

Université de Montréal

**Mammite bovine à *Escherichia coli*; identification et
caractérisation de la persistance**

par

Julie-Hélène Fairbrother

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de maître

ès sciences vétérinaires (M.Sc.)

en sciences vétérinaires option microbiologie

Février 2014

© Julie-Hélène Fairbrother, 2014

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé

**Mammite bovine à *Escherichia coli*; identification et
caractérisation de la persistance**

présenté par

Julie-Hélène Fairbrother

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Ann Letellier, présidente-rapporteuse

Serge Messier, directeur de recherche

David Francoz, codirecteur

Éric Nadeau, codirecteur

Jocelyn Dubuc, membre du jury

Résumé

Escherichia coli est un agent de mammites environnementales. Par contre, *E. coli* peut persister dans la glande mammaire. Les objectifs de cette étude étaient de confirmer la présence d'infection persistante chez des vaches laitières canadiennes et d'identifier la possibilité de contagion entre les quartiers d'une vache dans une cohorte de 91 fermes suivies durant deux ans. De plus, les souches persistantes ont été comparées à des souches transitoires. Les profils génétiques ont été obtenus à l'aide de l'électrophorèse sur gel en champs pulsés. La détection de la résistance pour sept antibiotiques s'est faite par microdilution. Vingt-sept gènes de virulence ont été déterminés par hybridation sur colonies. De la persistance a été détectée chez 18 vaches et de la contagion entre quartiers, chez deux vaches. La proportion de résistance chez les *E. coli* persistants était de 0,0 % (enrofloxacin) à 27,8 % (ampicilline et tétracycline) et de 0,0 % (enrofloxacin) à 16,8 % (tétracycline) pour les *E. coli* transitoires. Pour chacune des résistances additionnelles, les probabilités d'être une souche persistante augmentaient par un facteur 1,6 (95% IC : 1.1, 2.4). Une souche résistante à l'ampicilline et à la céphalothine avait une plus forte probabilité d'être persistante. Une souche possédant le gène *iroN* avait 5.4 fois plus de probabilité (95% IC: 1.2, 24.0) d'être persistante. Aussi, une souche positive pour le gène *sitA* avait 8.6 fois plus de probabilité (95% IC: 2.8, 27.1) d'être persistante. En conclusion, cette étude confirme qu'*E. coli* peut persister dans la glande mammaire des vaches laitières canadiennes et que ces *E. coli* sont différents de ceux impliqués lors d'infection transitoire.

Mots-clés : *Escherichia coli*, bovin, mammite, persistance, génotype, virulence, résistance antibiotique

Abstract

Escherichia coli is part of the environmental mastitis pathogens. However, in some cases, persistence in the mammary gland occurs. The objectives of this study were to confirm persistent infection in Canadian dairy cows and to identify possible spread between quarters of a same cow in a cohort of 91 herds monitored over two years. Also, persistent strains were compared to transient strains. Antimicrobial susceptibility was determined by the broth microdilution method. Genetic profiles were obtained for same cow isolates by DNA fingerprinting with pulsed field gel electrophoresis. Twenty-seven virulence genes were determined by colony hybridization. Persistence was detected in 18 cows and contagion between quarters, in 2 cows. Proportions of resistance in persistent *E.coli* ranged from 0.0% (enrofloxacin) to 27.8% (ampicillin and tetracycline). Proportion of resistance in transient *E.coli* ranged from 0.0% (enrofloxacin) to 16.8% (tetracycline). For each additional antimicrobial resistance, odds of being classified as a persistent isolate increased by a factor of 1.6 (95% CI: 1.1, 2.4). Resistance to ampicillin and to cephalothin were both associated with higher odds of being a persistent *E. coli*. Isolates harboring gene *iroN* had 5.4 times higher odds (95% CI: 1.2, 24.0) of being classified as persistent isolates. Similarly, isolates positive to virulence gene *sitA* had 8.6 times higher odds (95% CI: 2.8, 27.1) of being classified as persistent isolates. In conclusion, this study confirmed that *E. coli* can persist in the udder of Canadian dairy cows and that these *E. coli* are different when compared to transient *E. coli*.

Keywords : *Escherichia coli*, bovine, mastitis, persistence, genotype, virulence, antimicrobial resistance

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VI
REMERCIEMENTS.....	VIII
1. INTRODUCTION	1
2. RECENSION DES ÉCRITS	3
2.1 DESCRIPTION DE L'AGENT	3
2.1.1 <i>Caractères bactériologiques</i>	3
2.1.2 <i>Habitat et pouvoir pathogène</i>	3
2.1.3 <i>Description des pathotypes d'Escherichia coli</i>	4
2.1.3.1 <i>E. coli</i> entéro-toxinogène (ETEC).....	4
2.1.3.2 <i>E. coli</i> entéro-pathogène (EPEC).....	4
2.1.3.3 <i>E. coli</i> producteur de toxine shiga (STEC).....	5
2.1.3.4 <i>E. coli</i> extra-intestinal (ExPEC)	6
2.2 DESCRIPTION DE LA MALADIE.....	6
2.2.1 <i>Mammite bovine</i>	6
2.2.2 <i>Infection à coliformes</i>	8
2.2.3 <i>Mammite à Escherichia coli</i>	8
2.2.3.1 Voies de transmission.....	8
2.2.3.2 Prévalence.....	9
2.2.3.3 Pathogénie	9
Entrée dans la glande mammaire	10
Multiplication dans la glande mammaire	10
Réponse de l'hôte	11
Évasion de la défense cellulaire	13
Sensibilité au sérum	13
Adhésion et invasion des cellules mammaires épithéliales.....	14
Facteurs de virulence.....	14
Adhésion et invasion.....	15
Production de toxines.....	17
Acquisition du fer	18

Autres	19
Combinaisons de facteurs de virulence.....	20
Groupes phylogénétiques	21
Persistence au niveau de la glande mammaire	22
Contagion	24
2.2.3.4 Signes cliniques	24
2.2.3.5 Traitement.....	25
Résistance aux antibiotiques	26
Résistance aux antibiotiques et facteurs de virulence	27
2.2.3.6 Prévention.....	28
3. ARTICLE 1.....	29
<i>ESCHERICHIA COLI</i> IS ASSOCIATED WITH PERSISTENT MAMMARY INFECTION IN CANADIAN DAIRY COWS	29
4. ARTICLE 2.....	53
CHARACTERIZATION OF BOVINE MAMMARY PATHOGENIC <i>ESCHERICHIA COLI</i> : PERSISTENT STRAINS ARE DIFFERENT	53
5. DISCUSSION	83
5.1 PERSISTENCE AU NIVEAU DE LA GLANDE MAMMAIRE.....	83
5.2 CONTAGION.....	91
5.3 CARACTÉRISATION DE LA PERSISTENCE	94
5.3.1 Identification de facteurs de virulence	94
5.3.2 Résistance aux antibiotiques	97
6. CONCLUSION.....	100
7. BIBLIOGRAPHIE.....	102

Liste des tableaux

Article 1

Table 1. Antimicrobial breakpoints	49
Table 2. Cows shedding <i>E. coli</i> from the same quarter and from different quarters.....	50
Table 3. Antimicrobial resistance and PFGE patterns for cows in Group 1	51
Table 4. Antimicrobial resistance and PFGE patterns for cows in Group 2	52

Article 2

Table 1. Proportion of antimicrobial resistance in persistent and control <i>E. coli</i> isolates.....	79
Table 2. List of 27 virulence genes under investigation.....	80
Table 3. Proportion of persistent and control <i>E. coli</i> isolates possessing specific virulence genes and unconditional associations between virulence genes and intramammary persistence in <i>E. coli</i>	82

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFA	Adhésine afimbriaire
C5a	Fraction du complément (aussi appelée anaphylatoxine)
CDT	Toxine cytolétale de distension
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNF1	Facteur cytotoxique nécrosant 1
CNF2	Facteur cytotoxique nécrosant 2
CS31A	Fimbria (Coli surface adhesin)
Eae	Intimine ou facteur attachant effaçant
EPEC	<i>Escherichia coli</i> entéro-pathogène
ERIC	Consensus intergénique répétitif d'entérobactérie
ETEC	<i>Escherichia coli</i> entéro-toxinogène
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extra-intestinal
F	Fimbria
H	Antigène flagellaire
IL	Interleukine
K	Antigène capsulaire
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Thermosensible
O	Antigène somatique
P	Fimbria P
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PFGE	Électrophorèse sur gel en champs pulsés
S	Fimbria S
STa	Toxine thermostable
STEC	<i>Escherichia coli</i> producteur de Shiga-toxine
Stx1	Shiga-toxine 1
Stx2	Shiga-toxine 2
Tir	Récepteur de l'intimine

TLR	Récepteur “Toll-like”
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TTSS	Système de sécrétion de type III
VT	Vero-toxine
VTEC	<i>Escherichia coli</i> producteur de Vero-toxine

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le docteur Serge Messier, pour son immense confiance, pour ses conseils et pour sa patience.

Je remercie également mes codirecteurs. Tout d'abord, je remercie le docteur David Francoz pour ses idées originales, son point de vue clinique et pour ses nombreux conseils. Je remercie le docteur Éric Nadeau d'avoir accepté de partager son expertise en laboratoire et pour toutes ses recommandations.

Je remercie les docteurs Ann Letellier et Jocelyn Dubuc d'avoir accepté de siéger à mon jury d'examen de mémoire de maîtrise.

Je remercie l'équipe du Réseau canadien de recherche sur la mammites bovine et la qualité du lait pour l'accès à la base de données et aux isolats. Merci au docteur Simon Dufour pour son point de vue d'épidémiologiste et ses idées plus qu'intéressantes.

Je remercie l'équipe du laboratoire de Bactériologie de la Faculté de médecine vétérinaire et du laboratoire EcL, particulièrement Jade-Pascale Prévost et Clarisse Desautels pour les secrets qu'elles m'ont partagés.

Merci infiniment à mes parents pour leur soutien continu et inconditionnel. Grâce à eux, j'ai continuellement l'envie de me surpasser. Je remercie mon père pour sa sagesse, ses conseils et pour le modèle qu'il est.

Merci à tous mes proches pour les encouragements continus et infinis, le renforcement positif et le soutien culinaire.

Ce projet de recherche a été réalisé grâce à un soutien financier de la part du Fond du Centenaire de la Faculté de médecine vétérinaire et de la part du fond de recherche clinique Pfizer de la Faculté de médecine vétérinaire.

1. Introduction

Pour l'industrie laitière, la mammite bovine est toujours considérée comme étant la maladie de production la plus fréquente et la plus coûteuse, et ce, mondialement (Halasa et al., 2007). En ce qui concerne les agents pathogènes de la glande mammaire, ils sont classés en deux groupes distincts; les agents contagieux et les agents environnementaux. Les agents contagieux se sont adaptés afin de survivre dans la glande mammaire et sont principalement transmis d'une vache à l'autre ou d'un quartier à l'autre d'une même vache lors de la traite. Les agents environnementaux, quant à eux, sont des envahisseurs opportunistes et sont, typiquement, rapidement éliminés de la glande mammaire (Bradley, 2002). *Escherichia coli* est un agent pathogène environnemental. Par contre, cette bactérie peut persister dans la glande mammaire, indiquant que certains *E. coli* possèdent des atouts semblables à ceux des agents contagieux (Fairbrother et Nadeau, 2010). Des infections récurrentes à *E. coli* peuvent être dues à des épisodes répétés d'infections suivies de guérison ou à une infection persistante avec une alternance d'épisodes de mammite clinique et de périodes de mammite subclinique (Zadoks et al., 2011). Une infection intramammaire persistante est causée par une souche unique. La confirmation d'une telle persistance se fait à l'aide de méthodes de biologie moléculaire telles que des méthodes utilisant les réactions en chaîne par polymérase (PCR) ou par l'analyse de fragments d'ADN chromosomique par électrophorèse sur gel en champs pulsés (PFGE). Une étude au Royaume-Uni a démontré que 20,5 % de tous les cas de mammites cliniques à *E. coli* sont survenus au niveau de quartiers infectés de façon persistante (Bradley et Green, 2001). Ceci prouve que la classification des agents pathogènes de la mammite bovine

n'est pas aussi bien définie que précédemment décrite (Bradley, 2002). Il est donc raisonnable de penser que des souches transitoires et persistantes existent et que celles-ci sont différentes afin de leur permettre d'agir différemment avec l'hôte. Par contre, jusqu'à maintenant, il ne semble pas y avoir de facteur de virulence spécifique différenciant les souches capables de produire une infection intramammaire des autres souches d'*E. coli*. De plus, malgré des différences phénotypiques *in vitro*, aucune différence génétique n'a été établie pour différencier des *E. coli* transitoires et persistants (Zadoks et al., 2011). La persistance d'*E. coli* au niveau de la glande mammaire n'a jamais été décrite auparavant pour les vaches laitières canadiennes. Ainsi, il est important de caractériser les isolats d'*E. coli* en provenance de vaches excréant ce microorganisme à répétition afin de mieux comprendre les infections intramammaires dues à *E. coli* au Canada. Les objectifs de cette étude étaient, tout d'abord, de confirmer la présence de persistance à *E. coli* chez les vaches laitières canadiennes et d'identifier la présence de contagion de cet agent pathogène entre les quartiers d'une même vache. De plus, les souches persistantes ont été comparées à des souches de mammite aiguë ou transitoire en ce qui concerne la présence de facteur de virulence et la résistance aux antibiotiques afin de noter les différences entre les deux groupes.

2. Recension des écrits

2.1 Description de l'agent

2.1.1 Caractères bactériologiques

Escherichia coli est un membre de la famille des *Enterobacteriaceae*. Le genre *Escherichia* rassemble des bacilles droits, à Gram négatif, non sporulés, immobiles ou mobiles, aéro-anaérobies, à métabolisme respiratoire et fermentaire, oxydase négative, catalase positive et nitrate réductase positive (Euzéby, 2004).

2.1.2 Habitat et pouvoir pathogène

Escherichia coli est un agent ubiquiste faisant partie de la flore gastro-intestinale normale des mammifères et la plupart des souches d'*E. coli* sont inoffensives. Par contre, certaines souches ont réussi à acquérir des attributs spécifiques leur permettant une adaptation à de nouvelles niches et leur offrant la capacité de causer diverses maladies. *Escherichia coli* est donc une cause importante de maladie, et ce, mondialement et chez la plupart des mammifères. Ces attributs spécifiques sont la plupart du temps encodés au niveau d'éléments génétiques qui peuvent être mobilisés vers différentes souches afin de créer de nouvelles combinaisons de facteurs de virulence ou sur des éléments génétiques qui ont peut-être déjà été mobiles, mais qui sont maintenant ancrés au niveau du génome. Les combinaisons de facteurs de virulence qui se sont vues les plus favorables ont su persister afin de devenir un pathotype spécifique d'*E. coli* capable de provoquer la maladie chez des individus

sains (Kaper et al., 2004). Les principaux pathotypes chez les animaux de consommation sont les *E. coli* entéro-toxinogène (ETEC); *E. coli* entéro-pathogène (EPEC); *E. coli* producteur de toxine Shiga (STEC) ou verotoxinogène (VTEC); et *E. coli* extra-intestinaux (ExPEC) (Fairbrother et Nadeau, 2010).

2.1.3 Description des pathotypes d'*Escherichia coli*

2.1.3.1 *E. coli* entéro-toxinogène (ETEC)

Les ETEC sont la cause la plus importante de diarrhée chez les animaux de consommation (Gyles et Fairbrother, 2008). Ces souches produisent une ou plusieurs adhésines fimbriaires et des entérotoxines. Chez les ruminants, les adhésines fimbriaires les plus importantes sont F5, F41 et F17. Les entérotoxines produites par les ETEC peuvent être thermostables (STa) ou thermosensibles (LT). Les ETEC présents dans l'environnement sont ingérés, passent par l'estomac et colonisent le petit intestin suite à un attachement grâce aux adhésines fimbriaires. Ceux-ci produisent ensuite les entérotoxines qui stimulent la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale. Ceci mène à de la diarrhée, de la perte de poids et à une mort possible (Gyles et Fairbrother, 2010).

2.1.3.2 *E. coli* entéro-pathogène (EPEC)

Les EPEC sont le plus souvent associés à de la diarrhée postsevrage chez le porc. Ce pathotype n'est pas d'importance majeure chez les ruminants. Les EPEC s'attachent intimement aux cellules de l'épithélium intestinal par le biais d'une protéine de la

membrane nommée intimine ou facteur attachant effaçant (Eae). Les EPEC envoient un signal aux cellules épithéliales, probablement par le biais du système de sécrétion de type III (TTSS) et des protéines sécrétées. Ce signal engendre une augmentation du calcium intracellulaire, la phosphorylation de certaines protéines des cellules épithéliales, l'activation des kinases et l'activation du récepteur pour l'intimine (Tir). L'attachement intime des EPEC se fait grâce à la reconnaissance de Tir et des récepteurs cellulaires de l'hôte par l'intimine et grâce à certains changements au niveau du cytosquelette des cellules de l'hôte. À proximité de cet attachement se produit un effacement des microvillosités et les EPEC semblent se situer au dessus d'un piédestal. La diarrhée présente lors d'infection due aux EPEC s'explique par la perte de surface d'absorption par les microvillosités, l'activation de l'activité de sécrétion des cellules épithéliales et par la perte de jonction serrées entre les cellules épithéliales (Gyles et Fairbrother, 2010).

2.1.3.3 *E. coli* producteur de toxine shiga (STEC)

Les ruminants sont les principaux réservoirs de STEC (Karmali, 2005). Ces *E. coli* produisent une toxine shiga (Stx) ou verotoxine (VT). Tels que les EPEC, les STEC s'attachent aux cellules de l'épithélium intestinal à l'aide d'une intimine ou du facteur Eae. Les bovins sont souvent porteurs de STEC de sérotype O157 :H7, mais ceux-ci ne causent pas de signes cliniques chez ces derniers (Fairbrother et Nadeau, 2010). Par contre, ce sérotype est d'importance en santé publique. Les toxines shiga sont produites par les STEC dans les intestins et sont transférées intactes vers la circulation sanguine. Les toxines se lient aux récepteurs des cellules endothéliales des capillaires au niveau

des glomérules rénaux et du système gastro-intestinal, entre autre. Les toxines sont ensuite internalisées par endocytose et des dommages cellulaires s'en suivent causant le syndrome hémorragique et urémique chez les humains.

2.1.3.4 *E. coli* extra-intestinal (ExPEC)

Les ExPEC (septicémiques ou non) possèdent habituellement une variété de facteurs de virulence extra-intestinaux qui permettront à la souche de coloniser les muqueuses de l'hôte, d'éviter ou de contourner l'immunité locale ou systémique, d'acquérir des nutriments essentiels tels que le fer, de créer des dommages ou d'envahir l'hôte et de stimuler une réaction inflammatoire nocive (Johnson et Russo, 2002). Les adhésines fimbriaires les plus souvent produites sont F17, CS31A, P, S, F165 ou celles faisant partie de la famille AFA. Ces *E. coli* ont la capacité de produire, entre autre, les « cytotoxic necrotizing factors (CNF) » 1 ou 2, les toxines cytoléthales de distension (CDT) et le système d'acquisition du fer aéro bactéine (Fairbrother et Nadeau, 2010).

2.2 Description de la maladie

2.2.1 Mammite bovine

Malgré tous les efforts et les mesures prises pour le contrôle de cette maladie, la mammite bovine reste la maladie la plus importante et la plus coûteuse au niveau de l'industrie laitière (Halasa et al., 2007). La mammite ou l'inflammation au niveau de la glande mammaire se développe lorsqu'un agent pathogène réussit à traverser les barrières du canal du trayon et à se multiplier au niveau du lait. Lorsque les

mécanismes de défense immunitaire combattent cette infection rapidement et de façon efficace, la mammite sera de faible intensité et transitoire. Par contre, lorsque les mécanismes de défense sont compromis, lors de période de parturition par exemple, ou lorsque l'agent pathogène possède des mécanismes d'évasion face au système immunitaire, la mammite sera plus sévère ou chronique. L'intensité de la réponse inflammatoire déterminera le type de mammite; subclinique ou clinique (Morin, 2009). Classiquement, la mammite bovine peut se diviser en deux grandes catégories, contagieuse et environnementale. Les agents pathogènes de la glande mammaire qui sont considérés comme étant contagieux sont ceux qui sont adaptés pour une survie chez l'hôte, particulièrement au niveau de la glande mammaire. Le mode de transmission se fait principalement d'un quartier infecté vers un quartier sain et d'une vache à l'autre lors du moment de la traite. Les agents contagieux ont la capacité de persister au niveau de la glande mammaire. Les microorganismes pathogènes environnementaux sont des agents opportunistes. Typiquement, ils infectent la glande mammaire, se multiplient, engendrent une réponse immune et sont rapidement éliminés (Bradley, 2002).

Staphylococcus aureus et *Streptococcus agalactiae* sont des exemples d'agents de mammite contagieuse. Les coliformes sont des agents de mammite environnementale. Avec l'avènement de nouvelles méthodes de typage, cette méthode de classification semble maintenant plutôt simpliste. Au sein des deux catégories, les souches isolées peuvent varier en ce qui concerne le degré de contagiosité (Morin, 2009).

2.2.2 Infection à coliformes

Les mammites à coliformes sont une cause majeure (30 à 50 %) de maladie au niveau des élevages performants de vaches laitières (Morin, 2009). Les coliformes sont présents dans les fèces et sont des agents ubiquistes dans la ferme laitière. *Escherichia coli* est le coliforme le plus souvent isolé lors de mammite. Une mammite à *E. coli* peut survenir chez n'importe quel mammifère, mais elle est plus fréquente chez les bovins. De plus, cette maladie est plus fréquemment rencontrée chez les vaches qui sont de fortes productrices, qui ont un comptage de cellules somatiques faible et qui sont dans les deux semaines suite à la mise bas. De plus, le risque d'infection mammaire par cet agent augmente avec le nombre de parités (Fairbrother et Nadeau, 2010).

2.2.3 Mammite à *Escherichia coli*

2.2.3.1 Voies de transmission

En ce qui concernant la mammite à *E. coli*, la source d'infection la plus commune est la matière fécale présente dans l'environnement des vaches. La litière organique telle que la paille, les sciures et copeaux de bois supporte bien la croissance du *E. coli*, surtout lorsque la température est élevée et lorsque la litière est humide (Morin, 2009). Ceci favorise donc la contamination du canal du trayon et augmente l'incidence de la mammite. Quelques études antérieures démontrent que certaines souches d'*E. coli* provoquant des mammites auraient des caractéristiques semblables à celles des agents de mammite contagieuse. Ces caractéristiques sont la persistance au sein de la glande mammaire, l'apparition de mammites récurrentes dans le même quartier avec un *E. coli*

possédant le même génotype et la transmission de l'infection d'un quartier à l'autre (Bradley et Green, 2001).

2.2.3.2 Prévalence

Avec l'emploi de la désinfection du trayon lors de la traite et des antibiotiques au tarissement, l'incidence des cas de mammites contagieuses a diminué, mais les mammites à *E. coli* sont devenues la cause la plus fréquente de mammite en début de lactation (Hill, 1994). L'incidence des mammites dues à *E. coli* varie d'un pays à l'autre, se situant généralement entre 2 et 15%. Par contre, une incidence plus élevée, atteignant 50% a été rapportée dans certains pays (Fairbrother et Nadeau, 2010).

2.2.3.3 Pathogénie

La majorité des infections intramammaires à *E. coli* ont lieu au début ou à la fin du tarissement (Smith et al., 1985; Blum et al., 2000). Elles demeurent subcliniques jusqu'au moment de la parturition. Plus souvent, la maladie est rencontrée chez les vaches fortes productrices, durant les deux semaines suivant la parturition et chez les vaches qui ont un comptage de cellules somatiques bas (Gyles et Fairbrother, 2010). Les *E. coli* causant les mammites cliniques à coliformes sont des agents pathogènes opportunistes de l'environnement et il ne semble pas y avoir une association entre le sérotype, le génotype ou les facteurs de virulence présents et la sévérité de la maladie (Wenz et al., 2006). La résistance au sérum est considérée comme étant le seul point en

commun entre les différents isolats d'*E. coli*, mais, même pour ceci, la fréquence rapportée varie entre 59 et 99,5 % (Blum et al., 2008).

Entrée dans la glande mammaire

La mammites se développe lorsque le canal du trayon de la vache est exposé aux matières fécales ou à un environnement contaminé. Plus souvent, ceci a lieu après la traite, lorsque le canal du trayon est toujours ouvert. Suite au contact direct avec l'environnement contaminé, *E. coli* pénètre au niveau du trayon et s'installe dans le canal et dans les sinus lactifères. L'intensité de la réponse de l'hôte déterminera l'apparition des signes cliniques (Fairbrother et Nadeau, 2010).

Multiplication dans la glande mammaire

L'adhésion du *E. coli* au niveau de l'épithélium de la glande mammaire n'a pas un rôle important pour la pathogénie de la maladie. Les coliformes ne semblent pas coloniser la glande mammaire, mais plutôt se multiplier dans les sécrétions sans attachement au niveau des cellules de surface (Morin, 2009). Le métabolisme des coliformes doit s'adapter rapidement afin que ceux-ci se multiplient et causent la maladie. Ainsi, la sévérité de la mammites est directement proportionnelle au comptage bactérien dans les sécrétions mammaires (Hogan et Larry Smith, 2003). Deux facteurs de virulences sont importants pour les coliformes à ce stade de l'infection; la capacité d'utiliser le lactose comme source d'énergie et la capacité de se multiplier dans des conditions de quasi-anaérobiose. Le lactose est le principal carbohydrate dans le lait et l'oxygène est

présent en très petite quantité. La réponse de l'hôte face à la présence d'*E. coli* dans la glande mammaire dépend du stade de la lactation. Les sécrétions provenant d'une glande mammaire tarie ne supportent pas la croissance et la multiplication des coliformes. À ce stade, c'est la faible quantité de fer qui est le facteur limitant. Lors du tarissement, les lactoferrines, agents chélateurs du fer, augmentent, et ce, jusqu'au début de la production du colostrum (Hogan et Larry Smith, 2003). Par contre, en période de parturition ou durant les premières semaines de la lactation, les vaches sont plus susceptibles à développer des signes cliniques plus marqués suite à la multiplication du *E. coli* dans la glande mammaire. Ceci est dû au fait que les vaches sont immunosupprimées et que l'appel des neutrophiles est moins efficace ou que les mécanismes de phagocytose et de mort intracellulaire des bactéries sont fragilisés (Smith, 2009).

Réponse de l'hôte

Les neutrophiles sont les cellules les plus importantes pour la défense de l'hôte face à une infection à *E. coli*. Il est essentiel que ces cellules arrivent rapidement au niveau de la lumière de la glande mammaire afin d'avoir une efficacité totale. Ainsi, lorsque la période de lactation est bien établie, les infections mammaires à *E. coli* sont accompagnées d'un minimum de signes cliniques systémiques tels que la fièvre et d'une diminution temporaire de la production laitière. Les signes cliniques sont modérés et la vache guérie par elle-même. Dans cette situation, la réponse inflammatoire est considérée comme étant physiologique à 100 % (Burvenich et al., 2003). Durant la période de parturition ou en début de lactation, plusieurs facteurs permettent au *E. coli*

se de multiplier en grande quantité. Les facteurs les mieux connus sont la faible concentration de lactoferrines dans le lait, une réponse tardive des leucocytes polynucléaires, une diminution au niveau de la tension d'oxygène due à la multiplication bactérienne. Ceci engendre ainsi une diminution de l'efficacité de la destruction des *E. coli* dans les phagolysosomes et une transition rapide vers la présence d'une population leucocytes mononucléaires dans la glande mammaire remplaçant les polynucléaires plus efficaces (Fairbrother et Nadeau, 2010).

Les *E. coli* se multiplient et meurent dans la glande mammaire libérant ainsi les LPS (endotoxine) de la membrane cellulaire externe. La liaison des LPS avec les cellules de l'hôte initie la production de TNF- α par celles-ci. Le TNF- α est responsable de l'enclenchement de la cascade de l'inflammation qui est causé lors de l'apparition des signes cliniques locaux et systémiques (Hoeben et al., 2000 ; Blum et al., 2000). Les prostaglandines, IL-1, IL-6, IL-8, C5a et l'oxyde nitrique sont d'autres éléments importants dans la réponse inflammatoire (Morin, 2009). Malgré le fait que la concentration de LPS dans le lait soit élevée, celle-ci n'est pas détectable ou très faible dans le plasma (Dosogne et al., 2002). La production des médiateurs de l'inflammation au niveau de la glande mammaire est responsable de l'appel des neutrophiles. Lorsque l'appel de ceux-ci se fait de façon efficace et rapide, les bactéries sont phagocytées et détruites. Si l'appel n'est pas efficace, les bactéries se multiplient et les signes cliniques de mammites apparaissent. La majorité des mammites à *E. coli* produisent des signes cliniques locaux, mais un peu moins de 10 % des cas seront systémiques ou seront accompagnés d'une diminution marquée de production laitière (Smith et al., 1985 ; Bradley et Green, 2000).

Évasion de la défense cellulaire

La capacité d'évasion du système immunitaire, plus précisément des neutrophiles, est un facteur de survie important pour les coliformes. La charge bactérienne dans la glande mammaire et la sévérité de la maladie dépendent de la rapidité et de l'efficacité de la réponse des neutrophiles. La susceptibilité d'un coliforme face à la phagocytose dépend de la variabilité au niveau des antigènes de surface exposés. Ainsi, les *E. coli* ayant la capacité de produire une capsule auront plus tendance à engendrer des infections intramammaires de plus longue durée que les souches d'*E. coli* non capsulées. De plus, la présence de composantes cellulaires autres que la capsule peut avoir un effet sur la phagocytose. Certains *E. coli*, faisant parti des sérogroupes O8 et O9, possèdent des facteurs antiphagocytique qui ne sont pas associés à la capsule. Plusieurs *E. coli* ont la capacité d'exprimer des cytotoxines et des hémolysines, mais la production d'exotoxines ne semble pas être un point critique afin de faciliter l'évasion du système de défense de l'hôte (Hogan et Larry Smith, 2003).

Sensibilité au sérum

La résistance face à l'activité bactéricide du sérum est un facteur de virulence commun à plusieurs coliformes en cause lors de mammite. Par contre, ceci n'est pas un prérequis pour la maladie. L'activité bactéricide du sérum est possible grâce au complément. De plus, l'activité du complément est plus importante dans les sécrétions d'une glande mammaire en involution que dans le lait produit en période de lactation.

Par contre, la résistance face au sérum ne varie pas chez les coliformes, qu'ils soient prélevés durant le tarissement ou durant la période de lactation. De plus, le pourcentage de coliformes sensibles au sérum en provenance de cas d'infection intramammaire est similaire au pourcentage de coliformes sensibles présents dans l'environnement de vaches. Ainsi, les coliformes résistants au sérum n'ont pas d'avantage par rapport aux coliformes sensibles au sérum en ce qui concerne les infections intramammaires (Hogan et Larry Smith, 2003).

Adhésion et invasion des cellules mammaires épithéliales

Il a été démontré qu'une souche expérimentale d'*E. coli* pouvait s'internaliser dans les cellules épithéliales alvéolaires mammaires chez des souris déficientes en TLR4 et créer des microcolonies. Cette internalisation n'est pas associée à de l'inflammation et les bactéries semblent entrer en phase de latence. Ceci évoque l'existence de vaches infectées chroniquement et l'existence de mammite récurrente à *E. coli*. Conséquemment, les interactions possibles entre *E. coli* et les cellules épithéliales mammaires pourraient avoir une importance plus grande que proposée à l'heure actuelle en ce qui concerne la pathogénie de la maladie (Shpigel et al., 2008).

Facteurs de virulence

Le rôle des facteurs de virulence d'*E. coli* lors d'infections entériques chez les animaux est bien connu. Par contre, peu d'informations sont disponibles sur les caractéristiques des souches impliquées dans les cas de mammite. Plusieurs études antérieures ont tenté

de caractériser les souches d'*E. coli* en cause lors de mammite bovine. Celles-ci ont pu démontrer que la plupart de ces souches ne possèdent pas de facteur de virulence connu ou que la mammite bovine n'est pas issue de facteurs de virulence spécifiques (Bean et al., 2004 ; Blum et Leitner, 2013 ; Fernandes et al., 2011 ; Ghanbarpour et Oswald, 2010 ; Suojala et al., 2011 ; Wenz et al., 2006). Plusieurs facteurs de virulence présents chez les *E. coli* pathogènes leur donnent la capacité d'engendrer des infections urinaires, de la diarrhée, des septicémies et des méningites chez les humains et chez les animaux. Ces facteurs de virulence sont des toxines, des adhésines, des invasines, la production de capsule, la capacité de résister au complément dans le sérum et la capacité de récupérer le fer dans le milieu de croissance. La mammite bovine ressemble beaucoup aux infections urinaires par le fait que l'infection est ascendante et due aux bactéries présentes dans l'environnement. Plusieurs facteurs de virulence sont nécessaires afin d'aller à l'encontre des mécanismes de défense de l'hôte et afin que la bactérie colonise, se multiplie et survive au niveau de la glande mammaire (Kaipainen et al., 2002).

Adhésion et invasion

L'adhésion des microorganismes au niveau des cellules de l'hôte est la première étape de la colonisation (Döpfer et al., 2000). Plusieurs adhésines ont été associées avec la pathogénie d'*E. coli* lors de maladie chez les bovins. Les adhésines fimbriaires F17 sont principalement détectées chez les *E. coli* de bovins et d'ovins et elles sont associées à de la diarrhée et aux septicémies (Le Bouguéneq et Bertin, 1999 ; Cid et al., 1999). La famille des adhésines fimbriaires F17 inclut F17a-A, F17b-A, F17c-A et

F17d-A. Des gènes codant pour les adhésines fimbriaires F17 ont été détectés chez des *E. coli* produisant des mammites bovines (Lehtolainen, et al., 2003). Les adhésines fimbriaires P et S, codées par les opérons *pap* et *sfa*, sont produites par les souches d'*E. coli* uropathogènes (Harel et al., 1991) et pourraient aussi être d'importance pour les souches de mammites. En 2010, il a été rapporté que 16,7 % des souches de mammites bovine étudiées en Finlande possédaient le gène *papC* (Suojala et al., 2011). Les adhésines afimbriaires sont encodées par divers gènes *afa*. Ces adhésines, ou protéines d'adhésion, permettent l'adhérence des *E. coli* pathogènes aux divers tissus de l'hôte. L'adhésine afimbriaire AfaE-8 est retrouvée chez les *E. coli* isolés de veaux avec des infections au niveau intestinal et/ou extra-intestinal et d'humain avec des septicémies ou des pyélonéphrites (Girardeau et al., 2003). Les gènes codant pour les adhésines fimbriaires P et S ainsi que pour l'adhésine afimbriaire AfaE-8 ont été détectés chez des *E. coli* de mammites (7 %, 8 % et 1 % respectivement) en Finlande (Kaipainen et al., 2002). Une autre adhésine afimbriaire connue est la CS31A qui est un polypeptide de surface. Le gène codant pour cette adhésine a été détecté chez quelques *E. coli* de mammites (Fernandes et al., 2011 ; Ghanbarpour et Oswald, 2010 ; Wenz et al., 2006). L'adhésine fimbriaire de type I (gène *fimH*) a également été détectée dernièrement chez des *E. coli* de mammites (Fernandes et al., 2011). Le gène *lpfA*, codant pour le fimbriae « long polar fimbriae » est un gène qui favorise l'adhésion aux cellules de l'hôte et celui-ci a été identifié au départ au niveau d'*E. coli* provoquant de la diarrhée et chez des *E. coli* non pathogènes (Toma et al., 2006). Dogan et al. ont réussi à démontrer que la présence du gène *lpfA* était associée avec la capacité qu'a un *E. coli* à envahir des cellules épithéliales mammaires bovines en culture (Dogan et al., 2012).

De plus, Dogan et al. suggèrent que la présence de *lpfA* pourrait favoriser la virulence au niveau de la glande mammaire par le biais de la médiation de l'adhésion des cellules épithéliales. Blum et Leitner ont également pu démontrer que le gène *lpfA* était très prévalent (33 %) au niveau des souches de mammite (Blum et Leitner, 2013).

Production de toxines

Plusieurs toxines différentes peuvent être produites par les *E. coli* pathogènes. Les facteurs nécrosants cytotoxiques ou « cytotoxic necrotizing factors » (CNF) sont des facteurs de virulence importants pour les *E. coli* pathogènes. Les toxines CNF, associées aux gènes *cnf1* et *cnf2* produisent des dommages pour les cellules endothéliales et des microangiopathies thrombotiques (Wenz et al., 2006). Les *E. coli* CNF positifs sont souvent associés à de la septicémie et des avortements chez les vaches et à de la diarrhée chez les veaux. Le facteur de virulence CNF2 peut être présent chez les vaches adultes en santé, mais aussi présent lors de cas de pneumonie, métrite et rapporté dans un cas de mammite (Pohl et al., 1993). Plus récemment, en Finlande, il s'est avéré que CNF2 était parmi les facteurs de virulence les plus souvent identifiés au niveau de souches de mammite bovine. Celui-ci a été détecté chez 14,4 % des souches, seul ou en combinaison avec d'autres facteurs (Kaipainen et al., 2002). Wenz et al. rapportent que CNF2 est le facteur de virulence le plus souvent détecté des *E. coli* issus de mammite bovine, mais dans une proportion tout de même assez basse (12 isolats sur 128). De plus, aucune différence dans la sévérité de la mammite n'a été notée, malgré la présence de ce facteur de virulence (Wenz et al., 2006). En ce qui concerne CNF1, celui-ci a déjà été détecté au niveau de souches de mammite bovine, et

ce, pour la plupart, en combinaison avec les gènes codant pour les adhésines fimbriaires S et P (Kaipainen et al., 2002). Le gène *astA* code pour « enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 » (EAST1). Cette toxine a initialement été détectée au niveau des fèces d'un enfant en diarrhée. Dernièrement, il a été démontré que des souches d'*E. coli* en provenance d'animaux de la ferme possédaient le gène *astA* (Veilleux et Dubreuil, 2005). Par exemple, chez des bovins sains en France, *astA* a été détecté au niveau de 50% des isolats d'*E. coli* Stx1 positifs, mais chez seulement 6,5% des isolats Stx2 positifs. Une étude en Israël a permis de démontrer que ce gène était le seul détecté dans une proportion significativement plus élevée au niveau de souches d'*E. coli* associées à de la mammite bovine (37%) comparativement à des souches de l'environnement (4%) (Blum et Leitner, 2013). Par contre, ceci n'était pas caractéristique de la majorité des souches de mammite. Il a été suggéré que le récepteur pour EAST1 et pour STa soit le même, prenant en considération l'homologie au niveau des séquences de EAST1 et du domaine entéro-toxinogène de STa ainsi que les modes d'action de ces toxines qui sont similaires (Veilleux et Dubreuil, 2005). L'expression de ce récepteur, étant limitée à l'épithélium intestinal (Veilleux et Dubreuil, 2005), rend la virulence d'*astA* questionnable dans un contexte d'infection au niveau de la glande mammaire (Blum et Leitner, 2013).

Acquisition du fer

L'aérobactine est un facteur de virulence important pour les *E. coli* en cause lors d'infections extra-intestinales chez les animaux. L'ensemble de gènes pour l'aérobactine est composé de 5 gènes (*iucABCD* et *iutA*). Quatre de ces gènes sont

nécessaires pour la biosynthèse de l'aérobactine et le cinquième (*iutA*), quant à lui, code pour un récepteur de la membrane externe du *E. coli*, soit ferriaérobactine (Thariath et al., 1993). Nemeth et al. ont pu démontrer que les souches provenant de mammites bovines étaient statistiquement différentes ($P \leq 0.026$) des souches d'*E. coli* provenant de matières fécales en ce qui concerne la production d'aérobactine. Par contre, seulement 20 % des souches de mammite possédaient la capacité de produire de l'aérobactine (Nemeth et al., 1994). Kaipainen et al. ont démontré que certaines souches d'*E. coli* isolées de mammite en Finlande (11 %) et en Israël (4 %) possédaient les gènes pour la production d'aérobactine (Kaipainen et al., 2002). Plus tard, en Finlande, il a été démontré que 16,7 % des souches d'*E. coli* testées possédaient le gène *iucD* (Suojala et al., 2011). Suite à une étude en Iran, le gène *iucD* a été détecté chez 12 % des souches étudiées (Ghanbarpour et Oswald, 2010). Un autre gène permettant l'acquisition du fer est *irp2* (Ewers et al., 2007). En Finlande, ce gène a été détecté chez 26,4 % des souches d'*E. coli* de mammite bovine (Suojala et al., 2011).

Autres

Le gène *iss* (increased serum survival) permet au *E. coli* d'augmenter sa survie dans le sérum. Le gène *iss* est identifié chez 75 % à 91 % des souches d'*E. coli* extra-intestinales (Johnson et al., 2008). Dernièrement, en Finlande, 16,7 % des souches de mammites étudiées possédaient ce facteur de virulence (Suojala et al., 2011). Ce gène a aussi été détecté parmi les isolats d'*E. coli* de mammite dans une étude en Israël. Par contre, des proportions semblables ont été détectées au niveau des *E. coli* de l'environnement (Blum et Leitner, 2013). La résistance au sérum est possible chez

d'autres agents pathogènes de mammites indiquant ainsi que ceci est probablement un facteur non spécifique qui aide à la pathogénicité, mais qui n'est pas nécessaire pour la virulence dans la glande mammaire (Rainard, 2003).

Combinaisons de facteurs de virulence

La présence du fimbriae F17 est souvent associée à d'autres facteurs de virulence chez les *E. coli* pathogènes (Kaipainen et al., 2002). La plupart des souches bovines exprimant le sous-type F17c produisent également le facteur d'adhésion afimbriaire CS31A (Le Bouguéneq et Bertin, 1999). De plus, près de la moitié des souches F17 positives sont résistantes au sérum et produisent de l'aérobactine (Pohl et Mainil, 1995). Parmi les souches associées à la mammité, Kaipainen et al. ont observé que la présence de gènes en lien avec F17 pouvait se présenter sous différentes combinaisons avec les gènes pour CNF2, aérobactine, TraT et l'adhésine afimbriaire Afa8 (Kaipainen et al., 2002). La lipoprotéine TraT induit la résistance au sérum en interagissant avec le complément (Pramoonjago et al., 1992). La combinaison Afa8, CNF2, F17 et aérobactine en est une aussi retrouvée au niveau des souches en Iran (Ghanbarpour et Oswald, 2010). Dans cette dernière étude de Kaipainen, le gène *cnf2* a aussi été détecté en combinaison avec les gènes codant pour les adhésines fimbriaires P et S et avec CNF1. Suojala et al. rapportent que plusieurs combinaisons de facteurs de virulence ont été détectées dans leur collection d'*E. coli*. Par contre, le plus souvent, une seule souche représentait chaque combinaison détectée, indiquant que les souches d'*E. coli* en cause lors de mammité bovine présentent une grande variabilité génétique (Suojala et al., 2011). Ceci a aussi été rapporté lors d'études antérieures, mais avec des

panels différents de facteurs de virulence étudiés (Kaipainen et al., 2002 ; Bean et al., 2004 ; Wenz et al., 2006).

Groupes phylogénétiques

Les *E. coli* commensaux appartiennent aux groupes phylogénétiques A ou B1, les *E. coli* entéro-pathogènes appartiennent aux groupes A, B1 ou D et les *E. coli* ExPEC appartiennent au groupe B2 et quelques-uns au groupe D. De plus, les ExPEC sont issus de certains clones spécifiques au sein de ces groupes qui peuvent être reconnus par des sérotypes O:K:H caractéristiques (Johnson et Russo, 2002). Le lien existant entre la phylogénie et les souches d'*E. coli* ExPEC a été démontré à plusieurs occasions par différents auteurs. Les souches d'*E. coli* ExPEC appartiennent en grande partie au groupe phylogénétique B2 et quelques-uns appartiennent au groupe D. Les *E. coli* présents dans la flore gastro-intestinale des animaux de la ferme appartiennent plutôt au groupe A et B1 (Escobar-Páramo et al., 2004). Ceci est aussi vrai pour les ExPEC impliqués en médecine humaine. La majorité des souches isolées de l'urine ou du liquide céphalo-rachidien des nouveau-nés appartiennent au groupe phylogénétique B2 et D et ces souches possèdent un plus grand nombre de facteurs de virulence du groupe ExPEC comparativement aux souches issues des autres groupes lors de ces mêmes pathologies (Escobar-Páramo et al., 2004).

En Iran, une étude a démontré que les souches d'*E. coli* provenant de mammite bovine faisaient principalement partie du groupe phylogénétique A (45 %) et qu'aucune des souches n'appartenait au groupe B2 (Ghanbarpour et Oswald, 2010). Fernandes et al. ont obtenu la même conclusion lors de leur étude avec des souches en

provenance du Brésil. La plupart des souches appartenaient au groupe A (24/27) alors qu'ils s'attendaient à retrouver des souches dans le groupe B2 ou D (Fernandes et al., 2011). Ceci a également été observé chez des souches de la Finlande où la majorité (82,6 %) faisait partie du groupe A (Suojala et al., 2011). En Israël, les souches en provenance de mammite appartenaient majoritairement au groupe B1 (51 %) et au groupe A (38 %) (Blum et Leitner, 2013). Les différences de proportion détectées dans ces études peuvent être dues à plusieurs facteurs tels que les méthodes d'échantillonnage, la sélection des souches pour les diverses études et la région géographique échantillonnée. Les souches invasives et causant des infections extra-intestinales font habituellement partie du groupe B2 (Clermont et al., 2000). Malgré le fait que la mammite soit une infection extra-intestinale, les souches d'*E. coli* impliquées dans la mammite bovine ne sont pas excessivement invasives, expliquant possiblement la faible proportion de souches du groupe B2 (Blum et Leitner, 2013).

Persistence au niveau de la glande mammaire

La plupart des cas de mammite bovine dus à *E. coli* sont transitoires et se terminent par la mort de l'agent pathogène ou de l'hôte. Par contre, depuis les années '90, avec l'arrivée des premières techniques de caractérisation génétique, l'existence de mammite récurrente à *E. coli* a été démontrée (Lam et al., 1996 ; Lipman et al., 1995). De la récurrence lors de l'isolement d'*E. coli* au niveau du même quartier peut indiquer deux situations. Dans un premier temps, il peut s'agir d'épisodes répétés d'infection et de guérison. Ceci se produit lorsque l'hôte présente une susceptibilité particulière à cette maladie. Étant donné l'hétérogénéité des *E. coli* de l'environnement, ces épisodes

répétés seraient dus à des *E. coli* génétiquement distincts. Dans un second temps, il peut s'agir d'une infection persistante avec alternance de signes cliniques de maladie et de moment de mammite subclinique. Une infection intramammaire persistante doit être due à une souche bactérienne unique présente pendant une longue période au niveau de la glande mammaire, engendrant des isollements répétés provenant de multiples épisodes de mammite clinique (Zadoks et al., 2011). Des études antérieures ont pu démontrer que certains *E. coli* ont la capacité de persister au niveau de la glande mammaire, mais que ce phénomène était plutôt rare (Bradley et Green, 2001). Lors d'une étude aux Pays-Bas incluant 7 troupeaux de bovins laitiers, des épisodes de récurrence clinique dus à *E. coli* ont été détectés dans 9,1 % des quartiers infectés (Lipman et al., 1995 ; Lam et al., 1996). Quelques années plus tard, Döpfer et ses collègues ont pu décrire le même phénomène chez une cohorte de 300 fermes laitières. Dans cette étude, une proportion de 4,77 % de tous les épisodes de mammite clinique dus à *E. coli* était en fait associée à de la persistance intramammaire et les *E. coli* isolés possédaient le même génotype (Döpfer et al., 1999). Ces proportions de persistance sont plus faibles que celle rapportée au Royaume-Uni. Lors de cette dernière étude, 6 fermes laitières ont été suivies. Un total de 20,5 % de tous les cas de mammites cliniques à *E. coli* est survenu au niveau de quartiers infectés de façon persistante (Bradley et Green, 2001). Ceci suggère un changement au niveau de la susceptibilité de l'hôte par rapport à une infection persistante à *E. coli* ou l'apparition de souches plus adaptées à l'environnement de la glande mammaire.

Contagion

Lorsque la même souche d'*E. coli* est isolée lors d'infection au niveau de la glande mammaire à répétition, mais au niveau de quartiers différents, ceci pourrait indiquer qu'il y a eu un transfert de cette souche entre les quartiers, donc de la contagion. Ceci est un phénomène qui a été détecté antérieurement. Au Royaume-Uni, 8,5 % des cas récurrents apparaissant dans différents quartiers de la même vache possédaient le même génotype que le *E. coli* isolé initialement (Bradley et Green, 2001). De plus, aux Pays-Bas, ils ont conclu que chez 2,98 % de tous les épisodes de mammites, la transmission d'*E. coli* entre les quartiers d'une même vache se serait probablement produite (Döpfer et al., 2000). Tel que mentionné précédemment, une réinfection avec une même souche d'*E. coli* à partir de l'environnement est très peu probable due à la très grande hétérogénéité de ce microorganisme.

2.2.3.4 Signes cliniques

Les mammites à *E. coli* se manifestent par des signes cliniques qui varient de très sévère, parfois même fatal à une mammite légère où les vaches n'ont que des signes locaux tels que des grumeaux dans le lait et de l'enflure au niveau de la glande mammaire. La sévérité des signes cliniques, pouvant être de modérés à sévères, est quant à elle grandement associée aux caractéristiques de l'hôte (Burvenich et al., 2003). L'issue de la maladie peut mieux se prédire en présence de signes cliniques systémiques (Wenz et al., 2006). Les signes cliniques associés avec une augmentation marquée de mortalité, de réforme ou d'une production sous-optimale de lait sont l'hyperthermie, une diminution au niveau de la fréquence ou de l'amplitude des

contractions du rumen, une déshydratation marquée et de la dépression (Morin, 2009). Les mammites cliniques issues d'une infection persistante ont tendance à démontrer des signes cliniques plus modérés que les mammites cliniques associées à une nouvelle infection (Bradley et Green, 2001).

2.2.3.5 Traitement

Pour les mammites subcliniques à coliforme, l'usage d'antibiotiques peut s'avérer inutile. Souvent, la guérison est spontanée et l'infection est de courte durée. De plus, les vaches présentant une mammite à coliforme avec des signes cliniques légers à modérés sont souvent capables de combattre l'infection sans l'administration d'antibiotiques. Seules certaines vaches présentant des signes cliniques plus sévères ou immunosupprimées bénéficieront d'une antibiothérapie (Morin, 2009).

Les mammites peuvent être traitées par infusion intramammaire ou par voie parentérale. Par contre, plusieurs des antibiotiques utilisés dans les infusions intramammaires ne sont pas efficaces pour traiter une infection à coliforme. Par exemple, l'érythromycine et la pirlimycine disponibles au Canada n'ont aucune efficacité contre les coliformes. Les céphalosporines telles que la céphapirine et le ceftiofur sont reconnues comme étant généralement efficaces contre *E. coli*. Un traitement systémique est plus souvent utilisé lors de mammites sévères (accompagnées de signes cliniques systémiques tels que de la fièvre ou abattement en plus de l'apparence anormale du lait et de l'enflure au niveau de la glande mammaire). De plus, un traitement de support (fluides et anti-inflammatoires) est habituellement administré en même temps que l'antibiothérapie (Wagner et Erskine, 2006). Les

mammites accompagnées de signes systémiques sont plus souvent dues à des coliformes. Une étude antérieure a pu démontrer que 42 % des vaches naturellement infectées et présentant des signes cliniques sévères souffraient de bactériémie concomitante (Wenz et al., 2001).

Tout usage systémique d'antibiotiques pour traiter la mammite doit se faire hors homologation au Canada, puisqu'il n'y a pas d'antibiotique étiqueté pour un usage systémique pour la mammite. Pour un usage d'antibiotiques hors homologation chez des animaux de consommation, il faut prendre en considération que le temps de retrait devra être augmenté pour le lait et pour la viande. Les antibiotiques disponibles pour usage chez les vaches laitières et efficaces contre les coliformes sont les suivants : oxytétracycline, triméthoprim-sulfaméthoxazole, ceftiofur et ampicilline.

Résistance aux antibiotiques

Afin de bien contrôler la mammite bovine et d'éviter les problèmes associés avec la résistance aux antibiotiques et l'échec du traitement, il est important de connaître certaines caractéristiques de l'antibiorésistance des agents pathogènes en cause. Plusieurs études démontrent des résultats concernant la surveillance de l'antibiorésistance, mais les méthodes utilisées pour déterminer le statut des diverses souches ne sont pas toujours les mêmes. Il faut donc être prudent quant à la comparaison de ces résultats. Une étude en Finlande sur 154 isolats d'*E. coli* provenant de 65 fermes laitières a pu démontrer que les antibiotiques pour lesquels de la résistance était plus souvent détectée étaient l'ampicilline (18,6 %), la streptomycine (16,4 %), la tétracycline (15,7 %) et le sulfaméthoxazole (13,6 %). De plus, pour cette

étude, aucune résistance n'a été détectée pour la gentamicine, le florfénicol et pour le ceftiofur (Suojala et al., 2011). Une étude aux Etats-Unis rapportait des résultats d'antibiorésistance pour un suivi de 10 antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire pour 129 *E. coli* isolés de cas de mammite bovine. La plupart des *E. coli* (98,4 %) étaient résistants à l'ampicilline et plusieurs étaient résistants à la streptomycine (40,3 %), au sulfisoxazole (34,1 %) et à la tétracycline (24,8 %) (Srinivasan et al., 2007). Au Canada, une étude nationale a récemment eu lieu pour des isolats d'*E. coli* issus du programme de prélèvement du Réseau Canadien de Recherche sur la Mammite Bovine. Les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées pour 394 isolats provenant de 394 quartiers de 353 vaches sur 76 fermes laitières. La plupart des valeurs des CMI étaient sous le seuil de la résistance. Les proportions de résistance variaient de 0 pour le ceftriaxone et le ciprofloxacine à 14,8 % pour la tétracycline. La proportion de résistance était de 9,2 % pour le sulfisoxazole, de 8,7 % pour la streptomycine et de 8,2 % pour l'ampicilline (Saini et al., 2012b).

Résistance aux antibiotiques et facteurs de virulence

Parfois, il est possible de retrouver certains facteurs de virulence qui seraient corrélés avec la présence de résistance aux antibiotiques. Ceci n'est pas très souvent rapporté en ce qui concerne les souches d'*E. coli* causant des mammites bovines. Une étude en Finlande a pu rapporter une telle corrélation. De tous les gènes de virulences évalués, ils ont pu mettre en évidence que seulement *iucD* présentait une corrélation avec la résistance envers la streptomycine, l'ampicilline, le sulfaméthoxazole et le triméthoprime. Ce gène code pour l'aérobactine qui est impliqué dans l'acquisition du

fer et peut être présent soit au niveau d'un chromosome ou sur un plasmide, où beaucoup de gènes d'antibiorésistance sont situés (Suojala et al., 2011). Cette découverte pourrait indiquer que ces gènes sont situés sur le même plasmide ou près l'un de l'autre sur le même îlot de pathogénicité.

2.2.3.6 Prévention

Les efforts pour la prévention des mammites à coliformes devraient viser une réduction de l'exposition des trayons aux coliformes présents dans l'environnement durant le tarissement et durant la période péri-partum. Ainsi, il faut contrôler la contamination de l'environnement immédiat des vaches. La vaccination semble être une avenue intéressante pour la prévention des mammites à coliformes. Les vaccins déjà existants engendrent une réponse face aux antigènes « core LPS ». L'immunité acquise n'empêche pas l'infection intramammaire, mais réduit la sévérité des signes cliniques rencontrés. Plusieurs autres vaccins sont présentement à l'étude, tels que des vaccins visant les récepteurs pour les protéines impliquées dans l'acquisition du fer (Morin, 2009).

3. Article 1

***Escherichia coli* is associated with persistent mammary infection in Canadian dairy cows**

Julie-Hélène Fairbrother^a, David Francoz^b, Éric Nadeau^a, Serge Messier^{a,c}

^aDépartement de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

^bDépartement de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

^cCanadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network, C. P. 5000 Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada

ACKNOWLEDGEMENTS

The bacterial isolates have been furnished by the Canadian Bovine Mastitis Research Network with support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Alberta Milk, Dairy Farmers of New Brunswick, Nova Scotia, Ontario and Prince Edward Island, Novalait inc., Dairy Farmers of Canada, Canadian Dairy Network, AAFC, PHAC, Technology PEI Inc., Université de Montréal and University of Prince Edward Island.

ABSTRACT

Escherichia coli is part of the environmental mastitis pathogens. However, in some cases, persistence in the mammary gland occurs, indicating that some *E. coli* causing mastitis have similar attributes to those of contagious mastitis pathogens. The objectives of the present study were to confirm persistent infection of the udder in Canadian dairy cows recurrently excreting *E. coli* from the same quarter and to identify possible spread of the organism between quarters of a same cow in a cohort of 83 Canadian dairy herds monitored over a 2 year period. Firstly, antimicrobial susceptibility patterns were determined by the broth microdilution method. Then, genetic profiles were obtained for some cow isolates by DNA fingerprinting with pulsed field gel electrophoresis. Quarters in which identical *E. coli* genotypes were found were considered persistently infected. In 12.2 % of all intramammary infections (IMI) caused by *E. coli*, persistent infections caused by the same *E. coli* genotype were found. The same genotype was also detected in different quarters of a same cow, suggesting spread between quarters. This represented 1.2% of all *E. coli* cases during the study period. Persistent and contagious strains had the same antimicrobial resistance pattern when repeatedly isolated. Also, antimicrobial resistance for all *E. coli* isolates was found to be highest for tetracycline (23.8%), ampicillin (20%) and cephalothin (13.8%). Combined findings in this study confirmed that persistent *E. coli* IMI occur in Canadian dairy cows. In addition, there is a possibility of contagion between quarters, but this event was very rare. This evokes an evolution in *E. coli* behaviour towards the mammary gland due to either bacterial selection or host factors.

Key words: *Escherichia coli*, bovine, mastitis, persistence, genotype.

Introduction

For the dairy industry, mastitis is still considered one of the most frequent and costly production diseases worldwide (Halasa et al., 2007). Concerning the mastitis pathogens, they are typically classified in two distinct groups; contagious or environmental. The contagious pathogens are adapted to survive within the mammary gland. On the other hand, environmental pathogens are opportunistic invaders and are typically rapidly eliminated (Bradley, 2002). *Escherichia coli* is part of the environmental pathogens. However, in some cases, persistence in the mammary gland occurs, indicating that some *E. coli* that cause mastitis have similar attributes to those of contagious mastitis pathogens (Fairbrother and Nadeau, 2010). Facing recurrent *E. coli* cases can be due to repeated episodes of infection and cure or to a persistent infection with alternating subclinical and clinical episodes (Zadoks et al., 2011). For persistence to occur, the mastitis would have to be caused by a single strain. Demonstration of such persistence is done by using molecular methods such as PCR-based methods or analysis of chromosomal DNA restriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). A study elaborated in the United Kingdom demonstrated that 20.5% of all clinical *E. coli* mastitis cases arose in persistently infected quarters (Bradley and Green, 2001). This is evidence that the classification of mastitis pathogens may not be as clear as previously thought (Bradley, 2002). *E. coli* persistence within the udder has never been demonstrated in Canadian dairy herds. Hence, it is important to characterize *E. coli* isolates from recurrently excreting cows in order to better understand intramammary infection caused by *E. coli* in Canada. Findings will help better understand the possible changes in *E. coli* behaviour. The

objectives of the present study were to confirm persistent infection of the udder in Canadian dairy cows recurrently excreting *E. coli* from the same quarter and to identify possible spread of the organism between quarters.

Materials and Methods

Sample Collection

Escherichia coli isolates studied are part of the Mastitis Pathogen Culture Collection (MPCC) maintained by the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network (CBMQRN). The National Cohort of Dairy Farms (NCDF) was set up in the CBMQRN and is intended to represent the Canadian dairy farm population (Reyher et al., 2011). The herds were conveniently selected on the basis of location (Alberta, Ontario, Québec and Atlantic), bulk tank somatic cell count (SCC), housing type and proportion of Holstein-Friesian cows in the herd. NCDF milk sampling was monitored during a two-year period (from January, 2007 to December, 2008). During this two year period, an average of 83 farms participated. Amongst the milk-sampling series, one focused on clinical mastitis cases. Dairy producers sampled the affected quarter of cows identified as having clinical mastitis. These samples were taken on the day of the mastitis diagnosis (M1), and repeated at 2 to 3 weeks (M2), and again at 4 to 5 weeks (M3) after onset of clinical mastitis. Each sample was associated with a mastitis clinical score: grade 1, abnormal milk only; grade 2, abnormal milk and swollen quarter; grade 3, abnormal milk, swollen quarter and sick cow (Sears and McCarthy, 2003). Samples were frozen at the farm and sent monthly to 1 of the 4 laboratories participating in the Mastitis Laboratory Network.

Bacteriological culture

Milk samples were cultured as soon as they arrived at the laboratory according to the established procedures (National Cohort of Dairy Farms, 2009). Briefly, 10 μ L of milk was inoculated on a bi-plate; half Columbia agar with 5% sheep blood and half MacConkey agar and plates were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ in normal atmosphere. A first examination of the plates was done after 18-20 hours of incubation. Plates were reincubated for an additional 24 hours. Gram-negative bacteria that were lactose and indole positive, oxidase negative, citrate negative were identified as *E. coli*. According to the guidelines of the CBMQRN, these isolates were frozen in trypticase soy broth with 15 % glycerol when they grew as a pure culture and when there was more than 1 colony/plate.

Cow selection

All cows from which *E. coli* was isolated more than once during the sampling period were included in the study. Isolation of the bacteria could be from the same quarter or from different quarters. For cows from which *E. coli* was isolated from the same quarter, the first sample was always associated to clinical mastitis (M1). Subsequent isolations were either obtained from mastitis follow-up samples (M2 and M3) or were associated to another mastitis episode (M1). When isolated from different quarters, excreted *E. coli* could be from the same day samplings.

Antimicrobial susceptibility determination

Antimicrobial susceptibility of the *E. coli* isolates was determined by the broth microdilution method and interpreted according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Table 1 illustrates breakpoints used and general comments concerning the antimicrobials. For each antimicrobial, four dilutions, including specific breakpoints, were tested to determine presence of resistance. Cation adjusted Mueller-Hinton broth was used as the medium for susceptibility testing. The final concentration of bacteria was approximately 5×10^5 CFU/mL. Trays were incubated at $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ for 16 to 20 hours in a normal atmosphere incubator. *E. coli* ATCC 25922 was used as a control standard.

DNA fingerprinting

The genetic profiles of *E. coli* isolates obtained from the same cows were compared using PFGE. DNA was extracted, digested using *Xba*I enzyme and PFGE was done according to the CDC/PulseNet One-day Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli*, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* (CDC, 2004). Briefly, bacterial colonies grown overnight at $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ on Columbia agar with 5% sheep blood were suspended in TE buffer (100mM Tris: 100 mM EDTA pH 8.0). Cell suspension was adjusted using a spectrophotometer with a 610 nm wavelength for an optical density of approximately 1.35. A 400 μL aliquot of adjusted cell suspension was put in a 1.5 mL microcentrifuge tube. To this was added 20 μL of Proteinase K (20 mg/mL stock) and then, 400 μL of melted 1% Seakem Gold: 1% SDS agarose. This mixture was dispensed into plug molds. Plugs were

allowed to solidify at room temperature for 10-15 minutes. Plugs were then transferred in a tube containing 5 mL of the cell lysis buffer (50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl) and 25 μ L of Proteinase K (20 mg/mL stock). Plugs were incubated in a 54°C shaking water bath for 1.5-2 hours. After lysis, the buffer was removed and 10-15 mL sterile Ultrapure (Reagent Grade Type 1) water was added to each tube. The tubes returned to the shaking water bath for 10-15 min at 50 °C. The water was removed and plugs were washed with TE buffer (10 mM Tris: 1mM EDTA, pH 8.0) in the shaking water bath for 10-15 min at 50 °C. This last step was repeated three more times. Plugs were stored in TE buffer at 4°C until needed. For restriction digestion of DNA, a 2.0 mm wide plug slice was incubated in a 37°C water bath with *Xba*I restriction enzyme (50 U/sample) and H buffer (Roche Molecular biochemical or equivalent). Plug slices were casted in a 1% SeaKem Gold agarose gel using 0.5X Tris-borate EDTA buffer (TBE). The electrophoresis was run on the CHEF-DR II module (Bio-Rad Laboratories) with the following conditions: initial A time, 2.2 s; final A time, 54.2 s; volts/cm, 6; temperature, 14°C and run time, 18 hours. The initial running buffer for all samples was 0.5X TBE. HEPES buffer was used when smears, probably due to DNA degradation, were detected and interfered with fragment analysis (Koort et al., 2002). With this buffer, the following electrophoresis conditions were used: initial time, 5 sec; final time, 70 sec; volts/cm, 4; temperature 14°C and run time; 24 hours. *Salmonella* Braenderup strain H9812 was used as a DNA size standard. When the electrophoresis run was over, gels were stained with 40 μ L of ethidium bromide stock solution (10 mg/mL) for 20-30 min.

Interpretation and definitions

When comparing antimicrobial resistance patterns, detection of an identical pattern (i.e. same phenotype) in a same cow served as a preliminary indication of persistence. The PFGE patterns were analysed visually, independently for each cow and were interpreted according to the criteria established by Tenover et al., 1995. Indistinguishable strains have identical patterns; closely related strains have 2-3 fragment differences, possibly related strains have 4-6 fragment differences and different strains have ≥ 7 fragment differences.

A persistent infection was considered when the same *E. coli* genotype was identified in the same quarter of the same cow at least twice in the two-year sampling period. Spread between quarters was considered when the same *E. coli* phenotype and genotype was identified in different quarters of the same cow.

Results

During the two-year sampling period, 134 346 milk samples were collected for analysis. A total of 7 622 samples were associated with clinical mastitis and follow-up samples. *E. coli* was isolated in 11% of these samples and was thus the second most common pathogen isolated from clinical mastitis and from follow-up samples. *Staphylococcus aureus* was the most commonly isolated pathogen. (Reyher et al., 2011). When the MPCC database was consulted for this study (at the beginning of 2009), most of the data from the two year sampling period was available. At that moment, according to the compiled results, 342 *E. coli* isolates of interest were recovered and frozen. These *E. coli* were cultured from clinical mastitis and follow-up

samples. Follow-up sampling was part of the process and was not necessarily associated with mastitis clinical signs. The 342 *E. coli* were isolated from 299 cows. Of these 299 cows, a selection was done targeting cows with multiple *E. coli* shedding. Thus, two groups of cows were established for the study (Table 2). First, a total of 22 cows that repeatedly shed *E. coli* (twice or three times) from the same quarter was selected and is referred hereafter as “Group 1”. The first isolation of *E. coli* was always associated with a clinical mastitis episode (M1). In addition, 15 cows were chosen because *E. coli* was isolated twice, but in different quarters and referred hereafter as “Group 2”. One cow met criteria to be included in both groups (cow 5, shown in group 1 in table 2), having isolates detected repeatedly in quarters 2 and 4. A total of 80 isolates were available for analysis. These isolates are from 24 farms out of the 83 farms participating in the NCDF.

Antimicrobial resistance

Overall, 32.5% (26/80) of the tested *E. coli* isolates were resistant to at least one antimicrobial. The most frequent resistances were for tetracycline (23.8%), ampicillin (20%) and cephalothin (13.8%). No resistance was detected to enrofloxacin. Antimicrobial resistance in isolates of Group 1 was: ampicillin (26%) cephalothin (18%), ceftiofur (8%), spectinomycin (6%), tetracycline (30%) and SXT (10%). For Group 2 isolates, antimicrobial resistance was: ampicillin (10%) cephalothin (6.7%), ceftiofur (6.7%), spectinomycin (3.3%) tetracycline (13.3%) and SXT (6.7%). Twenty (91%) cows of the Group 1 and ten (67%) cows of Group 2 were infected with *E. coli* sharing the same antimicrobial resistance pattern over time or between quarters (Tables

3 and 4).

Persistence and contagion

A total of 77% (17) of cows from the Group 1 showed indistinguishable PFGE patterns (Table 3). Furthermore, a closely related pattern was observed for isolates from the cow 8. Hence, the proportion of persistently infected cows was 6% (18/299) for this two-year study. Three cows (6, 12 and 22) excreted isolates with different PFGE patterns and one cow (3) excreted an isolate, which was untypable. The longest observed persistence period was 45 days (cow 1). Among the 299 cows presenting a *E. coli* clinical mastitis, 342 sampling periods were associated with *E. coli* shedding. Thus, a total of 12.2 % (42/342) of all intra-mammary infections were associated with *E. coli* that had the ability to persist in the mammary gland. Two cows of the Group 2 were infected by isolates presenting identical PFGE patterns, suggesting spread between quarters or contagion (Table 4). This represents 1.2% (4/342) of all *E. coli* cases during the study period. On both occasions, the same genotype was found in the same cow and at the same time. In cow 5 (Group 1), *E. coli* in quarters 2 and 4 were identical and persisted.

Discussion

Mammary infections caused by *E. coli* are generally considered to be of short duration and non contagious. Transient infections usually have a duration of 10 days or less (White et al., 2010). Also, *E. coli* mammary infection usually ends with death of either the host or the pathogen (Zadoks et al., 2011). However, in some cases persistent

infection and transmission of *E. coli* between quarters occurs (Bradley and Green, 2001). In the current study, the proportion of *E. coli* isolated in recurrent quarters due to the same genotype was 12.2%. This proportion is slightly higher or very similar to previous reports from outside Canada. In a study including 7 dairy herds in the Netherlands, a proportion of 9.1% was reported (Lam et al., 1996). Döpfer and colleagues described the same phenomenon where a proportion of 4.77% was detected in a cohort of 300 Dutch dairy farms (Döpfer et al., 1999). However, the proportion of cases that arose in persistently infected quarters is lower than previous report by Bradley and Green. They monitored 6 dairy herds in England and indicated that a total of 20.5% of all *E. coli* mastitis cases in their study took place in persistently infected quarters, as measured by recurrence of clinical mastitis (Bradley and Green, 2001). Bradley and Green presented their results as a shift in the behaviour of mastitis causing *E. coli*, due to a change in susceptibility of the bovine population to this type of infection or due to a change in the behaviour of *E. coli* (Bradley and Green, 2001). The lower proportion in the current Canadian study could be associated with a geographical difference, due to a different “evolution” of the *E. coli* strains or due to a difference in possible cow factors involved in the initial removal of infection. Also, some of the producers did not respect the sampling schedule and some of the samplings were omitted after the detection of the clinical mastitis. This might have a slight impact on the final proportion of persistence.

Recurrent cases of *E. coli* mastitis could previously be reported without the use of DNA fingerprinting (Hogan et al., 1989). In fact, these cases were designated as

“potential repeated cases”. Unfortunately, this could be misleading. In this study, if only antimicrobial resistance profiles were used for interpretation, we would have had a proportion of persistent quarter infection of 13.5% (46 out of 342). This is close to our final proportion of 12.2%, but DNA fingerprinting allowed us to be more accurate as we found that two additional cows were not persistently infected. For cows in Group 2, DNA fingerprinting allowed us to prove that 8 of these cows were not infected with the same *E. coli* genotype in different quarters. On the other hand, all of the cows with the same genotype had the same antimicrobial resistance phenotype. Recurrent cases of *E. coli* excretion or mastitis can occur either as a result of reinfection from the environment or as a result of actual persistence of a single strain of *E. coli* within the mammary gland (Bradley and Green, 2001). *E. coli* isolates present in the cow’s environment are considered to be very heterogeneous allowing DNA fingerprinting to differentiate between repeated episodes of infection or persistence. Repeated episodes are more likely to be due to chance or to increased cow level susceptibility to infection (Zadoks et al., 2011). All of the studies mentioned above, including this one, utilized DNA fingerprinting, such as enterobacterial repetitive consensus typing or PFGE, to differentiate recurrent from persistent infection. In this study, antimicrobial resistance patterns were used as a preliminary potential indicator of persistent intra-mammary infection (IMI) or contagion. This was not a good indicator because, out of the 16 times the PFGE pattern was different, 10 antimicrobial resistance patterns were identical.

The total duration of persistence in this study ranged from 6 to 45 days. Cow 4 (group

1) was resampled too early (6 days after clinical mastitis). Since a transient infection can be present for 10 days or less, the persistence in this case can be questionable, but this cow was still included in the persistently infected group. Excluding this cow, persistence range from 13 to 45 days. A previous study reported a range of 12 to 109 days between clinical episodes caused by the same *E. coli* genotype (Bradley and Green, 2001). Within the CBMQRN research projects, sampling of milk was part of a pre-determined protocol requiring follow up samples after the detection of clinical mastitis. This means that cows repeatedly excreting *E. coli* in the 5 weeks following initial mastitis could be easily detectable. However, after the initial sampling period, dairy producers might have been less motivated in sampling cows with further recurrent cases of mastitis, already aware of the compromised udder health. This bias could explain, in part, the fact that no persistence was detected after 45 days. An interesting aspect of the sampling protocol used by the CBMQRN was the possibility of detecting *E. coli* intermittent excretion. Previous studies were more focused on sampling cows with repeated clinical mastitis or only resampled affected cows once.

The isolation of the same genotype of *E. coli* associated with mastitis episodes from different quarters within the same cow was found, but rarely, accounting for 1.2% of all *E. coli* cases. This is lower than proportions previously reported from studies done outside of Canada; 8.5% (Bradley and Green, 2001) and 2.98% (Döpfer et al., 1999). As mentioned previously, reinfection with the same strain of *E. coli* from the environment is very unlikely, due to the great heterogeneity of this microorganism. In our case, this could be explained by a spread between quarters followed by expression

of clinical signs of mastitis at the same time. As for isolates from same quarters (group 1), PFGE was the final method for strain comparison.

Concerning antimicrobial resistance for the isolates of the present investigation, it was found to be highest for the following antimicrobials: tetracycline; 23.8%, ampicillin; 20% and cephalothin; 13.8%. Resistance to tetracycline and ampicillin were similar, but slightly higher than recently reported in a Finnish study (Suojala et al., 2011). The latter described 15.7% resistance for tetracycline and 18.6% resistance for ampicillin. Also, resistance to tetracycline (24.8%) and first generation cephalosporins (over 15%) were similar to results reported lately in New York, USA (Srinivasan et al., 2007). However, Srinivasan and colleagues found a very high resistance to ampicillin (98.4%). Although enrofloxacin is not licensed for use in lactating dairy cattle in Canada, it could still be used in an off-label matter. As fluoroquinolons are antimicrobials of importance in treating human infections we wanted to monitor presence of possible resistance in the selected isolates. None of the tested isolates showed resistance to enrofloxacin.

Escherichia coli involved in IMI is generally considered as an opportunistic environmental pathogen. Data collected previously suggested a degree of adaptation to the bovine mammary gland (Bradley and Green, 2001). It was mentioned that this adaptation could be due to several reasons such as the increased ability to sequester iron, the survival within the mammary neutrophils or the adherence to and invasion of mammary tissues (Bradley, 2002). A previous study demonstrated that strains from

persistent IMI causing recurrent cases of clinical mastitis invade faster and in greater numbers than the strains from single cases (Döpfer et al., 2000). Lately, a study conducted on the intracellular fate of *E. coli* in mammary epithelial cells suggested that *E. coli* associated with chronic mastitis exploit endocytosis pathways to avoid bactericidal mechanisms thus allowing intracellular survival (Almeida et al., 2011). To date, no specific virulence factors have been identified to differentiate persistent and transient *E. coli* (Suojala et al., 2011; Zadoks et al., 2011). We know that many different subsets of *E. coli* have been demonstrated, such as enterotoxigenic *E. coli* (ETEC); enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and shiga toxin producing *E. coli* (STEC). It is therefore reasonable to expect that another subset more adapted to the mammary environment exists, but is yet unidentified (Bradley, 2002). Also, in this bovine mastitis subset, reasons to explain why some strains can persist are left to explore. Differences in clinical outcomes have already been demonstrated. For instance, recurrent cases of mastitis caused by the same genotype tend to be less clinically severe than transient cases of mastitis (Bradley and Green, 2001). Differences in mastitis strain virotypes are yet to be investigated.

References

Almeida, R.A., Dogan, B., Klaessing, S., Schukken, Y.H., Oliver, S.P., 2011. Intracellular fate of strains of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with acute or chronic mastitis. *Vet. Res. Commun.* 35, 89–101.

Blum, S., Heller, E.D., Krifucks, O., Sela, S., Hammer-Muntz, O., Leitner, G., 2008. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. *Vet. Microbiol.* 132, 135–148.

Bradley, A., 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164, 116–128.

Bradley, A.J., Green, M.J., 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1845–1849.

CDC, 2004. Center for Disease Control and Prevention PulseNet Protocols.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Third Edition. CLSI document M31-A3 (ISBN 1-56238-659-X). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Dogan, B., Klaessig, S., Rishniw, M., Almeida, R.A., Oliver, S.P., Simpson, K., Schukken, Y.H., 2006. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 116, 270–282.

Döpfer, D., Almeida, R.A., Lam, T.J., Nederbragt, H., Oliver, S.P., Gaastra, W., 2000. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Vet. Microbiol.* 74, 331–343.

Döpfer, D., Barkema, H.W., Lam, T.J., Schukken, Y.H., Gaastra, W., 1999. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 80–85.

Fairbrother J.M. and Nadeau E., 2010. Colibacillosis. In *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*. Lefèvre PC, Blancou J, Chermette R, Uilenberg G, eds. Lavoisier. Vol. 2, Chapter 74: 917-945.

Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., Hogeveen, H., 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q* 29, 18–31.

Hogan, J.S., Smith, K.L., Hoblet, K.H., Schoenberger, P.S., Todhunter, D.A., Hueston, W.D., Pritchard, D.E., Bowman, G.L., Heider, L.E., Brockett, B.L., 1989. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J. Dairy Sci.* 72, 1547–1556.

Koort, J.M.K., Lukinmaa, S., Rantala, M., Unkila, E., Siitonen, A., 2002. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3497–3498.

Lam, T.J., Lipman, L.J., Schukken, Y.H., Gaastra, W., Brand, A., 1996. Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *Am. J. Vet. Res.* 57, 39–42.

Lehtolainen, T., Shwimmer, A., Shpigel, N.Y., Honkanen-Buzalski, T., Pyörälä, S., 2003. In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. *J. Dairy Sci.* 86, 3927–3932.

National Cohort of Dairy Farms (NCDF). 2009 ; National Cohort of Dairy Farms reference manual. Accessed November 24th, 2011.

Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Kelton, D.F., Scholl, D.T., 2008. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 91, 1366–1377.

Reyher, K.K., Dufour, S., Barkema, H.W., Des Côteaux, L., Devries, T.J., Dohoo, I.R., Keefe, G.P., Roy, J.-P., Scholl, D.T., 2011. The National Cohort of Dairy Farms--a data collection platform for mastitis research in Canada. *J. Dairy Sci.* 94, 1616–1626.

Sears, P.M., McCarthy, K.K., 2003. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19, 93–108, vi.

Shpigel, N.Y., Elazar, S., Rosenshine, I., 2008. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 60–65.

Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Lewis, M.J., Nguyen, L.T., Headrick, S.I., Schukken, Y.H., Oliver, S.P., 2007. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Vet. Microbiol.* 124, 319–328.

Suojala, L., Pohjanvirta, T., Simojoki, H., Myllyniemi, A.-L., Pitkälä, A., Pelkonen, S., Pyörälä, S., 2011. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 147, 383–388.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.

White, L.J., Schukken, Y.H., Dogan, B., Green, L., Döpfer, D., Chappell, M.J., Medley, G.F., 2010. Modelling the dynamics of intramammary *E. coli* infections in dairy cows: understanding mechanisms that distinguish transient from persistent infections. *Vet. Res.* 41, 13.

Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, S., Katholm, J., Schukken, Y.H., 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16, 357–372.

Tables

Table 1. Tested antimicrobial breakpoints for *E. coli* mastitis isolates

Antimicrobial	Breakpoints ($\mu\text{g/mL}$)			Interpretation
	S	I	R	
Ampicillin	≤ 8	16	≥ 32	Human data
Cephalothin	≤ 8	16	≥ 32	Human data
Ceftiofur	≤ 2	4	≥ 8	Cattle mastitis
Enrofloxacin	≤ 0.25	0.5-1	≥ 2	Cattle respiratory disease/Chicken and turkey <i>E. coli</i>
Spectinomycin	≤ 32	64	≥ 128	Cattle respiratory disease
Tetracycline	≤ 4	8	≥ 16	Human data
TMP-Sulfa ¹	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$	Human data

¹Trimethoprim-sulfamethoxazole combination.

Table 2. Cows shedding *E. coli* from the same quarter and from different quarters

Cow identification	Quarter identification	Sampling period	Sampling date	Cow identification	Quarter identification	Sampling period	Sampling date
Same quarter – Group 1				Different quarters – Group 2			
1	3	M1	2007.08.16	23	3	M1	2008.05.14
		M2	2007.09.14		4	M1	2008.07.06
		M3	2007.09.30	24	4	M1	2007.05.03
2	4	M1	2007.08.09		2	M1	2007.11.03
		M2	2007.08.27	25	1	M1	2007.07.21
3	3	M1	2008.04.01		3	M1	2007.07.22
		M2	2008.04.30	26	2	M1	2008.08.17
4	1	M1	2008.08.16		1	M1	2008.08.17
		M2	2008.08.22	27	2	M1	2007.09.02
5	2	M1	2007.03.20		3	M1	2007.08.17
		M1	2007.03.20	4	M1	2007.05.06	
		M2	2007.04.18	28	2	M1	2007.08.13
M2	2007.04.18	29	3		M3	2007.12.13	
6	2		M1	2007.09.26	2	M1	2008.06.21
		M1	2007.11.02	30	1	M1	2007.07.05
7	2	M1	2008.06.09		2	M1	2007.07.05
		M1	2008.07.02	31	1	M1	2008.07.22
		M2	2008.07.15		3	M1	2008.07.20
8	2	M1	2008.05.14	32	3	M1	2008.01.24
		M3	2008.06.19		2	M1	2008.04.15
9	4	M1	2007.02.26	33	4	M1	2008.03.17
		M2	2007.03.13		2	M1	2008.03.17
10	3	M1	2007.09.22	34	1	M2	2007.07.19
		M3	2007.10.20		3	M1	2008.07.30
11	3	M1	2008.06.23	35	2	M1	2008.07.22
		M2	2008.07.09		4	M1	2008.09.08
		M3	2008.07.30	36	3	M1	2008.01.19
12	3	M1	2007.06.29		1	M1	2008.11.06
		M1	2008.06.18	37	1	M1	2007.05.06
13	2	M1	2008.08.16		2	M1	2007.10.24
		M3	2008.09.17				
14	1	M1	2008.06.05				
		M3	2008.07.07				
15	4	M1	2008.03.20				
		M2	2008.04.10				
16	1	M2	2007.10.15				
		M3	2007.10.31				
17	2	M1	2007.04.03				
		M2	2007.04.24				
		M3	2007.05.07				
18	4	M1	2008.05.16				
		M2	2008.06.04				
19	2	M1	2008.03.03				
		M3	2008.04.04				
20	4	M1	2007.07.30				
		M2	2007.08.14				
21	4	M1	2007.04.05				
		M2	2007.04.18				
22	1	M1	2008.02.02				
		M1	2007.07.08				

Table 3. Antimicrobial resistance and PFGE patterns for cows in Group 1

Cow Identification	Days between sampling	Antimicrobial resistance pattern	PFGE pattern	Interpretation
1	29 and 16	Identical	Indistinguishable	Persistence
2	18	Identical	Indistinguishable	Persistence
3	29	Different	One isolate is untypable	Inconclusive
4	6	Identical	Indistinguishable	Persistence
5	29	Identical	Indistinguishable	Persistence
6	37	Identical	Different	No persistence
7	23 and 13	Identical	Indistinguishable	Persistence
8	36	Identical	Closely related	Persistence
9	15	Identical	Indistinguishable	Persistence
10	28	Identical	Indistinguishable	Persistence
11	16 and 21	Identical	Indistinguishable	Persistence
12	21	Different	Different	No persistence
13	32	Identical	Indistinguishable	Persistence
14	32	Identical	Indistinguishable	Persistence
15	21	Identical	Indistinguishable	Persistence
16	16	Identical	Indistinguishable	Persistence
17	21 and 13	Identical	Indistinguishable	Persistence
18	19	Identical	Indistinguishable	Persistence
19	35	Identical	Indistinguishable	Persistence
20	15	Identical	Indistinguishable	Persistence
21	13	Identical	Indistinguishable	Persistence
22	209	Identical	Different	No persistence

Table 4. Antimicrobial resistance and PFGE patterns for cows in Group 2

Cow Identification	Days between sampling	Antimicrobial resistance pattern	PFGE pattern	Interpretation
23	53	Different	Different	No spread
24	147	Identical	Different	No spread
25	1	Identical	Different	No spread
26	0	Identical	Different	No spread
27	16	Identical	Different	No spread
28	99	Different	Different	No spread
29	191	Different	One isolate is untypable	Inconclusive
30	0	Different	Different	No spread
31	2	Different	Different	No spread
32	82	Identical	Different	No spread
33	0	Identical	Indistinguishable	Spread
34	30	Identical	Different	No spread
35	48	Identical	Different	No spread
36	292	Identical	Different	No spread
37	171	Different	Different	No spread

4. Article 2

Characterization of bovine mammary pathogenic *Escherichia coli*: persistent strains are different

Julie-Hélène Fairbrother^a, David Francoz^b, Serge Messier^{a,c}, Simon Dufour^{a,c}, John M. Fairbrother^a

^aDépartement de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

^bDépartement de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

^cCanadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network, C. P. 5000 Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada

ACKNOWLEDGEMENTS

The bacterial isolates have been furnished by the Canadian Bovine Mastitis Research Network with support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Alberta Milk, Dairy Farmers of New Brunswick, Nova Scotia, Ontario and Prince Edward Island, Novalait inc., Dairy Farmers of Canada, Canadian Dairy Network, AAFC, PHAC, Technology PEI Inc., Université de Montréal and University of Prince Edward Island.

ABSTRACT

Escherichia coli is an environmental mastitis pathogens. However, sometimes, this pathogen can persist in the mammary gland, indicating that some *E. coli* that cause mastitis have attributes resembling those of contagious mastitis pathogens. It is thus reasonable to assume that transient and persistent *E. coli* strains exist and that these harbour specific virulence genes that allow them to interact in a different way with the host. The objective of the current study was to compare antimicrobial resistance and virulence genes found in *E. coli* isolated from persistent intramammary infections and in *E. coli* isolated from transient infections in a cohort of 83 Canadian dairy herds monitored over a 2-year period. Antimicrobial susceptibility was determined by the broth microdilution and a total of 27 virulence genes, reported in the literature to be associated with *E. coli* extra-intestinal infections, were selected and detected by colony hybridization. Proportion of resistance in persistent *E. coli* ranged from 0.0% (enrofloxacin) to 27.8% (ampicillin and tetracycline). Proportion of resistance in control or transient *E. coli* ranged from 0.0% (enrofloxacin) to 16.8% (tetracycline). For each additional antimicrobial resistance, odds of being classified as a persistent isolate increased by a factor of 1.6 (95% CI: 1.1, 2.4). Resistance to ampicillin (OR: 9.8, $P<0.01$) and to cephalothin (OR: 7.6, $P=0.02$) were both associated with higher odds of being a persistent *E. coli*. Isolates harboring gene *iroN* had 5.4 times higher odds (95% CI: 1.2, 24.0) of being classified as persistent isolates. Similarly, isolates testing positive to virulence gene *sitA* had 8.6 times higher odds (95% CI: 2.8, 27.1) of being classified as persistent isolates. In conclusion, this study confirmed that persistent intramammary *E. coli* were different from transient *E. coli*. Findings

concerning iron-acquisition have shed new light on the mechanisms of long-term intramammary survival.

Key words: *Escherichia coli*, bovine, mastitis, persistence, virulence, antimicrobial resistance

Introduction

Mastitis is considered one of the most frequent and costly production diseases for the dairy industry worldwide (Halasa et al., 2007). Mastitis pathogens are classified in two distinct groups; contagious or environmental. Contagious pathogens are adapted to survive within the mammary gland and can be transmitted from cow to cow or from quarter to quarter mainly during milking. On the other hand, environmental pathogens are opportunistic invaders and are rapidly eliminated (Bradley, 2002). *Escherichia coli* is an opportunistic environmental pathogen. However, in some cases, persistence in the mammary gland occurs, indicating that some *E. coli* that cause mastitis have similar attributes to those of contagious mastitis pathogens (Fairbrother and Nadeau, 2010). A study conducted in the United Kingdom demonstrated that 20.5% of all clinical mastitis cases associated with *E. coli* arose in persistently infected quarters (Bradley and Green, 2001). Also, in a recent study (Fairbrother, J.H., University of Montreal, St-Hyacinthe, Canada, unpublished data) conducted on Canadian commercial dairy farms, 12.2% of all *E. coli* intramammary infections (IMI) appeared to be persistent. Thus, it is reasonable to assume that transient and persistent *E. coli* strains exist, harbouring specific virulence genes that allow them to interact in different ways with the host. To date, however, no specific virulence factors permitting the differentiation of isolates

causing or not mastitis have been identified (Zadoks et al., 2011). Furthermore, despite differences in phenotypic traits *in vitro*, no specific genetic differences permitted the differentiation of transient and persistent *E. coli* IMI (Zadoks et al., 2011). Finally, to date, the severity of clinical signs and outcome of the disease have been largely attributed to the host-characteristics (Burvenich et al., 2003). The objective of the current study was to compare antimicrobial resistance and virulence gene profiles found in *E. coli* isolated from persistent IMI and in *E. coli* isolated from transient IMI.

Materials and Methods

Sample Collection

Escherichia coli isolates studied were part of the Mastitis Pathogen Culture Collection (MPCC) maintained by the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network (CBMQRN). A cohort of dairy farms, the National Cohort of Dairy Farms (NCDF), was set up by the CBMQRN and was intended to represent the Canadian dairy farm population (see Reyher et al., 2011 for details). Herds were conveniently selected on the basis of location (Alberta, Ontario, Québec and Atlantic), bulk tank somatic cell count (SCC), housing type, and proportion of Holstein-Friesian cows in the herd. Herds were followed over a two-year period (from January, 2007 to December, 2008), numerous udder health parameters being recorded and milk samples series collected. During this time, an average of 83 farms participated. Amongst the milk-sampling series, one focused on clinical mastitis cases. Dairy producers sampled the affected quarter of all cows identified as having clinical mastitis. Samples were taken on the day of the mastitis diagnosis (M1), and at 2 to 3 weeks (M2) and 4 to 5

weeks (M3) after onset of clinical mastitis. Each sample was associated with a mastitis clinical score: grade 1, abnormal milk only; grade 2, abnormal milk and swollen quarter; grade 3, abnormal milk, swollen quarter and sick cow (Sears and McCarthy, 2003; Reyher et al., 2011). Samples were frozen at the farm and sent monthly to 1 of the 4 laboratories participating in the Mastitis Laboratory Network. Clinical mastitis samples were thawed and cultured as soon as they arrived at the laboratory.

Bacteriological culture

Bacteriological culture was done according to the established procedures (National Cohort of Dairy Farms, 2009). Briefly, 10 μ L of milk was inoculated on a bi-plate; half Columbia agar with 5% sheep blood and half MacConkey agar and plates were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ in a normal atmosphere. A first examination of the plates was done after 18-20 hours of incubation. Plates were reincubated for an additional 24 hours. Gram-negative bacteria that were lactose and indole positive, oxidase negative, citrate negative and variable motility were identified as *E. coli*. According to the guidelines of the CBMQRN, these isolates were frozen in trypticase soy broth with 15 % glycerol when they grew as a pure culture and when there was more than 1 colony/plate.

Selection of isolates

Isolates were selected according to previous DNA fingerprinting results using pulse-field gel electrophoresis (Fairbrother, J.H., University of Montreal, St-Hyacinthe, Canada, unpublished data). During the two-year sampling period, 18 quarters from 18

cows each excreting the same *E. coli* genotype for a certain period of time (mean of 25.94 days with a 10.74 standard deviation) were identified. Isolates from these quarters were defined as persistent isolates and selected for the current study. In addition, 79 isolates from quarters presenting a transient *E. coli* IMI were chosen as controls. For inclusion in the latter group, quarters were required to have a complete clinical mastitis case series (M1, M2 and M3 samples), with an *E. coli* isolated from the M1 sample and no subsequent *E. coli* isolated during the two-year sampling period.

Antimicrobial susceptibility determination

Antimicrobial susceptibility of the *E. coli* isolates was determined by the broth microdilution method and interpreted according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Table 1 illustrates breakpoints used and general comments concerning the antimicrobials. For each antimicrobial, four dilutions, including specific breakpoints, were tested to determine presence of resistance. Cation adjusted Mueller-Hinton broth was used as the medium for susceptibility testing. The final concentration of bacteria was approximately 5×10^5 CFU/mL. Trays were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 16 to 20 hours in a normal atmosphere incubator. *E. coli* ATCC 25922 was used as a control standard.

Virulence genes

A presence of a total of 27 virulence genes (Table 2), reported in the literature to be associated with *E. coli* extra-intestinal infections, was examined in isolates as follows:

Colony hybridization

The DNA amplicons were labeled with [α - 32 P]CTP by using a DNA labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Colony hybridization was performed as described previously (Harel et al., 1991). Briefly, isolates were spot inoculated on Luria-Bertani agar and incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 15-18 hours. Colonies were then transferred to Whatman 541 filter papers by direct contact for two hours. The Whatman filter papers were then peeled off and placed, colony side up, on Whatman 3MM filter papers soaked with each of the following solutions: 1) 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) for 3 minutes; 2) 0.5 M NaOH-1.5 M NaCl for 15 minutes, and; 3) 0.5 M Tris hydrochlorate (pH 7.5) twice for 5 minutes each time. The filters were then air dried at room temperature. For hybridization, filters were at first placed in a pre-hybridization solution, which consisted of 3 X SSC (1X SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate), 10X Denhardt solution (1X Denhardt solution is 0.02% Ficoll [Sigma-Aldrich] and 0.02% bovine serum albumin) 1% heat-denatured salmon sperm DNA, and 0.01% SDS for one hour at 65°C . Then, the pre-hybridizing solution was removed and replaced with fresh solution containing about 10^6 cpm of the appropriate heat-denatured, ^{32}P labeled DNA probe per filter. Hybridization was carried out under agitation at 65°C overnight. The filters were then washed in 3 X SSC with 0.1% SDS three times for 30 min each time at 65°C and air-dried. The filters were finally exposed to X-ray film for three hours at -80°C and developed. Strains used as positive controls are listed in table 2. ECL3463 was used as the negative control.

Statistical methods

Initially, descriptive statistics were computed and analyzed. Unique antimicrobial

resistance and virulence genes profiles were then constituted and the number of persistent and control *E. coli* isolates per profile computed. Then, unconditional associations were modeled with IMI persistence as the outcome and resistance to antibiotic or presence of specific virulence genes as explanatory variables using a multilevel logistic regression accounting for clustering of observation per farm using MIWin version 2.27. The same model was used to evaluate associations between IMI persistence and clinical mastitis severity, days in milk, and parity. The impact of the number of virulence genes possessed by a given isolate and of the number of antimicrobials to which resistance was observed was also tested in the multilevel model.

The simpson diversity index (Ricotta, 2005) was then computed for each population using Past version 2.17 to compare genetic diversity (based on virulence gene profiles) between persistent *E. coli* and control isolates. The simpson index is commonly used to measure homogeneity of a community and ranges from 0 (one taxon completely dominate the community) to 1 (all taxa are equally present). Bootstrapping was used to generate 95% confidence intervals (CI) for the Simpson diversity index. To preserve independence of the data, only one persistent and one control *E. coli* isolate per farm were used for these analyses. To achieve this, one isolate was randomly selected for inclusion (using SAS proc survey procedure) whenever there were two or more isolates for a given population of isolates on a given farm.

Approximate power calculations were conducted using PASS (Hintze, 2001). Sample size for the current study was bounded by the very limited number of persistent *E. coli* strains (n=18) that could be retrieved from the 2 year cohort. Consequently,

retrospective power calculations were conducted to identify power to detect statistical differences for different combination of strength of association and proportion of isolates presenting a specific characteristic (e.g. a virulence gene) given the number of isolates available and using an alpha of 0.05.

Results

Resistance to antimicrobials

Proportion of resistance in persistent *E.coli* isolates ranged from 0.0% (enrofloxacin) to 27.8% (ampicillin and tetracycline); (Table 1). Proportion of resistance in control *E.coli* isolates ranged from 0.0% (enrofloxacin) to 16.8% (tetracycline). Among the persistent strains 38.9% showed resistance to at least one antimicrobial, whereas multiresistance was only observed in 17.8% of the control isolates. Resistance to enrofloxacin, however, was never observed. Ten unique antimicrobial profiles were observed. The antimicrobial resistance profile was not significantly associated with persistence of IMI. The number of antimicrobials to which a strain was resistant, on the other hand, was significantly associated with persistence of the isolate. For each additional antimicrobial resistance, odds of being classified as a persistent isolate increased by a factor of 1.6 (95% CI: 1.1, 2.4). Similarly, demonstrating resistance to at least one antimicrobial was associated with 3.0 (95% CI: 1.0, 9.2) times higher odds of being classified as a persistent isolate. Resistance to ampicillin and to cephalothin were both associated with higher odds of being a persistent *E. coli* isolate (Table 1).

Presence of virulence genes

Among the control isolates studied, 74.7% harbored at least one of the virulence genes under investigation, whereas 83.4% of the persistent isolates tested positive to at least one of the virulence genes (Table 3). The *sfaA*, *stx1*, and *stx2* genes were never observed. Furthermore, *f17*, *cdtB-1*, *kpsM-II*, *ibeA*, *clpG-31a*, *neuC*, and *usp* were observed solely in control isolates. Associations between presence of the gene and persistence of the IMI could, therefore, not be evaluated for these ten genes. On examination of virulence gene combinations, 41 unique virulence gene profiles could be constituted. No virulence gene profile was associated with persistence of the IMI. In general, odds of IMI persistence increased with number of virulence genes harbored (OR: 1.1; 95% CI: 0.94, 1.3), but this association was not statistically significant. Isolates harboring *iroN* had 5.4 times higher odds (95% CI: 1.2, 24.0) of being classified as persistent isolates. Similarly, isolates positive for *sitA* had 8.6 times higher odds (95% CI: 2.8, 27.1) of being classified as persistent isolates. When virulence gene *iroN* was detected, *sitA* was always present.

Additional observations

Days in milk and parity were not significantly associated with persistence of the IMI. Mastitis clinical score, however, was significantly associated with IMI persistence. Mastitis cases with a severity score of 2, for instance, had 18.6 times higher odds (95% CI: 2.2, 155.2) of being non-persistent compared to cases with severity score of 1. Mastitis cases with a severity score of 3 had 2.1 times higher odds (95% CI: 0.6, 8.0) of being non-persistent compared with cases with severity of 1.

Relatively high Simpson's index of genetic diversity were observed in both persistent (Simpson's index: 0.90; 95% CI: 0.75, 0.92) and control (Simpson's index: 0.90; 95% CI: 0.82, 0.93) *E. coli* isolate populations suggesting a wide range of different *E. coli* strains. Genetic diversity was not statistically different among the two *E. coli* populations studied.

Power of the study

The current study had 83% power to detect an association corresponding to an odds ratio of 3.5 (e.g. 3.5 times higher odds of IMI persistence when a specific gene was present) for relatively common characteristics or genes (i.e. observed in 50% of isolates). For characteristics or genes observed in only 25% of isolates, the current study had 82% power to detect association corresponding to an odds ratio of 4.0. Finally, for relatively uncommon characteristics or genes (i.e. observed in 10% of isolates), the current study had 80% power to detect association corresponding to a odds ratio of 6.5. For these calculations, clustering of observations by herd was not taken into account. Power reported is, therefore, possibly slightly overestimated.

Discussion

Antimicrobial resistance results generated in different studies cannot be easily compared. The comparison of data requires common methodology and preferentially a presentation of the data as MIC distribution (Schwarz et al., 2010). The proportion of resistance in IMI *E. coli* isolates studied here was found to be highest for tetracycline

and ampicillin. Acquired resistance to tetracyclines is widespread for many bacteria, considerably reducing the usefulness of this antimicrobial (Giguère, 2006). Also, it has been reported that many *E. coli* causing bovine mastitis are resistant to aminobenzyl penicillins (Prescott, 2006a). We also found that frequency of resistance to cephalothin was among the highest in our study. This is not surprising as this first-generation cephalosporin is susceptible to the same plasmid-mediated beta-lactamase as ampicillin (Prescott, 2006b). On the other hand, we did not detect any resistance to enrofloxacin. Although the use of this drug is indicated for the treatment and control of bovine respiratory disease in beef and non-lactating cattle in Canada, extra-label drug use is not recommended but not legally prohibited (Walker and Dowlin, 2006). Nevertheless, in view of the importance in human medicine of this antimicrobial, we felt it of interest to investigate resistance. Interestingly, it was possible to differentiate our persistent and control isolates on the basis of antimicrobial resistance, the former showing a higher proportion of resistance to at least one antimicrobial and being resistant to a higher number of antimicrobials. However, no particular antimicrobial resistant pattern was associated with the persistence of *E. coli*, although we demonstrated that strains resistant to ampicillin or cephalothin had higher odds of persisting in the mammary gland.

Frequency of resistance to tetracycline and ampicillin in persistent isolates was also greater than that reported in a Canadian national study, where strains from the CBMQRN were also studied but at a larger scale (Saini et al., 2012). For the latter, MIC values were determined for 394 isolates from 394 quarters of 353 cows on 76 dairy farms. Resistance to tetracyclines was the most common followed by sulfonamides

and ampicillin. Overall frequency of resistance to tetracyclines was of 14.8%, being lower than that found in our persistent strains (27.8%), but very similar to that in the control strains (16.5%). In addition, fewer *E. coli* isolates were resistant to ampicillin (8.2%) in the national study, being lower than that found in our persistent group (27.8%), but slightly higher than that of our control group (3.8%).

Many unique virulence gene profiles (n=41) were detected both in persistent and control isolates although none of these profiles were associated with the ability to persist. This shows that *E. coli* causing IMI have a high genotypic variability. This finding has previously been reported, with different virulence factor panels being evaluated (Kaipainen et al., 2002; Wenz et al., 2006; Ghanbarpour and Oswald, 2010; Fernandes et al., 2011). However, it has also been shown that the genotypic diversity of mastitis strains does not reflect the diversity found in the environmental *E. coli* population (Blum and Leitner, 2013). This un-identical genotypic distribution suggests that some level of selection takes place. Despite many attempts to identify specific virulence genes associated with IMI *E. coli*, these isolates mostly lack known virulence genes (Kaipainen et al., 2002; Lethlainen et al., 2003; Wenz et al., 2006; Ghanbarpou and Oswald, 2009; Suojala et al., 2011; Blum and Leitner, 2013). Nonetheless, the knowledge that the *E. coli* isolates involved in bovine mastitis may form a subset different to environmental isolates (Blum et al., 2008; Blum and Leitner, 2013), is suggestive that certain genetic traits permit *E. coli* to adapt to the intra-mammary ecology.

Clear differences with regards to invasion and survival in mammary epithelial cells *in vitro* have been described to distinguish *E. coli* isolates from transient and persistent

infections (Almeida et al., 2011; Döpfer et al., 2000). Nevertheless, no clear genetic differences have been identified between *E. coli* IMI isolates causing persistent or acute infections (Zadoks et al., 2011). In the present study, a collection of *E. coli* isolates causing bovine mastitis was compared to a set of strains isolated from persistently infected cows. Proportions of detected virulence genes were generally low. Higher proportions were found amongst the iron acquisition genes (*fyuA*, *irp1*, *irp2* and *sitA*) and for the increased serum survival gene (*iss*). The highest proportion for persistent strains was for *sitA* (55.6%) and for *iss* (54.4%) for control strains. To our knowledge, no previous study has reported *sitA* as being an important virulence gene for bovine mastitis strains. This could be explained by the fact that *sitA* was only detected in 12.7% of the control strains, thus not usually considered important in acute mastitis isolates. On the other hand, *iss* has been reported and serum resistance is the only trait known to be as a common finding in *E. coli* mastitis strains (Blum and Leitner, 2013). The *iss* gene was identified for the first time in a human septicemic *E. coli* (Johnson et al., 2008). Over the past years, efforts to identify virulence genes of importance in ExPEC strains, as compared to other *E. coli*, have been unrewarding. However, *iss* has stood out and was identified as being significantly more associated with avian pathogenic *E. coli* (APEC) than with fecal isolates from healthy birds (Pfaff-McDonough et al., 2000). Also, it has been reported that *iss* was detected in 75 to 91% ExPEC isolates and in 49 to 57% fecal isolates (Johnson et al., 2008). To date, serum resistance is the only virulence factor that has repeatedly been reported in *E. coli* mastitis isolates (Blum and Leitner, 2013). Serum resistance can be reported in many ways. For instance, when using molecular methods, the *traT* or *iss* genes can be

detected. Only in the past years, *traT* was detected in 37% of Finnish isolates and in 41% of Israeli isolates (Kaipainen et al., 2002). Later, *iss* was detected in 16.7% of Finnish isolates (Suojala et al., 2011) and in 33% of Israeli isolates (Blum and Leitner, 2013). Once again, in the latter study, similar rates for the presence of *iss* were found in the mastitis and environmental isolates. In the present study, findings were similar for persistent (44.4%) and control isolates (54.5%). Several studies have demonstrated that most mastitis pathogens (gram-positive bacteria and *E. coli*) are serum-resistant, although other studies show that serum resistance is not a prerequisite for coliform bacteria to cause IMI (Rainard, 2003).

Interestingly, isolates possessing *iroN* and *sitA* had higher odds of being persistent. To our knowledge, this had never been reported previously. In Finland, it was reported that isolates positive for S and P fimbriae, CNF1 and CNF2 were significantly associated with persistent mastitis (Lehtolainen et al., 2003). This was not the case in our study. However, it is important to keep in mind that isolates in the Finland study were considered as persistent if the second sample, taken 3 to 4 weeks later, had growth of *E. coli*. However, no genotyping was done to prove the persistence ability of the isolates. Later, a second study was carried out on *E. coli* isolates originating from 65 dairy herds in Southern Finland, in which persistence of IMI was confirmed by PFGE. In the statistical model used, no virulence factor or antimicrobial resistance trait was associated with the persistence of *E. coli* IMI (Suojala et al., 2011).

iroN and *sitA* are both associated with iron acquisition. *iroN* codes for a novel catecholate siderophore. This virulence gene, in combination with other genes, was found to be significant in distinguishing between commensal, neonatal diarrhea and

post-weaning disease *E. coli* clones in pigs (Chapman et al., 2006). Also, along with *sitA*, a putative iron transport gene, and other genes involved in iron metabolism, *iroN* is typically found in isolates of the APEC pathotype (Rodriguez-Siek et al., 2005). This may be an indicator of the importance of iron in the pathogenesis of persistent *E. coli* IMI. However, it is important to consider that the present study only reports the presence of these genes and does not demonstrate that they are functional. *E. coli* strains that possess the ability to persist in the mammary gland require a means to express this particular trait, such as adherence or the ability to survive intracellularly (Bradly and Green, 2001). It has already proven experimentally that serum resistance permits strains to survive a prolonged time period in the mammary gland. The retention within the gland resulted in bacterial survival within neutrophils and reappearance of clinical signs of mastitis with time (Hill et al., 1979).

The persistent cases of IMI tended to be milder than control cases. This has been previously reported and could favour chronicity, causing a less dramatic response by the host (Bradley and Green, 2001).

Given the number of persistent *E. coli* isolates that could be retrieved from the 2 year cohort, the current study had limited power to detect statistically significant association between presence of a gene and IMI persistence. For this reason, the authors can hardly conclude, based on 95% CI or *P*-value solely, on absence of association for genes showing relatively weak association with IMI persistence. For instance, numerous genes showed association corresponding to odds ratio between 1.0 and 1.5 and the power of the study does not sanction conclusions on the statistical irrelevance of these genes. Nevertheless, one could still conclude that, if the observed association truly

exists, this association is nonetheless relatively weak and, therefore, the associated gene is not likely to be an essential component of IMI persistence. Furthermore, given the number of quarters followed (n=24,000/year for 2 years) and sampled (n=3,000 quarters sampled repeatedly) to obtain these 18 persistent IMI, it is quite unlikely that future larger, and more powerful, studies will be able to further elucidate the role of the virulence genes that were weakly associated with persistence.

In conclusion, this study confirmed that persistent IMI *E. coli* are different than the ones isolated from transient IMI. This information concerning iron-acquisition has shed new light on the mechanisms of long-term intra-mammary survival. However, although certain traits were identified to differentiate persistent and transient *E. coli* strains, suggesting that a certain level of selection takes place, genetic diversity was not different among the two populations studied. Further efforts, such as whole genome sequencing, are still needed to identify additional traits associated with a better bacterial adaptation to the mammary gland environment.

References

- Almeida, R.A., Dogan, B., Klaessing, S., Schukken, Y.H., Oliver, S.P., 2011. Intracellular fate of strains of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with acute or chronic mastitis. *Vet. Res. Commun.* 35, 89–101.
- Bauer, R.J., Zhang, L., Foxman, B., Siitonen, A., Jantunen, M.E., Saxen, H., Marrs, C.F., 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-usp, iha, and iroN (E. coli). *J. Infect. Dis.* 185, 1521–1524.
- Blum, S., Heller, E.D., Krifucks, O., Sela, S., Hammer-Muntz, O., Leitner, G., 2008. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. *Vet. Microbiol.* 132, 135–148.
- Blum, S.E., Leitner, G., 2013. Genotyping and virulence factors assessment of bovine mastitis *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 163, 305–312.
- Bradley, A., 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J* 164, 116–128.
- Bradley, A.J., Green, M.J., 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1845–1849.

Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L., 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34, 521–564.

Chapman, T.A., Wu, X.-Y., Barchia, I., Bettelheim, K.A., Driesen, S., Trott, D., Wilson, M., Chin, J.J.-C., 2006. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4782–4795.

Cid, D., Sanz, R., Marín, I., de Greve, H., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Amils, R., de la Fuente, R., 1999. Characterization of nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strains producing F17 fimbriae isolated from diarrheic lambs and goat kids. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1370–1375.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Third Edition. CLSI document M31-A3 (ISBN 1-56238-659-X). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Daigle, F., Harel, J., Fairbrother, J.M., Lebel, P., 1994. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 40, 286–291.

Döpfer, D., Almeida, R.A., Lam, T.J., Nederbragt, H., Oliver, S.P., Gaastra, W., 2000. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Vet. Microbiol.* 74, 331–343.

Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Curtiss, R., 3rd, 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect. Immun.* 68, 4145–4154.

Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kießling, S., Alt, K., Antão, E.-M., Laternus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Böhnke, U., Steinrück, H., Philipp, H.-C., Wieler, L.H., 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology* 297, 163–176.

Fairbrother J.M. and Nadeau E., 2010. Colibacillosis. In *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*. Lefèvre PC, Blancou J, Chermette R, Uilenberg G, eds. Lavoisier. Vol. 2, Chapter 74: 917-945.

Fernandes, J.B.C., Zanardo, L.G., Galvão, N.N., Carvalho, I.A., Nero, L.A., Moreira, M.A.S., 2011. *Escherichia coli* from clinical mastitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 1146 –1152.

Ghanbarpour, R., Oswald, E., 2010. Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. Res. Vet. Sci. 88, 6–10.

S., 2006. Tetracyclines and Glycylcyclines, in: Antimicrobial therapy in veterinary medicine, S. Giguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Baggot, R.D. Walker and P.M. Dowling, ed. Iowa State University Press, Ames: Blackwell, 231-240.

Girardeau, J.P., Bertin, Y., Martin, C., Der Vartanian, M., Boeuf, C., 1991. Sequence analysis of the *clpG* gene, which codes for surface antigen CS31A subunit: evidence of an evolutionary relationship between CS31A, K88, and F41 subunit genes. J. Bacteriol. 173, 7673–7683.

Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., Hogeveen, H., 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. Vet Q 29, 18–31.

Harel, J., Lapointe, H., Fallara, A., Lortie, L.A., Bigras-Poulin, M., Larivière, S., Fairbrother, J.M., 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. J. Clin. Microbiol. 29, 745–752.

Hilali, F., Ruimy, R., Saulnier, P., Barnabé, C., Lebouguéneq, C., Tibayrenc, M., Andremont, A., 2000. Prevalence of virulence genes and clonality in *Escherichia coli* strains that cause bacteremia in cancer patients. *Infect. Immun.* 68, 3983–3989.

Hill, A.W., Shears, A.L., Hibbitt, K.G., 1979. The survival of serum resistant *Escherichia coli* in the bovine mammary gland following experimental infection. *Res. Vet. Sci.* 26, 32–37.

Hintze, J. 2001, Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA

Johnson, T.J., Wannemuehler, Y.M., Nolan, L.K., 2008. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2360–2369.

Kaipainen, T., Pohjanvirta, T., Shpigel, N.Y., Shwimmer, A., Pyörälä, S., Pelkonen, S., 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet. Microbiol* 85, 37–46.

Karch, H., Schubert, S., Zhang, D., Zhang, W., Schmidt, H., Olschläger, T., Hacker, J., 1999. A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect. Immun.* 67, 5994–6001.

Lehtolainen, T., Pohjanvirta, T., Pyörälä, S., Pelkonen, S., 2003. Association Between Virulence Factors and Clinical Course of *Escherichia coli* Mastitis. *Acta Vet Scand* 44, 203–205.

National Cohort of Dairy Farms (NCDF). 2009 ; National Cohort of Dairy Farms reference manual. Accessed November 24th, 2011. <http://www.mastitisnetwork.org>.

Oswald, E., Pohl, P., Jacquemin, E., Lintermans, P., Van Muylem, K., O'Brien, A.D., Mainil, J., 1994. Specific DNA probes to detect *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotising factor type 1 or type 2. *J. Med. Microbiol.* 40, 428–434.

Pfaff-McDonough, S.J., Horne, S.M., Giddings, C.W., Ebert, J.O., Doetkott, C., Smith, M.H., Nolan, L.K., 2000. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis.* 44, 23–33.

Prescott, J.F., 2006a. Beta-lactam Antibiotics: Penam Penicillins, in: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, S. Giguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Baggot, R.D. Walker and P.M. Dowling, ed. Iowa State University Press, Ames: Blackwell, 121-137.

Prescott, J.F. 2006b. Beta-lactam Antibiotics: Cephalosporins, in: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, S. Giguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Baggot,

R.D. Walker and P.M. Dowling, ed. Iowa State University Press, Ames: Blackwell, 139-157.

Rainard, P., 2003. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Vet. Res.* 34, 647–670.

Reyher, K.K., Dufour, S., Barkema, H.W., Des Côteaux, L., Devries, T.J., Dohoo, I.R., Keefe, G.P., Roy, J.-P., Scholl, D.T., 2011. The National Cohort of Dairy Farms--a data collection platform for mastitis research in Canada. *J. Dairy Sci.* 94, 1616–1626.

Ricotta, C., 2005. Through the jungle of biological diversity. *Acta. Biotheor.* 2005 53(1): 29-38

Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K., 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.* 36, 241–256.

Saini, V., McClure, J.T., Léger, D., Keefe, G.P., Scholl, D.T., Morck, D.W., Barkema, H.W., 2012. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 95, 4319–4332.

Sandhu, K.S., Clarke, R.C., Gyles, C.L., 1997. Hemolysin phenotypes and genotypes of eaeA-positive and eaeA-negative bovine verotoxigenic *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412, 295–302.

Sears, P.M., McCarthy, K.K., 2003. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19, 93–108, vi.

Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gaastra, W., 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet. Microbiol.* 141, 1–4.

Suojala, L., Pohjanvirta, T., Simojoki, H., Myllyniemi, A.-L., Pitkälä, A., Pelkonen, S., Pyörälä, S., 2011. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 147, 383–388.

Walker, R.D. & Dowling, P.M., 2006. Fluoroquinolones, in: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, S. Giguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Baggot, R.D. Walker and P.M. Dowling, ed. Iowa State University Press, Ames: Blackwell, 263-284.

Wenz, J.R., Garry, F.B., Barrington, G.M., 2006. Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229, 259–262.

Woodward, M.J., Carroll, P.J., Wray, C., 1992. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 31, 251–261.

Ye, C., Xu, J., 2001. Prevalence of iron transport gene on pathogenicity-associated island of uropathogenic *Escherichia coli* in *E. coli* O157:H7 containing Shiga toxin gene. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2300–2305.

Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, S., Katholm, J., Schukken, Y.H., 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16, 357–372.

Tables

Table 1. Proportion of antimicrobial resistance in persistent and control *E. coli* isolates

Antimicrobial	Breakpoints (µg/mL)			Interpretation	% Resistant isolates observed		OR ¹	95% CI	P-value
	S	I	R		Persistent <i>E. coli</i> n=18	Control <i>E. coli</i> n=79			
Ampicillin	≤ 8	16	≥ 32	Human data	27.8	3.8	9.8	2.1, 45.8	<0.01*
Cephalothin	≤ 8	16	≥ 32	Human data	22.2	2.8	7.6	1.5, 39.4	0.02*
Ceftiofur	≤ 2	4	≥ 8	Cattle mastitis	11.1	1.3	11.8	0.89, 157.1	0.06
Enrofloxacin	≤ 0.25	0.5-1	≥ 2	Cattle respiratory disease/Chicken and turkey <i>E. coli</i>	0.0	0.0	---	---	---
Spectinomycin	≤ 32	64	≥ 128	Cattle respiratory disease	5.6	1.3	4.4	0.25, 77.3	0.31
Tetracycline	≤ 4	8	≥ 16	Human data	27.8	16.5	1.9	0.56, 6.7	0.29
TMP-Sulfa ²	≤ 2/38	-	≥ 4/76	Human data	11.1	5.1	2.3	0.37, 13.9	0.38

¹ Unconditional association (odds ratio) between presence of resistance to a specific antimicrobial and odds of being a persistent *E. coli* isolate.

² Trimethoprim-sulfamethoxazole combination.

* Statistically significant associations (P -value ≤ 0.05)

Table 2. List of 27 virulence genes under investigation

Virulence gene/activity	Function	DNA sequence (5'→3')	Amplified product (bp)	Control strains	Reference article
Adhesins					
<i>bmaE</i>	M-agglutinin major subunit	For: ATGGCGCTAACTGCCATGCTG Rev: AGGGGGACATATAGCCCCCTTC	507	ECL12344	Chapman et al., 2006
<i>F17</i>	F17a pili major sub-unit	For: TATCCTTGGAACTAGGCGG Rev: CCAGTGGTGAATCCGTGT	300	ECL13256	Cid, D. et al., 1999
<i>hra1</i>	Hemagglutinin - non fimbrial adhesin	For: TCACTTGCAGACCAGCGTTTC Rev: GTAACCTCACACTGCTGTCACCT	537	ECL1033	Ewers, C. et al., 2007
<i>papC</i>	Pilus assembly, <i>pap</i> operon	For: GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG Rev: ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328	ECL13256	Daigle, F. et al., 1994
<i>sfaA</i>	Type S fimbriae major sub-unit	For: CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA Rev: CTCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC	410	94-279-171	Hilali, F. et al., 2000
<i>clpG-31a</i>	CS31A Coli surface-associated	For: GCACAATTACTGCTGATGCG Rev: GTTATAAGTTACTGCCACGTTTC	710	31a	Girardeau, J.P. et al., 1991
Invasins					
<i>afaD8</i>	Invasin, AFA-8	For: GTTGAAGTACTGCTTAATACCACTG Rev: TGAGCATTCTCCGCTAACTGATAAT	280	ECL13455	Hilali, F. et al., 2000
<i>ibeA</i>	Invasion protein	For: AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC Rev: TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	170	ECL12312	Ewers, C. et al., 2007
Toxins					
<i>cdtB-1</i>	Cytotoxic distending toxin I (b subunit)	For (a1): AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA Rev (a2): AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTTA For (s1): GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG Rev (s2): GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG	430	ECL9632	Chapman et al., 2006
<i>cnf1</i>	Cytotoxic necrotizing factor 1	For: TTATATAGTCGTCAAGATGGA Rev: CACTAAGCTTTACAATATTGAC	634	ECL13455	Oswald, E. et al., 1994
<i>cvaC</i>	Colicin V, conjugative plasmids (<i>traT</i> , <i>iss</i> and antimicrobial resistance)	For: CACACACAAACGGGAGCTGTT Rev: CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	680	ECL12364	Chapman et al., 2006
<i>hlyA</i>	Alpha-hemolysin (chromosome)	For: AGCCGGAACAGTTCTCTCAG Rev: CCAGCATAACAGCCGATGTA	526	ECL7805	Sandhu et al. 1997
<i>stx1</i>	Shiga-like toxin I	For: TTAGACTTCTCGACTGCAAAG Rev: TGTTGTACGAAATCCCCTCTG	531	ECL6611	Woodward et al., 1992
<i>stx2</i>	Shiga-like toxin II	For: CTATATCTGCGCCGGTCTG Rev: AGACGAAGATGGTCAAACG	327	ECL6611	Woodward et al., 1992

Table 2. List of 27 virulence genes under investigation (continued)

Virulence gene/activity	Function	DNA sequence (5'→3')	Amplified product (bp)	Control strains	Reference article
Capsule synthesis <i>kpsM-II</i>	Polysialic acid transport proteins, group II (K1, K4, K5, K7, K12, K30, K42, K92)	For: GCGCATTGCTGATACTGTTG Rev: CATCCAGACGATAAGCATGAGC	272	O1:K1	Chapman et al., 2006
Iron acquisition <i>fepC</i>	Ferric enterobactin transport ATP-binding protein	For: TACCTGGATAATGCTGTCGG Rev: ATGGTGTGATGGGGCTGGC	347	EDL933	Ye, C. & Xu, J., 2001
<i>fyuA</i>	<i>Yersinia</i> siderophore receptor (ferric yersiniabactin uptake)	For: TGATTAACCCCGACGGGAA Rev: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880	ECL8985	Chapman et al., 2006
<i>irp1</i>	Protein for biosynthesis of yersiniabactin (peptide/polypeptide synthetase)	For: TGAATCGCGGGTGTCTTATGC Rev: TCCCTCAATAAAGCCACGCT	240	ECL12421	Karch, H. et al., 1999
<i>irp2</i>	Iron-repressible protein (yersiniabactin synthesis)	For: AAGGATTTCGCTGTACCGGAC Rev: TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	286	ECL12364	Ewers, C. et al., 2007
<i>iron</i>	Novel catecholate siderophore	For: AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG Rev: GACGCCGACATTAAGACGCAG	665	ECL12021	Chapman et al., 2006
<i>iutA</i>	Ferric aerobactin receptor (iron uptake/transport)	For: GGCTGGACATCATGGGAAGTGG Rev: CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300	ECL1106	Chapman et al., 2006
<i>sitA</i>	Putative iron transport gene	For: AGGGGGCACAACCTGATTCTCG Rev: TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	608	ECL12344	Rodriguez-Siek, K.E. et al., 2005
Additional virulence genes <i>iss</i>	Increased serum survival	For: ATCACATAGGATTCTGCCG Rev: CAGCGGAGTATAGATGCCA	309	ECL12364	Ewers, C. et al., 2007
<i>malX</i>	PTS system for maltose and glucose	For: GGACATCCTGTACAGCGCGCA Rev: TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	922	ECL12021	Ewers, C. et al., 2007
<i>neuC</i>	p7 protein (polysialic acid synthesis)	For: GGTGGTACATTCGGGATGTC Rev: AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	676	ECL12421	Ewers, C. et al., 2007
<i>Tsh</i>	Temperature sensitive hemagglutinin (hemoglobin protease)	For: GGTGGTGCCTGGAGTGG Rev: AGTCCAGCGTAGTGG	640	ECL3110	Dozois, C.M. et al., 2000
<i>Usp</i>	Uropathogenic specific protein	For: ACATTACGGCAAGCCTCAG Rev: AGCGAGTTCCTGGTGAAGC	440	ECL12021	Bauer, R.J. et al., 2002

Table 3. Proportion of persistent and control *E. coli* isolates possessing specific virulence genes and unconditional associations between virulence genes and intramammary persistence in *E. coli*

Virulence gene (VG)	% of isolates with VG		OR ¹	95% CI	P-value
	Persistent <i>E. coli</i> n=18	Control <i>E. coli</i> n=79			
Adhesins					
<i>bmaE</i>	5.6	3.8	1.3	0.12, 14.0	0.84
<i>F17</i>	0.0	6.3	---	---	---
<i>hra1</i>	16.7	22.8	0.63	0.15, 2.6	0.52
<i>papC</i>	16.7	6.3	3.2	0.64, 15.8	0.16
<i>sfaA</i>	0.0	0.0	---	---	---
<i>clpG-31a</i>	0.0	1.3	---	---	---
Invasins					
<i>afaD8</i>	5.6	3.8	1.3	0.12, 14.0	0.84
<i>ibeA</i>	0.0	1.3	---	---	---
Toxins					
<i>cdtB-1</i>	0.0	3.8	---	---	---
<i>cnf1</i>	5.6	2.5	2.1	0.17, 25.4	0.57
<i>cvaC</i>	16.7	5.1	3.8	0.76, 18.5	0.11
<i>hlyA</i>	22.2	19.0	1.3	0.35, 4.7	0.71
<i>stx1</i>	0.0	0.0	---	---	---
<i>stx2</i>	0.0	0.0	---	---	---
Capsule synthesis					
<i>kpsM-II</i>	0.0	5.1	---	---	---
Iron acquisition					
<i>fepC</i>	5.6	3.8	1.4	0.12, 16.8	0.78
<i>fyuA</i>	27.8	22.8	1.3	0.39, 4.1	0.70
<i>irp1</i>	27.8	21.5	1.3	0.41, 4.4	0.63
<i>irp2</i>	27.8	21.5	1.3	0.41, 4.4	0.63
<i>iroN</i>	22.2	5.1	5.4	1.2, 24.0	0.03*
<i>iutA</i>	22.2	10.1	2.5	0.67, 9.6	0.17
<i>sitA</i>	55.6	12.7	8.6	2.8, 27.1	<0.01*
Additional virulence genes					
<i>iss</i>	44.4	54.4	0.61	0.22, 1.7	0.35
<i>malX</i>	11.1	3.8	3.2	0.47, 21.1	0.24
<i>neuC</i>	0.0	1.3	---	---	---
<i>Tsh</i>	5.6	6.3	0.89	0.09, 9.1	0.92
<i>Usp</i>	0.0	1.3	---	---	---

¹ Unconditional association (odds ratio) between presence of a specific virulence gene and odds of being a persistent *E. coli* isolate.

* Statistically significant associations (P -value ≤ 0.05)

5. Discussion

5.1 Persistance au niveau de la glande mammaire

Les infections intramammaires à *Escherichia coli* sont souvent de courte durée, car le système de défense de l'hôte élimine la bactérie de façon efficace, surtout lorsque l'infection a lieu en fin de lactation (Hill et al., 1978; Hill et Shears, 1979). En début de lactation, l'élimination de ce microorganisme est plus problématique et ceci serait dû à des déficiences au niveau de la fonction et du nombre de neutrophiles (Hill et al., 1979a; Shuster et al., 1996).

La capacité qu'a *E. coli* à persister au niveau de la glande mammaire a été démontrée antérieurement, mais ce phénomène était décrit comme étant rare et de faible importance clinique (Hill et Shears, 1979; Hogan et al., 1989; Lam et al., 1996). En 1979, Hill et ses collègues ont dénombré quotidiennement sur une période de 120 jours les bactéries et les neutrophiles suite à une infection expérimentale à *E. coli* (Hill et Shears, 1979). Ils ont observé que 5 des 28 infections se sont avérées de longue durée avec des signes de récurrence. De façon intermittente, ils pouvaient observer de l'inflammation au niveau de la glande mammaire, de la pyrexie et lorsqu'*E. coli* était isolé de nouveau, il s'agissait toujours du même sérotype que celui de la souche infectante initiale. Parfois, ils n'arrivaient pas à cultiver la bactérie lors des périodes de rémissions, leur laissant croire que celle-ci ne se trouvait pas dans la citerne de la glande, mais plutôt au niveau du tissu parenchymateux de cette dernière. En 1996, Lam et ses collègues ont publié une étude épidémiologique sur les mammites cliniques à *E. coli* détectées lors d'un suivi de sept fermes laitières aux Pays-Bas ayant une moyenne

de comptage de cellules somatiques de moins de 150 000/mL. Les isolats d'*E. coli* isolés étaient comparés entre eux à l'aide d'une méthode d'empreinte d'ADN, soit « enterobacterial repetitive intergenic consensus » ou ERIC PCR. Plusieurs génotypes d'*E. coli* ont été identifiés au sein de chacune des fermes. Des infections intramammaires persistantes ont été détectées, mais sporadiquement. De plus, différents quartiers étaient infectés avec différents génotypes d'*E. coli*, indiquant que ce dernier est un agent pathogène environnemental et que, de façon habituelle, il ne se propage pas d'un quartier l'autre. En 2000, Bradley et Green ont pu démontrer la capacité d'*E. coli* d'accéder à la glande mammaire durant la période de tarissement, d'y persister et de provoquer des signes cliniques de mammite ultérieurement, soit après le début de la période de lactation (Bradley et Green, 2000). Cette dernière étude s'est déroulée au Royaume-Uni et incluait six fermes laitières. La comparaison génétique des divers *E. coli* s'est aussi faite à l'aide d'ERIC PCR. Ainsi, ils ont pu démontrer que *E. coli* avait la capacité de persister au niveau de la glande mammaire pour plus de 100 jours et ils ont identifié ce phénomène comme étant important pour l'incidence de la mammite clinique.

Afin d'être considérée comme étant persistante, l'infection doit être due à une seule souche présente pour une longue durée et résultant en plusieurs isolements de l'agent et en plusieurs épisodes cliniques (Zadocks et al., 2011). L'utilisation de méthodes d'empreinte d'ADN ou de génotypage nous permet de distinguer les deux scénarios possibles lors de mammites récurrentes : soit une réinfection par un *E. coli* de l'environnement et de la persistance au niveau de la glande mammaire. Il a antérieurement été démontré que les *E. coli* présents dans l'environnement étaient

d'une grande diversité génétique (Nemeth et al., 1994) et qu'une discrimination de ces *E. coli* pouvait être faite grâce à des méthodes d'empreinte d'ADN. Une réinfection par un même clone est donc invraisemblable.

Avant l'usage des techniques de biologie moléculaire pour les comparaisons d'isolats, des méthodes phénotypiques étaient utilisées. Ces méthodes, telle que la sérotypie, permettent d'avoir une idée globale et préliminaire de la situation, mais elles sont moins discriminantes. Malgré ceci, les proportions de persistance identifiées étaient assez faibles. Par exemple, la proportion de mammite clinique à *E. coli* présente dans des quartiers où il y avait récurrence était de 7,5 % dans une étude américaine (Hogan et al., 1989) et de 5,5 % dans une étude au Royaume-Uni (Wildesmith et al., 1986).

Avec l'avènement des méthodes de comparaison génotypique, telles que l'ERIC PCR ou l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE), les données rapportées ont pu se préciser. Ainsi, Lam et ses collègues ont pu rapporter une proportion de 9,1 % de persistance au niveau de sept fermes laitières aux Pays-Bas (Lam et al., 1996). Quelques années plus tard aux Pays-Bas, Döpfer et ses collègues rapportaient une proportion de persistance plus basse. Ils ont rapporté que 4,77 % des épisodes de mammite clinique à *E. coli* se produisaient au niveau de quartiers infectés de façon persistante (Döpfer et al., 1999). Cette proportion plus faible pourrait être due au fait que le modèle de cette étude était plus vaste que pour la précédente. Tout d'abord, une cohorte de 300 fermes laitières était à l'étude. De plus, pour cette dernière étude, les troupeaux avaient une moyenne de <400 000/mL de comptage de cellules somatiques. Ceci a pu mener à des résultats différents d'une étude plus sélective en ce

qui concerne ce comptage. D'autres critères plus généraux, tels que la localisation, la durée et le calendrier des prélèvements ont aussi pu influencer les résultats de cette étude. Les auteurs de cette dernière étude suggèrent également que la proportion rapportée puisse être sous-estimée due à un manque d'assiduité de la part des éleveurs pour les prélèvements. En effet, l'échantillonnage n'était peut-être pas toujours fait de façon adéquate puisqu'il n'y avait pas d'observance en continu. L'échantillonnage de vaches infectées de façon persistante, et ce, sur une longue période de temps (18 mois), peut paraître moins intéressant pour l'éleveur comparativement à l'échantillonnage d'une vache nouvellement infectée pour laquelle aucune information n'est disponible, résultant ainsi à une sous-estimation de la persistance. Lorsqu'une vache présente un premier épisode de mammite clinique, il est très motivant et intéressant pour l'éleveur d'obtenir l'information quant à l'agent pathogène. Par contre, lorsque la vache semble infectée de façon persistante et qu'il y a présence de signes récurrents de mammite clinique, la motivation de l'éleveur peut être moindre, celui-ci assumant que la santé du pis est compromise.

Au Royaume-Uni, une étude incluant six troupeaux de bovins laitiers dans la région de Somerset a pu démontrer la présence de persistance à *E. coli* (Bradley et Green, 2001). Durant la période étudiée, soit du 1^{er} juin 1997 au 31 mai 1998, 337 cas de mammite clinique ont été observés. De tous ces cas, *E. coli* était l'agent pathogène le plus souvent isolé. Cent dix-sept cas de mammite clinique à *E. coli* se sont produits dans 101 quartiers de 89 vaches. De tous les cas de mammite clinique à *E. coli*, 23,9 % (28 sur 117) se sont produits dans des quartiers présentant deux cas ou plus de mammite à *E. coli*. Dans 85,7 % (24 sur 28) des cas de mammite récurrente, le

génotype des *E. coli* était identique, par ERIC PCR, au *E. coli* initialement isolé. Ainsi, un total de 20,5 % (24 sur 117) de tous les cas de mammite clinique à *E. coli* sont survenus dans des quartiers infectés de façon persistante. Cette proportion de persistance est plus élevée que celle rapportée en 1986 (5,5 %) au Royaume-Uni (Wilesmith et al., 1986). Cette dernière proportion avait été rapportée sans l'aide de méthodes de typage par empreinte d'ADN indiquant que la proportion réelle pourrait être encore plus faible. Bradley et Green rapportaient que ce changement pourrait être un indicateur d'un changement au niveau de la susceptibilité de la population bovine face aux infections persistantes ou à un changement au niveau d'*E. coli*. Un exemple concret de ceci est présenté dans leur publication. Ils ont noté qu'une vache a été infectée par deux génotypes différents d'*E. coli* dans deux quartiers différents. Sur ces deux quartiers, un seul a développé de la mammite clinique récurrente suggérant ainsi que le génotype est d'importance et que les facteurs intrinsèques à l'hôte ne sont pas toujours responsables d'une infection persistante (Bradley et Green, 2001). De plus, ceux-ci ont pu démontrer que les mammites récurrentes dues au même génotype avaient tendance à être cliniquement moins sévères que les mammites ne présentant pas de récurrence. Les auteurs ont donc proposé que ceci puisse être un avantage pour une souche adaptée à la glande mammaire de ne pas provoquer de réponse dramatique chez l'hôte.

Une étude récente concernant la caractérisation d'isolats d'*E. coli* en provenance de mammite clinique comportait 154 isolats d'*E. coli* provenant de 65 fermes laitières dans le sud de la Finlande (Suojala et al., 2011). Une partie des *E. coli* provenait de cas initiaux (144 isolats) et les autres de prélèvements faits trois semaines

après l'apparition des premiers signes cliniques de mammite. Des 85 quartiers prélevés au jour 21, 10 quartiers étaient infectés avec le même génotype (identifié par PFGE) d'*E. coli* que celui initialement détecté. Ainsi, 13 % de tous les cas de mammite clinique à *E. coli* ou d'isolement de la bactérie (suivi postinfection) sont survenus dans des quartiers infectés de façon persistante. Cette proportion est plus basse que celle rapportée par Bradley et Green. Ceci pourrait être dû à plusieurs facteurs, tels que le modèle de l'étude et la région à l'étude qui étaient différents. En Finlande, 65 fermes laitières étaient à l'étude comparativement à 6 au Royaume-Uni. Suojala et ses collègues ont pu démontrer que le troupeau avait un effet de regroupement ou un « clustering effect » sur la persistance des infections intramammaires ($P = 0,03$); (Suojala et al., 2011). Ainsi, de la persistance a été détectée seulement dans 9 fermes, chacune d'elle présentant un génotype distinct. Puisque cette dernière étude faisait le suivi de plus de fermes laitières, il est possible qu'un effet de dilution sur la proportion finale de cas de persistance, gardant en tête l'effet agglomérant sur la persistance. De plus, sur les 144 cas initialement diagnostiqués, seulement 85 quartiers ont été prélevés 21 jours plus tard pour un suivi d'infection intramammaire persistante. Ceci a pu avoir une influence sur la proportion finale rapportée. Le but de cette dernière étude n'était pas de rapporter des données de persistance, mais plutôt de rapporter des données de susceptibilité aux antibiotiques et de détection de facteurs de virulence au niveau de souches d'*E. coli* en provenance de différents cas de mammites cliniques.

Peu de données sont disponibles concernant la persistance intramammaire d'*E. coli*. À notre connaissance, aucune donnée récente n'était disponible pour les troupeaux canadiens. Il était donc opportun pour nous d'étudier ceci à l'aide des isolats

conservés suite à un échantillonnage exhaustif fait par le Réseau Canadien de Recherche sur la Mammite Bovine et la qualité du lait (RCRMB). Les détails de cet échantillonnage se trouvent dans la publication concernant la Cohorte Nationale de fermes laitières canadiennes (Reyher et al., 2010). En bref, la période d'échantillonnage s'est déroulée sur deux ans, soit de la fin 2006 à la fin de l'année 2008. Lors de la première année, 91 fermes étaient inscrites au projet, mais une s'est désistée la première année et 16 lors de la seconde. Ainsi, la cohorte échantillonnée était composée d'une moyenne de 83 fermes laitières. L'intérêt face à cette collection de souches pour notre étude était surtout dû au fait que les vaches présentant des mammites cliniques devaient être échantillonnées au moment de la présentation des signes cliniques, puis un suivi devait être fait 2-3 semaines plus tard, puis 4-5 semaines plus tard. Ceci nous a donc permis d'évaluer la proportion de persistance à *E. coli* au niveau national. Durant les deux années, 134 346 échantillons de lait (réservoir, quartier et composite) ont été prélevés. La détection de bactéries pathogènes s'est avérée plus importante que ce qui était prévu (Reyher et al., 2010). *Staphylococcus aureus* (13 %) était la bactérie pathogène la plus souvent isolée des cas de mammite clinique et de leur prélèvement de suivi. *E. coli* était le deuxième agent pathogène (11 %) le plus souvent isolé. Notre étude génotypique a pu démontrer que 12,2 % (42 sur 342) de tous les cas (ou suivi de cas) de mammite clinique à *E. coli* sont survenus dans des quartiers infectés de façon persistante. Cette proportion est semblable à certaines proportions rapportées antérieurement, mais plus basse que celle rapportée au Royaume-Uni par Bradley et Green (2001). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette proportion plus faible. Tout d'abord, la région échantillonnée est beaucoup plus vaste

(pancanadien) et la cohorte a été créée de façon à ce que celle-ci représente le mieux possible la population canadienne de fermes laitières. De plus, les fermes ont été sélectionnées afin d'atteindre une distribution régionale uniforme en ce qui concerne le comptage moyen de cellules somatiques. Toutes les fermes comptaient plus de 80 % de vaches de race Holstein-Friesian et la traite se faisait deux fois par jour. La proportion plus faible dans notre étude pourrait en partie être expliquée par le fait que la cohorte à l'étude était beaucoup plus extensive que celle de Bradley et Green. Un autre facteur qui a pu affecter à la baisse la proportion de persistance est l'assiduité du producteur par rapport aux prélèvements de lait lors des suivis de mammites cliniques. L'assiduité entière (prise du lait initial et des deux suivis) était de 59 %. À ceci s'ajoute 16 % de cas qui comptaient un prélèvement initial et seulement un prélèvement de suivi (Reyher et al., 2010). La lacune en ce qui concerne la prise des prélèvements de suivi, pouvant découler d'une perte de motivation chez le producteur, pourrait engendrer une sous-estimation de la proportion de persistance. La qualité des échantillons prélevés a aussi pu avoir une influence à la baisse sur la proportion rapportée. Les laits contaminés par une flore bactérienne présente sur la peau du trayon, par exemple, n'ont pas pu être utilisés. Les *E. coli* conservés lors de l'échantillonnage par le RCRMB étaient uniquement ceux obtenus lors de croissance en culture pure. De cette façon, même si une vache excrétaient du *E. coli* de nouveau à partir d'un quartier infecté de façon persistante, mais qu'il y avait présence concomitante de contaminants, ce *E. coli* ne pouvait pas être utilisé pour notre étude. Plusieurs microorganismes étaient d'intérêt pour cette cohorte. Il a donc été nécessaire d'établir des priorités quant à la conservation de chacun des isolats. Pour les échantillons associés à des mammites

cliniques, 14 % de contamination a été rapporté (Reyher et al., 2010). Par ailleurs, il est important de noter que les laits prélevés ont été congelés avant l'ensemencement. Ceci se faisait pour des raisons de convenance, les laboratoires de diagnostics n'étant pas toujours à proximité des fermes. Il a antérieurement été rapporté que la congélation pouvait diminuer la proportion de détection d'*E. coli* dans des échantillons de lait en provenance de cas de mammite (Schukken et al., 1989). Ainsi, la proportion des *E. coli* détectés a pu être affectée, diminuant par le fait même les possibilités de détection de persistance.

L'existence de la persistance intramammaire est maintenant clairement établie. Avec le temps, il est possible que celle-ci augmente, mais il est important de rester prudent quant à l'interprétation, car la conscientisation peut à elle seule faire en sorte qu'une augmentation soit détectée.

5.2 Contagion

Tout d'abord, la contagion peut se produire entre les quartiers d'une même vache. Ainsi, des signes de mammite récurrente apparaissent, mais dans différents quartiers. Ceci peut être dû à une transmission par contact direct ou indirect entre les quartiers ou peut être le résultat d'une exposition concomitante (Zadoks et al., 2011). Plusieurs scénarios peuvent être en cause lors de mammite récurrente à *E. coli* dans différents quartiers, mais possédant le même génotype. Tout d'abord, il peut s'agir d'une réinfection environnementale par la même souche. Il pourrait s'agir aussi d'une infection des différents quartiers au même moment, mais de présentation des signes cliniques à des moments différents. Finalement, il se peut qu'il y ait transmission de

l'agent pathogène d'un quartier à l'autre, soit de la contagion entre les quartiers (Döpfer et al., 1999). Tel que mentionné précédemment, une réinfection environnementale par un même clone d'*E. coli* est très peu probable étant donné à la très grande variabilité génétique des *E. coli* de l'environnement. La deuxième option est possible, mais encore une fois peu probable. Pour qu'une infection du même clone d'*E. coli* ait lieu au même moment, la pression d'infection de ce même clone dans l'environnement doit être grande, ce qui serait difficile à expliquer considérant que l'environnement de la vache est en présence d'une population très hétérogène d'*E. coli*. Très peu d'études rapportent la possibilité de contagion entre les quartiers d'une même vache par *E. coli*. Aux Pays-Bas, Döpfer et ses collègues extrapolaient que 68 épisodes ou 2,98 % de tous les épisodes de mammites causées par *E. coli* seraient dus à un *E. coli* du même génotype au niveau de différents quartiers de la même vache (Döpfer et al., 1999). Cette découverte a en fait surpris les auteurs. La transmission de bactérie pathogène d'un quartier à l'autre chez une même vache avait déjà été rapportée pour les agents contagieux de mammites tels que *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus agalactiae*. En ce qui concerne *Streptococcus agalactiae*, la transmission de cette dernière se ferait uniquement de façon contagieuse, c'est-à-dire d'un quartier à un autre par le biais de matériel contaminé par le lait d'une vache infectée. La confirmation de ce mode de transmission a pu se faire par la détection de la présence d'une seule souche (génotype identique) chez plusieurs vaches d'une même ferme (Zadocks et al., 2011). De plus, selon plusieurs études épidémiologiques, *Staphylococcus aureus* fait aussi parti de la classe des agents de mammite contagieuse. Cette classification est soutenue par le fait que les données de biologie moléculaire indiquent que chez la

plupart des troupeaux aux prises avec des mammites à *Staphylococcus aureus*, un seul clone semble infecter plusieurs vaches et ce clone est souvent le plus prévalent du troupeau (Zadoks et al., 2011). La classification des mammites à *E. coli* semble plus ambiguë maintenant que nous avons des preuves que cet agent pathogène puisse persister et être contagieux. Au Royaume-Uni, Bradley et Green ont pu démontrer que le même génotype que celui identifié initialement était impliqué dans 8,5 % de tous les épisodes de mammite récurrente ayant lieu dans différents quartiers de la même vache (Bradley et Green, 2001). Ils ont également démontré la présence possible de contagion entre quartiers. Dans notre étude, ceci a aussi été détecté, mais avec une très faible proportion de 1,2 %. En réalité, ceci ne représente que 2 vaches; une qui a présenté des signes de mammite clinique au niveau de deux quartiers qui ont été prélevés la même journée et l'autre qui a présenté aussi des signes cliniques dans deux quartiers en même temps et qui excrétaient toujours le même *E. coli* 29 jours plus tard au niveau de ces deux quartiers. Dans ces deux cas, il est difficile d'expliquer l'apparition des signes cliniques au même moment. S'il s'agit de contagion entre quartiers, il est possible qu'un des deux quartiers était infecté préalablement, sans que ceci soit répertorié, que l'infection intramammaire ait persisté, qu'il y ait eu contagion vers l'autre quartier et que les signes cliniques apparaissent en même temps. Par contre, dans notre étude, il manque d'évidence que la transmission entre quartiers puisse se produire. Nous savons que la possibilité de transmission existe, mais celle-ci est probablement plus souvent masquée par la présence plus importante de cas classiques de mammites aiguës ou ponctuelles à *E. coli*. La quantité d'*E. coli* génotypés dans notre étude est limitée, car nous n'avons pas inclus les isolats d'*E. coli* issus de mammites ponctuelles. Ainsi, le

nombre d'isolats caractérisé par ferme se limite à ceux en provenance de vaches excréant du *E. coli* à répétition. Aucun patron identique n'a été identifié chez différentes vaches d'une même ferme. Si les vaches présentant des mammites ponctuelles avaient aussi été étudiées, la proportion de mammite contagieuse à *E. coli* aurait peut-être été plus grande. Tout de même, la proportion de contagion chez les vaches canadiennes est plus basse que celles retrouvées précédemment en Europe. Ces deux dernières études incluaient, elles aussi, uniquement les vaches présentant des mammites récurrentes.

5.3 Caractérisation de la persistance

5.3.1 Identification de facteurs de virulence

L'étude et la recherche de facteur de virulence au niveau des *E. coli* pathogènes sont d'intérêt lors du diagnostic d'infections causées par des pathotypes connus. En ce qui concerne certaines maladies, telles que la diarrhée néonatale chez les veaux, les pathotypes et les facteurs de virulence qui en font partie sont bien définis. Ainsi, chez les bovins, nous reconnaissons l'importance des ETEC pour la diarrhée néonatale, les EPEC et STEC pour la dysenterie hémorragique et les ExPEC pour les cas de septicémies. De plus, les facteurs de virulence les plus souvent rencontrés sont F5, F41 et STa pour les ETEC; Stx1 et/ou Stx2 et Eae pour les STEC et P, F17, CNF1, CNF2, CDT, C31A et aérobactine pour les ExPEC (Fairbrother et Nadeau, 2010). En ce qui concerne la mammite bovine, aucun facteur de virulence spécifique ne prédomine chez les *E. coli* étudiés (Kaipainen et al., 2002; Lethlainen et al., 2003; Wenz et al., 2006;

Ghanbarpour et Oswald, 2010; Suojala et al., 2011; Blum et Leitner, 2013). Par contre, il a été démontré que les *E. coli* présents dans l'environnement de la vache possèdent une distribution génotypique différente de ceux en cause lors de mammite, suggérant qu'une certaine sélection existe (Blum et Leitner, 2013). En ce qui concerne les mammites persistantes, aucune différence génétique claire n'a été établie entre ces souches et celles provenant de mammites transitoires (Dogan et al., 2006; Suojala et al., 2011). Notre étude nous a permis de mettre en évidence le fait que les gènes associés avec l'acquisition du fer semblent être d'importance pour la persistance au niveau de la glande mammaire. Les gènes *fyuA* (27,8 %), *irp1* (27,8 %), *irp2* (27,8 %), *iroN* (22,2 %), *iutA* (22,2 %) et *sitA* (55,6 %) sont ceux qui ont été détectés le plus fréquemment chez les souches persistantes. Ces proportions étaient toujours plus élevées lorsque comparées avec les proportions détectées au niveau des souches transitoires. Par contre, cette différence était significative uniquement pour les gènes *iroN* et *sitA*.

Le fer est essentiel pour pratiquement tous les organismes vivants. Chez les bactéries, différents mécanismes ont évolué afin de faire face aux problèmes dus à leur dépendance au fer, leur permettant ainsi d'atteindre des concentrations adéquates, et ce, dans différentes situations de disponibilité (Andrews et al., 2003). Chez l'hôte, telle que la vache, les concentrations de fer sont très basses, se situant aux alentours de 10^{-25} M dans le sang et même à une concentration plus basse au niveau des autres sites (Wiles et al., 2008). Normalement, les bactéries nécessitent une concentration cytoplasmique d'environ 10^{-6} M pour se multiplier (Andrews et al., 2003). Ainsi, les agents pathogènes, tels que les *E. coli*, ont évolué en sélectionnant des stratégies

d'acquisition du fer présent chez l'hôte. Ces stratégies incluent, entre autres, l'expression de systèmes d'acquisition du fer qui se servent de sidérophores pour récupérer le fer de l'environnement et le concentrer au niveau du cytosol bactérien. Les sidérophores sont des chélateurs du fer synthétisés par les bactéries. Ces molécules ont une très forte affinité pour l'ion ferrique Fe^{+3} , qui est insoluble en tant que cation libre. Les sidérophores forment des complexes avec le fer et ceci permet l'internalisation dans la cellule par le biais de récepteurs qui facilitent le transport des complexes à travers la membrane cellulaire jusque dans le cytosol où ce dernier est libéré (Wiles et al., 2008). Un mécanisme de défense de l'hôte bien connu est la limitation de la disponibilité du fer pour les agents pathogènes. Les eucaryotes possèdent aussi des protéines agissant comme chélateurs du fer afin de séquestrer et transporter ce dernier vers l'intérieur ou l'extérieur des cellules de l'hôte (Wiles et al., 2008). La transferrine est un exemple de chélateur chez les eucaryotes. Par contre, certains chélateurs, tels que l'entérobactine chez les *E. coli*, présentent une meilleure affinité pour le fer; diminuant ainsi l'effet de compétition (Wiles et al., 2008).

Les mécanismes d'acquisition du fer chez les *E. coli* sont nombreux, mais le système pour l'aérobactine est le mieux décrit. Ce dernier système est composé de plusieurs gènes, dont le gène *iut* favorisant l'absorption du composé aérobactine-fer (Dziva et Stevens, 2008). Ce gène, avec d'autres gènes de virulence, se trouve sur un plasmide ColV, soit le pAPEC-O2-ColV (Johnson et al., 2006). En plus d'aérobactine, d'autres systèmes d'acquisition et de transport du fer ont été identifiés sur le plasmide ColV. Entre autres, le système du sidérophore salmocheline (locus *iroBCDEN*) et le système de transport de fer *sitABC* (Johnson et al., 2006). *fyuA* (absorption de

yersiniabactine) et *irp2* (protéine iron-repressible) sont deux gènes de virulence qui ne sont pas sur des plasmides. Ceux-ci sont d'importance chez les *E. coli* pathogènes d'aviaire (APEC) où ils ont été détectés chez plus de 65 % des souches isolées lors de colibacillose (Janssen et al., 2001).

L'importance de la présence de ces gènes de virulence pour le mécanisme d'acquisition du fer chez les *E. coli* isolés au niveau de la glande mammaire n'avait jamais, à notre connaissance, été rapportée. Par contre, mis à part *sitA* (55,6 %), les proportions rapportées ne sont pas élevées. Suojala et collaborateurs ont pu démontrer que le gène *irp2* était présent chez 26,4 % des isolats d'*E. coli* en provenance de cas de mammites (Suojala et al., 2011). Ce gène était celui qui était le plus souvent rapporté dans cette dernière étude. De plus, lors de la comparaison entre les souches transitoires et les souches persistantes, aucune différence n'a été identifiée en ce qui concerne la présence de gènes de virulence. Par contre, les gènes *sitA* et *iroN* n'étaient pas à l'étude. L'identification de ces derniers gènes au niveau des *E. coli* persistants suggère qu'il existe une différence, non seulement phénotypique, mais génotypique entre les différentes populations d'*E. coli* d'importance lors d'infection intramammaire.

5.3.2 Résistance aux antibiotiques

Dans l'ensemble, les proportions de résistance aux antibiotiques étaient faibles dans les deux groupes de souches à l'étude. Les proportions les plus élevées étaient pour l'ampicilline et pour la tétracycline (27,8 % pour les deux antibiotiques). En général, les proportions de résistances pour les souches transitoires étaient négligeables et parfois même plus basses que celles rapportées dans la littérature. Seule la tétracycline

(16,5 %) présentait une proportion de résistance plus importante dans ce dernier groupe. Certaines publications récentes rapportent que la proportion de la résistance varie de 14,8 à 37,4 % pour les *E. coli* isolés de cas de mammite bovine (Saini et al., 2012b). Pour l'ampicilline, la proportion de résistance pour le groupe transitoire était de 3,8 % et les proportions préalablement rapportées étaient de 8,2 à 98,4 % (Saini et al., 2012b). En ce qui concerne le ceftiofur, la proportion de résistance est de 1,3 % pour le groupe transitoire. Cette proportion est légèrement plus élevée que celle rapportée par Saini et al. (0,8 %), mais plus basse que celle rapportée aux États-Unis par Erskine et al. (2002), selon laquelle 4,6 % des isolats étaient résistants (Erskine et al., 2002). Par contre, la proportion de résistance détectée pour le groupe de souches persistantes était de 11,1 %, ce qui est plus élevé que précédemment rapporté. Au Canada, le ceftiofur est largement utilisé chez les bovins laitiers (Saini et al., 2012a). Par contre, la distribution de ce dernier vers la glande mammaire est faible dû à une forte liaison de la molécule avec les protéines plasmatiques lors d'utilisation systémique de cette dernière (Prescott, 2006b). Ainsi, il est probable que les concentrations atteintes au niveau de la glande mammaire soient sous-optimales, favorisant la sélection d'*E. coli* résistants au ceftiofur. En temps normal, la résistance envers les antibiotiques de haute importance en médecine humaine, tels que les céphalosporines de troisième génération et les fluoroquinolones, est rare chez les coliformes impliqués dans la mammite bovine (Saini et al., 2012b). Ceci est également vrai pour les *E. coli* de notre étude, à l'exception de la proportion de résistance détectée pour le ceftiofur chez les *E. coli* persistants.

Mis à part l'enrofloxacin, il a été intéressant de noter que les proportions de résistance étaient toujours plus élevées pour les *E. coli* persistants. Malgré que ces différences soient significatives uniquement pour l'ampicilline et la céphalothine, cette information additionnelle suggère qu'une certaine sélection est nécessaire afin d'assurer la persistance d'*E. coli* au niveau de la glande mammaire.

6. Conclusion

En conclusion, cette étude nous a permis de démontrer que *Escherichia coli* avait la possibilité de persister au niveau de la glande mammaire de vaches laitières canadiennes. De plus, nous avons identifié la possibilité de transmission d'*E. coli* d'un quartier à l'autre d'une même vache. Historiquement, il a été défini que la présence de persistance était associée avec les agents pathogènes contagieux. Par contre, ce dogme semble maintenant désuet et la classification des agents de la mammite, moins bien définie. Il existe sans aucun doute plusieurs facteurs associés à l'hôte ou à l'agent pathogène permettant une telle persistance. Cette étude a démontré une différence entre les souches persistantes et les souches transitoires de mammite bovine. L'information que nous avons obtenue en ce qui concerne l'importance de l'acquisition du fer nous a permis de mieux comprendre certains éléments permettant la persistance et la survie prolongée au niveau de l'environnement de la glande mammaire. Par contre, malgré l'identification de certains atouts pour les souches persistantes, suggérant un degré de sélection pour celle-ci, la diversité génétique n'était pas différente entre les deux populations à l'étude. Ainsi, des travaux ultérieurs, tel que le séquençage complet du génome, sont toujours nécessaires afin d'identifier d'autres traits caractéristiques associés avec une meilleure adaptation à l'environnement de la glande mammaire. L'identification de facteurs de virulence essentiels à la persistance permettra de développer des outils d'intervention qui pourront neutraliser la virulence de l'agent pathogène et ainsi, prévenir la maladie. Chez les animaux, l'immunisation passive ou active envers les hémolysines, la capsule et les fimbriae de type P et 1 protègent contre des infections causées par des ExPEC exprimant ces facteurs de virulence (Johnson et

Russo, 2002). Une meilleure connaissance de la population bactérienne cible permettra de mieux concentrer les efforts pour la prévention de la persistance d'*E. coli* au niveau de la glande mammaire.

7. Bibliographie

Almeida, R.A., Dogan, B., Klaessing, S., Schukken, Y.H., Oliver, S.P., 2011. Intracellular fate of strains of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with acute or chronic mastitis. *Vet. Res. Commun.* 35, 89–101.

Andrews, S.C., Robinson, A.K., Rodríguez-Quñones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215–237.

Bauer, R.J., Zhang, L., Foxman, B., Siitonen, A., Jantunen, M.E., Saxen, H., Marrs, C.F., 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN*(*E. coli*). *J. Infect. Dis.* 185, 1521–1524.

Bean, A., Williamson, J., Cursons, R.T., 2004. Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 51, 285–287.

Blum, J.W., Dosogne, H., Hoeben, D., Vangroenweghe, F., Hammon, H.M., Bruckmaier, R.M., Burvenich, C., 2000. Tumor necrosis factor-alpha and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 19, 223–235.

Blum, S., Heller, E.D., Krifucks, O., Sela, S., Hammer-Muntz, O., Leitner, G., 2008. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. *Vet. Microbiol* 132, 135–148.

Blum, S.E., Leitner, G., 2013. Genotyping and virulence factors assessment of bovine mastitis *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 163, 305–312.

Bradley, A., 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J* 164, 116–128.

Bradley, A.J., Green, M.J., 2000. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. *J. Dairy Sci.* 83, 1957–1965.

Bradley, A.J., Green, M.J., 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1845–1849.

Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L., 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34, 521–564.

CDC, 2004. Center for Disease Control and Prevention PulseNet Protocols. Available at www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf.

Chapman, T.A., Wu, X.-Y., Barchia, I., Bettelheim, K.A., Driesen, S., Trott, D., Wilson, M., Chin, J.J.-C., 2006. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4782–4795.

Cid, D., Sanz, R., Marín, I., de Greve, H., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Amils, R., de la Fuente, R., 1999. Characterization of nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strains

producing F17 fimbriae isolated from diarrheic lambs and goat kids. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1370–1375.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Third Edition. CLSI document M31-A3 (ISBN 1-56238-659-X). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Daigle, F., Harel, J., Fairbrother, J.M., Lebel, P., 1994. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 40, 286–291.

Dogan, B., Klaessig, S., Rishniw, M., Almeida, R.A., Oliver, S.P., Simpson, K., Schukken, Y.H., 2006. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 116, 270–282.

Dogan, B., Rishniw, M., Bruant, G., Harel, J., Schukken, Y.H., Simpson, K.W., 2012. Phylogroup and lpfA influence epithelial invasion by mastitis associated *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 159, 163–170.

Döpfer, D., Almeida, R.A., Lam, T.J.G.M., Nederbragt, H., Oliver, S.P., Gaastra, W., 2000. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Veterinary Microbiology* 74, 331–343.

Döpfer, D., Barkema, H.W., Lam, T.J., Schukken, Y.H., Gaastra, W., 1999. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J. Dairy Sci* 82, 80–85.

Dosogne, H., Meyer, E., Sturk, A., van Loon, J., Massart-Leën, A.M., Burvenich, C., 2002. Effect of enrofloxacin treatment on plasma endotoxin during bovine *Escherichia coli* mastitis. *Inflamm. Res.* 51, 201–205.

Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Curtiss, R., 3rd, 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect. Immun.* 68, 4145–4154.

Dziva, F., Stevens, M.P., 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37, 355–366.

Erskine, R.J., Kirk, J.H., Tyler, J.W., DeGraves, F.J., 1993. Advances in the therapy for mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 9, 499–517.

Erskine, R.J., Walker, R.D., Bolin, C.A., Bartlett, P.C., White, D.G., 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J. Dairy Sci.* 85, 1111–1118.

Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.-B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., Denamur, E., 2004. A specific genetic background is required for

acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1085–1094.

Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kießling, S., Alt, K., Antão, E.-M., Latus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Böhnke, U., Steinrück, H., Philipp, H.-C., Wieler, L.H., 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology* 297, 163–176.

Euzéby, J.P., 2004 : Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacdico.net> (Consulté le 22 février 2013)

Fairbrother J.M. and Nadeau E., 2010. Colibacillosis. In *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*. Lefèvre PC, Blancou J, Chermette R, Uilenberg G, eds. Lavoisier. Vol. 2, Chapter 74: 917-945.

Fernandes, J.B.C., Zanardo, L.G., Galvão, N.N., Carvalho, I.A., Nero, L.A., Moreira, M.A.S., 2011. *Escherichia coli* from clinical mastitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 1146 –1152.

Ghanbarpour, R., Oswald, E., 2010. Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. *Res. Vet. Sci.* 88, 6–10.

Giguère S., 2006. Tetracyclines and Glycylcyclines, in: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, S. Giguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Baggot, R.D. Walker and P.M. Dowling, ed. Iowa State University Press, Ames: Blackwell, 231-240.

Girardeau, J.P., Bertin, Y., Martin, C., Der Vartanian, M., Boeuf, C., 1991. Sequence analysis of the *clpG* gene, which codes for surface antigen CS31A subunit: evidence of an evolutionary relationship between CS31A, K88, and F41 subunit genes. *J. Bacteriol.* 173, 7673–7683.

Girardeau, J.P., Lalioui, L., Said, A.M.O., De Champs, C., Le Bouguéneq, C., 2003. Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the *afa-8* operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.* 41, 218–226.

Gyles, C.L., Fairbrother, J.M., 2008. *Escherichia Coli*, in: Gyles, Carlton L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. (Eds.), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Blackwell Publishing, pp. 193–223.

Gyles, C.L., Fairbrother, J.M., 2010. *Escherichia Coli*, in: Gyles, Carlton L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. (Eds.), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Blackwell Publishing, pp. 267-308.

Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., Hogeveen, H., 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q* 29, 18–31.

Harel, J., Daigle, F., Maiti, S., Désautels, C., Labigne, A., Fairbrother, J.M., 1991. Occurrence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS Microbiology Letters* 82, 177–182.

Harel, J., Lapointe, H., Fallara, A., Lortie, L.A., Bigras-Poulin, M., Larivière, S., Fairbrother, J.M., 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 29, 745–752.

Hilali, F., Ruimy, R., Saulnier, P., Barnabé, C., Lebouguéne, C., Tibayrenc, M., Andremont, A., 2000. Prevalence of virulence genes and clonality in *Escherichia coli* strains that cause bacteremia in cancer patients. *Infect. Immun.* 68, 3983–3989.

Hill A. W., 1994. *Escherichia coli* mastitis. In Carlton L. Gyles, ed. *Escherichia coli* in domestic animals and humans, CAB International, p.117-134.

Hill, A.W., Shears, A.L., 1979. Recurrent coliform mastitis in the dairy cow. *Vet. Rec.* 105, 299–301.

Hill, A.W., Shears, A.L., Hibbitt, K.G., 1978. The elimination of serum-resistant *Escherichia coli* from experimentally infected single mammary glands of healthy cows. *Res. Vet. Sci.* 25, 89–93.

Hill, A.W., Shears, A.L., Hibbitt, K.G., 1979a. The pathogenesis of experimental *Escherichia coli* mastitis in newly calved dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 26, 97–101.

Hill, A.W., Shears, A.L., Hibbitt, K.G., 1979. The survival of serum resistant *Escherichia coli* in the bovine mammary gland following experimental infection. *Res. Vet. Sci.* 26, 32–37.

Hintze, J. 2001, Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA

Hoeben, D., Burvenich, C., Trevisi, E., Bertonni, G., Hamann, J., Bruckmaier, R.M., Blum, J.W., 2000. Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *J. Dairy Res.* 67, 503–514.

Hogan, J., Larry Smith, K., 2003. Coliform mastitis. *Vet. Res.* 34, 507–519.

Hogan, J.S., Smith, K.L., Hoblet, K.H., Schoenberger, P.S., Todhunter, D.A., Hueston, W.D., Pritchard, D.E., Bowman, G.L., Heider, L.E., Brockett, B.L., 1989. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J. Dairy Sci.* 72, 1547–1556.

Janßen, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H.-C., Wieler, L.H., 2001. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology* 291, 371–378.

Johnson, J.R., Russo, T.A., 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad E coli”. *J. Lab. Clin. Med.* 139, 155–162.

Johnson, T.J., Siek, K.E., Johnson, S.J., Nolan, L.K., 2006. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 188, 745–758.

Johnson, T.J., Wannemuehler, Y.M., Nolan, L.K., 2008. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2360–2369.

Kaipainen, T., Pohjanvirta, T., Shpigel, N.Y., Shwimmer, A., Pyörälä, S., Pelkonen, S., 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet. Microbiol* 85, 37–46.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.

Karch, H., Schubert, S., Zhang, D., Zhang, W., Schmidt, H., Olschläger, T., Hacker, J., 1999. A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect. Immun.* 67, 5994–6001.

Karmali, M.A., 2005. Use of comparative genomics as a tool to assess the clinical and public health significance of emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes. *Meat Sci.* 71, 62–71.

Koort, J.M.K., Lukinmaa, S., Rantala, M., Unkila, E., Siitonen, A., 2002. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3497–3498.

Kremer, W.D., Noordhuizen-Stassen, E.N., Lohuis, J.A., 1990. Host defence and bovine coliform mastitis. Host defence mechanisms and characteristics of coliform bacteria in coliform mastitis in bovine: a review. *Vet Q* 12, 103–113.

Lam, T.J., Lipman, L.J., Schukken, Y.H., Gaastra, W., Brand, A., 1996. Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *Am. J. Vet. Res.* 57, 39–42.

Le Bouguéneq, C., Bertin, Y., 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet. Res.* 30, 317–342.

Lehtolainen, T., Pohjanvirta, T., Pyörälä, S., Pelkonen, S., 2003. Association Between Virulence Factors and Clinical Course of *Escherichia coli* Mastitis. *Acta Vet Scand* 44, 203–205.

Lehtolainen, T., Shwimmer, A., Shpigel, N.Y., Honkanen-Buzalski, T., Pyörälä, S., 2003. In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. *J. Dairy Sci.* 86, 3927–3932.

Lipman, L.J., de Nijs, A., Lam, T.J., Gaastra, W., 1995. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. *Vet. Microbiol.* 43, 13–19.

Morin, D.E., 2009. Mammary gland health and disorders, in: Smith B.P., Large animal internal medicine 4th ed., St Louis, Mo: Mosby Elsevier. Chapter 36: 1112-1143

National Cohort of Dairy Farms (NCDF). 2009 ; National Cohort of Dairy Farms reference manual. Accessed November 24th, 2011. <http://www.mastitisnetwork.org>

Nemeth, J., Muckle, C.A., Gyles, C.L., 1994. In vitro comparison of bovine mastitis and fecal *Escherichia coli* isolates. *Vet. Microbiol.* 40, 231–238.

Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Kelton, D.F., Scholl, D.T., 2008. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 91, 1366–1377.

Oswald, E., Pohl, P., Jacquemin, E., Lintermans, P., Van Muylem, K., O'Brien, A.D., Mainil, J., 1994. Specific DNA probes to detect *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotising factor type 1 or type 2. *J. Med. Microbiol.* 40, 428–434.

Pfaff-McDonough, S.J., Horne, S.M., Giddings, C.W., Ebert, J.O., Doetkott, C., Smith, M.H., Nolan, L.K., 2000. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis.* 44, 23–33.

Pohl, P., Mainil, J., 1995. F17 positive *Escherichia coli*. *Vet. Rec.* 137, 623–624.

Pohl, P., Oswald, E., Van Muylem, K., Jacquemin, E., Lintermans, P., Mainil, J., 1993. *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Vet. Res.* 24, 311–315.

Pramoonjago, P., Kaneko, M., Kinoshita, T., Ohtsubo, E., Takeda, J., Hong, K.S., Inagi, R., Inoue, K., 1992. Role of TraT protein, an anticomplementary protein

produced in *Escherichia coli* by R100 factor, in serum resistance. J. Immunol. 148, 827–836.

Prescott, J.F., 2006a. Beta-lactam Antibiotics: Penam Penicillins, in: Antimicrobial therapy in veterinary medicine, S. Giguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Baggot, R.D. Walker and P.M. Dowling, ed. Iowa State University Press, Ames: Blackwell, 121-137.

Prescott, J.F. 2006b. Beta-lactam Antibiotics: Cephalosporins, in: Antimicrobial therapy in veterinary medicine, S. Giguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Baggot, R.D. Walker and P.M. Dowling, ed. Iowa State University Press, Ames: Blackwell, 139-157.

Rainard, P., 2003. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. Vet. Res. 34, 647–670.

Reyher, K.K., Dufour, S., Barkema, H.W., Des Côteaux, L., Devries, T.J., Dohoo, I.R., Keefe, G.P., Roy, J.-P., Scholl, D.T., 2011. The National Cohort of Dairy Farms--a data collection platform for mastitis research in Canada. J. Dairy Sci. 94, 1616–1626.

Ricotta.C, 2005. Through the jungle of biological diversity. Acta. Biotheor. 2005 53(1): 29-38

Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K., 2005. Characterizing the APEC pathotype. Vet. Res. 36, 241–256

Saini, V., McClure, J.T., Léger, D., Dufour, S., Sheldon, A.G., Scholl, D.T., Barkema, H.W., 2012a. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 95, 1209–1221.

Saini, V., McClure, J.T., Léger, D., Keefe, G.P., Scholl, D.T., Morck, D.W., Barkema, H.W., 2012b. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 95, 4319–4332.

Sandhu, K.S., Clarke, R.C., Gyles, C.L., 1997. Hemolysin phenotypes and genotypes of eaeA-positive and eaeA-negative bovine verotoxigenic *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412, 295–302.

Schukken, Y.H., Grommers, F.J., Smit, J.A., Vandegeer, D., Brand, A., 1989. Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. *J. Dairy Sci.* 72, 1900–1906.

Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gaastra, W., 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet. Microbiol.* 141, 1–4.

Sears, P.M., McCarthy, K.K., 2003. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19, 93–108, vi.

Shpigel, N.Y., Elazar, S., Rosenshine, I., 2008. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 60–65.

Shuster, D.E., Lee, E.K., Kehrl, M.E., Jr, 1996. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1569–1575.

Smith, K.L., Todhunter, D.A., Schoenberger, P.S., 1985. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. *J. Dairy Sci.* 68, 402–417.

Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Lewis, M.J., Nguyen, L.T., Headrick, S.I., Schukken, Y.H., Oliver, S.P., 2007. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Vet. Microbiol.* 124, 319–328.

Suojala, L., Pohjanvirta, T., Simojoki, H., Myllyniemi, A.-L., Pitkälä, A., Pelkonen, S., Pyörälä, S., 2011. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 147, 383–388.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.

Thariath, A., Socha, D., Valvano, M.A., Viswanatha, T., 1993. Construction and biochemical characterization of recombinant cytoplasmic forms of the IucD protein (lysine:N6-hydroxylase) encoded by the pColV-K30 aerobactin gene cluster. *J. Bacteriol.* 175, 589–596.

Toma, C., Higa, N., Iyoda, S., Rivas, M., Iwanaga, M., 2006. The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. *Res. Microbiol.* 157, 153–161.

Veilleux, S., Dubreuil, J.D., 2006. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. *Vet. Res.* 37, 3–13.

Wagner, S. & Erskine, R., 2006., Antimicrobial Drug use in Bovine Mastitis, in: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, S. Giguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Baggot, R.D. Walker and P.M. Dowling, ed. Iowa State University Press, Ames: Blackwell, 507-517.

Walker, R.D. & Dowling, P.M., 2006. Fluoroquinolones, in: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, S. Giguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Baggot, R.D. Walker and P.M. Dowling, ed. Iowa State University Press, Ames: Blackwell, 263-284.

Wenz, J R, Barrington, G.M., Garry, F.B., Ellis, R.P., Magnuson, R.J., 2006. *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J. Dairy Sci* 89, 3408–3412.

Wenz, J.R., Barrington, G.M., Garry, F.B., McSweeney, K.D., Dinsmore, R.P., Goodell, G., Callan, R.J., 2001. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 976–981.

Wenz, John R, Garry, F.B., Barrington, G.M., 2006. Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229, 259–262.

White, L.J., Schukken, Y.H., Dogan, B., Green, L., Döpfer, D., Chappell, M.J., Medley, G.F., 2010. Modelling the dynamics of intramammary *E. coli* infections in dairy cows: understanding mechanisms that distinguish transient from persistent infections. *Vet. Res.* 41, 13.

Wiles, T.J., Kulesus, R.R., Mulvey, M.A., 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* 85, 11–19.

Wilesmith, J.W., Francis, P.G., Wilson, C.D., 1986. Incidence of clinical mastitis in a cohort of British dairy herds. *Vet. Rec.* 118, 199–204.

Woodward, M.J., Carroll, P.J., Wray, C., 1992. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 31, 251–261.

Ye, C., Xu, J., 2001. Prevalence of iron transport gene on pathogenicity-associated island of uropathogenic *Escherichia coli* in *E. coli* O157:H7 containing Shiga toxin gene. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2300–2305.

Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, S., Katholm, J., Schukken, Y.H., 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16, 357–372.

