toi je ne serais pas rendue ici aujourd'hui.

Merci à toute ma famille, qui m'a toujours encouragée à faire de mon mieux dans la vie.

Merci au Dr Serge Messier, qui m'a épaulée durant ces 3 années de résidence et qui est toujours de très bon conseil.

Merci aux Dre Archambault et Dr Uhland, qui m'ont apporté une très grande aide au cours de l'étude de mes examens du Board.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de bactériologie de la FMV, qui m'ont endurée pendant 3 ans et qui m'ont transmis leur savoir.

Merci au Dr Higgins, qui a été et qui reste pour moi, un exemple à suivre.

Merci au Dre Fortin, qui me donne la chance chaque jour d'en apprendre davantage et qui est pour moi un grand exemple de détermination.

Merci aux techniciens et techniciennes des laboratoires du LEAQ et du LEPAQ, qui m'ont fourni toutes les souches de *S. aureus* nécessaires.

Merci aux gens du laboratoire Ecl de la FMV, pour toute l'aide apportée avec la technique d'hybridation.

Merci au Dre Josée Harel et à son équipe, pour son aide et son expertise dans le domaine de la biologie moléculaire.

# INTRODUCTION





Les infections intra-mammaires font partie intégrante du quotidien des élevages de bovins laitiers. Les traitements, les frais en services vétérinaires, les pertes de production, le rejet du lait et autres facteurs découlant de ces infections engendrent des pertes économiques importantes dans l'industrie laitière. Le Dr Daniel Scholl, directeur du Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine, se prononçait sur le sujet lors du Symposium des bovins laitiers tenu en 2004. Selon lui, on peut estimer les pertes financières liées aux mammites chez les bovins et ce, tout agent étiologique confondu, à environ 500 millions de dollars au Canada (Gagné, 2004). Selon le Dr Scholl toujours, au Québec seulement, les pertes se chiffraient à 200 millions de dollars (Lacombe, 2004). Ces données vont de paire avec les chiffres avancés par le National mastitis council aux États-Unis qui estime les pertes économiques liées à la mammite à 150 dollars américains par vache chaque année (Lacombe, 2004).

Parmi ces agents infectieux, un des plus importants est *Staphylococcus aureus*. Les mammites causées par *S. aureus* sont caractérisées par leur aspect chronique réfractaire aux traitements antibiotiques (Barkema *et al.*, 2006). Plusieurs causes sont avancées pour expliquer ce phénomène. Parmi elles, on peut citer l'inaccessibilité de la bactérie au système immunitaire de l'hôte et aux antibiotiques par sa capacité à prendre une forme intracellulaire ainsi qu'à former des biofilms (Barkema *et al.*, 2006). On parle également de résistance aux antibiotiques et plus particulièrement à la pénicilline chez les *S. aureus* producteurs de bêta-lactamases (Barkema *et al.*, 2006). Plusieurs facteurs influencent le succès du traitement des mammites à *S. aureus* comme par exemple l'âge de l'animal, la durée de la condition, le nombre de quartiers infectés, la topographie du quartier infecté, le comptage en cellules somatiques, la sensibilité de la souche bactérienne aux antibiotiques, la durée du traitement, le choix de la molécule antibiotique, le génotype de la souche de *S. aureus* etc (Barkema *et al.*, 2006).

Dans l'industrie laitière, il n'est pas usuel d'ajouter des produits antimicrobiens à la nourriture des animaux en raison des résidus antibiotiques dans le lait que cela engendrerait (Werckenthin, 2001). L'utilisation d'antibiotiques est donc réservée à un usage thérapeutique, réduisant ainsi les possibilités de développement

d'antibiorésistance (Werckenthin, 2001). Par contre, la seule exception à cette règle demeure le traitement prophylactique au tarissement avec des tubes intra-mammaires contenant des antimicrobiens (Werckenthin, 2001).

Plusieurs études font état de la sensibilité des souches de *S. aureus* isolées de lait de vaches envers différents antimicrobiens (Pengov *et al.*, 2003 ;Shitandi, 2004 ;Thorsberry *et al.*, 1993 ;Sabour *et al.*, 2004 ;Owens *et al.*, 1997 ;Tenhagen *et al.*, 2006 ;Moroni *et al.*, 2006 ;Vintov *et al.*, 2003 ;Salmon *et al.*, 1998 ;De Oliveira *et al.*, 2000 ;Gentilini *et al.*, 2000 ;Yoshimura *et al.*, 2002 ;Bennedsgaard *et al.*, 2006). Dans la majorité d'entre elles, on constate que ces isolats sont en général assez sensibles aux antibiotiques. L'exception qui fait la règle est la pénicilline, antibiotique pour lequel les valeurs de sensibilité varient d'une étude à l'autre. Les données concernant la sensibilité des souches de *S. aureus* isolées de lait de vaches au Québec manquent. Une seule étude menée par une équipe de l'Ontario sur un faible nombre d'isolats traite de la question (Sabour *et al.*, 2004). Les auteurs ont décelé très peu de résistance chez les souches de *S. aureus*.

Au cours de ce texte, les principales données concernant l'antibiorésistance des souches de *S. aureus* isolées de lait de vaches et son diagnostic seront revues. L'objectif principal de cette étude est de déterminer la sensibilité des souches de *S. aureus* isolées d'échantillons de lait de vaches laitières provenant de différentes régions du Québec.

# PARTIE 1



## RECENSION DE LA LITTÉRATURE

# 1. Caractéristiques bactériologiques des *Staphylococcus aureus*

## 1.1. Nomenclature

Depuis la création en 1985 de la sous-espèce bactérienne *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, l'espèce connue sous le nom *Staphylococcus aureus* devient automatiquement une sous-espèce : *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (Euzéby, 2006). Cependant, la majorité des auteurs font abstraction de cette nuance pour éviter les confusions et alléger le texte. Le terme *Staphylococcus aureus* sera donc employé dans ce manuscrit.

## 1.2. Caractéristiques

*Staphylococcus aureus* est une bactérie coque à Gram positif de 0,5 à 1,5 µm qui forme des amas ou des tétrades au frottis. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives qui peuvent croître dans un milieu contenant de 10 à 15% de NaCl et à des températures variant entre 10 et 45°C. Après 18 à 24 heures d'incubation, les colonies sont opaques, lisses, régulières et atteignent 1 mm de diamètre. Les colonies peuvent présenter différentes colorations, allant du blanc à l'orangé. Sur gélose contenant 5% de sang de mouton, les colonies présentent une hémolyse variable. La double zone d'hémolyse est assez caractéristique de cette espèce bactérienne. Elles sont positives pour les tests de catalase, coagulase et thermonucléase (DNase) et fermentent le mannitol en anaérobiose. Les hydrates de carbone sont métabolisés par les staphylocoques par les voies de l'oxydation et de la fermentation (Hirsh *et al.*, 2004).

## 1.3. Facteurs de virulence

### 1.3.1. Coagulase

La production d'une coagulase, enzyme causant la coagulation du plasma de lapin *in vitro*, par certaines souches de staphylocoques permet de les classer comme souches plus pathogènes que celles négatives au test de coagulase. Les souches de *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* et 24 à 40% des

souches de *S. hyicus* produisent une coagulase (Devriese, 2005). Selon certains auteurs, cette enzyme ne servirait qu'à dissocier les staphylocoques pathogènes de staphylocoques non pathogènes et n'aurait pas de rôle dans la pathogénie (Hirsh *et al.*, 2004).

### 1.3.2. Adhésines

Cette bactérie produit des protéines de surface appelées MSCRAMMs («microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules») qui jouent un rôle d'adhésines. Il existe plusieurs types d'adhésines présentes chez certaines souches de *S. aureus* conférant un tropisme pour des types cellulaires particuliers (Hirsh *et al.*, 2004).

### 1.3.3. Capsule

Ce type bactérien génère une capsule polysaccharidique dont il existe 11 sérotypes. La fonction de cette capsule est entre autres de protéger la bactérie de la phagocytose. La production d'une capsule est régie par des opérons situés sur l'îlot «*Staphylococcal* Casette Chromosome Genetic element» (Hirsh *et al.*, 2004).

### 1.3.4. Toxines

Les *S. aureus* produisent de nombreuses exotoxines, dont 11 types différents d'entérotoxines allant de A à M (les lettres F et J font défaut). Il semblerait que les entérotoxines des staphylocoques d et j soient impliquées dans la persistance des souches de *S. aureus* au niveau de la glande mammaire et le développement de la chronicité de la condition. En effet, les gènes *sed* et *sej* codant pour ces deux toxines sont fréquemment retrouvés chez les souches de *S. aureus* issues d'infections intramammaires chroniques (Haveri *et al.*, 2007). Les *S. aureus* produisent également la toxine du syndrome du choc toxique ou TSST-1. Plusieurs gènes codent l'expression de ces toxines. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire qui résistent à la chaleur ainsi qu'aux enzymes digestives. En général, les entérotoxines sont préformées lorsque l'hôte les absorbe. Les entérotoxines et la TSST-1 font partie de la famille des superantigènes (Hirsh *et al.*, 2004).

Un autre membre de la famille des superantigènes, le PTSAg «pyrogenic toxin superantigen» serait fortement impliqué dans l'implantation des infections intramammaires à *S. aureus*. En effet, le gène codant pour cette toxine a été retrouvé dans plusieurs études et son rôle dans la pathogénie des mammites à *S. aureus* semble établi (Haveri *et al.*, 2007).

Deux types de toxines exfoliantes sont produites par les *S. aureus* soient sETA et ETB. La première est codée par un gène situé sur un prophage alors que celui qui code pour la seconde est situé sur un plasmide. La cible de ces toxines est une protéine située uniquement dans la matrice intracellulaire de l'épiderme et nommée desmogléine (Hirsh *et al.*, 2004). Il semble que l'implication de ces toxines dans les infections intra-mammaires à *S. aureus* soit négligeable car les gènes codant pour ces deux toxines sont rarement retrouvés chez les souches d'origine bovine. De plus, leur présence chez des souches de *S. aureus* isolées de lait de vaches pourrait indiquer un transfert de l'humain vers le bovin (Haveri *et al.*, 2007).

### 1.3.5. Hémolysines

Plusieurs types d'hémolysines peuvent être observés, par exemple l'hémolysine alpha, bêta, gamma et delta. Les gènes codant pour ces hémolysines sont situés sur un chromosome (Hirsh *et al.*, 2004). Les gènes codant pour ses hémolysines sont retrouvés chez les *S. aureus* isolés de cas de mammites chez les vaches laitières, mais leur rôle dans la pathogénie des mammites à *S. aureus* n'est pas clair. En effet, aucune étude n'a démontré jusqu'à maintenant leur potentiel pathogène et les différences possibles entre ces souches et celles retrouvées au niveau de la peau de la glande mammaire (Haveri *et al.*, 2007).

La toxine alpha agit sur les lipides de membranes, donnant une coloration verdâtre aux globules rouges sur des milieux de culture contenant du sang. Chez l'hôte, les toxines qui sont sécrétées sous forme de monomères s'organisent pour former une structure cylindrique qui s'insère dans la membrane des cellules et laissent passer les ions. Selon la concentration, les toxines agissent différemment sur la cellule hôte, allant de l'initialisation de l'apoptose à la mort cellulaire par nécrose. Selon un mécanisme qui pourrait être associé avec la toxine alpha, les *S. aureus* peuvent être phagocytés par des cellules non professionnelles et échapper aux endosomes et ainsi

se multiplier d'une manière intracellulaire et être ensuite relâchés par la cellule. Parallèlement à ce phénomène, les *S. aureus* produisent des MprF («Multiple peptide resistance Factor») qui leur permettent de survivre en présence de défensines (Hirsh *et al.*, 2004).

Un deuxième type de toxine, la toxine bêta, est très fréquente chez les souches de *S. aureus* d'origine animale. Sur des géloses contenant du sang de mouton ou de bovin, on peut voir une zone d'hémolyse double parfois appelée alpha-bêta, qui apparaît comme une zone d'hémolyse claire près de la colonie, entourée par une zone d'hémolyse incomplète. Son rôle dans la pathogénicité des *S. aureus* n'est pas bien établi. Certains auteurs avancent qu'elle agirait sur les membranes cellulaires eucaryotes (Hirsh *et al.*, 2004).

Les souches de *S. aureus* produisent une toxine gamma qui n'est pas visible sur les milieux de cultures contenant du sang parce que l'agar présent dans les milieux inhibe le phénotype de la toxine. La toxine gamma qui est formée de deux protéines stimule la dégranulation des phagocytes, ce qui augmente les dommages tissulaires liés à la réponse inflammatoire. Un autre type de toxine aurait le même rôle, la leucocydine (Hirsh *et al.*, 2004).

Enfin, *S. aureus* produit une toxine delta dont le rôle dans la pathogénicité reste mal compris. Par une action détergente, cette toxine peut lyser la plupart des cellules, cette propriété est inhibée par le sérum (Hirsh *et al.*, 2004).

### **1.3.6. Sidérophores**

Contrairement aux staphylocoques non pathogènes, les *S. aureus* ont la capacité de bien croître dans des conditions où les concentrations en fer sont faibles. Les staphylocoques coagulase positive ont en effet le potentiel de produire des sidérophores : l'aurochéline et la staphyloferrine leur permettent d'acquérir le fer fixé sur des protéines de l'hôte comme la transferrine. Ces bactéries peuvent également utiliser d'autres sidérophores fabriqués par des entérobactéries telles que l'entérobactine et l'aérobactine (Hirsh *et al.*, 2004).

## **1.4. Habitat**

*S. aureus* est retrouvé de manière naturelle dans les sites chauds et humides tels les muqueuses. Les mammifères ainsi que les oiseaux peuvent être porteurs au niveau

des narines, du naso-pharynx, de la peau, du périnée, du tractus intestinal et génital. Les *S. aureus* peuvent survivre dans l'environnement pendant plusieurs mois, s'ils sont protégés de la sécheresse et de la dessiccation (Staphylocoque doré, 2008).

### **1.5. Pouvoir pathogène**

Différentes conditions pathologiques sont rencontrées selon les espèces. Chez les humains, il s'agit d'abcès, d'intoxication alimentaire, du syndrome du choc toxique, d'exfoliation bulbeuse, d'ostéomyélite, de méningite etc. Chez les équins, il y a entre autres la botryomycose, alors que chez les canins et les porcins, cette bactérie est rarement rencontrée. Chez la volaille, des infections de plaies, des arthrites et des synovites sont plus fréquentes. Chez les lapins, *S. aureus* peut causer des infections chroniques incurables qui se manifestent sous forme d'abcès (Vancraeynest *et al.*, 2004). Enfin, chez les ovins et plus particulièrement les bovins, *S. aureus* cause des mammites contagieuses qui prennent différents aspects comme des mammites gangréneuses, aiguës et le plus souvent, chroniques (Monecke *et al.*, 2007).

### **1.6. Pathogénie des infections intra-mammaires à *S. aureus***

L'infection intra-mammaire à *S. aureus* peut débuter de deux façons : soit par des bactéries présentes sur l'épiderme du trayon qui colonisent le canal du trayon, soit par une migration ascendante de lait contaminé vers la glande mammaire. Cette dernière résulte la majorité du temps de pratiques de traite inadéquates. Par la suite, les bactéries se multiplient et gagnent la région supérieure de la mamelle. Les bactéries adhèrent aux cellules épithéliales des alvéoles et produisent des toxines. L'adhésion des bactéries favorise la migration des cellules inflammatoires tels les neutrophiles et les macrophages du sang vers le lait. Ce phénomène aurait plusieurs conséquences comme l'augmentation du comptage des cellules somatiques au niveau du lait, une diminution du système immunitaire de l'hôte et des dommages tissulaires. En finalité, les bactéries atteignent la membrane basale sous-épithéliale, se lient au fibrinogène ainsi qu'à des récepteurs cellulaires de l'hôte pour initier une infection de type chronique (Cucarella *et al.*, 2003).



## 1.7. Diagnostic

L'isolement de *Staphylococcus aureus* à partir du lait sur gélose au sang de mouton et l'identification à l'espèce sont relativement aisés. Après 24 heures d'incubation les colonies ont un diamètre de 2 à 5 millimètres, sont lisses et pigmentées (National mastitis council, 1999). La majorité des souches isolées de lait de vaches (95%) présentent une zone d'hémolyse (National mastitis council, 1999). À l'examen microscopique d'une lame colorée au Gram, les bactéries se présentent en amas et sont Gram positives (National mastitis council, 1999). Les *S. aureus* présentent des caractères positifs pour les tests de la catalase et de la coagulase ainsi que pour la production d'acétoïne (test de Voges-Proskauer) (National mastitis council, 1999). Ces critères suffisent généralement pour différencier *S. aureus* des autres staphylocoques coagulase positive isolés de lait de vache. Les systèmes de galerie API peuvent aussi être utilisés pour une identification plus poussée, mais peinent généralement à distinguer *S. aureus* de *S. intermedius* (Euzéby, 2006).

Toutefois, l'excrétion des *S. aureus* au niveau de la glande mammaire se fait de façon intermittente et en petit nombre, rendant l'isolement du pathogène parfois plus difficile. Différentes techniques ont été proposées pour contrer ce problème. Par exemple, il a été démontré qu'en augmentant l'inoculum de départ de 0.01ml à 0,1ml, les chances relatives d'isoler *S. aureus* de l'échantillon passaient de 78% à 90% respectivement (Lam *et al.*, 1996). Dinsmore *et al.* ont prouvé que le fait d'incuber à 35°C pour une période de 4 heures à 18 heures l'échantillon de lait avant l'ensemencement standard augmentait également les chances d'isoler l'agent pathogène en cause. Il a aussi été prouvé qu'un cycle de congélation décongélation permettait de retrouver 1,5 fois plus souvent *S. aureus* dans un échantillon de lait si comparé à l'ensemencement direct sur gélose (Vilanueva *et al.*, 1991). Enfin, l'ensemencement du culot résultant de la centrifugation de l'échantillon de lait augmenterait les chances d'isoler *S. aureus* de 86% (Zecconi *et al.*, 1997).

Les chances d'isoler *S. aureus* à partir d'échantillons de lait varient en fonction de son excrétion intermittente et de la quantité de bactéries par millilitre de lait (Silva *et al.*, 2005). Ce phénomène amène une grande frustration auprès des producteurs de lait qui paie pour des analyses de laboratoire qui ne leurs apportent pas toujours de

réponse (Silva *et al.*, 2005). Pour contrer ce problème, la compagnie 3M a développé un produit, le 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plates. Il s'agit de milieu de culture sélectif prêt à l'emploi, permettant l'isolement rapide de *S. aureus* ainsi que la numération des unités formant colonies à partir d'un échantillon de lait. Le milieu utilisé dans la fabrication des géloses Pétrifilm est le Baird-Parker chromogénique modifié qui est sélectif pour les staphylocoques. La confirmation à l'espèce de *S. aureus* se fait par l'ajout d'un disque de deoxyribonuclease avec colorant (Silva *et al.*, 2005). L'étude de Silva, *et al.* a permis de démontrer que la sensibilité de ce test pour l'isolement de *S. aureus* à partir d'échantillons de lait était de 87,5% lorsque comparé à la culture bactérienne. L'utilisation de ce test reste prometteuse pour l'utilisation dans certaines productions laitière aux prises avec *S. aureus*, mais certaines difficultés liées à l'utilisation et la lecture des géloses Pétrifilm restent à être standardisées (Silva *et al.*, 2005). De plus, un autre inconvénient est que l'identification à l'espèce se fait par la détection de la production de désoxyribonucléase par la bactérie. Hors, cela pourrait éventuellement engendrer des faux-positifs avec d'autres staphylocoques produisant cet enzyme, comme c'est le cas de *Staphylococcus hyicus*, qui cause à l'occasion des mammites chez les vaches laitières (Serge Messier, communication personnelle).

Il existe également d'autres tests rapides, comme les tests d'agglutination qui sont utilisés en médecine humaine (Zschock *et al.*, 2005). Ces tests se divisent en trois grandes générations. Dans la première, les tests comme le Staphylase-Test® de la compagnie Oxoid utilisent des érythrocytes de mouton sensibilisés au fibrinogène de lapin (Zschock *et al.*, 2005). Ceux de la deuxième génération, comme le Masta-Staph® (Mast Diagnostics) et le Staphyloslide Latex Test® (Becton Dickinson) contiennent des particules de latex recouvertes de fibrinogène d'origine humaine et de IgG (Zschock *et al.*, 2005). Enfin, la troisième génération regroupe des tests comme Staphytect-Plus® (Oxoid), Dry Spot Staphytect Plus® (Oxoid) ainsi que Slidex Staph Plus® (Biomérieux) basés sur la détection du fibrinogène, de la protéine A et de structures externes comme des polysaccharides de capsule propres à *S. aureus* (Zschock *et al.*, 2005). Dans leur étude, Zschock *et al.* ont testé ces 6 tests envers des souches de *S. aureus* isolées de lait de vaches. Parmi les 6 tests, le Masta-Staph a

obtenu la meilleure efficacité, avec une spécificité de 90,1% et une sensibilité de 86,7%. Il s'est aussi avéré que ces tests présentaient une moins grande performance sur les souches de *S. aureus* d'origine vétérinaire comparativement aux souches d'origine humaine.

Une autre façon de détecter la présence de *S. aureus* directement dans les échantillons de lait est la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Le principe de cette épreuve consiste à isoler l'ADN bactérien à partir du lait et de rechercher un gène spécifique à la bactérie ciblée. Dans le cas de *S. aureus*, le gène de choix est celui codant pour la thermonucléase, le gène *nuc*, qui est spécifique à cette espèce bactérienne (Baron *et al.*, 2004). Les avantages du PCR si on le compare à la culture bactérienne, sont qu'il est plus rapide et plus sensible. Il surpasse donc la culture bactérienne lorsque le compte bactérien est faible, lorsqu'il y a présence de résidus antibiotiques dans le lait ou encore lorsqu'il y a présence d'un grand nombre de leucocytes dans l'échantillon (Gillepsie *et al.*, 2005). Le domaine de la biologie moléculaire évolue très rapidement et on retrouve maintenant plusieurs variations de la technique PCR pour rechercher *S. aureus* dans les échantillons de lait. Ainsi, des PCR simples, au cours desquels uniquement *S. aureus* est recherché, ont été développés (Kim *et al.*, 2001 ; Yamagishi *et al.*, 2007 ; Kubota *et al.*, 2007). Il est également possible maintenant avec le PCR en temps réel de quantifier le nombre de bactéries dans l'échantillon de lait testé (Graber *et al.*, 2007). On retrouve également de PCR dits multiplex, car ils permettent de rechercher par un seul test plusieurs agents causals de la mammite dans un échantillon. On retrouve donc des combinaisons de PCR multiplex recherchant *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus* et *Escherichia coli* ou encore *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus uberis* (Chotar *et al.*, 2006 ; Phuektes *et al.*, 2003). Enfin, on retrouve aussi des PCR multiplex en temps réel recherchant à la fois *S. aureus*, *S. uberis* et *S. agalactiae* (Gillepsie *et al.*, 2005).

## **2. L'évolution de la résistance de *S. aureus* envers les antimicrobiens**

L'historique de l'évolution de l'antibiorésistance en médecine vétérinaire est très peu détaillé. La plupart des données de la littérature faisant état de ce phénomène sont

plutôt basées sur la médecine humaine. L'antibiorésistance est un sujet d'intérêt récent en médecine vétérinaire et est fortement lié à l'impact direct que cela peut avoir en médecine humaine. Toutefois, l'évolution rapide de la médecine vétérinaire a généré un intérêt accru sur ce sujet.

## 2.1. Situation en médecine humaine

En médecine humaine, l'arrivée de la pénicilline sur le marché en 1944 a créé une véritable révolution. Disponible sous forme de poudre applicable topiquement ou sous forme de solution à inhaler, ce nouvel antibiotique était utilisé pour diverses affections. Deux ans à peine après sa mise en marché, 6% des souches de *S. aureus* isolées dans les hôpitaux étaient résistantes à la pénicilline (Livermore, 2000; Lowy, 2003). En 1948, la proportion de souches résistantes était de 50% pour atteindre quelques années plus tard l'ordre des 80 à 90% (Livermore, 2000; Lowy, 2003). Bientôt, d'autres molécules prennent d'assaut le domaine médical : le chloramphénicol, les tétracyclines, l'érythromycine et la streptomycine (Livermore, 2000).

Dans les années soixante les pharmacologues tentent une nouvelle approche avec des antimicrobiens résistants aux pénicillinases produites par les staphylocoques. Les céphalosporines de première génération ainsi que la méthicilline font leur entrée sur le marché (Lowy, 2003). Les cas de *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM) ne tardent pas à apparaître et en 1961, moins d'un an suivant son introduction, des cas de SARM sont dénombrés dans les hôpitaux (Livermore, 2000; Lowy, 2003).

Dans les années soixante, la gentamicine est introduite et on constate l'émergence de souches de *S. aureus* multi-résistantes. Plus le temps passe, plus de nouvelles molécules apparaissent et plus la résistance aux antibiotiques chez les souches de *S. aureus* d'origine humaine est chose commune (Lowy, 2003). Dans les années 80, les quinolones sont utilisées pour contrer les infections causées par les bactéries à Gram négatif. Vu leur efficacité contre les Gram positif, les cliniciens les utilisent à grande échelle ce qui contribue à une pression sélective et au développement de résistance chez les *S. aureus* (Lowy, 2003). Si bien que dans les années 80-90, les seules options thérapeutiques disponibles pour traiter les cas de SARM demeurent des molécules de dernière ligne comme la vancomycine. Or dès 1997, les premiers cas de *S. aureus*

résistants à la vancomycine (VRSA) sont publiés (Livermore, 2000). Il reste donc très peu d'armes pour lutter contre ce type d'infection et la combinaison quinupristin/dalfopristin en fait partie (Livermore, 2000).

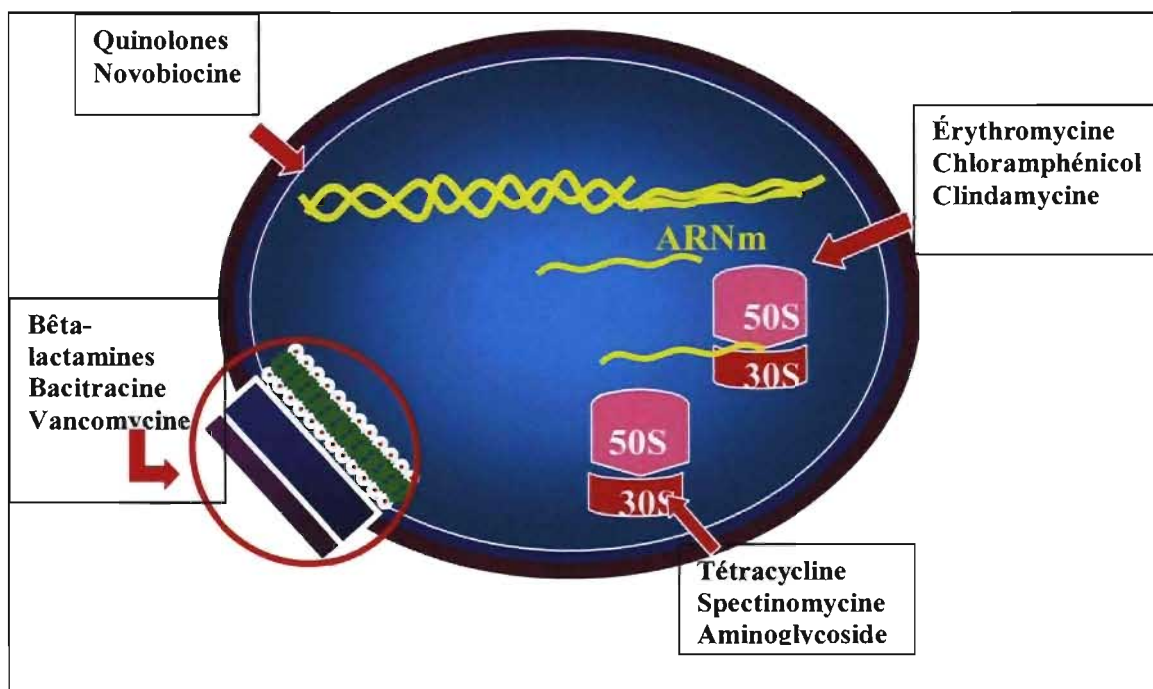
## **2.2. Situation en médecine vétérinaire**

Tout comme en médecine humaine, l'utilisation d'antimicrobiens en médecine vétérinaire peut contribuer au développement de la résistance chez les bactéries (Lowy, 2003). Ce phénomène est d'autant plus inquiétant lorsqu'il touche des bactéries d'origine animale transmissibles à l'humain (Teuber, 2001). Durant les 50 dernières années, plus de 50% de la masse totale d'antibiotiques utilisés provenait des pratiques vétérinaires et de l'agriculture (Teuber, 2001). L'utilisation d'antibiotiques à doses suboptimales comme promoteur de croissance et l'usage massif en prophylaxie ont contribué à la mauvaise perception que l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire participait à l'émergence de l'antibiorésistance (Teuber, 2001). De plus, puisque de nombreux antibiotiques sont utilisés en médecine humaine et en médecine vétérinaire, cela ne fait que renforcer l'hypothèse de l'implication de la médecine vétérinaire dans ce phénomène d'antibiorésistance (Teuber, 2001). Une analyse du risque publiée en 2004 mentionne que le risque potentiel de transmission d'antibiorésistance des animaux vers les humains est surtout lié aux bactéries ayant un potentiel zoonotique élevé telles les *Campylobacter* spp. et les *Salmonella* spp (Helmuth *et al.*, 2004). D'un autre côté, on voit maintenant des cas de SARM et de *S. intermedius* multi-résistants chez des éleveurs d'animaux de la ferme et des propriétaires d'animaux domestiques pour lesquels le sens de la transmission de la bactérie n'est pas complètement élucidé (Huijsdens *et al.*, 2006 ; Juhasz-Kaszanyitzky *et al.*, 2007 ; Guardabassi *et al.*, 2004).

## **3. Les différentes classes d'antimicrobiens, leurs mécanismes d'action et les stratégies de résistance développées par les *S. aureus***

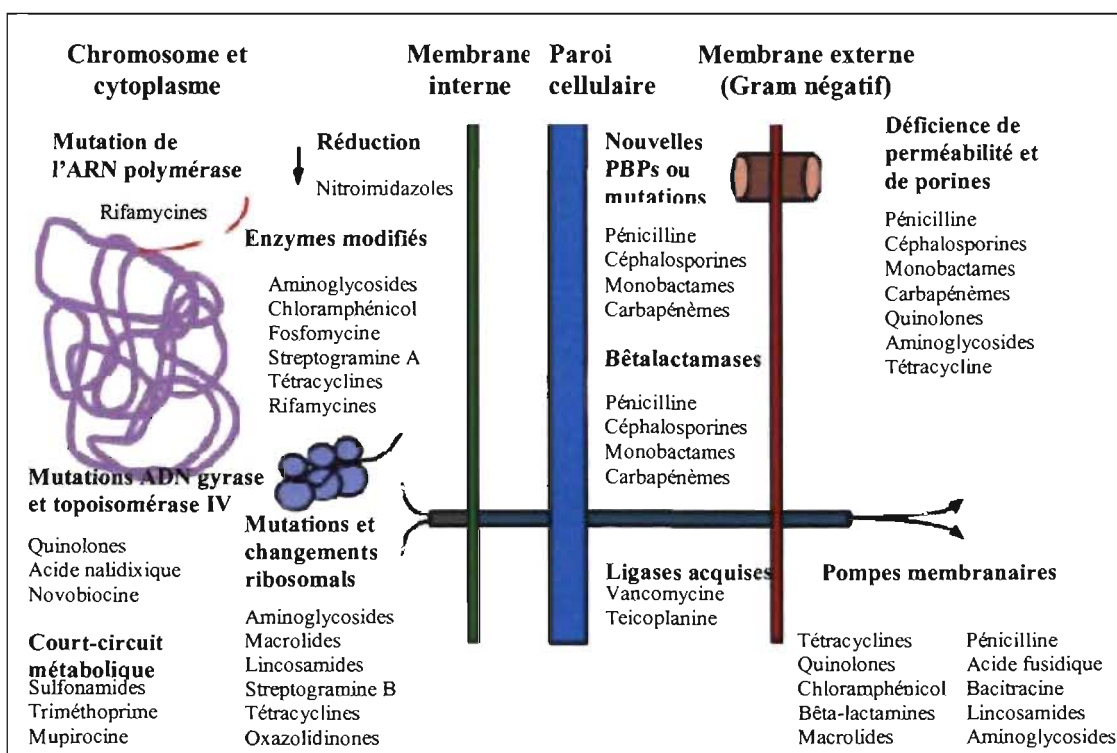
Les molécules antimicrobiennes ciblent différentes composantes de l'organisme bactérien afin d'exercer une action bactéricide ou bactériostatique. Par exemple, la

pénicilline, de par son action sur la paroi cellulaire, agit de façon bactéricide. La tétracycline quant à elle, est plutôt bactériostatique en empêchant la synthèse protéique en agissant sur la sous unité 30S ribosomale.



**Figure 1.** Sites d'action des différents antimicrobiens. Afin d'exercer leur action, les différentes classes d'antimicrobiens agissent sur divers constituants de la cellule bactérienne. Par exemple, les bêta-lactamines, la bacitracine et la vancomycine vont agir en empêchant la synthèse de la paroi bactérienne. Les quinolones et la novobiocine agissent plutôt au niveau du superenroulement de l'ADN bactérien. La synthèse protéique est aussi une cible de choix, soit par des antimicrobiens agissant au niveau de la sous-unité 30S du ribosome (tétracycline, spectinomycine, aminoglycosides) ou de la sous-unité 50S du ribosome (érythromycine, chloramphénicol, clindamycine).

Pour échapper aux différents mécanismes d'action des antimicrobiens, les bactéries doivent utiliser différentes stratégies. Par exemple, certains microorganismes ont développé des pompes à efflux situées au niveau de la membrane cellulaire qui



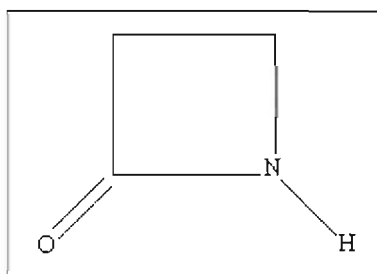
**Figure 2.** Stratégies développées par les *S. aureus* pour résister aux antimicrobiens d'après (Sundsford *et al.*, 2004) En fonction du mécanisme d'action de la molécule antimicrobienne, les bactéries ont développé des modes de résistance. Par exemple, des pompes situées au niveau de la de la membrane permettent aux bactéries de diminuer le gradient intracellulaire en antimicrobien, en diminuant ainsi l'efficacité. Un autre moyen de résister aux antibiotiques est de modifier les sites d'action de ceux-ci. Les bactéries résistent aussi en rendant leur membrane non perméable aux molécules antimicrobiennes. Il y a aussi la production d'enzymes comme les bêta-lactamases qui agissent directement au niveau de la molécule antimicrobienne et la rendent inactive.

expulsent la molécule antimicrobienne à l'extérieur de la bactérie, diminuant ainsi la concentration intracellulaire en antimicrobien et de par le fait même, l'action de celui-ci. D'autres, suite à des mutations, transforment le site de fixation de la molécule

antibiotique. Ne pouvant plus se fixer, l'antibiotique ne peut donc plus agir (Sundsford *et al.*, 2004).

### 3.1. Bêta-lactamines

La famille des bêta-lactamines comprend plusieurs classes d'antibiotiques. Parmi elles se trouvent les pénicillines, les céphalosporines, les carbapenems, les monobactams et les penems (hybrides entre les pénicillines et les céphalosporines. Ces antimicrobiens ont tous une structure en commun : l'anneau  $\beta$ -lactame (voir figure 3) (Poole, 2004).



**Figure 3.** Structure du noyau  $\beta$ -lactame. Schématisation de la structure chimique du noyau bêta-lactame. Cette structure est commune à tous les membres de la famille des bêta-lactamines. C'est aussi cette structure qui est ciblée par les bêtalactamases, des enzymes élaborés par les *S. aureus*. L'action de

ces enzymes rendent les antimicrobiens des certaines classes de cette famille inactifs contre les *S. aureus*.

Premier antibiotique découvert, la pénicilline est produite par le champignon *Penicillium notatum* et est utilisée de façon courante depuis les années 50. Depuis sa mise en marché, de nombreuses autres molécules ont vu le jour et font partie de la famille des bêta-lactamines. Certains de ces antibiotiques ont été créés dans le but d'élargir le spectre d'action en étant plus efficaces aux mécanismes de résistance des bactéries (Poole, 2004).

#### 3.1.2. Mécanisme d'action des bêta-lactamines

Ces antibiotiques interviennent au niveau de la phase terminale de la formation de la paroi peptidoglycane. Ils inhibent l'action des PBPs («penicillin-binding-proteins») qui sont des transpeptidases, endopeptidases et des carboxypeptidases qui construisent les liens entre les unités de polymère de glycopeptides. L'action des bêta-lactamines sur les bactéries à Gram positif n'est pas seulement de prévenir les liens entre les peptidoglycanes, mais elle contribue également au relâchement de l'acide lipotéichoïque, ce qui conduit à des enzymes autolytiques participant à



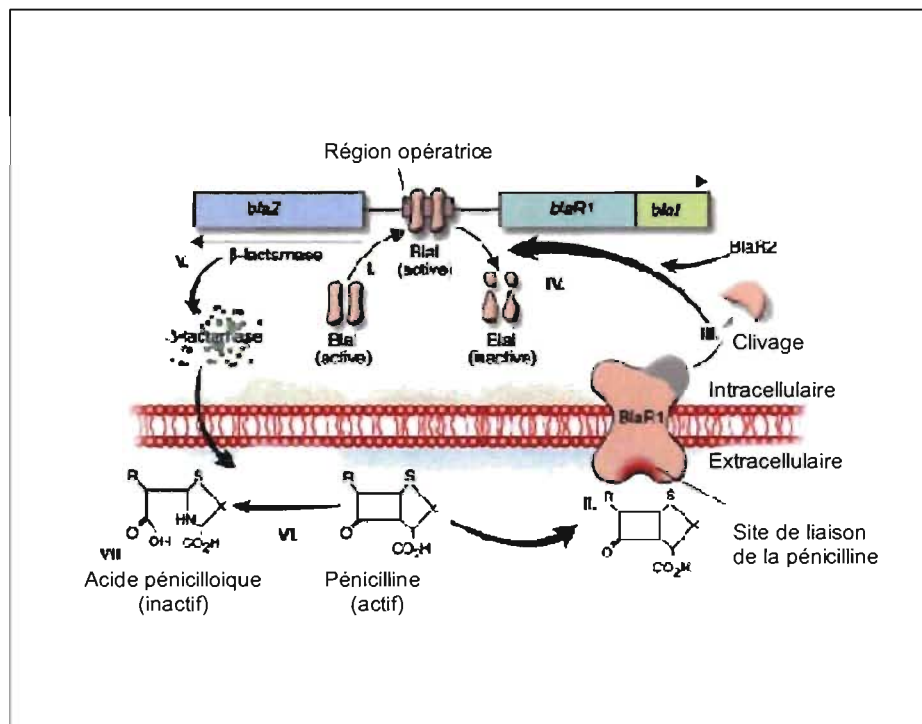
l'action bactéricide. Le mode d'action exact demeure inconnu (Poole, 2004). Cette famille d'antibiotiques possède donc une action bactéricide et par conséquent, n'est active que contre les bactéries en phase de croissance qui activement synthétisent du peptidoglycane de la paroi cellulaire.

### **3.1.3. Spectre d'action des bêta-lactamines**

L'efficacité de l'action des molécules faisant partie des bêta-lactamines dépend de différents aspects : leur affinité pour les différentes PBPs qui sont les récepteurs des bêta-lactamines, le contenu relatif de la paroi en peptidoglycanes (nettement plus élevé chez les bactéries à Gram positif versus à Gram négatif), la capacité de la molécule à traverser la membrane externe des bactéries à Gram négatif, et finalement, la résistance aux différents types de bêta-lactamases produites par les bactéries (Prescott, 2006).

### **3.1.4. Mécanismes de résistance des *S. aureus* vis-à-vis les bêta-lactamines**

La résistance aux bêta-lactamines chez les *Staphylococcus* est principalement relié à la production de bêta-lactamases, et de façon secondaire à l'altération des PBPs et ou à l'acquisition de nouvelles PBPs (Werckenthin, 2001). Les souches de *S. aureus* résistantes aux pénicillines produisent des enzymes appelées pénicillinases qui font partie de la famille des bêta-lactamases. Lorsque cette enzyme est produite, il y a hydrolyse et destruction des liens amides du noyau  $\beta$ -lactame de la molécule qui devient alors inefficace. Selon leurs séquences d'ADN, les gènes codant pour les bêta-lactamases sont divisées en 4 classes, appelées les classes Ambler, allant de A à D. Elles peuvent également être divisées en 4 groupes selon le phénotype d'antibiorésistance qu'elles engendrent. Un de ces 4 groupes est quant à lui divisé en 8 sous-groupes, selon le schéma élaboré par Bush (Werckenthin, 2001). Chez *S. aureus*, le gène codant pour la production de bêta-lactamases est *blaZ*. Les représentants des classes A, C et D sont des constituants du transposon Tn552 situé sur un plasmide de grande taille alors que ceux de la classe B sont situés sur un chromosome (Werckenthin, 2001 ;Malik *et al.*, 2007).



**Figure 4.** Induction de la synthèse des bêta-lactamases chez les *S. aureus* sous l'effet de la pénicilline. (Lowy, 2003) I. La protéine liant l'ADN BlaI se fixe à la région opératrice, empêchant la transcription de l'ARN par *blaZ* et *blaR1-blaI*. En absence de la pénicilline, les bêta-lactamases sont produites à de faibles niveaux. II. La liaison de la pénicilline au capteur transmembranaire BlaR1 stimule l'activation autocatalytique de BlaR1. III-IV. Une fois actif, BlaR1 clive, soit directement, soit indirectement via une seconde protéine BlaR2, BlaI en fragments inactifs, permettant l'initiation de la transcription de *blaZ* et *blaR1-blaI*. V-VII. Les bêta-lactamases, enzymes extracellulaires codés par *blaZ*, hydrolysent l'anneau bêta-lactame de la pénicilline, la rendant ainsi inactive.

Le gène *blaZ* est en général lié à d'autres gènes de résistance. Deux gènes régulateurs, l'anti-répresseur *blaR1* et le répresseur *blaI* contrôlent l'expression du gène *blaZ*. Ces deux gènes codent pour des protéines de régulation soient BlaR1 et BlaI. La protéine BlaR1 est un récepteur transmembranaire qui, suite à une

exposition à la pénicilline ou à ses dérivés, va s'auto-clivé (Figure 4). Le mécanisme n'est pas complètement compris et d'autres protéines jouent peut-être un rôle dans la régulation du gène *blaZ* (Lowy, 2003). Ce mode de résistance est valide pour toutes les pénicillines sensibles à l'action des pénicillinases (pénicilline G, ampicilline, amoxicilline etc.). Par contre, le mécanisme de résistance est différent chez les *S. aureus* résistants à la méthicilline, les SARM.

### **3.1.5. Méthicilline**

En 1961, la méthicilline est la première pénicilline semi-synthétique à envahir le marché. Tout comme les autres molécules du groupe des bêta-lactames, elle agit en liant les PBPs (transpeptidases et carboxypeptidases), des enzymes impliquées dans la synthèse des peptidoglycanes. Toutefois, des chaînes latérales volumineuses la protègent de l'action des bêta-lactamases produites par les staphylocoques, ce qui lui procure un avantage (Prescott, 2006).

### **3.1.6 Mécanismes de résistance des *S. aureus* contre la méthicilline**

Les *S. aureus* possédant le gène *mecA* qui code pour la protéine «penicillin binding protein 2a» (PBP2a) sont résistants à la méthicilline. Lorsqu'elles sont produites, les PBP2a remplacent les PBPs au niveau du peptidoglycan de la paroi bactérienne. Ayant moins d'affinité que les PBPs aux  $\beta$ -lactamines, les PBP2a permettent aux *S. aureus* de survivre et donc de résister à des grandes concentrations de tous les antibiotiques de cette classe (Prescott, 2006).

Le gène *mecA* qui code pour la résistance à la méthicilline, est situé sur un élément génétique mobile nommé «staphylococcal cassette chromosome» mec (SCCmec) (Werckenthin, 2001). Le transfert horizontal du gène *mecA* se produit d'un SARM à un *S. aureus* exempt, mais il semble y avoir des restrictions spécifiques à l'hôte pour la stabilité et le maintien du gène chez les staphylocoques, ce qui pourrait expliquer le faible nombre de clones (Poole, 2004). Les poids moléculaires de ces îlots génomiques varient entre 21 et 67 kb. Plusieurs gènes de résistance à d'autres antimicrobiens se retrouvent dans ces îlots et sont associés au SCCmec (Lowy, 2003). Les souches de SARM sont donc la plupart du temps résistantes aux  $\beta$ -lactamines,

aux aminoglycosides, aux macrolides et aux tétracyclines. La rifampine ainsi que les quinolones et la combinaison triméthoprime-sulfaméthoxazole sont quant à eux généralement efficaces *in vitro* face aux SARM (Prescott, 2006).

## 3.2. Quinolones et fluoroquinolones

Ce groupe d'antimicrobiens est constitué entièrement de molécules synthétiques. En 1965, l'acide nalidixique est le premier antibiotique de la classe des quinolones à être commercialisé (Walker *et al.*, 2006). Par la suite des fluoroquinolones ont été produites avec des spectres d'action plus larges et des effets secondaires moindres. En 1986, la norfloxacin avec un spectre plus large est introduite sur le marché (Walker *et al.*, 2006). Les quinolones sont divisées en 4 générations. L'acide nalidixique, le ciprofloxacine, l'enrofloxacine, l'orbifloxacine, le difloxacine, le danofloxacine, le sarafloxacine et le marbofloxacine sont des molécules utilisées en médecine vétérinaire (Walker *et al.*, 2006). Aucun représentant de la quatrième génération n'est commercialisé pour un usage vétérinaire (Walker *et al.*, 2006).

### 3.2.1. Mécanisme d'action des quinolones et des fluoroquinolones

L'ADN gyrase est une topoisomérase composée de deux sous-unités A et deux sous-unités B, dont les gènes codant sont respectivement les gènes *gyrA* et *gyrB*. Les sous-unités GyrA se lient à l'ADN alors que les sous-unités GyrB sont des ATPases. Le rôle principal de l'ADN gyrase est de permettre le surenroulement de l'ADN, ce qui permet une réduction de l'espace occupé par l'ADN dans la cellule (Schmitz *et al.*, 2002).

Depuis 1990, le rôle de l'enzyme topoisomérase IV est bien reconnu. Il s'agit également d'un hétérotétramère composé de deux sous-unités PAR C et deux sous-unités PAR E codées respectivement par les gènes *parC* et *parE*. *Staphylococcus aureus* constitue une exception à la règle puisque les gènes codant pour ces sous-unités sont les *grrA* et *grrB*. Ces sous-unités sont des homologues des sous-unités GYR A et GYR B. La topoisomérase IV permet le déroulement des brins d'ADN (Fluit *et al.*, 2001).

Les fluoroquinolones inhibent l'activité enzymatique des topoisomérases en interagissant avec le complexe gyrase-ADN ce qui se conclut en l'inactivation de la gyrase. Leur action est semblable pour ce qui est de la topoisomérase IV. Les quinolones vont inhiber de manière sélective la réplication de l'ADN bactérien. Cela n'explique pas la mort cellulaire qui s'en suit. Ce phénomène serait expliqué par le relâchement de morceaux d'ADN par les complexes quinolones-enzyme-ADN. Chez les *S. aureus*, il semble que la topoisomérase IV soit une cible de choix pour les fluoroquinolones contrairement aux *Escherichia coli* chez qui l'ADN gyrase est plus visée (Fluit *et al.*, 2001; Lowy, 2003).

### **3.2.2. Mécanismes de résistance des *S. aureus* face aux quinolones et fluoroquinolones**

Chez les *S. aureus* résistants aux fluoroquinolones, plusieurs mutations chromosomales au niveau des gènes codant pour la topoisomérase IV et ADN gyrase ont été identifiées. Ces mutations entraînent une diminution de l'affinité des fluoroquinolones pour les sites cibles. De plus, des pompes à efflux NorA multidrogues peuvent contribuer à la résistance clinique. Les souches exprimant cette pompe ont de faibles niveaux de résistance aux fluoroquinolones (Fluit *et al.*, 2001; Lowy, 2003). Contrairement à la situation chez les humains, très peu de choses sont connues sur les séquences des gènes et les mutations chez les staphylocoques d'origine animale. Il semble que le gène *gyrA* présent chez certains *S. intermedius* et *S. hyicus* diffère de celui retrouvé chez *S. aureus* et plus de recherches seront nécessaires pour identifier les mutations de ces gènes chez les staphylocoques d'origine animale (Werckenthin, 2001). Il faut donc recourir au séquençage pour détecter ces mutations. En médecine humaine, où on a répertorié par analyse des séquences ADN plusieurs mutations, la technologie de la puce à ADN permet d'identifier les mutations connues (Strommenger, 2006).

### **3.3. Aminoglycosides**

Les aminoglycosides sont un groupe d'antibiotiques bactéricides efficaces uniquement contre les bactéries aérobies ainsi que les mycoplasmes. Certaines de ces molécules sont aussi efficaces contre les *Pseudomonas* spp. De 1944 à 1975,

plusieurs antimicrobiens ont envahi le marché : streptomycine, néomycine, kanamycine, gentamicine, tobramycine, sisomicine, amikacine, netilmicin. Cependant la résistance accrue chez les bactéries et la grande toxicité de certains aminoglycosides diminuent leur utilisation. En pratique bovine, la dihydrostreptomycine est utilisée en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens sous forme d'infusion intra-mammaire.

### **3.3.1. Mécanisme d'action des aminoglycosides**

Afin d'exercer son action bactéricide, l'antibiotique doit tout d'abord traverser les membranes externe et cytoplasmique. Cela s'effectue par 2 modes différents, le premier étant un transport oxydatif actif et le second, une diffusion passive. Le transport oxydatif s'effectue uniquement sous conditions aérobies. Une fois à l'intérieur du cytoplasme, l'antibiotique se lie à une cible située sur la sous unité ribosomale 30S. Cette liaison interfère avec la traduction de l'ARNm en protéines induisant donc une erreur de traduction. La production d'acides aminés est alors faussée et il y a arrêt de la synthèse protéique. D'autres effets sont aussi présents, comme l'interférence avec le transport cellulaire d'électrons, l'induction d'une panne d'ARN, l'inhibition de la traduction, des effets sur le métabolisme de l'ADN et des dommages cellulaires. L'effet bactéricide est une conséquence de la lecture faussée des protéines causant l'incorporation de ces protéines anormales dans la membrane cytoplasmique entraînant la formation de canaux membranaires anormaux et altération de la membrane (Dowling, 2006).

### **3.3.2. Mécanisme de résistance des *S. aureus* aux aminoglycosides**

Les bactéries résistent aux aminoglycosides par le biais d'enzymes modifiant les groupements hydroxyles et amines de ces antibiotiques. À ce jour, plus de 50 de ces enzymes ont été caractérisées (Dowling, 2006). Tout dépendant des modifications qu'elles induisent, ces enzymes souvent portées par des intégrons, se classent dans les aminoglycosides acétyltransférases (AAC), aminoglycoside adényltransférases (ANT) et aminoglycosides phosphotransférases (APH). Les premières modifient le groupement amines et les deux dernières le groupement hydroxyl. En plus de ces enzymes, d'autres mécanismes de résistance comme les pompes à efflux et des

mutations de l'ARNr existent (Fluit *et al.*, 2001). La nomenclature des gènes impliqués dans la résistance aux aminoglycosides et aminocyclitols a été sujette à de nombreux changements (Werckenthin, 2001). Quatre gènes différents ont été retrouvés chez les staphylocoques d'origine animale.

Chez les *S. aureus* plus spécifiquement, le principal moyen de résistance est la synthèse d'enzymes modifiants. La résistance à la gentamicine, tobramycine et kanamycine est médiée par le gène *aac(6')-Ie+aph(2'')* qui code pour une enzyme bifonctionnelle ayant un effet AAC(6') et APH(2''). Ce gène est situé sur un transposon, le Tn4001. Des Tn4001-like sont retrouvés autant chez les *S. aureus* que chez les *Staphylococcus* spp. Le Tn4001 se retrouve sur différents plasmides ainsi qu'à différents emplacements chromosomiaux. La résistance à la néomycine, kanamycine et tobramycine et à l'amikacine est médiée par l'enzyme ANT(4')-I codée par le gène *ant(4')-Ia*. Ce gène est retrouvé sur des plasmides de faibles poids moléculaires et parfois en combinaison avec le gène *mecA*. Finalement, la résistance pour la néomycine et la kanamycine est également médiée par une enzyme APH(3')-III codée par le gène *aph(3')-IIIa* situé sur un chromosome et sur un plasmide (Fluit *et al.*, 2001).

### 3.4. Tétracyclines

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques utilisés en première ligne qui possèdent un large spectre d'action. Ce groupe est composé de molécules naturelles issues du champignon *Streptomyces*, et inclus des molécules telles que chlortétracycline, oxytétracycline et tétracycline et d'autres, semi synthétiques, comme la doxycycline et la minocycline. En médecine vétérinaire, plus particulièrement chez les animaux de production et la volaille, les tétracyclines ont été utilisées abondamment comme promoteurs de croissance. Les doses sous optimales employées à cette fin ont favorisé le développement de résistance chez les bactéries, plus particulièrement chez les bactéries à Gram négatif. Elles sont également utilisées en prophylaxie dans les grandes populations animales (Giguère, 2006).

### 3.4.1. Mécanisme d'action des tétracyclines

La molécule traverse la membrane externe de la cellule bactérienne par diffusion passive pour être ensuite acheminée par un mécanisme de transport actif à travers la membrane cellulaire interne. Une fois à l'intérieur de la bactérie, les tétracyclines se lient de façon réversible à la sous unité 30S ribosomale. L'effet bactériostatique des tétracyclines réside dans la réversibilité de cette liaison. Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en empêchant l'association de l'ARN aminoacyltransférase avec le ribosome au niveau du site accepteur du complexe ARNm-ribosome (Giguère, 2006; Chopra, 2001).

### 3.4.2. Mécanisme de résistance des *S. aureus* envers les tétracyclines

La résistance est souvent de type plasmidique et interfère avec le transport actif de la molécule de tétracycline à travers la membrane interne de la cellule. Il y a également des systèmes de pompes à efflux et de protéines cytoplasmiques de protection du ribosome qui sont présents. Il y a 29 gènes *tet* (tétracycline) et 3 gènes *otr* (oxytétracycline) de répertoriés jusqu'à maintenant (Chopra, 2001). Sur ce nombre, 18 gènes *tet* et 1 *otr* codent pour des pompes à efflux alors que 7 gènes *tet* et 1 *otr* codent pour des protéines de protection du ribosome. Les pompes à efflux sont des protéines associées à la membrane qui exportent les tétracyclines à l'extérieur de la cellule bactérienne. Cela diminue la concentration intracellulaire en antibiotiques et protège le ribosome. La majorité de ces pompes fonctionnent avec les tétracyclines, mais peu avec les minocyclines. Les pompes à efflux ont été divisées en 6 catégories selon leurs séquences d'acides aminés. Plus particulièrement chez les *S. aureus*, on retrouve le gène *tetK* qui code pour une pompe à efflux faisant partie du groupe 2. Lors d'expression de ce gène, il y a souvent un phénotype de résistance à la tétracycline mais pas à la minocycline. Le gène *tetK* est communément localisé sur plusieurs copies de petits plasmides de 4.3 à 4.7 kbp qui sont structurellement reliés et qui ne possèdent pas d'autres gènes de résistance (Werckenthin, 2001).

*Staphylococcus aureus* possède également un autre gène de résistance aux tétracyclines, le gène *tetM*, qui code pour une protéine de protection du ribosome. Cette dernière fait partie de protéines cytoplasmiques qui sont au nombre de 9 et qui



protègent le ribosome de l'action des tétracyclines et qui confèrent une résistance à la doxycycline et à la minocycline. Les auteurs croient que ces protéines se fixent au ribosome en changeant ainsi la conformation de celui-ci, empêchant alors la liaison avec les tétracyclines mais n'affectant pas la synthèse protéique (Chopra, 2001). Le gène *tetM* est souvent localisé sur des transposons conjugués provenant d'entérocoques, comme le Tn916 et le Tn1545. Le gène *tetM* apparaît comme étant le second gène de résistance aux tétracycline en importance chez les staphylocoques d'origine animale (Werckenthin, 2001). La résistance à la tétracycline chez les *S. intermedius* est presque exclusivement reliée à la présence de *tetM* (Werckenthin, 2001).

### **3.5. Macrolides et lincosamides**

Les macrolides et les lincosamides font partie avec les streptogramides d'un groupe d'antibiotiques communément nommé MLS. Les lincosamides comprennent la lincomycine, la clindamycine et la pirlimycine alors que chez les macrolides, l'érythromycine est plus souvent utilisée en médecine vétérinaire. Ce sont tous des produits disponibles de façon commerciale pour le traitement des infections intramammaires chez les vaches laitières. Cependant, certains d'entre eux ont été utilisés à grande échelle comme promoteur de croissance au niveau de l'alimentation des animaux de consommation (Lina *et al.*, 1999; Giguère, 2006).

#### **3.5.1. Mécanisme d'action des macrolides et lincosamides**

Au niveau structural, ces molécules sont différentes mais elles partagent de nombreuses homologues au niveau fonctionnel. Elles sont bactériostatiques et se fixent à la sous-unité 50S ribosomale au niveau de l'ARN ribosomal 23S. Ils inhibent ainsi la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 50S du ribosome en empêchant la peptidyltransférase d'agir sur l'élongation du peptide en cours de synthèse.

#### **3.5.2. Spectre d'action des macrolides et lincosamides**

Le spectre d'action de ces antibiotiques se confine surtout aux bactéries à Gram positif et aux mycoplasmes. Les bactéries à Gram négatif sont pour la plupart intrinsèquement résistantes aux MLS en raison de l'imperméabilité de la membrane

externe à ces molécules hydrophobes et aussi à cause de la méthylation du site cible sur le ribosome (Giguère, 2006; Fluit *et al.*, 2001).

### **3.5.3. Mécanisme de résistance des *S. aureus* envers les macrolides et lincosamides**

Il existe un mécanisme de résistance d'origine chromosomale et un autre plus fréquent et plus stable, c'est-à-dire d'origine plasmidique. Chez les bactéries à Gram positif, il existe 3 modes de résistance connus aux MLS. Le premier résulte de l'effet de l'enzyme adénine- $N^6$ -méthyltransférase qui entraîne des modifications post-transcriptionnelles du 23S rRNA. Le site affecté est le récepteur des MLS, donc celles-ci ne peuvent plus se fixer et agir. Ce type de modification entraîne une résistance croisée pour tous les antimicrobiens de cette classe et demeure le plus fréquemment rencontré. Les gènes codant pour ces enzymes sont les gènes *erm* («erythromycin ribosome methylation»), et ce sont *ermA* et *ermC* qui sont les plus souvent rencontrés chez *S. aureus*. Chez les *S. aureus*, la résistance aux MLS peut être constitutive, résistance à toutes les molécules du groupe, ou inductible, résistance aux macrolides uniquement. Un deuxième type de résistance aux MLS est constitué des pompes à efflux. Chez les *S. aureus*, les gènes *msrA* et *msrB* sont les principaux codant pour des pompes à efflux et sont portés par un plasmide. Ces gènes confèrent de la résistance aux macrolides ainsi qu'aux streptogramines de type B. D'autres gènes comme le *linA*, ont été identifiés chez les *S. aureus* et codent pour des nucléotidyltransférases conférant de la résistance aux lincosamides (Giguère 2006; Fluit *et al.*, 2001). Le gène *msrA* codant pour une pompe à efflux a rarement été détecté chez des staphylocoques d'origine animale, mais a été rapporté comme étant le troisième mode de résistance le plus fréquent après *ermA* et *ermC* chez des *Staphylococcus* d'origine humaine (Werckenthin, 2001).

### **3.6. Novobiocine**

La novobiocine est un dérivé de la coumarine et produite par un champignon *Streptomyces* (Dowling, 2006). Cet antimicrobien bactériostatique est utilisé en pratique bovine en combinaison avec la pénicilline pour le traitement intra-mammaire au tarissement (Dowling, 2006).

### **3.6.1. Mécanisme d'action de la novobiocine**

La novobiocine inhibe la réplication de l'ADN en inactivant la sous-unité bêta de l'ADN gyrase, ce qui a pour conséquence d'empêcher le superenroulement en empêchant la fixation de l'adénosine triphosphate sur la sous-unité bêta de l'ADN gyrase (Dowling, 2006).

### **3.6.2. Mécanisme de résistance des *S. aureus* envers la novobiocine**

Des mutations chromosomales conférant de la résistance à la novobiocine et pouvant être induite *in vitro*, ont été rapportées lors de traitement intra-mammaire selon Dowling (2006), mais peu de données sont disponibles à ce sujet dans la littérature.

## **3.7. Triméthoprime/sulfaméthaxazole**

Lorsque utilisés seuls, les antimicrobiens de la classe des sulfonamides, comme le sulfaméthaxazole, ne sont pas très efficaces, car une grande majorité des bactéries ont développées de la résistance envers ces antimicrobiens. Toutefois, couplés à une autre molécule, comme dans la combinaison triméthoprime/sulfaméthaxazole, les sulfonamides sont protégés et peuvent exercer leur action. En pratique bovine, la combinaison triméthoprime/sulfaméthaxazole est utilisée dans le traitement des infections systémiques comme dans le cas des mammites aiguës à *S. aureus* (Prescott, 2006).

### **3.7.1. Mécanisme d'action de la combinaison triméthoprime/sulfaméthaxazole**

Les sulfonamides empêchent de manière compétitive l'incorporation de l'acide para-aminobenzoïque (PABA) dans la molécule ptéroylglutamique de l'acide folique résultant en l'inhibition de la synthèse de l'acide folique au niveau de la cellule bactérienne. Plus précisément, ces agents antimicrobiens compétitionnent avec la PABA pour l'enzyme dihydroptéroate synthétase. Tout comme les bactéries, les cellules mammifères ont besoin de l'acide folique à la différence que ces dernières utilisent de l'acide folique préformée alors que les cellules bactériennes doivent la synthétiser par elles-mêmes. Cela explique la spécificité d'action des sulfonamides sur les cellules bactériennes (Prescott, 2006).

Le triméthoprime fait partie du groupe des diaminopyrimidines et empêche la production d'acide folique en se combinant à l'enzyme dihydrofolate réductase des bactéries. Il agit donc au même niveau que les sulfonamides en prévenant la synthèse des purines, et par conséquent de l'ADN (Prescott, 2006).

La combinaison du triméthoprime et du sulfaméthaxazole produit une synergie et prévient le développement rapide de la résistance chez les bactéries. Cette combinaison possède un spectre d'action large, mais est inactif en présence de tissus nécrotiques (Prescott, 2006).

### **3.7.2. Mécanisme de résistance des *S. aureus* envers la combinaison triméthoprime/sulfaméthaxazole**

La résistance aux sulfonamides chez les *S. aureus* est souvent le résultat d'une surproduction d'acide *p*-aminobenzoïque. Cette surproduction serait due à une mutation d'origine chromosomale sur le gène *sulA* (Werckenthin, 2001). La résistance au triméthoprime est quant à elle liée à la production de dihydrofolate réductase ayant une affinité réduite pour l'antibiotique et codée par les gènes *drfA* et *drfB*. Le gène *drfA* est situé sur le transposon Tn4003 faisant partie d'un plasmide de grande taille (Werckenthin, 2001).

## **4. Méthodes de détection de la résistance aux antibiotiques chez *S. aureus* et résultats d'études antérieures**

Il existe deux grandes catégories des tests permettant de détecter la résistance aux antibiotiques chez les bactéries, soient les tests phénotypiques et les tests génotypiques. Le tableau 1 résume les principaux avantages et inconvénients des méthodes phénotypiques et génotypiques (Cockerill, 1999; Sundsfjord, *et al.*, 2004).

Tableau 1. Principaux avantages et inconvénients des méthodes phénotypiques et génotypiques. D'après Cockerill, 1999 et Sundsfjord *et al.*, 2004.

|                               | <b>Avantages</b>   | <b>Inconvénients</b>  |
|-------------------------------|--|---|
| <b>Méthodes phénotypiques</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Standards du CLSI.</li> <li>-Détece tous les types de résistance.</li> <li>-Donne des valeurs de sensibilité en plus d'indiquer la résistance.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Requiert la culture de bactéries avant d'effectuer les tests.</li> <li>-Dépendant de l'expression du phénotype.</li> <li>-Population hétérogène.</li> <li>-Fastidieux.</li> </ul>   |
| <b>Méthodes génotypiques</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Directement à partir des spécimens</li> <li>-Rapidité</li> <li>-Détece le génotype.</li> <li>-Applicable aux bactéries fastidieuses.</li> <li>-Biosécurité élevée.</li> <li>-Détece des niveaux de résistance imperceptibles par les tests conventionnels.</li> <li>-Bon outil épidémiologique</li> <li>-Méthodes de référence.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Plusieurs types d'analyses pour différents gènes.</li> <li>-Ne détece que les mécanismes de résistance connus.</li> <li>-Contamination peut donner des faux-positifs.</li> <li>-Il n'existe pas de standard.</li> <li>-Gènes silencieux qui causent des faux-positifs.</li> <li>-Indique la résistance seulement ; ne donne aucune donnée quant à la sensibilité de la bactérie.</li> </ul> |

## 4.1. Méthodes phénotypiques

La littérature scientifique offre plusieurs articles traitant de l'antibiorésistance chez les *S. aureus* isolés de lait de vaches (Pengov *et al.*, 2003 ;Shitandi, 2004 ;Thorsberry, *et al.*, 1993 ;Sabour *et al.*, 2004 ;Owens *et al.*, 1997 ;Tenhagen *et al.*, 2006 ; Moroni *et al.*, 2006 ;Vintov *et al.*, 2003 ;Salmon *et al.*, 1998 ; De Oliveira *et al.*, 2000 ; Gentilini *et al.*, 2000 ;Yoshimura, 2002 ;Bennedsgaard *et al.*, 2006). Dans ces études, les patrons de résistance retrouvés chez les *S. aureus* isolés de lait de vache divergent entre eux. L'utilisation de différentes techniques dans ces études rend l'interprétation et la comparaison difficiles d'une étude à l'autre (Erskine *et al.*, 2004 ;Schlegelova *et al.*, 2001). Un autre facteur influençant les données réside dans les critères d'interprétation utilisés dans chacune des études pour établir le classement des souches comme étant sensibles, intermédiaires ou résistantes à un antimicrobien donné (Erskine *et al.*, 2004 ; Schlegelova *et al.*, 2001). Avant 1999, aucun standard n'avait été établi pour l'interprétation des données d'antibiorésistance obtenues chez les souches d'origine vétérinaire (Schlegelova *et al.*, 2001). Il était donc difficile d'extrapoler les données obtenues *in vitro* à l'efficacité d'un antibiotique *in vivo*. En 1999, un sous-groupe du «National committee for clinical laboratory standards», ou NCCLS, a vu le jour et s'est consacré à l'interprétation des données de sensibilité des isolats bactériens d'origine vétérinaire envers les antimicrobiens. Les standards établis par ce groupe, maintenant appelé «Clinical and laboratory standards institute», ou CLSI, sont maintenant suivis dans les laboratoires de bactériologie vétérinaires nord-américains (NCCLS, 1999). Malgré tout, la comparaison reste difficile pour les études antérieures à cette date, et celles n'utilisant pas la même technique pour détecter phénotypiquement la résistance chez les bactéries.

### 4.1.1. Diffusion en gélose : méthode de Kirby-Bauer

Parmi les différentes techniques mettant en évidence la résistance aux antimicrobiens, il y a la plus connue, la méthode de Kirby-Bauer de diffusion de disques sur gélose (Bauer, 1966). Il s'agit de disques imprégnés d'une concentration définie en antibiotique qui sont appliqués sur une gélose tapissée d'une suspension bactérienne à tester. L'antibiotique diffuse selon un gradient de concentration et génère une zone circulaire sans croissance bactérienne dont la taille varie selon la sensibilité de la

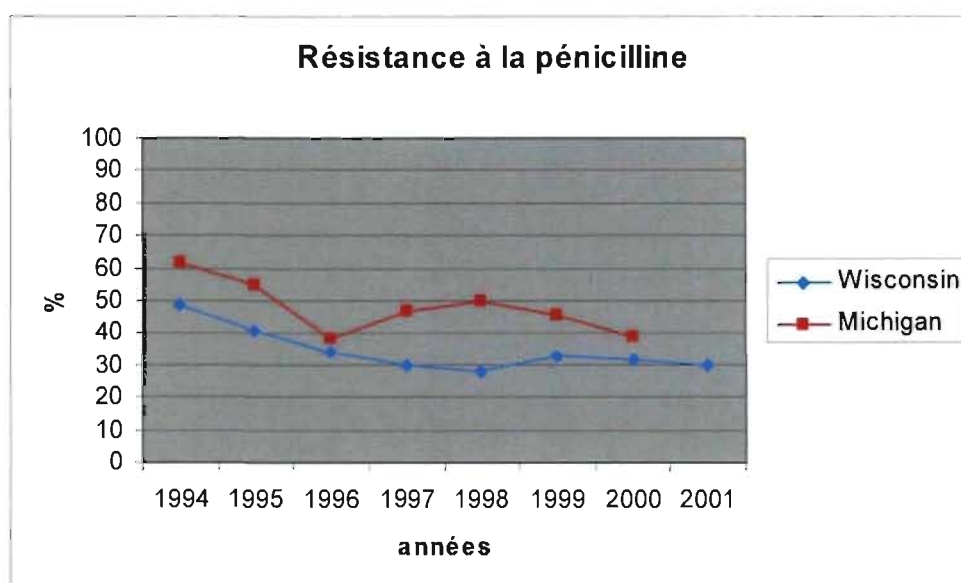
bactérie à l'antibiotique. Les zones d'inhibition sont directement corrélées avec des valeurs de concentrations minimales inhibitrices (CMI) connues pour une espèce bactérienne précise. En médecine vétérinaire cela n'est pas applicable à toutes les bactéries car la plupart des données proviennent de la médecine humaine. Les zones calculées en millimètres permettent de classer la sensibilité à l'antibiotique en trois catégories : sensible, intermédiaire et résistant. Cette forme de résultats constitue un avantage car elle est bien comprise par les praticiens qui sont moins familiers avec les valeurs de CMI. De plus, cette technique ne requiert pas beaucoup de temps ni d'argent, ni d'investissement et de matériel spécialisé. Elle s'adapte bien à la majorité des laboratoires diagnostiques. Par contre, cette méthode est limitée aux bactéries non fastidieuses qui croissent bien sur des milieux non enrichis, entre 18 et 24 heures et sans conditions particulières d'incubation. De plus, les résultats obtenus sont qualitatifs et doivent être interprétés avec précaution (Jorgensen *et al.*, 2003).

#### **4.1.2. Études antérieures utilisant la technique de Kirby-Bauer**

Dans les études les plus récentes sur la sensibilité des *S. aureus* isolés de lait de vaches, très peu utilisent la technique de Kirby-Bauer. Lorsque utilisée, cette technique est parfois comparée à d'autres. Parmi ces études, une traite de la différence de sensibilité entre des isolats de *S. aureus* provenant d'échantillons de lait de vaches issues de fermes à petites et à grandes productions laitières (Shitandi *et al.*, 2004). Il s'est avéré dans cette étude, que les souches provenant des fermes à plus grandes productions présentaient des pourcentages de sensibilité plus élevés envers les antibiotiques comparativement aux souches provenant de petites productions. Par exemple, pour la pénicilline, ils ont obtenu 81,1% de sensibilité pour les premières contre 66,2% de sensibilité pour les deuxièmes. Pour les autres antibiotiques testés, soient la tétracycline, le chloramphénicol, l'érythromycine et le triméthoprime-sulfaméthaxazole, les souches de *S. aureus* se sont avérées relativement sensibles.

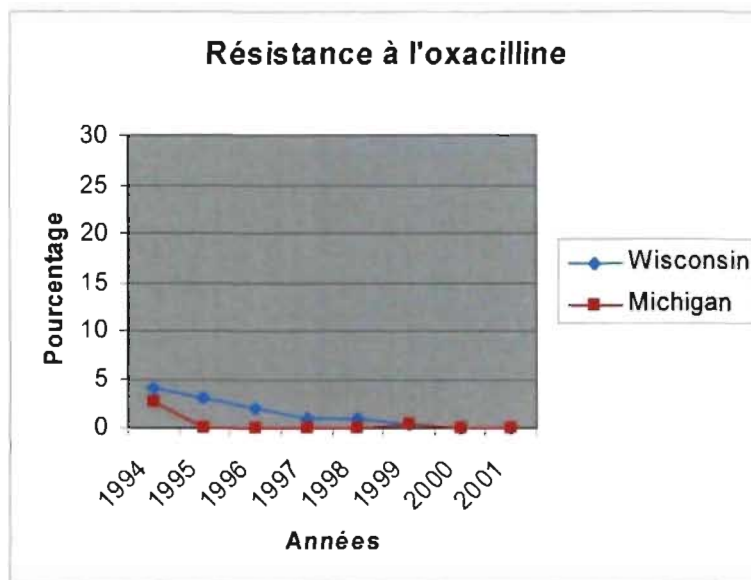
Deux études rétrospectives menées aux États-Unis rapportent des résultats obtenus par la technique de Kirby-Bauer chez des isolats de *S. aureus* provenant de lait de vaches. La première, effectuée au Wisconsin, couvre les années 1994 à 2001 et regroupe des *S. aureus* isolées de laits de vaches (Makovec *et al.*, 2003). La deuxième

a été faite sur des laits de vaches du Michigan et s'étalait de 1994 à 2000 (Erskine *et al.*, 2002). Aucune donnée concernant la provenance des laits n'a été compilée. Les figures 5, 6 et 7 montrent les tendances de la résistance des *S. aureus* pour la pénicilline, l'oxacilline (cloxacilline) et pour l'érythromycine. Les 3 graphiques démontrent une diminution de la résistance aux antibiotiques au fil du temps chez les *S. aureus* testés dans ces deux études. La résistance à la pénicilline est plus marquée dépassant parfois les 60% et ne descendant pas en bas des 30% de souches résistantes. En comparaison, la résistance des *S. aureus* pour l'oxacilline et l'érythromycine est très faible.

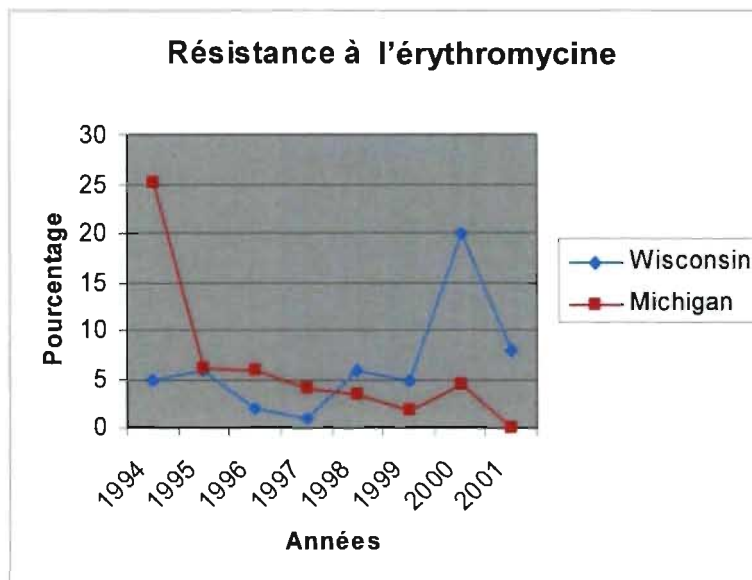


**Figure 5.** Évolution de la résistance des *S. aureus* à la pénicilline selon deux études à long terme (Erskine *et al.*, 2002; Makovec *et al.*, 2003). Cette figure représente les données de résistance de *S. aureus* isolés de lait de vaches envers la pénicilline de 1994 à 2001. Les points en rouge représentent les données d'une étude conduite au Michigan alors que ceux en bleu représentent une étude effectuée au Wisconsin.





**Figure 6.** Évolution de la résistance des *S. aureus* à l'oxacilline selon deux études à long terme (Erskine *et al.* 2002; Makovec *et al.*, 2003). Cette figure représente les données de résistance de *S. aureus* isolés de lait de vaches envers l'oxacilline de 1994 à 2001. Les points en rouge représentent les données d'une étude conduite au Michigan alors que ceux en bleu représentent une étude effectuée au Wisconsin.



**Figure 7.** Évolution de la résistance des *S. aureus* à l'érythromycine selon deux études à long terme (Erskine *et al.*, 2002; Makovec *et al.*, 2003). Cette figure représente les données de résistance de *S. aureus* isolés de lait de vaches envers l'érythromycine de 1994 à 2001. Les points en rouge représentent les données d'une étude conduite au Michigan alors que ceux en bleu représentent une étude effectuée au Wisconsin.

#### 4.1.3. Dilution en gélose

Parmi les autres techniques, il y a les techniques qui se basent sur des dilutions d'antimicrobiens. Le but des méthodes de dilution en gélose et en bouillon est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée. La valeur obtenue, généralement exprimée en  $\mu\text{g/mL}$  est la concentration minimale inhibitrice ou CMI.

Dans la cette catégorie, il y a la dilution en gélose. Cette technique consiste à fabriquer des géloses contenant des concentrations connues d'antibiotiques. Ce sont en général des dilutions doublantes. Ensuite, les suspensions bactériennes sont apposées sur les géloses à l'aide d'un réplicateur. C'est une technique avantageuse

lorsqu'il y a plusieurs isolats à tester envers un seul antimicrobien. C'est une méthode bien standardisée qui est reconnue comme étant la méthode de référence en Europe alors qu'en Amérique du Nord, c'est la méthode de microdilution qui est préconisée. La méthode de dilution en gélose permet d'identifier la contamination bactérienne plus facilement que les méthodes qui utilisent des bouillons. Cependant, il s'agit d'une technique très fastidieuse car il faut préparer de nombreuses géloses à des concentrations différentes et que la durée de vie de ces géloses est très courte (Jorgensen *et al.*, 2003 ;Schlegelova *et al.*, 2001).

#### **4.1.4. Techniques de dilutions en bouillon**

Les techniques de dilutions en bouillon sont aussi basées sur un principe de dilutions doublantes d'un agent antimicrobien. Il en existe deux sortes, les macrodilutions pour lesquelles un volume de 2 mL est utilisé et les microdilutions, pour lesquelles un volume de 0.1 mL est utilisé. La macrodilution est une méthode de référence bien standardisée, utile dans les projets de recherche où un seul antimicrobien et un seul type de bactérie sont testés. Cela demeure une technique fastidieuse qui requiert beaucoup de matériel et de temps (Jorgensen *et al.*, 2003).

La microdilution est le pendant de la macrodilution mais à une échelle réduite. Elle nécessite des microplaques de 96 puits dans lesquelles 8 antibiotiques peuvent être testés simultanément. Il s'agit de la technique de référence en Amérique du Nord (Jorgensen *et al.*, 2003). Les plaques peuvent être lues par un humain ou par un appareil robotisé. Elles peuvent être fabriquées dans le laboratoire même ou être achetées commercialement. Le désavantage des plaques commerciales reste le choix des antibiotiques constituant les plaques. La plupart des microorganismes peuvent être testés avec cette méthode. Le principal désavantage de la microdilution, tout comme la macrodilution et la dilution en gélose, est que la CMI obtenue se situe quelque part entre la plus haute concentration où il y a de la croissance et la plus basse concentration où la croissance est inhibée (Jorgensen *et al.*, 2003).

#### **4.1.5. Études antérieures utilisant la technique de la microdilution**

En 2004, le National Mastitis Council (NMC) a publié un rapport portant sur l'antibiorésistance chez les isolats bactériens reconnus comme principaux agents

pathogènes de la glande mammaire chez le bovin laitier (Erskine *et al.*, 2004). Ce rapport se veut une compilation des données publiées dans les principales études portant sur le sujet depuis une période de 30 ans. Par la compilation de ces résultats d'études, le NMC a mis en évidence que contrairement aux informations qui sont véhiculées, les souches de *S. aureus* isolées de lait de vaches ne présentent que rarement de l'antibiorésistance. Les tableaux 2 et 3 sont inspirés du rapport de NMC et mettent en évidence cette information.

**Tableau 2.** Concentrations minimales inhibitrices 90 (CMI<sub>90</sub>) des *S. aureus* provenant de laits de vaches laitières.

| Antibiotiques | 1997<br>(Owens <i>et al.</i> , 1997) | 2000<br>(Gentilini <i>et al.</i> , 2000) | 2000<br>(De Oliveira <i>et al.</i> , 2000) | 1997<br>(Watts <i>et al.</i> , 1997) |                      |
|---------------|--------------------------------------|--|--|--------------------------------------|----------------------|
|               |                                      |  |  | β-<br>Lactamase<br>+                 | β-<br>Lactamase<br>- |
| Ampicilline   | ND                                   | ND                                       | 1  | 4                                    | 0,5                  |
| Cloxacilline  | 0,5                                  | ND                                       | ND   | ND                                   | ND                   |
| Érythromycine | 0,5                                  | 0,75                                     | 0,5  | <b>64</b>                            | 0,5                  |
| Novobiocine   | 0,5                                  | ND                                       | ND   | ND                                   | ND                   |
| Oxacilline    | ND                                   | 0,5                                      | 1  | 1                                    | 0,25                 |
| Pénicilline   | 0,125                                | <b>1,5</b>                               | <b>0,5</b>                                 | <b>16</b>                            | <b>0,25</b>          |
| Pirlimycine   | 1                                    | ND                                       | 1  | <b>64</b>                            | 0,5                  |
| Tétracycline  | ND                                   | ND                                       | ND   | ND                                   | ND                   |

**Tableau 3.** Concentrations minimales inhibitrices 90 (CMI<sub>90</sub>) des *S. aureus* provenant de laits de taures laitières.

| <b>Antibiotiques</b> | <b>1998</b>                                      | <b>1998</b>  | <b>1995</b>                                       |
|----------------------|--|--|---|
|                      | <b>Danemark</b><br>(Salmon <i>et al.</i> , 1998) | <b>Nouvelle-Zélande</b><br>(Salmon <i>et al.</i> , 1998) | <b>États-Unis</b><br>(Watts <i>et al.</i> , 1995) |
| <b>Ceftiofur</b>     | 1  | 2  | 1   |
| <b>Cloxacilline</b>  | ND   | 0,5  | 0,5   |
| <b>Érythromycine</b> | 0,5  | 0,5  | 0,5   |
| <b>Novobiocine</b>   | ND   | 1  | 0,5   |
| <b>Oxacilline</b>    | 0,05   | ND   | ND  |
| <b>Pénicilline</b>   | ND   | ND   | 0,13  |
| <b>Pirlimycine</b>   | 0,5  | 1  | 0,5   |
| <b>Enrofloxacin</b>  | ND   | 0,25   | 0,5   |
| <b>Tétracycline</b>  | ND   | ND   | 0,6   |

Les données inscrites en caractères gras représentent les niveaux des CMI auxquels les bactéries démontrent de la résistance. De manière globale, la pénicilline est le seul antibiotique pour lequel plusieurs études ont démontré de la résistance chez les souches de *S. aureus*. L'étude de Watts et collaborateurs en 1997 montre que l'induction de la production de bêta-lactamases chez les souches de *S. aureus* augmentait considérablement les valeurs de CMI non seulement envers la pénicilline, mais aussi envers l'érythromycine et la pirlimycine.

#### **4.1.6. E test**

La technique de gradient de diffusion ou le E test, est un hybride entre les méthodes de Kirby-Bauer et de dilutions. Des bandelettes de plastique contenant un antibiotique, dont le gradient de concentration varie sur la longueur de la bandelette, sont appliquées sur une gélose tapissée d'une suspension bactérienne. Une zone ellipsoïdale se forme selon la sensibilité de la bactérie d'où le nom E test. À l'endroit où la croissance rejoint la bandelette on obtient une valeur de CMI car la bandelette est graduée. Plusieurs études restent à venir pour corroborer les résultats des techniques de dilutions à ceux du E test. C'est une technique simple mais qui est

assez coûteuse. Un des avantages du E test, est qu'il fournit une gamme de valeurs de CMI beaucoup plus grande que les techniques de dilutions doublantes (Jorgensen *et al.*, 2003).

#### **4.1.7. Autres techniques**

Enfin, d'autres techniques comme les test de sensibilité avec seuils limites permettent de tester des antibiotiques à des concentrations précises afin de pouvoir différencier entre les catégories sensible, intermédiaire et résistant. Il y a aussi les tests de tamisage qui testent à une concentration précise un antibiotique dans des conditions particulières pour détecter la résistance chez une bactérie (Swenson *et al.*, 2003). Par exemple, la cefoxitine est utilisée pour détecter les SARM (Boubaker, 2004).

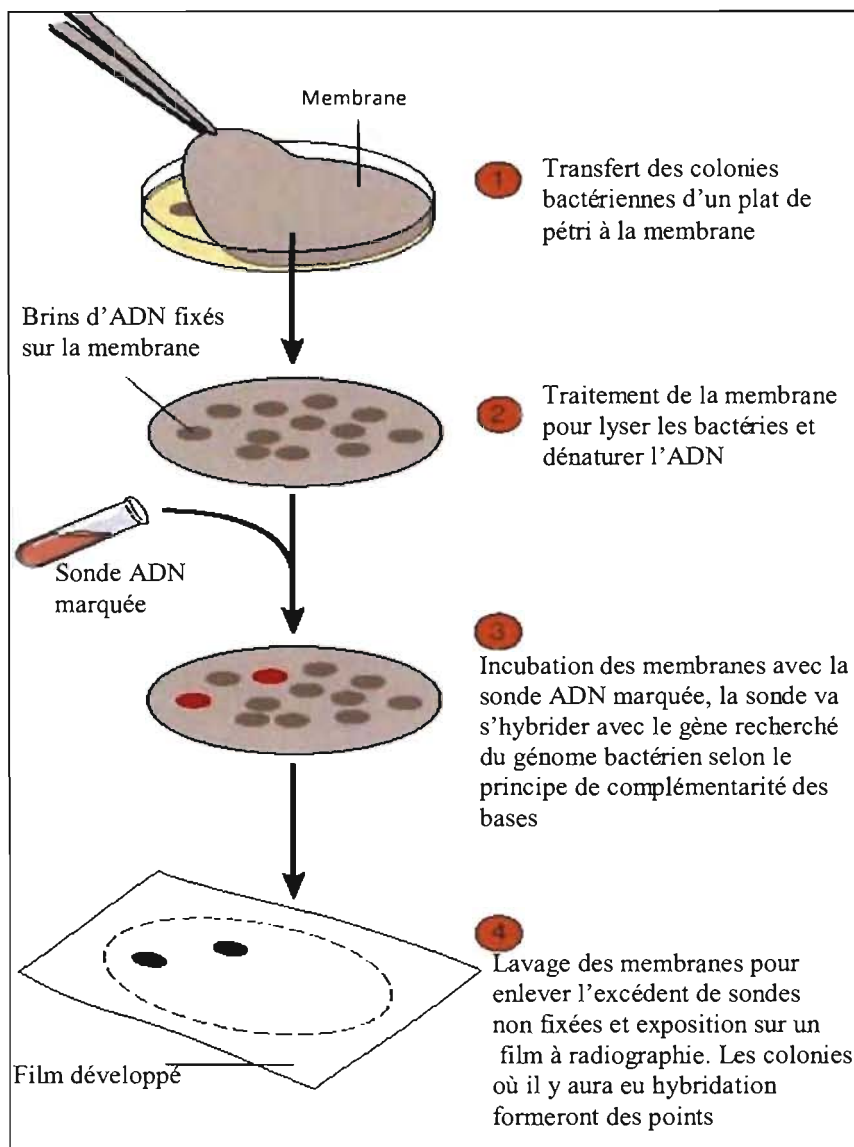
### **4.2. Méthodes génotypiques**

Les techniques conventionnelles de recherche de résistance fournissent uniquement un profil phénotypique d'un agent pathogène potentiel. Avec ces techniques, une faible activité de résistance ou une population hétérogène présentant des résistances variables sont difficilement détectables. L'analyse moléculaire des agents pathogènes procure une façon plus définie d'obtenir le statut d'un microorganisme face à un agent antimicrobien en identifiant les bactéries ayant le potentiel génétique nécessaire à l'antibiorésistance (Westin *et al.*, 2001). Des dizaines de techniques permettant de mettre en évidence des gènes de résistance aux antimicrobiens existent. Dans la plupart des cas, la détection génétique est basée sur l'hybridation spécifique de sondes représentant un gène de résistance ou une séquence avec des mutations conférant une résistance. Ainsi, l'hybridation sur colonies ou filtre contenant de l'ADN migré sur un gel, la technique de polymérisation en chaîne ou PCR et les micropuces à ADN utilisent ce principe. Le choix des technologies utilisées est propre à chaque laboratoire et dépend également de la bactérie en question. L'équipement requis pour accomplir ces analyses diffère aussi d'une technique à l'autre et la gamme de prix est très variable. Ces méthodes diagnostiques sont moins accessibles que les méthodes phénotypiques pour la majorité des laboratoires diagnostiques. Cependant, vu les avantages liés à cette technologie, plusieurs laboratoires se tournent vers cette alternative.

Idéalement, un test génotypique devrait cibler les séquences d'acides nucléiques situées dans la région codante pour le gène de résistance. Cela dans le but d'éviter des séquences à l'extérieur du gène qui pourrait contenir des éléments d'insertion ou des promoteurs de séquences présents chez des souches sensibles ou chez des souches qui possèdent d'autres gènes de résistance que celui recherché (Kamile Rasheed *et al.*, 2003; Tenover *et al.*, 2004). Dans le cas de mutations ponctuelles souvent chromosomiques conférant de la résistance, outre l'hybridation avec des sondes spécifiques détectant la mutation, une PCR permet d'amplifier la région d'intérêt qui par la suite est séquencée pour identifier précisément la mutation.

#### **4.2.1. Hybridation**

Parmi ces techniques, l'hybridation est l'une des plus anciennes. Cette méthode consiste à séparer les brins d'ADN pour mettre en contact un seul des brins avec une sonde simple brin. Différentes variantes existent et l'ADN ciblée ou parfois la sonde, est fixée sur une membrane qui peut être de la nitrocellulose ou une autre matrice. L'hybridation peut alors avoir lieu. Plusieurs révélateurs existent, comme des isotopes radioactifs, des substrats antigéniques, des enzymes etc. (Fluit *et al.*, 2001). La figure 8 représente une de ces techniques, l'hybridation sur colonie. Bien que l'hybridation demeure une ancienne technique, certains auteurs croient qu'elle surpassera dans un avenir proche les méthodes par PCR (Aarts *et al.*, 2001; Fluit *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2003).



**Figure 8.** Schématisation de la technique d'hybridation sur colonies. D'après Person education, 2005. 1. Les colonies d'une culture bactérienne en plat de pétri sont mis en contact avec une membrane. 2. Cette membrane est ensuite pelée, puis traitée avec différentes solutions chimiques afin d'assurer la lyse des bactéries et de dénaturer l'ADN. 3. Les membranes sont par la suite mises en contact avec une solution contenant la sonde ADN marquée. Cette sonde est spécifique au gène recherché dans le génome bactérien et ira s'hybrider avec le gène s'il est présent. Cette hybridation se fait selon le principe de la complémentarité des bases. 4. Les membranes subissent

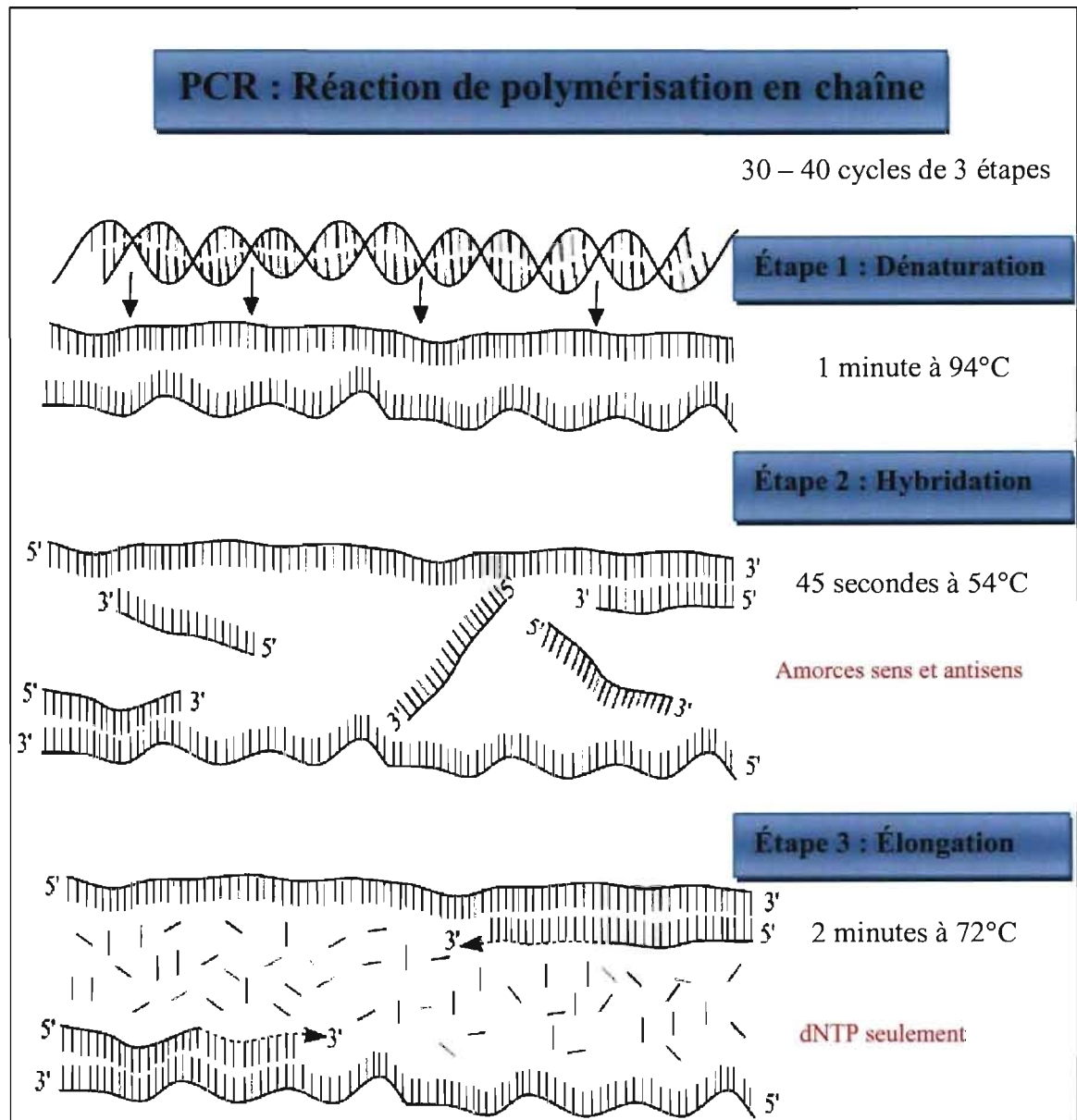


une série de lavage afin d'enlever toute sonde ne s'étant pas hybridée et sont exposées à un film radiographique. Après développement du film, les colonies pour lesquelles il y aura eu hybridation apparaîtront comme des points noirs sur le film.

#### **4.2.2. PCR : réaction de polymérisation en chaîne**

La détection de gènes de résistance demande un niveau de spécificité et de sensibilité et parfois de la rapidité. L'amplification de polymérisation en chaînes (PCR) permet de répondre à ces besoins (Figure 9). Elle consiste en des cycles répétitifs de dénaturation et d'élongation au bout desquels de nombreuses copies de l'ADN ciblées sont obtenues et cela, en peu de temps. Dans la PCR classique, la phase d'amplification est suivie d'une migration de l'amplicon sur gel d'agarose (Aarts *et al.*, 2001). Lors de cette étape qui peut être fastidieuse, les risques de contamination sont élevés. Avec le temps, plusieurs variantes de la technique de base ont été développées. Par exemple, dans le PCR multiplex, plus de deux paires d'amorces peuvent être utilisées afin de rechercher plus de 1 gène à la fois (Cai *et al.*, 2003).

Avec la PCR conventionnelle, l'amplicon, soit le résultat obtenu, doit être transféré sur un gel d'agarose afin de migrer et est révélé par coloration avec l'agent intercalant, le bromure d'éthidium qui sous lumière ultraviolette devient fluorescent. La présence ou l'absence du gène est alors révélée. Avec la venue de nouvelles techniques et autres alternatives, où l'ajout de colorants fluorescents est proposé, cette dernière étape peut être évitée. Ainsi, avec la PCR en temps réel, un colorant fluorescent s'intercale dans l'ADN double brin au fur et à mesure que l'amplicon se forme et les résultats sont dévoilés au tout au long de la progression de la réaction. Cette technologie permet de sauver du temps et donne une certaine quantification du gène recherché. De plus, il permet de détecter plusieurs gènes à la fois et de réduire les biorisques ainsi que les risques de contamination de produits PCR puisque il n'y a pas de manipulations de l'amplicon à la fin des cycles d'amplification (Aarts *et al.*, 2001).



**Figure 9.** Représentation du principe de base de la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) D'après Vierstracte, 1999. Lors de la PCR, il y a une succession de 30 à 40 cycles des trois mêmes étapes. En premier lieu, le mélange PCR est chauffé à 94°C, ce qui entraîne la séparation des brins ADN. Lors de la deuxième étape, les amorces sens et antisens, choisies en fonction de la région spécifique que l'on veut amplifier, viennent s'arrimer à leur région complémentaire sur les brins d'ADN mère. Puis au cours de la troisième et dernière étape, il y a

élongation grâce au travail d'une enzyme résistante à la chaleur et l'utilisation des nucléotides présents dans le mélange PCR.

Plusieurs techniques PCR ont été développées en médecine humaine pour diagnostiquer les souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques. Dans la plupart de ces techniques, ce sont des PCR multiplex, recherchant plusieurs gènes de résistance à la fois qui sont utilisés (Hal Jones *et al.*, 2006 ;Costa, *et al.*, 2005 ; Jaffe *et al.*, 2000 ; Strommenger *et al.*, 2003 ;Martineau *et al.*, 2000). Des techniques utilisant le PCR en temps réel sont également utilisées dans la détection des *S. aureus* résistants aux antibiotiques et procurent l'avantage d'être beaucoup plus rapides (Huletsky *et al.*, 2004 ;Lapierre *et al.*, 2003).En médecine vétérinaire, les exemples sont moins nombreux, mais l'outil PCR est de plus en plus utilisé pour le diagnostique de souches bactériennes résistantes, dont les *S. aureus* résistants à la pénicilline isolés de lait de vaches (Haveri, 2005).

### 4.2.3. Séquençage

Le séquençage de l'ADN est une technique très utilisée pour détecter des mutations au niveau de certains gènes de résistance, comme dans le cas de la résistance aux fluoroquinolones. Au cours des années, des mises au point ont été faites afin de pouvoir déterminer des séquences plus longues en moins de temps et à un coût moindre (Fluit *et al.*, 2001). Aujourd'hui, les techniques de séquençage développées se basent sur la méthode de Sanger (Séquençage, 2008). En résumé, il s'agit de cibler le segment d'ADN à séquencer et d'introduire une amorce complémentaire à une petite région du segment afin d'en initier la polymérisation. Pour cela, on ajoute dans le mélange une ADN polymérase thermostable ainsi que les 4 désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) tout comme dans les réactions PCR. Toutefois, on ajoute également des didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) en petite quantité. Ces didésoxynucléotides sont marqués à la fluorescence et ont la particularité d'être des terminateurs de chaîne au niveau du nucléotide correspondant au didésoxynucléotide ajouté. L'élongation ne peut donc se poursuivre après l'ajout du didésoxynucléotide et il en résulte la production de fragments ADN de différentes tailles croissantes. La séparation des fragments se fait par électrophorèse, à l'aide

d'un appareil à capillaires. Cet appareil est couplé à un détecteur de fluorescence et un logiciel informatique permet de lire les séquences ADN (Tenover *et al.*, 2004).

#### **4.2.4. Micropuces à ADN**

Enfin, il existe une technologie de pointe, les micropuces à ADN. Les micropuces permettent d'analyser des centaines à des milliers de loci différents simultanément en une période de temps relativement courte (Westin *et al.*, 2001). Leur principe se fonde sur la technique de l'hybridation, sauf que dans le cas des micropuces, ce sont des milliers des sondes qui sont fixées sur un substrat (membrane, lame de verre recouverte de polylysine etc.). L'ADN à tester est marqué avec un fluorochrome et la fluorescence émise d'un spot hybridé est récupérée par un photomultiplicateur couplé à un microscope à épifluorescence utilisé pour révéler les hybridations. Il existe plusieurs variantes, par exemple différents substrats sont utilisés comme membrane et les sondes sont de nature variée (Fluit *et al.*, 2001; Sundsfjord *et al.*, 2004).

La technologie de la micropuce à ADN est de plus en plus utilisée, et ce même en médecine vétérinaire pour détecter les facteurs de virulence et les gènes d'antibiorésistance chez les *S. aureus* isolés de lait de vaches (Monecke *et al.*, 2007 ;Strommenger *et al.*, 2006 ; Monecke *et al.*, 2003).

## **5. Le phénomène des *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM)**

### **5.1. Évolution en médecine humaine**

En médecine humaine, l'apparition des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline est un problème grandissant depuis l'introduction dans les années soixante de cet antimicrobien dans les hôpitaux. On note rapidement des cas d'infections réfractaires aux traitements chez les personnes hospitalisées et infectées par des SARM. Il faut trouver une molécule plus efficace mais le défi est majeur. Le phénomène d'abord limité au milieu hospitalier prend des proportions majeures lorsqu'on isole des souches de SARM chez des personnes n'ayant pas séjourné dans un hôpital. On opte pour des mesures de prévention qui vont du lavage des mains à l'isolement total des patients infectés. Le contrôle est difficile en raison d'un portage

sain de SARM au niveau de la flore nasale chez l'homme. Des techniques diagnostiques de plus en plus sophistiquées et rapides sont mises au point afin d'identifier les personnes porteuses de SARM (Hiramatsu *et al.*, 2001; Enright *et al.*, 2002).

## 5.2. SARM en médecine vétérinaire

En médecine humaine, l'isolement de SARM fait partie du quotidien de tous les laboratoires diagnostiques. Les cas se multiplient et des mesures de prévention doivent être prises afin de limiter sa propagation. En médecine vétérinaire, il semble que les infections aux SARM soient un problème émergent depuis les dix dernières années (Leonard *et al.*, 2008). Beaucoup de ces études portent sur des chevaux gardés en milieux hospitaliers (Middleton *et al.*, 2005 ; Hanselman *et al.*, 2006). Dans ces études, on relate des flambées de cas. Dans la littérature, quelques études relatant l'isolement de SARM chez les animaux sont publiées. Par exemple, en Corée, au Japon, en Belgique et aux USA des infections à SARM ont été rapportées chez des chevaux (Hartmann *et al.*, 1997; Seguin *et al.*, 1999), des chiens (Tomlin *et al.*, 1999) et des bovins (van Duijkeren *et al.*, 2004). La résistance à la méthicilline a aussi été détectée chez des staphylocoques provenant de chevaux sains au Japon (van Duijkeren *et al.*, 2004). Dans une autre étude, 15 isolats de *S. aureus* portaient le *mecA* et étaient résistants à l'oxacilline, 12 provenaient de mammites de vaches et 3 de poulets (Lee, 2003). Tomlin *et al.* rapportent l'isolement de *S. aureus* résistants à la méthicilline chez 11 chiens différents (Tomlin *et al.*, 1999). Dans une autre publication, un cheval aurait eu une infection de plaie post-chirurgicale infectée avec un SARM (Hartmann *et al.*, 1997). Toujours chez l'espèce équine, une épidémie de cas de SARM avec possibilité de transmission des humains aux animaux est relatée (Seguin *et al.*, 1999). Un rapport de cas plus récent rapporte un cas possible de transmission de SARM de lait de vache à l'humain (Juhász-Kaszanyitzky *et al.*, 2007). Le sens de la transmission n'a pu être établi avec certitude dans ce cas précis. Toutefois, il est à noter que les souches isolées ne contenaient pas le gène PVL (Panton-Valentine leukocidin) contrairement aux cas de SARM acquis dans la communauté, laissant suggérer que l'animal était peut-être la source de l'infection. Il est prudent de bien lire ces articles, car la plupart d'entre eux parlent de SARM sans

même avoir testé les souches pour la détection du gène *mecA*, technique qui demeure la méthode de référence dans ce domaine. D'ailleurs, de manière globale, peu d'études font mention de la recherche de gènes de résistance aux antibiotiques chez les *S. aureus* d'origine vétérinaire. Les rares études portent sur d'autres espèces animales que la vache laitière. Certaines études sur des staphylocoques isolés chez d'autres espèces animales que la vache mettent en parallèle une méthode phénotypique et une méthode génotypique pour évaluer la sensibilité des souches aux antibiotiques. La plupart des données confirment une concordance élevée (de l'ordre des 98%) entre les résultats obtenus dans ce genre d'études (Aarestrup *et al.*, 2000; Aarestrup, 2002; Vancraeynest *et al.*, 2004). Haveri *et al.* ont étudié la relation entre la présence du gène *blaZ* codant pour la résistance à la pénicilline et les valeurs de CMI obtenues par microdilution chez des souches de *S. aureus* provenant d'infections intra-mammaires chez des vaches (Haveri *et al.*, 2005). Ils en sont arrivés à la conclusion que les normes publiées par le CLSI pour interpréter les résultats de CMI ne permettaient pas de détecter toutes les souches résistantes. Avec ces normes, 40% des souches possédant le gène *blaZ* étaient classées comme étant sensibles à la pénicilline. D'autres auteurs ont recherché le gène *mecA* chez diverses souches de *S. aureus* provenant d'animaux dans des abattoirs et ont mis le gène en évidence chez 12 souches isolées à partir de glandes mammaires de bovins (Lee, 2003). Des gènes de résistance à l'érythromycine ont aussi été recherchés chez des staphylocoques provenant de lait de bovins. Le gène *ermC* a été retrouvé chez deux souches de *Staphylococcus* spp. et le gène *ermA* était présent chez 21 des 23 souches de staphylocoques testés, dont trois étaient des *S. aureus*. Le gène *msrA* a été recherché sans succès (Khan *et al.*, 2000).

## 6. Techniques de détection des SARM

Le nombre de techniques pour détecter les SARM ne cesse d'augmenter. Les souches de SARM doivent être considérées comme étant résistantes à toutes les céphalosporines, cephems, et autres bêta-lactamines comme l'ampicilline sulbactam, amoxicilline-acide clavulinique, ticarcillin-acide clavulinique, piperacilline-tazobactam et les carbapenem, peu importe les résultats de sensibilité *in vitro* à ces agents (Lee, 2003; Velasco *et al.*, 2005). Pour affirmer qu'un *S. aureus* est résistant à

la méthicilline et donc à plusieurs groupes d'antibiotiques, la méthode de référence est la mise en évidence du gène *mecA* par une méthode génotypique. Cependant, tous les laboratoires n'ont pas accès à cette technologie PCR et il a donc fallu développer d'autres techniques moins invasives. La détection de la résistance à différents antibiotiques tels la cloxacilline, l'oxacilline et des céphalosporines par différentes techniques comme le Kirby-Bauer, le E test, les macrodilutions, les microdilutions et les dilutions en gélose (méthode de criblage) est utilisée pour mettre en évidence la résistance à la méthicilline (Velasco *et al.*, 2005). Cependant, l'expression du phénotype de résistance à la méthicilline chez les *S. aureus* est dépendante de certains facteurs tels les conditions de croissance de la bactérie, la température d'incubation ainsi que l'osmolarité et le pH du milieu de culture (Velasco *et al.*, 2005). Les laboratoires sont également confrontés à des souches de *S. aureus* hétérogènes, ce qui engendre des résultats variables. Il existe également des trousse d'agglutination au latex qui détectent la présence de PBP2a par le biais d'anticorps monoclonaux contre PBP2a. Ces trousse sont faciles d'utilisation et permettent d'obtenir un résultat en moins de 20 minutes à partir d'une souche en culture pure. Selon les différentes études, le test de diffusion sur gélose d'un disque de cefoxitin (30 µg), ainsi que les trousse de détection de PBP2a par agglutination au latex sont les 2 techniques ayant les niveaux de spécificité et de sensibilité les plus élevés lorsque comparées à la mise en évidence du gène *mecA* (Boubaker, 2004; Lee *et al.*, 2004; Swenson *et al.*, 2005; Velasco *et al.*, 2005). Les auteurs recommandent d'utiliser deux techniques en parallèle, l'une ayant une haute spécificité et l'autre ayant une sensibilité élevée (Boubaker, 2004; Lee *et al.*, 2004; Velasco *et al.* 2005).

## **7. Conclusion**

### **7.1. Problématique**

Le Québec est aux prises avec le problème d'infections intra-mammaires à *S. aureus* réfractaires aux traitements. La résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus* causant ces infections n'est pas connue. Les souches de *S. aureus* isolées d'échantillons de lait de vaches au Québec ne présenteraient qu'un très faible niveau

de résistance aux antibiotiques lorsque analysées phénotypiquement et conséquemment, peu de souches devraient hybrider avec les gènes de résistance.

## 7.2. Buts et objectifs de l'étude

- Caractériser les profils de résistance à différents antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées d'échantillons de lait de vaches de différentes régions du Québec par une méthode de microdilution.
- Évaluer si un traitement systémique avec la tétracycline pouvait avoir un impact sur la résistance des bactéries situées au niveau de la glande mammaire, telles que les *S. aureus*.
- Vérifier si des antimicrobiens tels que la gentamicine et l'enrofloxacin sont utilisés en dérogation en production laitière en vérifiant le niveau de résistance des *S. aureus* envers ces molécules.
- Valider l'efficacité de l'hybridation sur colonies sur les *S. aureus* en utilisant la technique d'hybridation sur colonies avec sondes marquées à la radioactivité.
- Valider la technique d'hybridation sur colonies avec sondes marquées à la chemiluminescence en se basant sur la technique d'hybridation sur colonies avec sondes marquées à la radioactivité.
- Mettre en évidence la présence de gènes de résistance aux antibiotiques chez les souches de *S. aureus* par une méthode d'hybridation sur colonies.
- Comparer les phénotypes et les génotypes obtenus pour chacune des souches testées.

## 7.3. Retombées anticipées

Notre étude fournira des données concernant l'antibiorésistance chez les *S. aureus* isolés de lait de vaches au Québec. L'analyse de l'antibiorésistance des souches de *S. aureus* permettra une meilleure compréhension des infections intra-mammaires à *S. aureus*. Quoique cette étude ne soit pas épidémiologique, notre étude fournira des pistes pour des études plus ciblées quant à la résistance aux antibiotiques chez les infections intra-mammaires avec *S. aureus* et les stratégies de traitement à prendre.



# PARTIE 2



## MÉTHODOLOGIE

# 1. Souches

## 1.1. Provenance

Un total de 1000 souches identifiées comme étant des *S. aureus* ont été acheminées au laboratoire de bactériologie clinique de la Faculté de médecine vétérinaire. Ces souches provenaient du Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec, du Laboratoire d'expertise en pathologie animale du Québec ainsi que du laboratoire de bactériologie clinique de la Faculté de médecine vétérinaire. Les isolats provenaient de laits de vaches de fermes du Québec, tous prélevés durant l'année 2003-2004.

## 1.2. Sélection

Sur ces 1000 souches de *S. aureus*, 428 isolats ont été retenus. La sélection s'est faite en choisissant 1 seule souche par ferme, et un maximum de 3 souches pour un même code postal. La sélection s'est faite en fonction du budget accordé pour la recherche et dans le but de représenter le plus de régions possible du Québec. De manière générale, toutes les régions du Québec ont été couvertes.

## 1.3. Identification

L'identification des souches a été confirmée par le test de coagulase en tube (Becton, Dickinson and Company, Sparks). Un volume de 0,5 mL de sérum de lapin a été inoculé avec un faible inoculum bactérien. Les tubes ont été placés à 35°C pour 24 heures. Durant les 4 premières heures, la présence d'un caillot a été vérifiée à toutes les heures. La présence d'un caillot représentait un test positif (à 4 heures ou 24 heures) et l'absence d'un caillot un test négatif (à 24 heures). La double hémolyse sur gélose au sang de mouton a également orienté l'identification. Finalement, la recherche du gène *nuc*, gène d'identification à l'espèce spécifique à *S. aureus*, lors des techniques génotypiques a été réalisée par hybridation sur colonies (Baron *et al.*, 2004).

## 1.4. Conservation

Une culture pure de chacun des isolats a été conservée à -70°C dans un bouillon trypticase soya additionné de 10% de glycérol (Becton, Dickinson and Company, Sparks) jusqu'à leur utilisation ultérieure.

## **2. Techniques phénotypiques**

### **2.1. Microdilutions**

#### **2.1.1. Antibiotiques**

Un total de 10 antibiotiques ou combinaisons d'antibiotiques ont été testés par microdilutions. Ce sont : pénicilline G (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), tétracycline (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), pénicilline G (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) + novobiocine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), gentamicine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), pirlimycine (Pfizer, Kirkland, Québec), érythromicine (Sigma-Aldrich, ST-Louis, MO, USA), enrofloxacin (Bayer Schering Pharma, Berlin, Allemagne), trimétoprime (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) + sulfaméthaxazone (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), lincomycine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) et oxacilline (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Des solutions stocks concentrées à 1280 µg/mL ont été préparées en suivant les règles du CLSI (NCCLS, 1999; NCCLS, 2004). À l'exception de la tétracycline pour laquelle une solution fraîche était préparée à chaque utilisation, les solutions stock d'antibiotiques ont été distribuées en aliquots de 1 ml et conservées à -70°C. Un seul cycle de congélation/décongélation a été effectué.

#### **2.1.2. Préparation des plaques**

Des plaques de 96 puits en U (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) ont été utilisées et préparées au laboratoire. Un bouillon Mueller Hinton (Becton, Dickinson and Company, Sparks) ajusté en ions calcium et magnésium (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) a été utilisé selon les recommandations du CLSI. Dans le cas de l'oxacilline, 2% de NaCl (Becton, Dickinson and Company, Sparks) ont été ajoutés à ce même bouillon. Pour chacune des plaques, un volume de 50 µl de bouillon MH (Becton, Dickinson and Company, Sparks) a été distribué dans tous les puits sauf ceux de la colonne 2. Dans la colonne 2, 100 µl de la solution stock d'antibiotique, ou du mélange d'antibiotiques au ratio recommandé par le CLSI ont été déposés, à raison d'un antibiotique différent par rangée (NCCLS, 1999; NCCLS, 2004). Ensuite, à l'aide d'une pipette multicanaux, 50 µl de liquide dans la colonne 2 ont été prélevés puis déposés dans la colonne 3, et ainsi de suite jusqu'à la colonne 12 pour

réaliser des dilutions doublantes. Les 50 µl retirés de la dernière colonne ont été rejetés. Les concentrations testées variaient entre 0,0625 µg/mL et 64 µg/mL pour la gentamicine, la pénicilline G, la tétracycline, l'érythromycine, la lincomycine, l'enrofloxacin, l'oxacilline et la pirlimycine. Pour la combinaison pénicilline G-novobiocine, des concentrations variant entre 0,0625 µg/mL à 64 µg/mL et de 0,125 µg/mL à 128 µg/mL respectivement, pour un ratio 1:2. Finalement, pour la combinaison triméthoprim-sulfaméthaxazole, les concentrations 0,0025 µg/mL à 3,2 µg/mL et 0,06 µg/mL à 60,8 µg/mL ont été testées respectivement pour un ratio 1 :19. Les plaques ont été préparées en lot de 50 plaques. Une des plaques a servi de témoin positif et a été ensemencée avec la souche de *S. aureus* ATCC 29213 le jour même de la fabrication. Les autres plaques ont été congelées à -70°C jusqu'à leur utilisation le lendemain, si les valeurs de la plaque contrôle étaient dans les normes du CLSI (NCCLS, 1999; NCCLS, 2004). La congélation permettait d'éviter l'évaporation du milieu, ce qui aurait entraîné une élévation des concentrations en antimicrobiens et donc des variations dans les résultats.

### **2.1.3. Inoculation des plaques**

À partir d'une culture pure sur gélose âgée de 18 heures, 4 à 5 colonies ont été prélevées et déposées dans une solution de saline stérile afin d'obtenir un inoculum correspondant à un standard de 0,5 MacFarland. De cet inoculum, 0,5 ml a été transféré dans 4,5 ml de saline stérile. Après homogénéisation, 0,6 ml de cette solution a été ajouté à 6 ml de bouillon MH (Becton, Dickinson and Company, Sparks) ajusté en ions calcium et magnésium. Cinquante microlitres de cette solution bactérienne ont été distribués dans chacun des puits des plaques respectives pour obtention d'une concentration finale de  $5 \times 10^4$  UFC/puits. Parallèlement à chacune des plaques, une gélose TSA (Becton, Dickinson and Company, Sparks) additionnée de 5% de sang de mouton a été inoculée avec la suspension bactérienne finale pour assurer la pureté de la souche. Les plaques et les géloses ont été placées à l'incubateur pour 18 heures à 35°C en présence d'oxygène (NCCLS, 2004).

### 2.1.4. Lecture des plaques

La lecture des plaques s'est effectuée après 18 heures d'incubation à l'exception de l'oxacilline pour laquelle la lecture a été faite après 48 heures. Cette lecture a été effectuée à l'œil nu. Les normes du CLSI ont été respectées pour l'interprétation des résultats (NCCLS, 1999; NCCLS, 2004) (Tableau 4).

**Tableau 4.** Normes établies par le CLSI pour classer les isolats de *S. aureus* comme sensibles, intermédiaires ou résistants à un antimicrobien. D'après NCCLS M31-S1 et NCCLS M31-A.

| Valeurs seuils de CMI et diamètre de la zone |                        |                  |                        |
|--|------------------------|------------------|------------------------|
| Antibiotique                                 | S                      | I                | R                      |
| <b>Oxacilline</b>                            | ≤2 µg/mL               |                  | ≥4 µg/mL               |
| <b>Pénicilline G</b>                         | ≤0.12 µg/mL            |                  | ≥0.25 µg/mL            |
| <b>Pénicilline G +<br/>Novobiocine</b>       | ≤1 µg/mL /<br>2 µg/mL  | 2 µg/mL /4 µg/mL | ≥2 µg/mL /<br>4 µg/mL  |
| <b>Pirlimycine</b>                           | ≤2 µg/mL               |                  | ≥4 µg/mL               |
| <b>Pirlimycine disque</b>                    | ≥ 13 cm                |                  | ≤12 cm                 |
| <b>Erythromycine</b>                         | ≤0.5 µg/mL             | 1-4 µg/mL        | ≥8 µg/mL               |
| <b>Lincomycine</b>                           |                        |                  | ≥4 µg/mL               |
| <b>Tétracycline</b>                          |                        |                  | ≥16 µg/mL              |
| <b>Gentamicine</b>                           |                        |                  | ≥16 µg/mL              |
| <b>Enrofloxacin</b>                          |                        |                  | ≥4 µg/mL               |
| <b>Triméthoprim +<br/>sulfaméthoxazone</b>   | ≤2 µg/mL /<br>38 µg/mL |                  | ≥4 µg/mL /<br>76 µg/mL |

S = sensible I = intermédiaire R = résistant

## **2.2. Technique de Kirby-Bauer**

L'antibiotique pirlimycine a également été testé par la technique de Kirby-Bauer. Des disques de 2 µg de pirlimycine (Pfizer, Kirkland, Québec) ont été appliqués sur des géloses MH (Becton, Dickinson and Company, Sparks) préalablement tapissées d'une suspension bactérienne ajustée à 0,5 MacFarland. Les géloses ont été incubées 18 heures à 35°C en O<sub>2</sub> avant que la lecture ne soit effectuée. Les critères d'interprétation du CLSI ont été respectés (NCCLS, 1999; NCCLS, 2004) (Tableau 4).

## **3. Techniques génotypiques**

### **3.1. Vérification de la présence de gènes de résistance chez les souches contrôles**

À l'aide de la trousse QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen (Qiagen, Mississauga, Ontario), l'ADN bactérien des souches témoins a été extrait en suivant les lignes directrices de la monographie du manufacturier. Pour chacune des combinaisons amorces spécifiques et souches résistantes aux antibiotiques, un mélange PCR totalisant 50 µl a été préparé. Chaque mélange contenait 5 µl d'ADN bactérien, 5µl de tampon 10X, 5 µl de DNTP (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) (2 mmol), 2,5 µl de l'amorce sens, 2,5 µl de l'amorce anti-sens, 0,5 µl de Taq DNA polymerase et 25 µl d'eau. Les mélanges ont été placés dans un thermocycleur d'ADN (Techne, TC-512, Modèle FTC51h2d) et pré-incubés à 105,0°C, et soumis à 45 cycles d'amplification (2 minutes à 94°C, 30 secondes 94°C, 30 secondes à 55°C, 30 secondes à 72°C). Après le dernier cycle, les tubes PCR ont été incubés 5 minutes à 72°C, puis conservés à 4°C. Cinq microlitres de chacun des produits PCR combinés à du bromure d'éthidium (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario) ont été placés sur gel d'agarose 1,5% (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) pour électrophorèse pendant 1 heure à 5 V cm<sup>-1</sup>. Une échelle de poids moléculaires d'ADN (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) a été placée comme mesure étalon.

## **3.2. Essais préliminaires : hybridation sur colonies et détection de gènes par radioactivité P<sup>32</sup>**

La vérification de la lyse des bactéries s'est faite lors d'essais préliminaires. Le protocole utilisé est celui élaboré par le laboratoire EcL de la Faculté de médecine vétérinaire : (Annexe 1) (Broes *et al.*, 1988). Le gène *nuc* a été recherché pour identifier les *S. aureus*. Comme témoins positifs nous avons utilisé les souches de l'ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 et 25923. Comme témoins négatifs nous avons utilisé les souches de l'ATCC *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Enterococcus faecalis* 19433, et *Klebsiella pneumoniae* 13883.

### **3.2.1. Préparation des membranes**

La préparation des membranes a été faite à partir de colonies en culture pure, âgées de 18 heures et cultivées en bouillon TSB (Becton, Dickinson and Company, Sparks). Selon un protocole prédéterminé, 150 µL de suspension bactérienne ont été transférés dans une plaque 96 puits en U (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario). À l'aide d'un poinçon de 48 pics flambés, les suspensions bactériennes ont été imprégnées sur géloses TSA (Becton, Dickinson and Company, Sparks) + 5% sang de mouton. Une fois sèches, les géloses ont été incubées à 35°C pour 18 heures en présence d'oxygène. Par la suite, les géloses ont été placées au réfrigérateur pour un maximum de 72 heures. Un filtre de papier Whatman 541 de 90 mm (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) découpé de façon à pouvoir être identifié et orienté a été placé sur chacune des géloses pour un temps de contact d'au moins 2 heures, le temps minimum recommandé dans la technique.

### **3.2.2. Lyse bactérienne**

Après le temps de contact, chaque filtre est pelé avec précaution. Ils sont par la suite traités afin que l'ADN de la bactérie soit exposé et dénaturé. Les filtres sont placés en contact avec différentes solutions (voir annexe 1) selon des étapes successives (Broes *et al.*, 1988). À chacune des étapes suivantes, les filtres sont placés colonies vers le haut sur une plaque à biscuit sur laquelle on place un papier Mandel (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) imbibé de la solution traitante qui est utilisée.

Premièrement, les filtres sont placés 3 minutes en contact avec une solution de SDS 10% (Sodium dodecyl sulfate). Ils sont ensuite transférés pour une période de 15 minutes dans une solution de NaOH 0,5M + NaCl 1,5M. Puis, les filtres sont placés en contact avec une solution de Tris 0,5M pH 7,5 + NaCl 1,5M pour 5 minutes. Cette dernière étape est répétée une deuxième fois. Les filtres sont par la suite transférés sur un papier Mandel afin de les asséchés. Une fois bien secs, les filtres sont mis dans des boîtes de pétri jusqu'à leur utilisation.

### **3.2.3. Fabrication de la sonde**

Les séquences des amorces utilisées pour fabriquer la sonde se trouvent dans le tableau 6. La séquence de la sonde a ensuite été élaborée grâce à Genbank. Dans la technique d'hybridation sur colonies utilisant la radioactivité, le marquage de la sonde se fait lors de l'étape de la préhybridation (Annexe 1).

### **3.2.4. Préhybridation**

Pour les étapes de préhybridation et d'hybridation avec la sonde radioactive, un four à hybridation (Isotemp Hybridization Incubators, Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) a été utilisé. Le tube à hybridation a été chauffé au préalable dans le four à 65°C. Quinze (15) millilitres de solution de pré-hybridation (annexe 1) sont ajoutés au tube contenant les filtres. Le tube est placé au four avec rotation pour 1 heure et demie, période pendant laquelle l'ADN des bactéries se sépare en deux brins distincts.

### **3.2.5. Hybridation, lavage et révélation**

Après le temps d'incubation, le liquide est jeté et remplacé par 15 ml de la même solution mais fraîche et additionnée de 5µl de la sonde ADN spécifique pour le gène *nuc* et marquée au P<sup>32</sup>. Le tube est placé au four pour toute la nuit.

Une fois l'hybridation terminée, le liquide est jeté et remplacé immédiatement par 15 ml de la solution de lavage (annexe 1) et le tube est placé au four pour 45 minutes.

Cette étape est répétée trois fois.

Les filtres sont prélevés avec précaution et placés sur du papier absorbant jusqu'à ce qu'ils soient secs. Ils sont ensuite collés sur une feuille de papier et enrobés dans une pellicule de plastique transparente. Dans une chambre noire, les feuilles de papier sont placées dans des cassettes en contact avec un film à radiographie. Les cassettes



sont placées à moins 80°C pour 3 heures. Les films sont par la suite développés à l'aide d'une développeuse de film à radiographie automatique.

### **3.3. Hybridation sur colonies et détection de gènes par chemiluminescence**

#### **3.3.1. Préparation des membranes**

La préparation des membranes s'est faite de la même manière que dans le protocole d'essais préliminaires : hybridation sur colonies et détection de gènes par radioactivité P<sup>32</sup>. La seule différence est que des membranes de nylon positivement chargées (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) ont été utilisées plutôt que les filtres Whatman 541 de 90 mm (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario). Douze membranes différentes portant sur chacune d'elles 48 isolats bactériens ont été préparées pour chacune des sondes. De plus, une membrane portant 38 souches résistantes phénotypiquement a été préparée pour les sondes correspondantes.

#### **3.3.2. Lyse bactérienne**

Pour cette étape, le même matériel et les mêmes solutions que lors de l'essai préliminaire ont été utilisés. Les seules différences résident dans les temps de contact à chacune des étapes. Premièrement, les membranes sont placées 15 minutes en contact avec une solution SDS 10% (Sodium dodecyl sulfate). Elles sont ensuite transférées pour une période de 15 minutes dans une solution de NaOH 0,5M + NaCl 1,5M. Puis, les membranes sont placées en contact avec une solution de Tris 0,5M pH 7,5 + NaCl 1,5M pour 15 minutes. Cette dernière étape est répétée une deuxième fois. Une fois bien sèches, les membranes sont exposées à une lumière ultraviolette d'un transilluminateur pour une période de 5 minutes. Elles sont ensuite mises dans des boîtes de pétri jusqu'à leur utilisation.

#### **3.3.3. Fabrication des sondes**

Les séquences des amorces utilisées pour fabriquer les sondes se trouvent dans le tableau 6. Les séquences des sondes ont ensuite été élaborées grâce à Genbank. Le marquage des sondes s'est faite selon le protocole de la compagnie Roche, en utilisant la technique PCR.

### **3.3.4. Préhybridation**

Pour le traitement avec la chemiluminescence, un four à hybridation (Isotemp Hybridization Incubators, Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) a été utilisé. Les tubes à hybridation ont été chauffés au préalable dans le four à 42°C. Lors d'un autre essai, la technique a été reprise en utilisant une température de 65°C pour l'étape de la préhybridation. Les membranes sont ensuite placées dans les tubes identifiés et 40 ml de solution DIG easy Hyb (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) sont ajoutés par tube. Les tubes sont incubés pour 90 minutes.

### **3.3.5. Hybridation**

La solution de préhybridation est remplacée par 15 ml de solution DIG easy Hyb (Roche Diagnostics) à laquelle on ajoute 375 ng de sondes dénaturées et marquées à la digoxigénine (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Les tableaux 5 et 6 représentent les souches témoins utilisées ainsi que les amorces utilisées. Un tube à hybridation par gène recherché a été utilisé, soit 9 tubes. Les tubes ont été incubés 2 heures à 42°C lors d'un premier essai, puis à 65°C lors d'un deuxième essai.

**Tableau 5.** Souches témoins servant de contrôles pour vérifier l'efficacité et la spécificité des techniques d'hybridation sur colonies et de PCR.

| Gène   | Genbank accession no. | Contrôle positif | Profil de résistance  | Référence                         |
|--|-----------------------|------------------|---|-----------------------------------|
| <i>blaZ</i>  | U58139                | CCRI-1317        | Pénicilline   | (Martineau <i>et al.</i> , 2000)  |
| <i>Aac(6')</i> -<br><i>aph(2')</i><br>( <i>aacA-aphD</i> ) | M13771                | CCRI-1317        | Gentamicine,<br>tobramycine,<br>kanamycine                      | (Swenson, 1995;<br>Swenson, 1995) |
| <i>ermA</i>  | X03216                | CCRI-9330        | Macrolide,<br>lincosamide,<br>streptogramin B,<br>érythromycine | (Martineau <i>et al.</i> , 2000)  |
| <i>ermC</i>  | M17990                | CCRI-1317        | Macrolide,<br>lincosamide,<br>streptogramin B,<br>érythromycine | (Martineau <i>et al.</i> , 2000)  |
| <i>msrA</i>  | X52085                | CCRI-9330        | Erythromycine   | (Martineau <i>et al.</i> , 2000)  |
| <i>mecA</i>  | X52593                | CCRI-1317        | Méthicilline  | (Vannuffel <i>et al.</i> , 1995)  |
| <i>tet K</i>   | S67449                | pAT102           | Tétracycline  | (Ng, 2001)                        |
| <i>tetM</i>  | M21136                | pJ13             | Tétracycline  | (Ng, 2001)                        |
| <i>nuc</i>   | N315                  | ATCC 29213       |   | (Baron <i>et al.</i> , 2004)      |

**Tableau 6.** Séquences des amorces utilisées dans les réactions PCR et pour la fabrication des sondes utilisées dans les techniques d'hybridation sur colonies.

| Gènes  | Séquences (5'→3')  | Références                          |
|--|--|-------------------------------------|
| <i>aac(6')</i> -<br><i>aph(2')</i><br>( <i>aacA</i> -<br><i>aphD</i> ) | GAGCAATAAGGGCATACCAAAAATC<br>CCGTGCATTTGTCTTAAAAAACTGG   | (Tenover <i>et al.</i> ,<br>2004)   |
| <i>mecA</i>  | AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC<br>AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC         | (Perreten <i>et al.</i> ,<br>2005)  |
| <i>tetK</i>  | TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC<br>GCAAATCATTCCAGAAGCA              | (Aarestrup <i>et al.</i> ,<br>2000) |
| <i>tetM</i>  | GTAAATAGTGTCTTGGAG<br>CTAAGATATGGCTCTAACAA               | (Aarestrup <i>et al.</i> ,<br>2000) |
| <i>blaZ</i>  | AAGAGATTTGCCTATGCTTC<br>GCTTGACCACTTTTATCAGC             | (Aarestrup <i>et al.</i> ,<br>2000) |
| <i>Nuc</i>   | TGCTATGATTGTGGTAGCCATC<br>CTTCTAGCAAGTCCCTTTTCCA         | (Baron <i>et al.</i> ,<br>2004)     |
| <i>ermC</i>  | ATCTTTGAAATCGGCTCAGG<br>CAAACCCGTATTCCACGATT             | (Aarestrup <i>et al.</i> ,<br>2000) |
| <i>ermA</i>  | TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA<br>CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT        | (Vancraeynest <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>msrA</i>  | TCC AAT CAT TGC ACA AAA TC<br>AAT TCC CTC TAT TTG GTG GT | (Tenover <i>et al.</i> ,<br>2004)   |

### 3.3.6. Lavage

Quatre cycles de lavage ont été effectués. La solution d'hybridation a été remplacée par 15 ml de solution contenant 2 X SSC + 0,1% SDS et les tubes ont été incubés pendant 5 minutes. Cette étape a été répétée deux fois. Puis, la première solution de lavage a été remplacée par 15 ml de solution contenant 0,5 X SSC + 0,1% SDS. Les tubes ont été incubés pendant 15 minutes. Cette étape a été répétée deux fois.

### **3.3.7. Révélation**

Les membranes ont été lavées avec la solution de lavage (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) pendant 5 minutes. Elles ont ensuite été mises en contact avec la solution bloquante (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) durant 30 minutes. Par la suite, les membranes sont transférées de contenant et couvertes de solution d'anticorps (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) diluée 1 :10 000 pour 30 minutes. Les membranes sont ensuite lavées deux fois avec la solution de lavage (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) pendant 15 minutes. Les membranes sont placées dans la solution révélatrice (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) pendant 5 minutes. Elles sont ensuite placées sur un film de plastique transparent. Vingt (20) gouttes de substrat chemiluminescent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) sont ajoutées sur chacune des membranes. Un autre film de plastique transparent est placé par-dessus les membranes. Après un temps d'attente de 5 minutes, l'excédent de liquide est enlevé et les membranes sont placées en contact avec un film à radiographie (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) dans une chambre noire dans une cassette pour 30 minutes. Les films sont par la suite développés avec une développeuse de film radiographique automatique.

Pour les membranes portant les 40 souches avec un phénotype de résistance, une technique de détection de la chemiluminescence sans film radiographique a également été utilisée. Le phosphoimager (Storm 840, Molecular dynamics) a été utilisé, et les lectures de l'appareil ont été transférées dans un fichier excel.

### **3.4. Recherche de gènes de résistance par PCR**

Pour les 38 souches résistantes phénotypiquement, la présence de gène de résistance a été recherchée par PCR. À l'aide de la trousse QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen (Qiagen, Mississauga, Ontario), l'ADN bactérien a été extrait en suivant les lignes directrices de la monographie du manufacturier. Pour chacune des combinaisons amorces spécifiques et souches résistantes, un mélange PCR totalisant 50 µl a été préparé. Chaque mélange contenait 5 µl d'ADN bactérien, 5µl de tampon 10X, 5 µl de DNTP (2 mmol) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), 2,5 µl de l'amorce

sens, 2,5  $\mu\text{l}$  de l'amorce anti-sens, 0,5  $\mu\text{l}$  de Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) et 25  $\mu\text{l}$  d'eau. Les mélanges ont été placés dans un thermocycleur d'ADN (Techne, TC-512, Modèle FTC51h2d,) et pré-incubés à 105,0°C, et soumis à 45 cycles d'amplification (2 minutes à 94°C, 30 secondes 94°C, 30 secondes à 55°C, 30 secondes à 72°C) Après le dernier cycle, les tubes PCR ont été incubés 5 minutes à 72°C, puis conservés à 4°C. Cinq microlitres de chacun des produits PCR combiné à du bromure d'éthidium (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario) ont été placés sur gel d'agarose 1,5% (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) pour électrophorèse pendant 1 heure à 5 V  $\text{cm}^{-1}$ . Une échelle de poids ADN (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) a été placée comme mesure étalon.



## 1. Souches

Sur un total de 428 souches présumées de *S. aureus* testées, 10 étaient négatives pour le test de la coagulase en tube et les 418 autres étaient positives pour ce même test. Les résultats des tests de microdilutions ont été retenus pour ces 418 isolats. Vu la disponibilité de la poudre de l'antibiotique pirlimycine uniquement à la fin de l'étude, seulement 81 isolats ont été testés par microdilution pour cet antibiotique. En contrepartie, 415 souches ont été testées durant l'étude par diffusion en gélose (Kirby-Bauer) avec des disques de pirlimycine. Le nombre correspond à la disponibilité des disques au moment de l'étude.

## 2. Techniques phénotypiques

### 2.1. Microdilutions

Les tableaux 7, 8 et 9 présentent les résultats de CMI obtenus par la méthode de microdilution. Pour la technique de Kirby-Bauer utilisée avec la pirlimycine, 411 des souches testées se sont avérées sensibles et 4 étaient résistantes. D'une manière générale, 14,2% des souches étaient résistantes à au moins 1 des 10 antibiotiques testés. L'antibiotique pour lequel les souches de *S. aureus* démontrent le plus de résistance est la pénicilline avec 6,2% des souches ayant des valeurs de CMI élevées. Vient ensuite la pirlimycine sur 81 souches avec 3,7% des souches démontrant de la résistance, suivi de la lincomycine avec 2,8%, la tétracycline avec 1% et l'érythromycine avec 0,5%. Aucune des souches testées n'était résistante à la gentamicine, l'enrofloxacin, l'oxacilline ni aux les combinaisons triméthoprime-sulfaméthaxazone et pénicilline-novobiocine.

### 2.2. Technique de Kirby-Bauer

Sur les 415 souches testées par la méthode de diffusion sur gélose appelée Kirby-Bauer avec disque de pirlimycine, 0,2% des souches démontraient de la résistance.

### 2.3. Comparaison des techniques de microdilution et de Kirby-Bauer

Parmi les 4 souches démontrant de la résistance à la pirlimycine lorsque testées par la technique de Kirby-Bauer, seulement deux ont été testées par technique de



microdilution et démontraient également des valeurs de CMI classées résistantes. Une des souches ayant une CMI élevée par microdilution pour la pirlimycine était classée sensible, soit un diamètre de 25 mm avec le disque.

## 2.4. Résistance simple et multiple

Plusieurs souches résistantes à la pénicilline étaient aussi résistantes à d'autres antibiotiques alors que 20 des souches résistantes à la pénicilline ne l'étaient que pour cet antibiotique. Deux souches étaient à la fois résistantes à la pénicilline, à la lincomycine et à la pirlimycine. Une souche démontrait de la résistance à la fois à l'érythromycine et à la pénicilline G. Enfin, 3 souches étaient résistantes à la tétracycline et à la pénicilline G.

**Tableau 7.** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 8 antibiotiques envers les souches de *S. aureus* provenant d'échantillons de lait de bovins

| Antimicrobien<br>(nombre)  | CMI <sup>1</sup> , µg/mL |            |            |            |            |   |   |   |    |    |    |   |
|----------------------------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|---|---|---|----|----|----|---|
|                            | 0,0625                   | 0,125      | 0,25       | 0,5        | 1          | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 |   |
| <b>Gentamicine (418)</b>   | 10                       | 101        | <i>199</i> | <b>89</b>  | 16         | 3 | 0 | 0 |    | 0  | 0  | 0 |
| <b>Pénicilline (418)</b>   | <i>380</i>               | 10         |            | 0          | 3          | 1 | 3 | 5 | 5  | 4  | 3  | 2 |
| <b>Tétracycline (418)</b>  | 228                      | 76         | 63         | <b>34</b>  | 19         | 1 | 1 | 2 |    | 2  | 0  | 2 |
| <b>Érythromycine (418)</b> | 298                      | <b>108</b> | 7          | 2          | 1          | 0 | 0 |   | 0  | 0  | 0  | 2 |
| <b>Lincomycine (418)</b>   | 1                        | 5          | 33         | <i>174</i> | <b>184</b> | 9 |   | 5 | 3  | 0  | 1  | 3 |
| <b>Enrofloxacin (418)</b>  | <i>410</i>               | 4          | 1          | 3          | 0          | 0 |   | 0 | 0  | 0  | 0  | 0 |
| <b>Oxacilline (418)</b>    | <i>378</i>               | 29         | 10         | 1          | 0          | 0 |   | 0 | 0  | 0  | 0  | 0 |
| <b>Pirlimycine (81)</b>    | 6                        | 36         | <b>34</b>  | 1          | 0          | 0 |   | 3 | 0  | 0  | 0  | 0 |

<sup>1</sup> Les valeurs de CMI<sub>50</sub> sont inscrites en italique et celles de CMI<sub>90</sub> en caractère gras.

Les barres verticales représentent les valeurs seuils pour lesquelles les souches sont résistantes.

**Tableau 8.** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la combinaison TMS envers les souches de *S. aureus* provenant de lait de bovins.

|              | CMI <sup>1</sup> , µg/mL |             |             |             |             |            |            |            |             |             |             |
|--------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
|              | 0,0025/                  | 0,005/      | 0,01/       | 0,03/       | 0,05/       | 0,1/       | 0,2/       | 0,4/7      | 0,8/        | 1,6/        | 3,2/        |
|              | <b>0,06</b>              | <b>0,12</b> | <b>0,24</b> | <b>0,48</b> | <b>0,95</b> | <b>1,9</b> | <b>3,8</b> | <b>0,6</b> | <b>15,2</b> | <b>30,4</b> | <b>60,8</b> |
| TMS<br>(418) | 13                       | 17          | 64          | <i>216</i>  | <b>100</b>  | 5          | 3          | 0          | 0           | 0           | 0           |

<sup>1</sup> Les valeurs de CMI<sub>50</sub> sont inscrites en italique et celles de CMI<sub>90</sub> en caractère gras.

La barre verticale représente la valeur seuil pour laquelle les souches sont résistantes.

Pour la lincomycine, 3 souches avec des CMI supérieures ou égales à 64 étaient aussi résistantes à la pirlimycine en disque et une également par microdilution.

Une souche était uniquement résistante à la tétracycline et une autre à l'érythromycine.

**Tableau 9.** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la combinaison pénicilline/novobiocine envers les souches *S. aureus* provenant d'échantillons de lait de bovins.

|                    | CMI <sup>1</sup> , µg/mL |             |            |          |          |          |          |           |           |           |            |
|--------------------|--------------------------|-------------|------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|
|                    | 0.0625/                  | 0.125/      | 0.25/      | 0.5/     | 1/       | 2/       | 4/       | 8/        | 16/       | 32/       | 64/        |
|                    | <i>0.125</i>             | <i>0.25</i> | <i>0.5</i> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>4</b> | <b>8</b> | <b>16</b> | <b>32</b> | <b>64</b> | <b>128</b> |
| <b>Pén G/</b>      |                          |             |            |          |          |          |          |           |           |           |            |
| <b>Novobiocine</b> | <i>415</i>               | 3           | 0          | 0        | 0        | 0        | 0        | 0         | 0         | 0         | 0          |
| <b>(418)</b>       |                          |             |            |          |          |          |          |           |           |           |            |

<sup>1</sup> Les valeurs de CMI<sub>50</sub> sont inscrites en italique et celles de CMI<sub>90</sub> en caractère gras. La barre verticale représente la valeur seuil pour laquelle les souches sont résistantes.

## 2.5. Répartition géographique

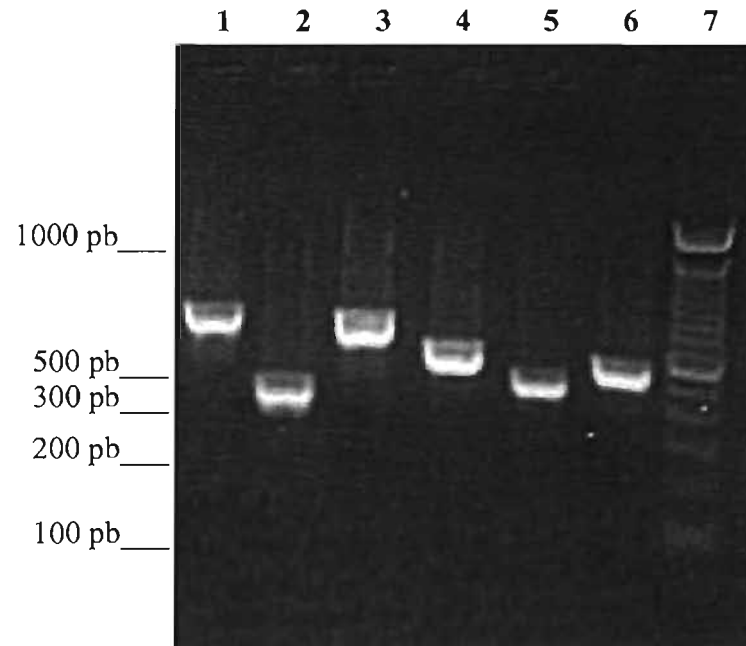
Les souches présentant de la résistance aux différents antibiotiques ne proviennent pas d'une même région géographique. En effet, lorsqu'on compare ces souches entre elles avec les codes postaux correspondants à leur provenance, on voit que les souches sont éparpillées un peu partout dans les régions du Québec. Cela laisse suggérer que les habitudes dans le choix des traitements antibiotiques sont constantes à travers le Québec.

## 3. Techniques génotypiques

### 3.1. Présence de gènes de résistance chez les souches témoins.

Les essais préliminaires par PCR et migration sur gel d'agarose ont démontré la présence de gène de résistance chez les souches témoins. Chez la souche CCRI-1317, des bandes de poids moléculaires différents ont été retrouvées soient une de 478 paires de bases (pb) correspondant au gène *blaZ*, une de 455 pb pour le gène *aacA-aphD*, une de 527 pb pour le gène *ermC* et une de 489 pb pour le gène *mecA*. Pour la souche CCRI-9330, deux bandes ont pu être observées, une de 600 pb correspondant au gène *ermA* et une de 301 pb au gène *msrA*. Dans le cas de la souche pJ13, une bande de 617 pb correspondant au gène *tetM* était présente. Pour la souche pAT102,

aucune bande correspondant au gène *tetK* n'a pu être retrouvée. Enfin, une bande de 376 pb correspondant au gène *nuc* a été retrouvée chez la souche de *S. aureus* ATCC 29213. La figure 10 donne un aperçu d'un des gels d'agarose de cette étape.



**Figure 10.** Essais préliminaires : démonstration de la présence des gènes de résistance sur les souches contrôles. Dans la colonne 1 on peut observer une bande de 600 pb correspondant au gène *ermA*. Dans la colonne 2, une bande de 301 pb correspond au gène *mrsA* tandis que dans la colonne 3 une bande de 617 pb correspond au gène *tetM*. Dans la colonne 4, on voit une bande de 478 pb correspondant au gène *blaZ* alors que dans la colonne 5, une bande de 376 pb correspond au gène *nuc*. Enfin dans la colonne 6, une bande de 489 pb représente le gène *mecA* et dans la colonne 7, on voit l'échelle de poids moléculaire.

### **3.2. Hybridation sur colonies et détection par sondes marquées à la radioactivité P<sup>32</sup>**

Lors des essais préliminaires d'hybridation sur colonies et détection par sondes marquées au P<sup>32</sup>, le gène *nuc* a été retrouvé chez les souches de *S. aureus* ATCC 29213 et 25923. En contrepartie, ce même gène n'a pas été retrouvé chez les souches témoins négatifs de l'ATCC suivantes : *E. coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 27833, *Enterococcus faecalis* 19433 et *Klebsiella pneumoniae* 13883. Ceci était un résultat attendu car le gène *nuc* est spécifique pour l'espèce *S. aureus*.

### **3.3. Hybridation sur colonies et détection par chemiluminescence**

Au cours des manipulations d'hybridation sur colonies et de détection de gènes par chemiluminescence, les résultats n'ont pas été concluants car la spécificité était faible. Les témoins positifs étaient parfois positifs, parfois négatifs. Les films étaient très difficiles à interpréter en raison d'un bruit de fond important. Les résultats sur les souches à tester étaient eux aussi non reproductibles.

En utilisant l'appareil phosphoimager pour effectuer la lecture des membranes, le bruit de fond était moins important. Pour cette étape, uniquement la membrane comportant les 38 souches ayant un phénotype de résistance a été testée. Pour le gène *blaZ*, 3 des 4 souches témoins positifs étaient positifs alors que 1 des 7 souches témoins négatifs était positif. De plus, 5 souches à tester n'ayant pas le phénotype de résistance pour la pénicilline étaient positives pour ce gène. Neuf des 26 souches ayant un phénotype de résistance pour la pénicilline semblaient positives pour le gène *blaZ*. Aucune corrélation entre l'intensité de la tache et la valeur de CMI obtenue n'était présente. Quant au gène *tetM*, 1 des 3 souches témoins positifs était positive, 2 des 7 souches témoins négatifs étaient positives, 16 souches à tester n'ayant pas le phénotype de résistance étaient positives. Deux (2) des 4 souches ayant le profil de résistance à la tétracycline étaient positives.

Pour le gène *ermA*, aucune des 3 souches témoins positifs n'était positive, 3 des 7 témoins négatifs étaient positifs, 7 des souches à tester ne présentant pas le phénotype

de résistance aux MLS étaient positives et 7 des 14 souches présentant ce phénotype étaient positives.

Pour le gène *ermC*, 1 des 4 souches témoins positifs était positive, les 6 souches témoins négatifs étaient négatives, 3 des 14 souches à tester ayant le phénotype étaient positives et 6 souches n'ayant pas le phénotype étaient positives.

Pour le gène *msrA*, 1 des 3 souches témoins positifs était positive et 3 des 7 souches témoins négatifs étaient positives. Trois des 14 souches présentant le phénotype étaient positives et 5 souches ne l'ayant pas étaient positives.

### **3.4. Détection des gènes de résistance par technique PCR**

#### **3.4.1. Comparaison des résultats obtenus par techniques hybridation sur colonies avec sondes marquées à la chemiluminescence et PCR**

Les résultats obtenus par hybridation sur colonies avec sondes marquées à la chemiluminescence et PCR ont été comparés. Le manque de spécificité de la technique d'hybridation sur colonies rend difficile cette analyse. En effet, parmi 4 souches chez lesquelles le gène *msrA* a été retrouvé par la technique de PCR, aucune n'a hybridé par colonies avec la sonde *msrA*. Il en est ainsi pour 2 souches positives pour le gène *ermC* et l'unique souche positive pour le gène *ermA* par PCR mais négatives par hybridation sur colonies.

#### **3.4.2. Comparaison des résultats obtenus par techniques phénotypiques et PCR**

Les résultats phénotypiques ont été comparés à ceux obtenus par PCR. Seules les souches ayant un phénotype de résistance ont été comparées. Sur les 26 souches résistantes phénotypiquement à la pénicilline, aucune n'a révélé la présence du gène *blaZ* lors de la recherche par PCR. Quatre souches présentant un phénotype de résistance pour la tétracycline ont été testées par PCR. Aucune d'elles ne portait le gène *tetM*. Le gène *tetK* n'a pas été recherché faute de témoin positif. Sur les 14 souches présentant un phénotype de résistance pour le groupe MLS, 4 étaient porteuses du gène *mrsA*, 1 portait le gène *ermC*, alors qu'une autre portait le gène

*ermA* en plus du gène *ermC*. Toutes les 38 souches de *S. aureus* testées portaient le gène *nuc*, gène marqueur de l'espèce *S. aureus*. Les gènes *mecA* et *aacA-aphD* n'ont pas été recherchés en raison de l'absence de phénotype de résistance envers l'oxacilline et les aminoglycosides respectivement. Dans tous les cas de gènes testés, les souches contrôles témoins positifs hybridait avec la sonde représentant leur gène qu'ils portaient. Le tableau 10 montre la corrélation entre le phénotype de résistance et le génotype retrouvé chez les 38 souches testées par PCR. En général, la corrélation est faible.

**Tableau 10.** Corrélation entre le phénotype de résistance aux antibiotiques et les résultats obtenus par PCR sur 38 souches présentant un phénotype de résistance aux antibiotiques.

| Identification<br>de la souche | Phénotype de résistance        | Présence du gène : |             |             |             |             |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                                |                                | <i>blaZ</i>        | <i>tetM</i> | <i>ermA</i> | <i>ermC</i> | <i>msrA</i> |
| 14                             | PEN (4)                        | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 32                             | PEN (64), LINCO (8), PIRLI (4) | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 33                             | PEN (64), LINCO (4), PIRLI (4) | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 46                             | PEN (2)                        | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 55                             | TETRA (64)                     | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 62                             | PEN (1)                        | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 64                             | PEN (8)                        | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 70                             | LINCO (4)                      | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 90                             | PEN (4)                        | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 96                             | PEN (8)                        | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 99                             | PEN (4)                        | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 111                            | PEN (4)                        | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 132                            | LINCO (4)                      | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 172                            | PEN (16)                       | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 178                            | LINCO (64), PIRLI (4)          | -                  | -           | -           | -           | +           |
| 180                            | PEN (32), ERYTH (64)           | -                  | -           | -           | +           | +           |
| 240                            | PEN (0,5)                      | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 250                            | PEN (8)                        | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 252                            | LINCO (4)                      | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 257                            | PEN (16)                       | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 265                            | LINCO (8)                      | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 287                            | PEN (0,5)                      | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 288                            | LINCO (4)                      | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 291                            | PEN (8), TETRA (32)            | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 304                            | LINCO (8)                      | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 318                            | ERYTH (64)                     | -                  | -           | +           | +           | +           |
| 373                            | PEN (2)                        | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 374                            | PEN (64)                       | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 382                            | PEN (32)                       | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 395                            | PEN (0,5), TETRA (64)          | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 400                            | PEN (64), TETRA (64)           | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 412                            | LINCO (32)                     | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 422                            | PEN (2)                        | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 441                            | LINCO (64)                     | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 450                            | PEN (32)                       | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 452                            | LINCO (64)                     | -                  | -           | -           | -           | +           |
| 456                            | PEN (16)                       | -                  | -           | -           | -           | -           |
| 457                            | PEN (16)                       | -                  | -           | -           | -           | -           |

PEN = Pénicilline; LINCO = Lincomycine; PIRLI = Pirlimycine; ERYTH = Erythromycine; TETRA = Tétracycline; ( ) = correspondant à la valeur de CMI obtenue par microdilution, en ug/mL.



# PARTIE 4



## **DISCUSSION**

**ET**

## **CONCLUSION**

# 1. Techniques phénotypiques

## 1.1. Microdilutions

### 1.1.1. Choix de la technique

La technique de microdilution a été retenue car elle est recommandée par le CLSI et, contrairement à la technique de Kirby-Bauer qui est plutôt qualitative, elle constitue une méthode quantitative, donc plus précise. Malgré cette décision, la non disponibilité de l'antibiotique pirlimycine sous format de poudre a contraint à l'utilisation de la technique Kirby-Bauer pour cet antimicrobien.

### 1.1.2. Choix des antimicrobiens

Le choix des différents antimicrobiens testés s'est fait dans un but premier qui était de représenter le plus de classes d'antibiotiques possible tout en utilisant un faible nombre d'antimicrobiens différents. Par exemple, la pénicilline G a été utilisée comme représentante pour toutes les bêta-lactamines sensibles aux pénicillinases tandis que l'oxacilline représentait les bêta-lactamines résistantes à ces enzymes (Jorgensen *et al.*, 2003). L'utilisation de l'oxacilline avait aussi comme objectif d'induire la résistance à la méthicilline si tel était le cas. La méthicilline étant une molécule instable, elle ne peut être utilisée lors des tests en laboratoire. Toutefois, l'utilisation de l'oxacilline pour induire chez les *S. aureus* le phénotype du gène *mecA* a été remise en question (Boubaker *et al.*, 2004; Swenson *et al.*, 2005; Velasco *et al.*, 2005). Certains auteurs préconisent maintenant l'utilisation d'un disque chargé avec 30 µg de cefoxitine et le CLSI abonde dans ce sens (NCCLS, 1999; NCCLS, 2004; Velasco *et al.*, 2005). Vu les résultats obtenus dans la présente étude, cela apparaît comme ayant peu d'impact puisqu'aucune multirésistance n'a été détectée et que rien nous laisse croire qu'il y avait présence de SARM parmi les souches testées. Par contre, il serait plus approprié d'utiliser la cefoxitine dans une étude ultérieure. D'autres antimicrobiens tels que la combinaison pénicilline-novobiocine et l'érythromycine ont été testés car ils sont les principes actifs de nombreux traitements intra-mammaires utilisés au Québec. La tétracycline et la combinaison triméthoprim-sulfaméthaxazone sont les deux principaux antimicrobiens utilisés par voie systémique lors de traitement de mammites aiguës. Enfin, l'enrofloxacin et la

gentamicine, qui sont des antimicrobiens disponibles mais non autorisés comme traitement de la mammite au Québec, ont été choisis dans le but d'effectuer une surveillance de dérogations à la loi.

### **1.1.3. Situation par rapport aux autres études publiées**

Si on situe les données d'antibiorésistance obtenues dans cette étude par rapport à celles publiées dans de nombreux articles à travers le monde, le Québec ne compte qu'un très faible taux de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques de manière générale, avec 14,2% des souches résistantes à au moins 1 des 10 antimicrobiens testés (Erskine *et al.*, 2004).

#### **1.1.3.1. Pénicilline**

De manière générale, la pénicilline est l'antibiotique pour lequel les niveaux de résistance sont les plus élevés. Par contre, on observe une tendance à la baisse depuis quelques années. (Erskine *et al.*, 2004) Dans la présente étude, une CMI<sub>90</sub> de seulement 0,0625 µg/mL a été obtenue pour la pénicilline, ce qui serait une des plus faibles publiées jusqu'à maintenant (Salmon *et al.*, 1998; De Oliveira *et al.*, 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002; Erskine *et al.*, 2004). Seules deux souches sur 418 présentaient des CMI élevées supérieures à 64 µg/mL.

#### **1.1.3.2. Oxacilline**

Il y a peu de résistance à l'oxacilline de rapportée pour les isolats de *S. aureus* provenant de glande mammaire bovine (Salmon *et al.*, 1998; De Oliveira *et al.*, 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002; Erskine *et al.*, 2004). Les résultats obtenus ici concordent, avec une CMI<sub>90</sub> de seulement 0,0625 µg/mL. Cela peut paraître étonnant, puisqu'au Québec, un des principaux traitements intra-mammaires utilisés est la cloxacilline, qui fait partie de la famille de l'oxacilline. Ces résultats dénotent également l'absence ou encore la faible prévalence de SARM au Québec au niveau du lait, aucune CMI supérieure à 0,5 µg/mL n'ayant été obtenue. C'est aussi le cas dans la majorité des pays. Ces données s'avèrent rassurantes en vertu de tous les problèmes associés au SARM chez les humains, le lait de consommation pouvant être fort probablement exclus des sources probables de transmission à l'humain (Salmon *et al.*, 1998; De Oliveira *et al.*, 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002; Erskine *et al.*, 2004).

### 1.1.3.3. Pirlimycine

Comme la compagnie ne pouvait fournir la poudre d'antibiotique au moment de l'étude, le choix a donc été fait de tester quand même les souches vis-à-vis cet antibiotique, en employant la technique de Kirby-Bauer. Nous avons 415 disques de pirlimycine disponibles, et donc 3 souches n'ont pu être testées par cette méthode. À la fin de l'étude, la poudre de pirlimycine est devenue disponible. Puisqu'il avait été décidé de tester à nouveau 81 souches avec des résultats douteux, (plaques dont les témoins ne présentaient pas de croissance et souches pour lesquelles il semblait y avoir de la résistance), ces mêmes 81 souches ont été testées par la technique de microdilution avec la pirlimycine.

Globalement, les résultats obtenus pour la pirlimycine dans cette étude avec une CMI<sub>90</sub> de 0,25 µg/mL se situent dans la moyenne (Salmon *et al.*, 1998; De Oliveira *et al.*, 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002; Erskine *et al.*, 2004). Une seule étude faisant exception avec des résultats de CMI<sub>90</sub> supérieurs à 64 µg/mL. Il faut cependant mentionner que dans cette étude, des techniques pour induire la résistance chez les souches avaient été utilisées (Watts *et al.*, 1995). Dans la présente étude, seulement 3,7% des souches testées présentaient de la résistance à la pirlimycine ce qui est très peu, compte tenu du fait que cet antibiotique est largement utilisé en pratique bovine au Québec.

### 1.1.3.4. Lincomycine

Dans les études où elle a été testée envers *S. aureus*, la lincomycine présente habituellement des CMI<sub>90</sub> élevées, oscillant entre 1,0 et 64,0 µg/mL, ce qui diffère du résultat obtenu dans la présente étude qui est de 1,0 µg/mL (De Oliveira *et al.*, 2000). Seules 2,8% des souches avaient des CMI classées comme résistantes, dont seulement 3 supérieures à 64 µg/mL. La lincomycine n'est pas un antibiotique largement utilisé au Québec pour le traitement des infections intra-mammaires, ce qui peut expliquer le peu de résistance retrouvée comparativement aux autres pays.

### 1.1.3.5. Érythromycine

Les résultats obtenus pour l'érythromycine se situent également dans la moyenne avec une CMI<sub>90</sub> de 0,125 µg/mL (Salmon *et al.*, 1998; De Oliveira *et al.*, 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002; Erskine *et al.*, 2004). Seule 2 souches

soit 0,5% au total, démontraient des CMI de 64 µg/mL et plus et étaient classées comme résistantes. La même étude que dans le cas de la pirlimycine a mis en évidence de CMI plus élevées en induisant la résistance (Watts *et al.*, 1995).

#### **1.1.3.6. Combinaison pénicilline/novobiocine**

La combinaison des antimicrobiens pénicilline et novobiocine n'est pas testée dans la majorité des études. Parfois, la novobiocine est testée seule, mais cela ne permet pas de mettre en évidence le synergisme de ces molécules envers les *S. aureus* (Dowling, 2006). Dans son recueil de conférences de l'année 2004, le NMC n'en fait aucune mention (Erskine *et al.*, 2004). Pourtant au Québec, il s'agit là d'une combinaison largement utilisée au tarissement des vaches laitières. Les données obtenues dans cette étude avec des CMI<sub>90</sub> inférieures à 0,0625/0,125 µg/mL sont identiques à celles des autres études (Salmon *et al.*, 1998; De Oliveira *et al.*, 2000). Cela se veut rassurant, car on mise souvent sur le traitement au tarissement pour éliminer les infections récentes à *S. aureus*.

#### **1.1.3.7. Tétracycline**

Tout comme pour la combinaison pénicilline/novobiocine, on ne trouve pas les données pour la tétracycline dans toutes les études. En effet, la tétracycline n'est pas utilisée dans le traitement local des mammites à *S. aureus*. Toutefois, lors d'infections aiguës accompagnées de signes systémiques, la tétracycline fait partie des antibiotiques utilisés par la majorité des vétérinaires au Québec. De plus, la tétracycline est largement utilisée pour traiter d'autres types d'infections. Notre étude a permis de démontrer que très peu de résistance était présente chez les souches testées, avec moins de 1%. Les CMI<sub>90</sub> et CMI<sub>50</sub> obtenues sont faibles, et se situent dans la moyenne inférieure si on les compare avec les autres études (Yoshimura *et al.*, 2002; Erskine *et al.*, 2004). Encore une fois, il s'agit d'une bonne nouvelle, car il ne semble pas que l'utilisation de cet antibiotique entraîne de la résistance chez les bactéries retrouvées dans la glande mammaire, comme c'est les cas au niveau intestinal chez certaines populations animales.

#### **1.1.3.8. Combinaison triméthoprim/sulfaméthaxazole**

La combinaison triméthoprim/sulfaméthaxazole a été incluse dans cette étude dans la même visée que pour la tétracycline. Toutefois, aucune autre étude n'a testé cette

combinaison antimicrobienne. Dans le cas présent, aucune résistance n'a été décelée et les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> obtenues étaient assez faibles.

#### **1.1.3.9. Enrofloxacin et gentamicine**

Contrairement à ce qui se passe dans d'autres pays industrialisés, l'usage de l'enrofloxacin et de la gentamicine n'est pas permis chez les vaches laitières au Québec. D'ailleurs, les données publiées dans les autres études proviennent de l'Europe et le NMC n'a pas inclus ces antibiotiques dans ses tableaux de compilation (Erskine *et al.*, 2004). Cette étude n'a mis en évidence aucune souche résistante envers ces deux produits et les CMI obtenues étaient très faibles. C'est le cas dans la majorité des pays pour lesquels les données sont publiées, sauf dans le cas de la Norvège, où des CMI des plus de 64 µg/mL ont été retrouvées pour l'enrofloxacin (Salmon *et al.*, 1998; De Oliveira *et al.*, 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002).

#### **1.1.3.10 Données existantes pour le Canada**

Les publications sur des données comparatives canadiennes qui traitent de la résistance des *S. aureus* isolés de glandes mammaires sont très rares et celles pour le Québec le sont encore plus. Une seule étude effectuée en Ontario a rapporté quelques données sur le sujet. Pour la province de Québec, 105 souches de *S. aureus* ont été testées envers la pénicilline et la tétracycline. Pour le premier, un pourcentage de résistance de 9,1 a été trouvé et pour le second, un pourcentage de 1,9 (Sabour *et al.*, 2004). Ces chiffres sont légèrement supérieurs à ce qui a été trouvé dans la présente étude, mais il faut souligner que le nombre de souches utilisées ici était quatre fois plus élevé que celui dans cette étude canadienne.

## **2. Techniques génotypiques**

### **2.1. Gènes de résistance chez les souches contrôles**

#### **2.1.1. Particularités des gènes de résistance pour la tétracycline**

Lors des essais préliminaires pour démontrer la présence des gènes de résistance cibles chez les souches témoins, il a été constaté que la souche pAT102 avait perdu son gène *tetK*. Cela s'expliquerait par le fait que le gène *tetK* est situé sur un plasmide

et qu'un plasmide peut se perdre lors des repiquages de la souche. Il a été essayé mais en vain de repiquer la souche à partir du tube de congélation sur des géloses concentrées en tétracycline. Compte tenu du fait qu'il y avait seulement 4 souches qui présentaient phénotypiquement de la résistance pour la tétracycline et que le gène *tetM* était testé, la décision a été prise de renoncer à rechercher le gène *tetK*, faute de témoin positif. Malgré tout, les probabilités de retrouver le gène *tetK* étaient plus élevées que pour le gène *tetM*, car le mécanisme de pompe à efflux pour lequel code le gène *tetK* est plus fréquent chez les *S. aureus* (Chopra *et al.*, 2001). Aussi, une alternative plus intéressante aurait été de rechercher malgré tout le gène *tetK* chez les souches à tester. Si une bande était apparue avec le poids moléculaire correspondant au gène *tetK*, il aurait été possible de procéder au séquençage et de confirmer la présence de *tetK* chez la souche.

### 2.1.2. Autres gènes

Chez toutes les autres souches témoins utilisées, les gènes de résistance ciblés par les paires d'amorces choisies ont été retrouvés. En effet, la technique de PCR a permis de mettre en évidence chez les souches des gènes de résistance aux antibiotiques et de poids moléculaires attendus, ce qui indique qu'il s'agissait de bons témoins positifs pour les épreuves subséquentes. Ici encore, il aurait été préférable de faire séquencer un exemple de chacun des gènes chez les souches témoins positifs afin de confirmer qu'il s'agissait bien des gènes recherchés.

## 2.2. Hybridation sur colonies et radioactivité P<sup>32</sup>

Les essais d'hybridation sur colonies en utilisant des sondes radioactives marquées au P<sup>32</sup> ont permis de démontrer que la sonde spécifique au gène *nuc* hybridait aux isolats de *S. aureus* et cela permettait de confirmer l'identification des *S. aureus*. Cette étape a aussi permis de démontrer que la lyse bactérienne sur colonies avait bien été effectuée. En effet, l'efficacité de la lyse bactérienne est une étape déterminante qui aurait pu freiner l'utilisation de la technique d'hybridation sur colonies. En effet, contrairement aux *E. coli* pour lesquels la technique a été développée, les *S. aureus* ne se lysent pas aussi facilement étant donné que la paroi des bactéries à Gram positif est constituée d'une couche très épaisse de peptidoglycans qui est résistante aux traitements chimiques. Malgré tout, les essais préliminaires ont démontré que la

technique permettait une lyse adéquate, et que l'intensité des signaux obtenus était aussi forte que pour les bactéries à Gram négatif.

## **2.3. Hybridation sur colonies et chemiluminescence**

### **2.3.1. Choix de la technique**

La technique de chemiluminescence pour révéler l'hybridation a été choisie parce qu'elle se voulait innovatrice, moins dangereuse et surtout moins contraignante que celle utilisant la radioactivité à  $P^{32}$ . En effet, cette dernière doit être utilisée dans des locaux dédiés et par une personne certifiée. Elle engendre aussi des déchets et une contamination potentielle des surfaces de travail par du matériel radioactif. Elle nécessite un équipement de protection et des manipulations très strictes. À l'opposé, la technique de chemiluminescence peut être effectuée dans n'importe quel local par une personne moins expérimentée et sans contraintes de sécurité et de manipulations.

### **2.3.2. Bruit de fond**

Par contre, dans cette étude, l'utilisation de la chemiluminescence s'est avérée très faiblement spécifique et non sensible. Un trop grand bruit de fond ne permettait pas de distinguer les témoins positifs des témoins négatifs et la technique n'a donc pu être validée. Ainsi, l'hybridation avec les souches de l'étude n'a pu être révélée. Les raisons pouvant expliquer ce problème majeur sont nombreuses.

#### **2.3.2.1. Protéinase K**

Tout d'abord, quelques adaptations du protocole suggéré par le manufacturier Roche ont été faites. Une étape critique qui n'a pas été suivie lors de la préparation des membranes, est le traitement à la protéinase K. Cette enzyme assure la digestion des débris de protéines, éliminant directement les anticorps anti-digoxigénine des protéines de la cellule bactérienne qui réagiraient par chemiluminescence. Ceci entraînant une réaction des protéines de la bactérie avec les anticorps anti-digoxigénine qui masque la réaction spécifique de sonde avec sa cible ADN, donc un bruit de fond qui empêche de distinguer clairement les hybridations positives de celles négatives. Nous avons constaté ici que cette étape est vraiment cruciale lors de l'utilisation de la technique de chemiluminescence (Roche, 2000).



### 2.3.2.2. Sondes

D'autres explications pour la présence du bruit de fond résident dans les sondes. Il se peut que la concentration des sondes était trop élevée. Cependant, ce point avait été contrôlé lors de la préparation des sondes et la concentration utilisée respectait les recommandations de la compagnie Roche, soit 25ng/ml. Il se peut également que les fragments marqués aient été contaminés par des produits PCR non spécifiques. Ce point avait aussi été contrôlé, et le poids moléculaire des fragments servant de sondes était exactement celui attendu. Une distribution inégale à la surface de la membrane de la sonde lors de l'hybridation, un volume insuffisant de solution d'hybridation ou le séchage trop important des membranes lors de l'hybridation peuvent aussi être mis en cause. Toutefois, les volumes apparaissaient suffisants, et une rotation continue avait lieu durant les hybridations. De plus, les membranes étaient toujours gardées humides (Roche, 2000).

### 2.3.2.3. Substrat

Des problèmes ont également pu survenir lors de l'étape d'incubation avec le substrat chemiluminescent. En effet, à cette étape critique, le substrat n'a peut-être pas été distribué également au niveau de la surface de la membrane. De plus, la technique de transparence recommandée par la compagnie n'est pas des plus facile. Cette technique consiste à recouvrir les membranes d'une pellicule de plastique transparent à l'étape d'incubation du substrat. Il faut s'assurer que les pellicules de plastique qui recouvrent les membranes sont bien tendues et sans plis, ce qui est pratiquement impossible. D'ailleurs, au début, une pellicule de plastique plus épaisse était utilisée et lors de la révélation, on pouvait voir sur le film radiographique tous les motifs de cette pellicule. Pour l'étape suivante, lorsqu'on expose les membranes sur le film, le même problème est rencontré puisqu'il faut placer un sac de plastique transparent contenant les membranes et le film dans la cassette. À ce moment, il est extrêmement difficile d'assurer une surface de contact adéquate entre le film et les membranes, sans compter que les membranes sont humides et difficilement manipulables (Roche, 2000). En effet, contrairement à la technique d'hybridation avec sondes marquées à la radioactivité  $P^{32}$  où les membranes sont sèches à l'étape d'exposition au film

radiographique, le protocole de la compagnie Roche utilisant la chemiluminescence nécessite que les membranes demeurent humides tout au long du procédé.

#### **2.3.2.4. Membranes**

Le bruit de fond peut aussi être causé par le fait que les membranes ont séché durant l'une des opérations. Cela ne semble pas le cas. Il se peut aussi que les membranes se soient touchées ou aient collé au récipient au cours d'une des étapes. Durant les étapes de pré-hybridation et d'hybridation, des feuilles de nylon ont été utilisées pour enrouler les membranes et éviter qu'elles ne se touchent. Peut-être que le fait d'utiliser ces feuilles a eu une influence sur les charges électrostatiques des membranes (Roche, 2000).

#### **2.3.2.5. Exposition**

Un temps d'exposition trop long ou trop court peut expliquer les incohérences dans les niveaux d'intensité des signaux. Les temps recommandés par le fabricant ont été respectés au début, puis des essais plus longs ou plus courts ont été faits sans changement notable. De plus, puisque les films à radiographies utilisés étant ceux vendus et recommandés par la compagnie Roche, il est donc moins probable qu'ils soient responsables d'un important bruit de fond.

#### **2.3.2.6. Hybridations non spécifiques**

En utilisant l'appareil phosphoimageur, le bruit de fond était beaucoup moins élevé. Sur le site web de l'Institut national de la recherche agronomique (INRA) Centre de Tours, on retrouve le principe du phosphoimageur. Cet appareil est un imageur qui donne la possibilité de faire des autoradiographies sur un écran sensible (écran au phosphore) ou encore de visualiser et d'analyser des signaux fluorescents. Lorsqu'on utilise la fluorescence, comme dans le cas de la présente étude, le signal doit être excitable par le laser à 450 nm et capable d'émettre entre 540 et 560 nm. Cela permet d'observer des acides nucléiques marqués avec un intercalant ou des immunoempreintes révélées par chemiluminescence. Lorsque la radioactivité est utilisée, il faut exposer les membranes à l'écran au phosphore. Ceci transforme les signaux radioactifs en un signal fluorescent lu par l'appareil. Cet appareil remplace donc complètement la technique d'autoradiographie sur film et permet même de visualiser à l'écran et de quantifier la radioactivité concentrée sur un point (INRA,

2008). L'utilisation de cet appareil élimine les étapes de révélation par le substrat et d'exposition à un film radiographique. Par conséquent, toutes les causes de génération de bruit de fond reliées à ces deux étapes peuvent être exclues. Ce qui amène à dire que le gros problème de la technique réside principalement dans ces deux dernières étapes. Toutefois, il y a avait quand même des hybridations non spécifiques qui ne permettaient pas toujours de distinguer les témoins positifs des témoins négatifs. Cela est probablement lié à l'étape de digestion avec la protéinase K qui n'a pas été effectuée, tel que discuté auparavant. Les problèmes d'hybridations non spécifiques peuvent être aussi causés par la température utilisée lors de l'hybridation. Une température trop basse engendre plus d'hybridations non spécifiques d'ADN (Roche, 2000). Pourtant, les températures 42°C et 65°C ont été utilisées sans qu'aucune différence ne soit notée.

## **2.4. Comparaison des résultats des techniques PCR et hybridation**

Dans la présente étude, la technique de PCR s'est avérée plus efficace que celle d'hybridation sur colonies car elle a permis d'obtenir des résultats sur les souches à tester. Il faut cependant nuancer cette affirmation car la technique d'hybridation n'a pas été validée dans la présente étude. Cela ne nous permet donc pas de comparer les résultats obtenus avec cette technique à ceux obtenus avec une autre. Avant d'affirmer que l'hybridation sur colonies ne fonctionne pas du tout, il faudrait reprendre la technique en suivant toutes les recommandations du manufacturier et la standardiser à nos équipements. Cette standardisation aurait dû se faire en utilisant la technique d'hybridation sur colonies avec sondes marquées à la radioactivité comme point de comparaison.

Lorsque comparée à la technique d'hybridation sur colonie, la technique PCR s'avère moins fastidieuse car moins de manipulations avec des points critiques sont nécessaires. Dans le cas présent, la technique hybridation sur colonies avait été privilégiée en raison du grand nombre de souches et de gènes à tester et dans le but de réduire les coûts.

## **2.5. Comparaison des résultats phénotypiques et génotypiques**

La technique PCR a permis ici de mettre en évidence des gènes de résistances sur quelques souches, mais non sur la majorité. Seuls les gènes codant pour la résistance au groupe MLS ont été détectés. Normalement, lors des études comparant les phénotypes et les génotypes de résistance chez les *S. aureus* isolés en médecine humaine, il y a toujours une excellente concordance (Martineau *et al.*, 2000; Strommenger *et al.*, 2003; Klingenberg *et al.*, 2004; Vancraeynest *et al.*, 2004; Haveri, 2005). Comment expliquer le fait qu'on n'ait pas retrouvé ce phénomène lors de l'utilisation de la technique PCR?

### **2.5.1. Extraction de l'ADN**

On pourrait penser que le problème réside dans une mauvaise extraction de l'ADN bactérien. Tout comme dans la technique d'hybridation sur colonies, les bactéries à Gram positif sont plus difficiles à lyser que les bactéries à Gram négatif. Si l'ADN n'est pas extrait en quantité suffisante, il se peut qu'il n'y ait pas eu amplification de la cible. Il se peut aussi qu'il y ait eu des contaminations importantes inhibant les étapes de l'amplification. Pourtant, toutes les souches témoins positifs allumaient, ce qui laisse suggérer que l'extraction était efficace.

### **2.5.2. Amorces**

Il se peut également que le problème soit lié aux amorces. Une dégradation prématurée des amorces aurait pu donner des résultats erronés. La taille des fragments ciblés a aussi pu jouer un rôle. En effet, les amorces avaient été conçues pour la technique d'hybridation sur colonies, donc codaient pour un fragment de poids moléculaire supérieur à 400 paires de base, ce qui est nettement plus élevé que ce qui est normalement utilisé lors de technique PCR.

### **2.5.3. Choix des gènes**

Enfin, le choix des gènes de résistance à rechercher n'était peut-être pas le bon. Le choix s'est fait en se basant sur les gènes les plus communément retrouvés chez les *S. aureus* du côté humain. En médecine humaine, ces gènes semblent être assez stables et reviennent d'une étude à l'autre. Très peu d'études vétérinaires existent sur le sujet.

Il n'est pas faux de penser que les souches de *S. aureus* isolés chez les animaux ne possèdent pas les mêmes mécanismes de résistance que ceux isolés chez les humains. Il est bien reconnu que les souches humaines et les souches animales diffèrent phylogénétiquement.

#### **2.5.4. Niveaux de résistance**

Enfin, les niveaux de résistance obtenus phénotypiquement étaient très peu élevés. Il se peut que ces phénotypes de résistance soient dus à des mécanismes secondaires qui ne sont pas liés à la présence de gènes de résistance.

### **3. Conclusion générale**

Cette étude a permis de caractériser les profils phénotypiques de résistance à différents antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées d'échantillons de lait de vaches de différentes régions du Québec. Il s'agit de la première étude de cette envergure touchant toutes les régions du Québec. Il a été mis en évidence que les souches de *S. aureus* du Québec ne présentent qu'un très faible niveau de résistance et que l'antibiotique envers lequel on retrouve le plus de résistance est la pénicilline. Quoique le niveau de résistance aux antibiotiques retrouvé chez les souches québécoises soit faible, les données obtenues se comparent avec celles des autres études effectuées dans d'autres pays.

Moins de 1% des souches testées présentaient de la résistance envers la tétracycline. Ce résultat semble montrer que les traitements systémiques avec la tétracycline lors d'infections intra-mammaires à *S. aureus* ne semblent pas engendrer le développement de la résistance des bactéries situées au niveau de la glande mammaire, telles que les *S. aureus*.

Aucune antibiorésistance envers l'enrofloxacin et la gentamicine n'a été retrouvée chez les souches testées. Cela peut laisser suggérer que ces antibiotiques ne sont pas utilisés en dérogation pour le traitement des mammites à *S. aureus* chez les vaches laitières du Québec.

La présente étude a permis de valider l'efficacité de l'hybridation sur colonies sur les *S. aureus* en utilisant la technique d'hybridation sur colonies avec sondes marquées à la radioactivité. Il est intéressant de constater que cette technique,

généralement utilisée pour les bactéries à Gram négatif, s'avère quand même efficace contre les Gram positif qui ont une paroi plus épaisse. Cela laisse envisager la possibilité d'utiliser cette technique dans d'autres études.

Notre étude n'a pas permis de valider la technique d'hybridation sur colonies avec sondes marquées à la chemiluminescence en se basant sur la technique d'hybridation sur colonies avec sondes marquées à la radioactivité. La plus grande faille a été de ne pas standardiser la technique sur les contrôles positifs avant de faire les essais chez les souches à tester. Il aurait d'abord fallu commencer par ajuster les paramètres de la technique à notre laboratoire sur les contrôles positifs. En procédant étape par étape pour normaliser la technique, en suivant les recommandations de la compagnie Roche et en utilisant le phosphoimager pour la révélation, nous aurions pu interpréter nos résultats, ce qui n'est pas le cas présentement.

Lorsqu'on compare les résultats des gènes de résistance obtenus par PCR chez les 38 souches phénotypiquement résistantes, on ne retrouve que très peu de corrélation. Cela peut s'expliquer par le fait que les gènes responsables des phénotypes de résistance n'aient pas été détectés car les sondes utilisées ne représentaient pas tous les gènes connus. On peut également penser à d'autres mécanismes de résistance encore inconnus.

## Bibliographie

- AARESTRUP FM, AGERSL Y, AHRENS P, JÆRGENSEN JC, MADSEN M, JENSEN LB. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Vet Microbiol.* 2000 Jun 12;74(4):353-64.
- AARESTRUP FM, JENSEN LB. Trends in antimicrobial susceptibility in relation to antimicrobial usage and presence of resistance genes in *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. *Vet Microbiol.* 2002 Oct 2;89(1):83-94.
- AARTS HJ, BOUMEDINE KS, NESME X, CLOECKAERT A. Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. 2001 *Vet Res.* May-Aug;32(3-4):363-80.
- BARKEMA HW, SCHUKKEN YH, ZADOKS RN. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 2006 Jun;89(6):1877-95.
- BARON F, COCHET MF, PELLERIN JL, BEN ZAKOUR N, LEBON A, NAVARRO A, PROUDY I, LE LOIR Y, GAUTIER M. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *J Food Prot.* 2004 Oct;67(10):2302-5.
- BAUER, A.W., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4). 493-496.
- BENNEDSGAARD TW, THAMSBORG SM, AARESTRUP FM, ENEVOLDSEN C, VAARST M, CHRISTOFFERSEN AB. Resistance to penicillin of *Staphylococcus aureus* isolates from cows with high somatic cell counts in organic and conventional dairy herds in Denmark. *Acta Vet Scand.* 2006 Nov 24;48(1):24.
- BOUTIBA-BEN BOUBAKER I, BEN ABBES R, BEN ABDALLAH H, MAMLOUK K, MAHJOUBI F, KAMMOUN A, HAMMAMI A, BEN REDJEB S. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine

detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical microbiology and infection 2004;10(8). 762-765.

BROES A, FAIRBROTHER JM, MAINIL J, HAREL J, LARIVIERE S. Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O8:KX105 and O8:K"2829" strains isolated from piglets with diarrhea. J Clin Microbiol. 1988 Nov;26(11):2402-9.

CAI HY, ARCHAMBAULT M, GYLES CL, PRESCOTT JF. Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. Anim Health Res Rev 2003;4(2). 73-93.

CHOPRA, I., ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev 2001;65(2). 232-260.

CHOTÁR M, VIDOVÁ B, GODÁNY A. Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. Folia Microbiol (Praha). 2006;51(6):639-46.

COCKERILL, F.R. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(2). 199-212.

COSTA AM, KAY I, PALLADINO S. Rapid detection of *mecA* and *nuc* genes in staphylococci by real-time multiplex polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005 Jan;51(1):13-7.

CONTRIBUTEURS À WIKIPEDIA. Staphylocoque doré, Wikipédia, l'encyclopédie libre, 8 février 2008, UTC, [http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Staphylocoque\\_dor%C3%A9&oldid=25888285](http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Staphylocoque_dor%C3%A9&oldid=25888285).

CONTRIBUTEURS À WIKIPEDIA. Séquençage de l'ADN, Wikipédia, l'encyclopédie libre, 8 février 2008, UTC, [http://fr.wikipedia.org/wiki/S%C3%A9quen%C3%A7age\\_de\\_l%27ADN](http://fr.wikipedia.org/wiki/S%C3%A9quen%C3%A7age_de_l%27ADN).

CUCARELLA C, TORMO MA, UBEDA C, TROTONDA MP, MONZÓN M, PERIS C, AMORENA B, LASA I, PENADÉS JR. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2004 Apr;72(4):2177-85.



- DE OLIVEIRA AP, WATTS JL, SALMON SA, AARESTRUP FM Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J Dairy Sci* 2000;83(4). 855-862.
- DEVRIESE LA, VANCANNEYT M, BAELE M, VANEECHOUTTE M, DE GRAEF E, SNAUWAERT C, CLEENWERCK I, DAWYNDT P, SWINGS J, DECOSTERE A, HAESEBROUCK F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005;55. 1569-1573.
- DINSMORE, R.P., ENGLISH, P.B., GONZALEZ, R.N., SEARS, P.M. Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 1992; 75. 2706-2712.
- DOWLING, P.M. Aminoglycosides. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4<sup>th</sup> ed., Ames, Blackwell publishing, 2006. 207-229.
- DOWLING, P.M. Miscellaneous antimicrobials: ionophores, nitrofurans, nitroimidazoles, rifamycins, oxazolidinones, and others. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4<sup>th</sup> ed., Ames, Blackwell publishing, 2006. 285-300.
- ENRIGHT MC, ROBINSON DA, RANDLE G, FEIL EJ, GRUNDMANN H, SPRATT BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(11). 7687-7692.
- ERSKINE RJ, WALKER RD, BOLIN CA, BARTLETT PC, WHITE DG. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J Dairy Sci* 2002;85(5). 1111-1118.
- ERSKINE Ron, CULLOR. J., *et al.* Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antimicrobial drugs. NMC annual meeting proceedings. 2004. 400-414.
- EUZÉBY, J.P. 2006, Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. de <http://www.bacdico.net>.
- FLUIT AC, VISSER MR, SCHMITZ FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(4). 836-871.

- GAGNÉ, JC., La mammite coûte plus de 500 M \$ au Canada. La terre de chez nous 2004. p.13
- GENTILINI E, DENAMIEL G, LLORENTE P, GODALY S, REBUELTO M, DEGREGORIO O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. J Dairy Sci 2000 ;83(6). 1224-1227.
- GIGUÈRE, S. Macrolides, azalides and ketolodes. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4<sup>th</sup> ed., Ames, Blackwell publishing, 2006. 191-205.
- GIGUÈRE, S. Tetracyclines and glycyclines. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4<sup>th</sup> ed., Ames, Blackwell publishing, 2006. 231-240.
- GILLESPIE BE, OLIVER SP. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. J Dairy Sci. 2005 Oct;88(10):3510-8.
- GRABER HU, CASEY MG, NASKOVA J, STEINER A, SCHAEREN W. Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk. J Dairy Sci. 2007 Oct;90(10):4661-9.
- GUARDABASSI L, LOEBER ME, JACOBSON A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. Vet Microbiol 2004;98(1). 23-27.
- GUARDABASSI L, SCHWARZ S, LLOYD DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. J Antimicrob Chemother 2004;54(2). 321-332.
- GUARDABASSI L, LOEBER ME, JACOBSON A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. Vet Microbiol. 2004 Jan 14;98(1):23-7.
- JAFFE RI, LANE JD, ALBURY SV, NIEMEYER DM. Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. J Clin Microbiol. 2000 Sep;38(9):3407-12.
- JONES CH, TUCKMAN M, HOWE AY, ORLOWSKI M, MULLEN S, CHAN K, BRADFORD PA. Diagnostic PCR analysis of the occurrence of methicillin

- and tetracycline resistance genes among *Staphylococcus aureus* isolates from phase 3 clinical trials of tigecycline for complicated skin and skin structure infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Feb;50(2):505-10.
- JUHÁSZ-KASZANYITZKY E, JÁNOSI S, SOMOGYI P, DÁN A, VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L, VAN DUIJKEREN E, WAGENAAR JA. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis.* 2007 Apr;13(4):630-2.
- HARTMANN FA, TROSTLE SS, KLOHNEN AA. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a postoperative wound infection in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 1997;211(5). 590-592.
- HAVERI, S. Comparaison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. *Veterinary microbiology* 2005;106. 97-102.
- HAVERI S, ROSLOF A, RANTALA L, PYORALA S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J of Applied Microbiol.* 2007;103. 993-1000.
- HELMUTH, R., HENSEL, A. Towards the rational use of antibiotics: results of the first International Symposium on the Risk Analysis of Antibiotic Resistance. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004;51(8-9). 357-360.
- HIRAMATSU K, CUI L, KURODA M, ITO T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001;9(10). 486-493.
- HIRSH, D.C., BIBERSTEIN, E.L. *Staphylococcus*. In *Veterinary microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, Blackwell Publishing. 2004;153-158.
- HOGAN, J.S., GONZALEZ, R.N., HARMON, R.J., NICKERSON, S.C., OLIVER, S.P., PANKEY, J.W., SMITH, K.L., *Laboratory handbook on bovine mastitis*. National mastitis council, inc., 1999, Madison, Wi, pages 65-75.
- HUIJSDENS XW, VAN DIJKE BJ, SPALBURG E, VAN SANTEN-VERHEUVEL MG, HECK ME, PLUISTER GN, VOSS A, WANNET WJ, DE NEELING AJ. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006 Nov 10;5:26.

- HULETSKY A, GIROUX R, ROSSBACH V, GAGNON M, VAILLANCOURT M, BERNIER M, GAGNON F, TRUCHON K, BASTIEN M, PICARD FJ, VAN BELKUM A, OUELLETTE M, ROY PH, BERGERON MG. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. J Clin Microbiol. 2004 May;42(5):1875-84.
- INRA:<http://wcentre.tours.inra.fr/equipements/phosphorimageur/utilisations-principes/index.htm> (2008)
- JORGENSEN, J., TURNIDGE, J.D. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In Manual of clinical microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington, D.C., ASM press, 2003; 1108-1127.
- JUHÁSZ-KASZANYITZKY E, JÁNOSI S, SOMOGYI P, DÁN A, VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L, VAN DUIJKEREN E, WAGENAAR JA. MRSA transmission between cows and humans. Emerging infectious diseases 2007;13(4). 630-632.
- KAMILE RASHEED, J., TENOVER, F.C. Detection and characterization of antimicrobial resistance genes in bacteria. In Manual of clinical microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington, D.C., ASM press, 2003; 1197-1212.
- KHAN SA, NAWAZ MS, KHAN AA, STEELE RS, CERNIGLIA CE. Characterization of erythromycin-resistant methylase genes from multiple antibiotic resistant *Staphylococcus* spp isolated from milk samples of lactating cows. Am J Vet Res 2000;61(9). 1128-1132.
- KIM CH, KHAN M, MORIN DE, HURLEY WL, TRIPATHY DN, KEHRLI M JR, OLUOCH AO, KAKOMA I. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* *nuc* gene in bovine milk. J Dairy Sci. 2001 Jan;84(1):74-83.
- KLINGENBERG C, SUNDSFIJORD A, RØNNESTAD A, MIKALSEN J, GAUSTAD P, FLAEGSTAD T. Phenotypic and genotypic aminoglycoside resistance in blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci from a single neonatal intensive care unit, 1989-2000. J Antimicrob Chemother 2004;54(5). 889-896.

- KUBOTA M, HAYASHI T, IWASAKI K, OHTSUKA H, KOHIRUIMAKI M, KAWAMURA S, SAKAGUCHI K, ABE R. Rapid and effective method for separation of *Staphylococcus aureus* from somatic cells in mastitis milk. J Dairy Sci. 2007 Sep;90(9):4100-7.
- LACOMBE, R. La mammité: pertes de 200 millions \$. Le Soleil 6 novembre 2004
- LAM, T.J.G.M., van WUYCKHUISE, L.A., FRANKEN, P., MORSELT, M.L., HARTMAN, E.G., SCHUKKEN, Y.H. Use of composite milk samples for diagnosis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. JAVMA 1996; 208. 1705-1708.
- LAPIERRE P, HULETSKY A, FORTIN V, PICARD FJ, ROY PH, OUELLETTE M, BERGERON MG. Real-time PCR assay for detection of fluoroquinolone resistance associated with *grlA* mutations in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2003 Jul;41(7):3246-51.
- LEE, J.H. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Appl Environ Microbiol 2003 ;69(11). 6489-6494.
- LEE JH, JEONG JM, PARK YH, CHOI SS, KIM YH, CHAE JS, MOON JS, PARK H, KIM S, EO SK Evaluation of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. J Clin Microbiol 2004;42(6). 2780-2782.
- LINA G, QUAGLIA A, REVERDY ME, LECLERCQ R, VANDENESCH F, ETIENNE J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(5). 1062-1066.
- LIVERMORE, D.M. Antibiotic resistance in staphylococci. Int J Antimicrob Agents 2000;16 Suppl 1. S3-10.
- LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest 2003;111(9). 1265-1273.
- MAKOVEC, J.A., RUEGG, P.L. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001). J Am Vet Med Assoc 2003;222(11). 1582-1589.

- MALIK S, CHRISTENSEN H, PENG H, BARTON MD. Presence and diversity of the beta-lactamase gene in cat and dog staphylococci. *Vet Microbiol.* 2007 Jul 20;123(1-3):162-8. Epub 2007 Feb 16.
- MARTINEAU F, PICARD FJ, LANSAC N, MÉNARD C, ROY PH, OUELLETTE M, BERGERON MG. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(2). 231-238.
- MONECKE S, LEUBE I, EHRICHT R. Simple and robust array-based methods for the parallel detection of resistance genes of *Staphylococcus aureus*. *Genome letters* 2003; 2. 106-118.
- MONECKE S, KUHNERT P, HOTZEL H, SLICKERS P, EHRICHT R. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet Microbiol.* 2007 Nov 15;125(1-2):128-40. Epub 2007 May 24.
- MORONI P, PISONI G, ANTONINI M, VILLA R, BOETTCHER P, CARLI S. Short communication: antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. *J Dairy Sci.* 2006 Aug;89(8):2973-6.
- NCCLS (1999). "Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard. NCCLS M31-A.
- NCCLS (2004). "Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Informational supplement. NCCLS M31-S1 Vol24(17): 35 pages.
- NG LK, MARTIN I, ALFA M, MULVEY M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and cellular probes* 2001;15(4). 209-215.
- OWENS WE, RAY CH, WATTS JL, YANCEY RJ. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *J Dairy Sci* 1997;80(2). 313-317.

PEARSON, E. (2005). de

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-20/2030.jpg>.

PERRETEN V, VORLET-FAWER L, SLICKERS P, EHRICT R, KUHNERT P, FREY J. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol* 2005;43(5). 2291-2302.

PHUEKTES P, BROWNING GF, ANDERSON G, MANSELL PD. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. *J Dairy Res.* 2003 May;70(2):149-55.

POOLE, K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(17). 2200-2223.

PRESCOTT, J.F. Beta-lactam antibiotics: penam penicillins. In *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4<sup>th</sup> ed., Ames, Blackwell publishing, 2006. 121-137.

ROCHE. Procedures for nonradioactive labelling and detection. In *Roche molecular biochemicals DIG application manual for filter hybridization*. Germany. Roche diagnostics. 2000. 39-148.

ROCHE. Appendix B: Troubleshooting the DIG system. In *Roche molecular biochemicals DIG application manual for filter hybridization*. Germany. Roche diagnostics. 2000. 184-195

ROCHE. Appendix C: Suggestions for improving DIG labelling and detection results. In *Roche molecular biochemicals DIG application manual for filter hybridization*. Germany. Roche diagnostics. 2000. 196-204.

SABOUR PM, GILL JJ, LEPP D, PACAN JC, AHMED R, DINGWELL R, LESLIE K. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. *J Clin Microbiol* 2004;42(8). 3449-3455.

SALMON SA, WATTS JL, AARESTRUP FM, PANKEY JW, YANCEY RJ JR. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *J Dairy Sci* 1998;81(2). 570-578.

- SCHLEGELOVA J, RYSÁNEK D, SEDIVÁ I, BABÁK V. Comparison of methods for the determination of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2001 Feb;48(1):21-9.
- SCHMITZ FJ, HIGGINS PG, MAYER S, FLUIT AC, DALHOFF A. Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002 ;21(9). 647-659.
- SEGUIN JC, WALKER RD, CARON JP, KLOOS WE, GEORGE CG, HOLLIS RJ, JONES RN, PFALLER MA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. J Clin Microbiol 1999;37(5). 1459-1463.
- SHITANDI A, STERNESJÖ A. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large- and small-scale producers in Kenya. J Dairy Sci. 2004 Dec;87(12):4145-9.
- SILVA BO, CARAVIELLO DZ, RODRIGUES AC, RUEGG PL. Evaluation of Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples. J Dairy Sci. 2005 Aug;88(8):3000-8.
- STROMMENDER B, SCHMIDT C, WERNER G, ROESSLE-LORCH B, BACHMANN TT, WITTE W. DNA microarray for the detection of therapeutically relevant antibiotic resistance determinants in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Mol Cell Probes. 2007 Jun;21(3):161-70.
- STROMMENDER B, KETTLITZ C, WERNER G, WITTE W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003;41(9). 4089-4094.
- SUNDSFJORD A, SIMONSEN GS, HALDORSEN BC, HAAHEIM H, HJELMEVOLL SO, LITTAUER P, DAHL KH. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. Apmis 2004;112(11-12). 815-837.
- SWENSON JM, CLARK NC, SAHM DF, FERRARO MJ, DOERN G, HINDLER J, JORGENSEN JH, PFALLER MA, RELLER LB, WEINSTEIN MP, *et al.* Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin



and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *Journal of clinical microbiology* 1995;33: 3019-3021.

SWENSON, J.M., FICK HINDLER, J. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In *Manual of clinical microbiology*. 8<sup>th</sup> ed. Washington, D.C., ASM press, 2003; 1178-1195.

SWENSON, J.M., TENOVER. F.C. Results of Disk Diffusion Testing with Cefoxitin Correlate with Presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* 2005;43(8): 3818-3823.

TENHAGEN BA, KÖSTER G, WALLMANN J, HEUWIESER W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci.* 2006 Jul;89(7):2542-51.

TENOVER, F.C., KAMILE RASHEED, J. Detection of antimicrobial resistance genes and mutations associated with antimicrobial resistance in microorganisms. In *Molecular microbiology diagnostic principles and practice*. 1<sup>st</sup> ed. Washington, D.C., ASM press, 2004; 391-406.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2001;4(5). 493-499.

THORNSBERRY C, MARLER JK, WATTS JL, YANCEY RJ JR. Activity of pirlimycin against pathogens from cows with mastitis and recommendations for disk diffusion tests. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 May;37(5):1122-6.

TOMLIN J, PEAD MJ, LLOYD DH, HOWELL S, HARTMANN F, JACKSON HA, MUIR P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 11 dogs. *Vet Rec* 1999;144(3): 60-64.

van DUIJKEREN E, BOX AT, HECK ME, WANNET WJ, FLUIT AC. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet Microbiol* 2004;103(1-2): 91-97.

VANCRÆYNEST D, HERMANS K, MARTEL A, VANEECHOUTTE M, DEVRIESE LA, HAESBROUCK F. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Vet Microbiol* 2004;101(4). 245-251.

- VANNUFFEL P, GIGI J, EZZEDINE H, VANDERCAM B, DELMEE M, WAUTERS G, GALA JL. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. J Clin microbiol 1995;33(11). 2864-2867.
- VELASCO D, DEL MAR TOMAS M, CARTELLE M, BECEIRO A, PEREZ A, MOLINA F, MOURE R, VILLANUEVA R, BOU G. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2005;55(3). 379-382.
- VIERSTRACTE,A.1999.de  
<http://images.google.ca/imgres?imgurl=http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif&imgrefurl=http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html&h=627&w=597&sz=47&hl=fr&start=2&tbnid=5Wjb1wdcRwx97M:&tbnh=136&tbnw=129&prev=/images%3Fq%3Dpcr%2Bprinciple%26gbv%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Dfr>
- VILLANUEVA, M.R., TYLER, J.W., THURMOND, M.C. Recovery of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* from fresh and frozen bovine milk. JAVMA 1991; 198. 1398-1400.
- VINTOV J, AARESTRUP FM, ELSBERG ZINN C, OLSEN JE. Phage types and antimicrobial resistance among Danish bovine *Staphylococcus aureus* isolates since the 1950s. Vet Microbiol 2003;97(1-2). 63-72.
- WALKER, R.D., DOWLING, P.M. Fluoroquinolones. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4<sup>th</sup> ed., Ames, Blackwell publishing, 2006. 263-284.
- WATTS, J.L., SALMON, S.A. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce beta-lactamase. J Dairy Sci 1997;80(4). 788-791.
- WATTS JL, SALMON SA, YANCEY RJ JR, NICKERSON SC, WEAVER LJ, HOLMBERG C, PANKEY JW, FOX LK. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. J Dairy Sci 1995;78(7). 1637-1648.
- WERCKENTHIN C, CARDOSO M, MARTEL JL, SCHWARZ S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine

*Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. Vet Res 2001;32(3-4). 341-362.

WESTIN L, MILLER C, VOLLMER D, CANTER D, RADTKEY R, NERENBERG M, O'CONNELL JP. Antimicrobial resistance and bacterial identification utilizing a microelectronic chip array. J Clin Microbiol 2001;39(3). 1097-1104.

YAMAGISHI N, JINKAWA Y, OMOE K, MAKINO S, OBOSHI K. Sensitive test for screening for *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis by broth cultivation and PCR. Vet Rec. 2007 Sep 15;161(11):381-3.

YOSHIMURA H, ISHIMARU M, KOJIMA A. Minimum inhibitory concentrations of 20 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Japan. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2002;49(9).457-460.

ZECCONI, A., PICCININI, R., ZEPPONI, A., RUFFO, G. Recovery of *Staphylococcus aureus* from centrifuged quarter milk samples. J. Dairy Sci. 1997; 80. 3058-3063.

ZSCHÖCK M, NESSELER A, SUDARWANTO I. Evaluation of six commercial identification kits for the identification of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. J Appl Microbiol. 2005;98(2):450-5.

## Annexe 1 (Broes *et al*, 1988)

### Protocole pour la détection des facteurs de virulence par sonde avec la radioactivité ( $P^{32}$ )

#### 1. Réception des échantillons:

- Culture sur gélose sang et déjà en colonies isolées, ensemercer chaque colonie dans 1 ml de bouillon TSB (Tryptic Soy Broth).
- Si par contre, on reçoit l'isolat sur un autre type de milieu de culture, on l'ensemence sur une gélose sang, pour vérifier sa pureté. On incube à  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  15-18 heures.
- Le lendemain, onensemence un tube de TSB 1ml. On met ensuite ces tubes de TSB à l'incubateur  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  15-18 heures.
- Mettre ces tubes à  $4^\circ\text{C}$  jusqu'à utilisation.
- Nous pouvons garder ces cultures jusqu'à 4 jours à  $4^\circ\text{C}$  avant de faire nos ensemencements sur gélose LB.

Préparer un support pour disposer les tubes, identifier le support ainsi :

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 2 |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3 |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 4 |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 5 |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 6 |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | A | B | C | D | E | F | G | H |

- Il est préférable de placer les tubes dans l'ordre des lettres (ex : A1, A2, A3, A4, A5, A6, B1...) et **NON** des chiffres, la lecture des sondes va être plus facile ainsi. **Voir la grille pour la disposition et la lecture des films.**
- On doit mettre un contrôle positif pour chaque facteur testé et ne pas oublier de mettre un contrôle négatif. **Voir la liste des souches contrôles employées.**
- Les souches contrôles sont ensemencées de la même façon que les souches du diagnostic et elles sont gardées à  $-70^\circ\text{C}$  pendant un maximum d'un à deux mois.
- Il est préférable de changer les contrôles de place entre chaque diagnostique, cela permet de mieux reconnaître les diagnostiques lors de la lecture.
- Quand le support est plein, on est prêt à ensemercer les échantillons sur les géloses LB.

## **2. Matériel pour ensemencement :**

- Plaque à Élixa Corning jetable, stérile
- Poinçon 48 pics
- Bocal assez grand pour le poinçon
- Alcool 100%
- Pipette 200 µl + tips appropriés
- Géloses Luria-Bertani (LB) (sorties la veille pour éviter une condensation sur les géloses)

## **3. Procédure:**

1. Prendre une plaque de 96 puits stérile de marque Corning. (Fisher :CS003595)
2. Identifier la plaque Élixa comme le support à tubes et inscrire sur le couvercle le # de la série du diagnostic et la date. (ex : D1S1(Diagnostic 1, série 1), D1S2, etc)
3. Des tubes de culture de 1ml, prendre 150µl de chaque souche (TSB) et mettre dans un puits respectif. Ne pas oublier de mettre les souches contrôles positives et négatives pour chacun des facteurs de virulence testés, à différents endroits de la plaque.
4. Quand tous les échantillons ont été mis dans les puits, on identifie le dessous des géloses LB: en haut, le # du diagnostic (ex: D1 S1), à droite, la lettre A (car les échantillons de la rangée A seront de ce côté)
5. Prévoir 4 à 5 géloses de plus que le nombre de sondes que nous faisons, au cas où il y aurait une contamination ou un mélange de colonies dû à l'humidité. **Il est important de sortir les géloses LB à la température de la pièce avant de les ensemenecer afin d'éviter la présence d'humidité sur les géloses.**
6. Mettre de l'alcool 100% dans un petit contenant en verre rectangulaire.
7. Mettre le poinçon dans le contenant de verre avec alcool 100%.
8. Flamber le poinçon.
9. Tremper le poinçon dans la plaque Élixa et le déposer délicatement sur la gélose LB en faisant attention à l'orientation de la gélose et ne pas glisser le poinçon sur la gélose.
10. Remettre le poinçon dans le contenant d'alcool 100%
11. Recommencer à partir de 8, pour le nombre de géloses désirées.
12. Une fois toutes les géloses ensemencées, on les met à l'incubateur 37±2°C, 15-18 heures.
13. Le lendemain, on sort les géloses de l'incubateur et si on ne fait pas les empreintes le jour même, on met les géloses à 4°C

jusqu'au traitement. Les géloses peuvent être traitées dans les 72 heures.

#### **4. Matériel pour empreintes:**

- Papier Whatman #541 90mm (Fisher :09 851B)
- Pincés

#### **5. Procédure pour faire les empreintes avec le filtre:**

- Couper les filtres Whatman #541 afin de pouvoir différencier le haut du bas et la gauche de la droite. **Voir modèle.**
- Déposer ensuite ces filtres sur les géloses pour que chaque colonie soit en contact avec le filtre.
- À l'aide de pincés, enlever les bulles d'air qui ont pu se former entre la gélose et le filtre.
- Laisser le papier filtre en contact avec la gélose un minimum de 2 heures.

#### **6. Matériel pour le traitement des filtres:**

- Bac en pyrex (moules à gâteau) ou plaque de biscuits, le nombre varie en fonction de la quantité de filtres à traiter.
- Papier absorbant (gel blot paper Mandel : S-10426693), coupé pour qu'il recouvre le fond de chaque bac.
- SDS 10%
- NaOH 0.5M + NaCl 1.5M
- Tris 0.5M pH 7.5 + NaCl 1.5M

#### **7. Procédure pour le traitement des filtres :**

- Placer un papier absorbant au fond de chaque bac en pyrex ou plaque de biscuits.
- Saturer le premier papier absorbant avec du SDS 10%. **Enlever l'excédant de solution.**
- Déposer ensuite les filtres (colonies vers le haut) sur le papier absorbant, pour 3 minutes. S'assurer qu'il n'y ait pas de bulles d'air sous le papier absorbant et sous les papiers filtres.
- Saturer un 2<sup>ème</sup> bac avec du NaOH 0.5M + NaCl 1.5M. **Enlever l'excédant de solution.**

- Transférer ensuite les filtres dans ce bac saturé, et laisser les filtres dans cette solution pour 15 minutes (toujours faire attention aux bulles d'air).
- Pendant ce temps, rincer le ou les premiers bacs à l'eau courante, et les préparer pour la troisième solution.
- Saturer le papier absorbant avec la troisième solution qui est du Tris 0.5M pH 7.5 + NaCl 1.5M. **Enlever l'excédant de solution.**
- Déposer les filtres dans ce bac pour 5 minutes.
- Répéter une 2<sup>ème</sup> fois cette dernière étape.
- Prendre les filtres du dernier traitement et les déposer sur un papier absorbant sec pour les laisser sécher.
- Une fois qu'ils sont bien secs (souvent le lendemain), les ramasser et les mettre dans un plat de pétri jusqu'à utilisation.

### **8. Traitement spécial d'un filtre: (ex: STa)**

- Certaines sondes doivent avoir un traitement différent des autres sondes. Pour le diagnostic, il s'agit du filtre de la sonde STa qui doit être traité à part.
- Placer le filtre dans le SDS 10% avec les autres, pour 3 minutes.
- Transférer ensuite le filtre dans un pétri de verre avec un papier filtre saturé de NaOH 0.5M + NaCl 1.5M
- Déposer ce pétri dans le bain-marie bouillant, pour que le pétri flotte sur l'eau, et ce jusqu'à ce que le filtre soit sec. Habituellement, 3 minutes.
- Mettre ensuite dans un autre pétri saturé de NaOH 0.5M + NaCl 1.5M, pour 1 minute.
- Après le mettre dans un autre pétri saturé de Tris-NaCl pour 4 minutes.
- Déposer ensuite sur le papier filtre pour faire sécher les filtres.

**N.B. :** Ne pas oublier de mettre ce filtre à part, il ne faut pas le mêler avec les autres

### **9. Solutions de traitement :**

- **SDS 10%:**
- 50 grammes de Sodium dodecyl sulfate
- Compléter à 500 ml avec H<sub>2</sub>O
- Filtrer la solution
  
- **NaOH 0.5M + NaCl 1.5M:**
- 10 grammes NaOH (hydroxyde de sodium)
- 43.8 grammes NaCl
- Compléter à 500 ml avec H<sub>2</sub>O
- Filtrer la solution
  
- **Tris 0.5M pH 7.5 + NaCl 1.5M:**
- 250 ml Tris-HCl 1M pH7.5\*\*\*
- 43.83 grammes NaCl
- Compléter à 500 ml avec H<sub>2</sub>O
- Faire autoclaver la solution
  
- **Tris-HCl 1M pH 7.5:**
- 121.1 grammes Trizma base
- Mettre environ 700 ml de H<sub>2</sub>O
- Ajuster le pH à 7.5 avec du HCl 12N (pur)
- Compléter le volume à 1000 ml avec de H<sub>2</sub>O
- **N.B. :** Le pH est très difficile à faire descendre, ne pas être étonné de la quantité de HCl à ajouter.

### **10. Procédure pour le traitement avec la radioactivité :**

- Allumer le four d'hybridation Isotemp Hybridization Incubators, Fisher Scientific
- **Température** doit être à 65°C
- **Cal** doit être à 4.0
- **Pro** doit être à Off
- **Den** doit être à On
- **De** doit être à 0.0
  
- Mettre dans le four le nombre de tubes nécessaires pour chaque sonde à faire.
- On met les tubes dans le four pour qu'ils atteignent la température 65°C.

E



**11. Solutions de base :**

- **20XSSC :**
  - 350.8 grammes NaCl
  - 176.4 grammes Citrate de sodium
  - Mettre 1600 ml d'H<sub>2</sub>O
  - Ajuster le pH à 7.0 avec du HCl
  - Compléter à 2000 ml avec H<sub>2</sub>O
  - Faire autoclaver
  
  - **SDS 10% :**
  - 50 grammes de Sodium dodecyl sulfate
  - Compléter à 500 ml avec H<sub>2</sub>O
  - Filtrer la solution
  
  - **100X denhart :**
  - 2 grammes Sérum albumine bovine (Sigma, gardé à 4°C)
  - 2 grammes Ficoll (Sigma)
  - 2 grammes Polyvinyl pyrrolidone
  - Compléter à 100 ml avec H<sub>2</sub>O
  - Filtrer
  - Répartir en 3ml dans des tubes PP stériles de 5ml et mettre au congélateur -20°C
  
  - **Sperme de saumon (SS) :**
  - Doit se faire le plus stérilement possible.
  - 
  - Solution mère de 10 mg/ml :
  - 500 mg de deoxyribonucleic acid (sperme de saumon) (Sigma, gardé à 4°C)
  - 50 ml H<sub>2</sub>O stérile
  - On doit couper les lanières de sperme avec des ciseaux nettoyés à l'alcool 70%.
  - Agiter de 2 à 3 heures dans un béccher préalablement stérilisé.
  - Mettre dans une bouteille de 100ml et faire autoclaver 15 minutes à 121°C.
  - Vérifier sur un gel d'agarose (3µl + loading buffer).
  - Séparer en petits aliquots de 850µl dans des tubes Eppendorf et mettre 7.5ml dans des tubes de 15ccPP.
  - Garder à -20°C.
-

**12. Pré-hybridation :**

- On peut durant ce temps préparer la solution de pré-hybridation, que l'on met dans une bouteille Pyrex de 500ml stérile.

**Solution de pré-hybridation :**

|   |              |                                  |
|---|--------------|----------------------------------|
| - | 22 ml.....   | H <sub>2</sub> O Milli-Q stérile |
| - | 4.5 ml.....  | 20XSSC                           |
| - | 3.0 ml.....  | 100X denhart                     |
| - | 0.3 ml.....  | SDS 10%                          |
| - | 0.75 ml..... | SS DNA (sperme de saumon)***     |

- Le total de cette solution est bon pour 2 sondes différentes. Donc si on fait 20 sondes, on prépare 10 fois la quantité.  
**\*\*\*Ne pas mettre tout de suite le sperme de saumon dans la solution.** On doit faire bouillir 10 minutes le sperme de saumon et le mettre sur la glace jusqu'à son utilisation.
- Pendant que le sperme bouille, on prépare la solution pour mouiller les membranes de nylon, servant à envelopper les filtres dans les tubes de verre.

**Solution pour membrane de nylon:**

4 ml 20XSSC  
76 ml H<sub>2</sub>O Milli-Q stérile  
Cette quantité devrait être suffisante pour 40 membranes de nylon.

Il suffit de tremper la membrane de nylon dans cette solution, puis on y dépose un filtre de chaque diagnostic dessus. On roule la membrane pour en faire un petit cylindre, que l'on dépose dans un tube en verre. Ne pas empiler les filtres les uns sur les autres, il doit toujours y avoir une membrane entre chaque filtre.

- Ajouter le sperme de saumon bouilli, bien mélanger la solution de pré-hybridation et garder sur la glace.
- Verser environ 15ml de la solution dans chacun des tubes en verre.
- Identifier le ou les tubes (STa, STb, LT, Eae...) et mettre le tube au four.
- On s'assure que les tubes ne coulent pas.
- Les filtres doivent rester au minimum 1 heure dans le four. Nous pouvons aller jusqu'à 2 heures de pré-hybridation.

### 13. HYBRIDATION :

- On prépare une autre solution d'hybridation de la même façon que pour la pré-hybridation, la seule différence c'est qu'on ajoutera ADN marqué au P<sup>32</sup>.
- \*\*\*\*On doit faire bouillir l'ADN marqué avec la radioactivité, 5 minutes \*\*\*
- On met le tout sur la glace jusqu'à utilisation.
- Tube par tube, on vide, la solution de pré-hybridation dans le lavabo.
- On ajoute 15 ml de cette solution d'hybridation dans le tube en verre.
- On ajoute ensuite l'ADN marqué dans le tube en verre. On s'assure que l'ADN correspond au bon tube.  
\*\*\*\*La quantité d'ADN à mettre, varie selon le temps de la préparation du marquage ADN et P<sup>32</sup>. La **première semaine**, on ajoute 5µl d'ADN marqué. La **deuxième semaine** (dans la solution que nous avons gardée), nous rajoutons 5µl d'ADN marqué. La **troisième semaine** (à partir d'une nouvelle solution d'hybridation), nous ajoutons 14µl d'ADN marqué. La **quatrième semaine**, nous rajouterons également 14µl d'ADN marqué à la solution gardée. Si nous pensons utiliser la sonde pour une cinquième semaine, nous gardons la solution et nous rajouterons le reste de l'ADN marqué. On procède de la même manière pour tous les tubes et on les replace dans le four au fur et à mesure. On les laisse au four pour toute la nuit.
- Le lendemain matin :  
On prépare la solution de lavage en arrivant le matin.

#### Solution de lavage :

150 ml 20XSSC

10 ml SDS 10%

840 ml H<sub>2</sub>O

Il devrait en avoir assez pour faire les trois lavages, si jamais il en manque, on peut toujours faire une demi-recette.

#### • 2 options sont possibles :

- 1<sup>ère</sup> - Si la solution a été préparée la veille (nouvelle solution), on récupère cette solution, que l'on met dans un tube conique PP 50ml bien identifié au nom de la sonde et on mettra tous les tubes à -20°C jusqu'à la prochaine utilisation dans le congélateur du réfrigérateur sur une tablette réservée à cet effet. Cette solution est bonne pour une deuxième utilisation.

---

2<sup>ème</sup> – Après la deuxième utilisation, on jette la solution dans un contenant prévu à cet effet et fourni par le service de Santé et Sécurité au Travail (SSST) de l'Université de Montréal.

- Au fur et à mesure qu'on enlève la solution d'ADN marqué au P<sup>32</sup>, on la remplace par environ 15 ml de solution de lavage.
- On remet les tubes au four pour 30-45 minutes.
- On fait un second lavage de 30-45 minutes, la solution de lavage est jetée dans un contenant fourni par le service de Santé et Sécurité au Travail (SSST) de l'Université de Montréal.
- On fait un troisième lavage de 30-45 minutes.
- Ensuite, on jette le troisième lavage dans le lavabo.
- On déroule une à une les membranes de nylon, pour éviter de mêler les filtres, et on dépose les filtres sur un papier absorbant en prenant bien soin d'identifier la sonde à laquelle il appartient. Pour accélérer le séchage des filtres, on peut les mettre sur un papier gel blot (Mandel) à l'étuve 37°C.
- On fait tremper les membranes, les tubes, les bouchons et le thermomètre dans de l'eau et du savon à radioactivité (COUNT OFF, Perkin-Elmer). On peut laisser tout ceci tremper pour 2 jours ou plus. Ensuite on rince et on laisse sécher. On vérifie avec le Geiger l'émission du bruit de fond.
- On peut durant ce temps, couper des papiers (gel blot Mandel) de la grandeur d'un film radiographique, sur lesquels on viendra coller les filtres.
- On colle les filtres par diagnostic et, si possible, dans le même ordre pour tous les diagnostics. On peut coller 6 filtres pour les petites cassettes et 14 pour les grandes. On identifie bien la sonde au filtre, le numéro du diagnostic dans le haut de la feuille et le # de la cassette dans laquelle on mettra cette feuille.
- On doit ensuite envelopper ce papier dans du saran wrap, pour éviter de contaminer l'intérieur de la cassette. Vérifier avec le Geiger l'émission du bruit de fond.
- On place ensuite chaque papier dans sa cassette,
- Dans la chambre noire, mettre un film radiographique dans la cassette sur le papier contenant les filtres.
- Pour reconnaître le sens du film, on pile le coin en haut à gauche.
- On met ensuite les cassettes au congélateur -80°C pour environ 3 heures.
- Développer les films, soit au développeur de l'Hôpital des Petits Animaux ou à celui de l'Hôpital des Grands Animaux.

#### 14. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Comparer l'intensité des spots des souches contrôles avec les souches provenant d'échantillon.
- Un résultat positif est celui donnant une intensité aussi bonne que le contrôle.
- Un résultat ambigu est inscrit +/- et vérifié par PCR

#### 15. MÉTHODE POUR LES FROTTIS

**Par mesure de sécurité, on doit faire des frottis (à intervalle d'environ 1 mois) pour vérifier qu'il n'y a pas de contamination avec de la radioactivité, du lieu de travail.**

**Si on fait des sondes à chaque semaine, on attend 1 mois avant de faire des frottis.**

**Si on fait des sondes une semaine et que nous pensons que nous n'en ferons pas avant quelques mois, il est préférable de faire des frottis tout de suite.**

**-Solution à scintillation :**

Omnifluor ( Dupont )-----0.4 gramme

Toluène-----100 ml

- Prendre un petit bout de papier filtre Whatman #541(Fisher 09 874 32) et le frotter à différents endroits de travail que nous voulons vérifier (ex:-plancher-poignée du four, plexiglass, évier, comptoir, poignée de porte, du congélateur et de l'étuve). **Voir le plan dessiné dans le cahier de radioactivité.**
- Mettre chaque frottis dans une bouteille spécifique (Mandel) remplie de liquide à scintillation. Indiquer sur le bouchon les chiffres de 1 à 13 correspondant aux différents endroits.

#### 16. DÉTAIL DES PRÉLÈVEMENTS

1. Devant de la hotte biologique
2. Dessus de la poubelle de radioactivité
3. Surface de travail en plexiglass
4. Derrière de l'écran de plexiglass
5. Evier
6. Comptoir à droite de l'évier
7. Plancher devant le comptoir
8. Poignée du four d'hybridation
9. Devant de la hotte chimique

10. Poignée de la porte 3118-1
11. Comptoir à droite de la porte du 3118-1
12. Poignée du réfrigérateur
13. Poignée extérieure de la porte 3118
14. Intérieur de la boîte styrofoam ayant servie à l'envoi de la radioactivité
15. Extérieur de la boîte styrofoam ayant servie à l'envoi de la radioactivité

#### 17. LECTURE DES FROTTIS

- La lecture des frottis se fait sur un appareil XXXXX situé dans le local de radiobiologie 1451.
- Mettre les bouteilles dans un portoir beige ayant du métal
- Mettre un drapeau noir avec le #12 (correspondant au P<sub>32</sub>)
- Pousser le drapeau vers la gauche (il doit sortir du rack)
- Mettre le portoir à droite dans l'appareil
- Appuyer sur la touche F2
- La lecture est d'environ 2 minutes par échantillon.
- Les résultats seront imprimés sur une feuille.
- Mettre les résultats dans le cartable de radioactivité
- Si les résultats de CPMC sont supérieurs à 300, il faut désinfecter avec le savon Count OFF (Mandel:6NE9422), suivant les instructions du fabricant.